



UNIVERSIDAD
POLITECNICA
DE VALENCIA

Departamento de Biotecnología



Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (UPV-CSIC)

Bases moleculares de la síntesis de termoespermina y sus implicaciones en el desarrollo vascular de *Arabidopsis thaliana*

Trabajo presentado por Francisco Vera Sirera para optar al grado de Doctor en Biotecnología por la Universidad Politécnica de Valencia. Dirigido por Miguel Ángel Blázquez Rodríguez y Juan Carbonell Gisbert.

Valencia, marzo de 2011

El Dr. Miguel Ángel Blázquez Rodríguez, Investigador Científico del CSIC, y el Dr. Juan Carbonell Gisbert, Profesor de Investigación del CSIC, ambos pertenecientes al Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (IBMCP, UPV-CSIC) de Valencia

CERTIFICAN que el Licenciado en Ingeniería Agronómica FRANCISCO VERA SIRERA ha realizado bajo su dirección en el Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas el trabajo que lleva por título “Bases moleculares de la síntesis de termoespermina y sus implicaciones en el desarrollo vascular de *Arabidopsis thaliana*”, y autorizan su presentación para optar al grado de Doctor.

Y para que así conste, expiden y firman el presente certificado en Valencia, a 7 de marzo de 2011.

Dr. Miguel Ángel
Blázquez Rodríguez

Dr. Juan
Carbonell Gisbert

El éxito es aprender a ir de fracaso en fracaso sin desesperarse.

Winston Churchill

El hecho de escribir los agradecimientos de mi tesis ha resultado una tarea mucho más difícil de lo que me esperaba; en primer lugar, por el pánico a olvidarme de alguien, algo que sin duda haré, por lo que pido al lector que no encuentre su nombre entre estas líneas que por favor no sea muy duro conmigo, en segundo lugar, por el miedo a no saber expresar la gratitud que cada uno de los aquí citados merece, nunca se me ha dado bien traducir en letras los pensamientos que surgen por mi mente; y en tercer lugar, porque estas son las últimas líneas que escribo de esta tesis, y estoy deseando acabar ya con una guinda que, quería que fuese perfecta y que por fin he comprendido que no lo será. Así pues quisiera dar las gracias a:

- a Miguel, por haberme dado la oportunidad de realizar esta tesis, y por haberme ayudado a ver la luz cuando yo solo veía oscuridad. A Juan, por haber creído en mí, más que yo mismo. A Eugenio por haberme enseñado prácticamente todo lo que sé del laboratorio. Sin vuestro triunvirato esta tesis no habría sido posible.

- a todos los miembros pasados y presentes del L20, luego llamado 3.07 y por último 2.07. A los Marta, Leo, David, Laura, Loli, Javi, Berta, Isabella, Andries, Jon Anders, Vero, Antonella, Espe, Nora, Iva, Juan Camilo y Mou; muchas gracias, habéis sido unos compañeros maravillosos.

- a todos aquellos miembros pertenecientes a esa categoría indefinida e indefinible llamada “4labos”: Toni, Begoña, Cristina Martí, Cristina Úrbez, Carlos, José Luis, Miguel Ángel Pérez, María Jesús, Dolo, Clara, Carol, Yolanda, Eavan, Pablo, Raquel, Leandro, Sophie, Diego, Hugo, Asun, Sara, Paco Timoner, Lucas, Silvia, Vicente, Teresa, MD, Sonia, Amparo, Clara Fuster, Raquel, Carolina, Álex, José Manuel, Patricia, Paloma y alguno más que me olvidaré. No puedo cerrar este grupo sin citar a María Ángeles, la cual merecería todos mis elogios, pero de la que solo diré que es un ejemplo a seguir por mí y todos los demás. .

- a las que fueron nuestras vecinas de poyata durante los inicios del L20 “las chicas de Carmen”, Pachi, Aurora, Pili, Sandra, Olga, y Leti.

- al resto de miembros de los laboratorios y servicios del IBMCP.
- a aquellos que me han abierto sus laboratorios durante mis épocas de exilio voluntario, a Alberto Marina y toda la gente del Instituto de Biomedicina de Valencia (Patricia, Ana, Pepe, Isa, Marisa, Celso y Rebeca). y a Hannele Tuominen y los compañeros del Umeå Plant Science Center (Luis y Edouard).
- a todos aquellos laboratorios externos al IBMCP que nos han prestado materiales o servicios de los que nosotros no disponíamos como el Servicio de Cartografía Génica de la Universidad Miguel Hernández de Elche, la Dra. Birgit Dräger, el Dr. François Parcy y el Dr. Keijiro Samejima.
- a Pedro y Emilio, esos dos científicos manchegos, compañeros de compras en Mercadona, limpiezas de baños y demás aventuras que surgen al compartir piso.
- a toda mi familia, tanto la de Elda con todos mis tíos y primos, como a mi nueva familia oreana, y especialmente a Antonio y Mónica, por haberme acogido como a uno más.
- a Mónica y Javi, porque sé que siempre estarán ahí cuando los necesite.
- a mi hermana Beatriz, porque aunque parezca imposible es la persona más parecida a mi del mundo.
- a mi abuelos Carmen y Santiago.
- a mis padres, Paco e Isabel, por haberme hecho lo que soy.
- a Aurora, por haber decidido compartir las alegrías y las miserias de esta vida conmigo.

Dedicado a mi abuela Carmen, por todo lo pasado, jamás podré olvidarte; y dedicado mi hijo, por todo lo futuro, espero que nunca me olvides.

RESÚMENES

Las poliaminas son pequeñas moléculas orgánicas policatiónicas presentes en todos los seres vivos. En las plantas regulan diversos procesos de desarrollo, como la floración, el crecimiento del tallo, la fructificación y la senescencia. La termoespermina es una tetraamina exclusiva de las plantas y procariotas cuya deficiencia, por la mutación del único gen responsable de su síntesis, *ACL5*, provoca un fenotipo enano en *Arabidopsis thaliana*, acompañado de graves defectos en la diferenciación de las células del metaxilema y una severa alteración en el patrón de formación de pared secundaria de los vasos.

Las aminopropil transferasas catalizan la síntesis de tri- y tetraaminas mediante la incorporación de un grupo aminopropilo a una di- o triamina, respectivamente. Estas aminopropil transferasas presentan un alto grado de similitud de secuencia entre sí, compartido además con las putrescina-N-metiltransferasas, otro grupo de enzimas presentes exclusivamente en las solanáceas. Estudios filogenéticos han mostrado que las aminopropil transferasas y las putrescina-N-metil transferasas están emparentadas evolutivamente.

Los objetivos que nos planteamos en esta tesis fueron:

- establecer el mecanismo por el que la termoespermina controla la correcta formación del xilema; y
- determinar las diferencias estructurales entre las diversas aminopropil transferasas y putrescina-N-metiltransferasas, responsables de su especificidad.

El primer objetivo lo abordamos mediante la búsqueda de supresores extragénicos de *acl5*. De los 40 supresores dominantes aislados, 11 de ellos presentan mutaciones en la región 5'-UTR de tres genes *bHLH*, a los que denominamos *AJAX*. Las mutaciones se localizan en una secuencia que codifica un pequeño péptido cuyo papel es reprimir la traducción de la ORF principal. Nuestros estudios *in vitro* indican que la supresión se consigue interfiriendo con la síntesis o la actividad de dicho pequeño péptido y permitiendo la síntesis de las proteínas *AJAX*. El papel de estos factores de transcripción en la regulación de la expresión génica durante el desarrollo del xilema solapa en parte con el de la termoespermina, pero no completamente, según indican los análisis transcriptómicos efectuados en plantas superproductoras de *AJAX2*.

El segundo objetivo se abordó mediante la comparación de los centros activos de las aminopropil transferasas y las putrescina-N-metil transferasas, y la identificación de aminoácidos potencialmente clave para sus actividades diferenciales. Se produjeron las correspondientes aminopropil transferasas recombinantes de *Arabidopsis* en sus versiones nativa y con los residuos clave mutados como en una putrescina-N-metil transferasa, y se compararon los parámetros cinéticos de ambas versiones. En ninguno de los casos fue posible convertir una actividad específica en otra, pero se confirmó la importancia de dichos residuos para la actividad enzimática.

Polyamines are small polycationic organic molecules present in all living beings. They regulate plant development processes such as flowering time, stem elongation, early fruit development, and senescence. Thermospermine is a tetraamine, unique to plants and prokaryotes, whose deficiency in *Arabidopsis thaliana* –caused by a knockout mutation in the single thermospermine synthase gene, *ACL5*– provokes a dwarf phenotype, as well as severe defects in the metaxylem differentiation, and an altered deposition of cell-wall material in these vessels.

Aminopropyl transferases catalyze the synthesis of tri- and tetraamine, by adding an aminopropyl group to a di- or triamine, respectively. They show a high sequence similarity to each other, shared also with putrescine-N-methyltransferases, another group of enzymes characteristic of Solanaceae. Phylogenetic studies have shown that aminopropyl transferases and putrescine-N-methyltransferases are evolutionarily related.

The goals that we considered in this thesis were:

- to establish the mechanism by which thermospermine controls xylem differentiation; and
- to determine the structural differences between the various aminopropyl- and N-methyltransferases that underlie their specificity.

The first goal was approached by a search for extragenic suppressors of *acl5*. We identified 40 suppressors, 11 of which present mutation in the 5'-UTR of three bHLH genes named *AJAX*. These mutations are located in a sequence that encodes a small peptide whose role is to repress the translation of the main ORF. Our *in vitro* studies reveal that the suppression is achieved by interfering with the synthesis or activity of this small peptide, therefore allowing the synthesis of *AJAX* proteins. The role of these transcription factors in the regulation of gene expression during xylem development partially overlaps with that of thermospermine, although not completely, as indicated by transcriptomic analyses of *AJAX2* overexpressing plants.

The second objective was approached by the comparison between active centers of aminopropyl transferases and putrescine-N-methyltransferases, and subsequent identification of aminoacids with a potential key role in the establishment of differential activity. The corresponding aminopropyl transferases from *Arabidopsis* were produced in their native version and with the key residues mutated as in putrescine-N-methyltransferases, and their kinetic parameters were determined. In none of the cases we observed conversion of one specific activity into another, but we confirmed the importance of those residues for a normal level of enzyme activity.

Les poliamines són petites molècules orgàniques policatiòniques presents en tots els éssers vius. En les plantes regulen diversos processos de desenvolupament, com la floració, el creixement de la tija, la fructificació i la senescència. La termoespermina és una tetraamina, exclusiva de les plantes i procarïotes, la deficiència de la qual per la mutació de l'únic gen responsable de la síntesi, *ACL5*, provoca un fenotip nan en *Arabidopsis thaliana*, acompanyat de greus defectes en la diferenciació del metaxilema i una severa alteració en el patró de formació de paret secundària dels vasos.

Les aminopropil transferases catalitzen la síntesi de tri- i tetraamines, mitjançant la incorporació d'un grup aminopropil a una di- o triamina, respectivament. Aquestes aminopropil transferases presenten un alt grau de similitud de seqüència entre si, compartit a més amb les putrescina-N-metil transferases, un altre grup d'enzims presents exclusivament en les solanàcies. Estudis filogenètics han mostrat que les aminopropil transferases i les putrescina-N-metil transferases estan emparentades evolutivament.

Els objectius que ens plantejem en aquesta tesi van ser:

- establir el mecanisme pel qual la termoespermina controla la formació correcta del xilema, i
- determinar les diferències estructurals entre les diverses aminopropil transferases y putrescina-N-metil transferases responsables de las seua especificitat.

El primer objectiu l'abordarem mitjançant la recerca de supressors extragenics de *acl5*. Dels 40 supressors dominants aïllats, 11 d'ells presenten mutacions en la regió 5' UTR de tres gens *bHLH*, els quals denominem *AJAX*. Les mutacions es localitzen en una seqüència que codifica un petit pèptid el paper del qual és reprimir la traducció de l' ORF principal. Els nostres estudis *in vitro* indiquen que la supressió s'aconsegueix interferint amb la síntesi o l'activitat del dit petit pèptid i permetent la síntesi de les proteïnes *AJAX*. El paper d'aquests factors de transcripció en la regulació de l'expressió gènica durant el desenvolupament del xilema solapa en part amb el de la termoespermina, però no completament, segons indiquen les anàlisis transcriptòmics efectuats en plantes superproductores d'*AJAX2*.

El segon objectiu es va abordar per mitja de la comparació dels centres actius de les aminopropil transferases i les putrescina-N-metil transferases, i la identificació d'aminoàcids potencialment clau per a les seues activitats diferencials. Es van produir les corresponents aminopropil transferases recombinants d'*Arabidopsis* en les seues versions nadiues i amb els residus clau mutats com en una putrescina-N-metil transferasa, i es van comparar els paràmetres cinètics d'ambdues versions. En cap dels casos va ser possible convertir una activitat específica en una altra, però es va confirmar la importància de aquests residus per a l'activitat enzimàtica.

ABREVIATURAS

<i>A. thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
<i>A. tumefaciens</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
ABA	ácido abscísico
AdoMet	S-adenosilmetionina
AdoMetdc	S-adenosilmetionina descarboxilada
aRNA	aminoalil-RNA
ATP	adenosín trifosfato
BAC	cromosoma artificial bacteriano
BEHPA	bis (2-etilhexil) fosfato
<i>C. reinhardtii</i>	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>
CAPS	secuencia polimórfica de restricción amplificada
cDNA	DNA complementario
CDS	secuencia codificante
cm	centímetro
Col-0	Columbia 0
CTP	citidina trifosfato
Cy3	Cianina 3
Cy5	Cianina 5
<i>D. stramonium</i>	<i>Datura stramonium</i>
dCAPS	secuencia polimórfica de restricción derivada y amplificada
DMSO	dimetil sulfóxido
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EMS	metanosulfonato de etilo
eV	electronvoltio
g	gravedad
GC	cromatografía de gases
GC-MS	cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas
GFP	proteína verde fluorescente
GTP	guanosín trifosfato
h	hora
HEPES	ácido N-2-Hidroxietilpiperacina-N'-2'-Etanosulfónico
HFBA	ácido hepta-flúor- <i>n</i> -butírico
HPLC	cromatografía líquida de alta eficacia
IAA	ácido indol acético
IPTG	isopropil- β -D-1-tiogalactopiranósido
kb	kilobase
La-0	Landsberg 0
La- <i>er</i>	Landsberg erecta
LB	medio de cultivo Luria-Bertani
m	metro

M	molar
Mb	megabase
min	minuto
mJ	milijulios
ml	mililitro
mm	milímetro
mM	milimolar
MS	medio de cultivo Murashige & Skoog
MTA	5'-metiltioadenosina
ng	nanogramo
nm	nanómetro
OD	densidad óptica
ORF	open reading frame (marco abierto de lectura)
<i>P. patens</i>	<i>Physcomitrella patens</i>
p/v	ratio peso/volumen
pb	pares de bases
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
pg	picogramo
pM	picomol
PMT	putrescina-N-metil transferasa
Put	putrescina
qRT-PCR	reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real
mRNA	RNA mensajero
tRNA	RNA de transferencia
rpm	revoluciones por minuto
s	segundo
SDS	dodecilsulfato sódico
Spd	espermidina
SPDS	espermidina sintasa
Spm	espermina
SPMS	espermina sintasa
SSC	cloruro sódico + citrato sódico
<i>T. maritima</i>	<i>Thermotoga maritima</i>
TLC	cromatografía en capa fina
T _m	temperatura de semihibridación
tSpm	termoespermina
tSPMS	termoespermina sintasa
uORF	upstream open reading frame (marco abierto de lectura aguas arriba)
UTP	uridina trifosfato
UTR	untranslated region (región no traducible)

V	voltio
v/v	ratio volumen/volumen
X-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido
μ g	microgramo
μ l	microlitro
μ m	micrómetro
<i>Z. elegans</i>	<i>Zinnia elegans</i>

ÍNDICE

I. Introducción.....	1
1. Biosíntesis de poliaminas.....	4
2. Las aminopropil transferasas.....	6
3. Función y modo de acción de las poliaminas.....	7
4. El xilema. Desarrollo vascular y poliaminas.....	10
II. Objetivos.....	15
III. Resultados.....	19
A. Modo de acción de la termoespermina en el desarrollo de <i>Arabidopsis thaliana</i>	21
1. Actividad bioquímica de ACL5.....	24
1.1. ACL5: ¿espermina o termoespermina sintasa?.....	24
1.2. Determinación de termoespermina en <i>Arabidopsis thaliana</i>	25
2. Moduladores genéticos de la acción de <i>ACL5</i>	29
2.1. Variación fenotípica natural del mutante <i>acl5</i>	29
2.2. Caracterización genómica del alelo <i>acl5-4</i>	32
2.3. Búsqueda de supresores del mutante <i>acl5-4</i>	34
2.4. Caracterización fenotípica de los supresores dominantes de <i>acl5-4</i>	35
2.5. Clonación posicional de <i>AJAX1</i> y <i>AJAX2</i>	43
2.6. Caracterización molecular de los genes <i>AJAX</i>	48
3. Análisis funcional de los genes <i>AJAX</i> en el desarrollo vascular.....	52
3.1. Superproducción de bHLH en los mutantes <i>ajax</i>	52
3.2. Relación funcional entre <i>ACL5</i> y los genes <i>AJAX</i>	55
B. Ingeniería enzimática de las aminopropil transferasas de plantas.....	67

1. Purificación de las enzimas SPDS, tSPMS y PMT.....	70
2. Características cinéticas de SPDS, tSPMS y PMT.....	71
3. Modificación del centro activo de SPDS y tSPMS.....	75
IV. Discusión.....	83
1. ACL5, AJAX y desarrollo vascular: ¿una ruta única o dos vías paralelas?	85
2. Las poliaminas y el control traduccional de <i>AJAX</i>	88
3. Los genes <i>AJAX</i> y el origen del xilema.....	93
4. Mecanismos bioquímicos de las aminopropil transferasas....	98
V. Conclusiones.....	105
VI. Materiales y métodos.....	109
1. Características y manejo del material biológico.....	111
1.1. Material vegetal.....	111
1.1.1. Esterilizado y preparación de las semillas.....	111
1.1.2. Mutagénesis de semillas de <i>Arabidopsis thaliana</i>	112
1.1.3. Transformación de <i>Arabidopsis thaliana</i>	112
1.1.4. Maceración y cuantificación de elementos del xilema.....	113
1.1.5. Microscopía.....	113
1.2. Cepas bacterianas.....	113
1.2.1. Transformación de bacterias.....	114
2. Técnicas de bioquímica.....	115
2.1. Extracción, identificación y cuantificación de poliaminas por GC-MS.....	115
2.2. Extracción, identificación y cuantificación de poliaminas por HPLC.....	116
2.3. Purificación de proteínas.....	117
2.3.1. Inducción de proteínas.....	117
2.3.2. Purificación de proteínas.....	117

2.4. Ensayos enzimáticos.....	117
3. Técnicas de biología molecular.....	119
3.1. Extracción de ácidos nucleicos.....	119
3.1.1. Extracción de RNA.....	119
3.1.2. Extracción de DNA genómico.....	119
3.1.3. Extracción de DNA plasmídico.....	119
3.2. Generación de construcciones en vectores plasmídicos...	120
3.2.1. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	120
3.2.2. Digestiones.....	120
3.2.3. Purificación de bandas de DNA separadas en geles de agarosa.....	120
3.2.4. Ligaciones.....	120
3.2.5. Mutagénesis dirigidas.....	121
3.3. Construcciones generadas.....	121
3.3.1. Sobre-expresión de <i>AJAX</i> en el mutante <i>acl5</i>	121
3.3.2. Transcripción <i>in vitro</i> de <i>ajax2</i>	122
3.3.3. Purificación de proteínas.....	123
3.4. Genotipados.....	124
3.4.1. Genotipado de la delección del mutante <i>acl5-4</i>	124
3.4.2. Genotipado de mutantes de inserción de T-DNA.....	124
3.5. Cartografiado de las líneas <i>ajx1-4</i> , <i>ajx2-10</i> y <i>ajx2-31</i>	126
3.6. Secuenciación de los alelos supresores de <i>AJAX1</i> , <i>AJAX2</i> , <i>AJAX3</i> y <i>AJAX4</i>	129
3.7. Análisis de expresión de genes.....	130
3.7.1. Obtención de c-DNA.....	130
3.7.2. Análisis qRT-PCR.....	130
3.8. Transcripción-traducción <i>in vitro</i>	131
3.9. Análisis de expresión génica mediante micromatrices...	131
3.9.1. Extracción de RNA total.....	131

3.9.2. Amplificación de RNA.....	131
3.9.3. Marcaje fluorescente del RNA amplificado.....	132
3.9.4. Hibridación de cy-dy-a RNA con las micromatrices..	132
3.9.5. Lavado de las micromatrices.....	133
3.9.6. Escaneo y análisis de las micromatrices.....	133
4. Análisis filogenético y estructural.....	134
4.1. Rastreo y análisis de secuencias.....	134
4.2. Análisis estructural.....	135
VII. Bibliografía.....	137
VIII. Anexos.....	153

INTRODUCCIÓN

Desde el punto de vista biológico, se conoce como poliaminas a un grupo de compuestos alifáticos de bajo peso molecular, caracterizados por la presencia de grupos amino primarios (-NH₂) y posibles grupos amino secundarios (-NH-). Las poliaminas con una presencia más extendida entre los organismos de los distintos reinos son: la putrescina, la espermidina y la espermina (Figura 1). Existen en plantas y bacterias, otras poliaminas menos comunes, como la cadaverina, el diaminopropano o la termoespermina, siendo esta última un isómero de la espermina.

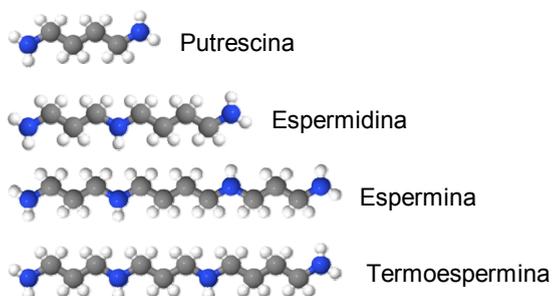


Figura 1. Estructura química de las principales poliaminas de interés biológico. En blanco se representan átomos de hidrogeno, en gris átomos de carbono y en azul átomos de nitrógeno

Aunque todos los seres vivos son capaces de sintetizar alguna poliamina, tanto la proporción relativa de cada una de ellas como la forma en que se presentan son muy variables. Generalmente, la putrescina y la espermidina se encuentran a una concentración más elevada que la espermina. Existe una fracción, normalmente minoritaria, compuesta por las formas libres de poliaminas (Torrighiani *et al.* 1987), mientras que la gran mayoría de ellas se encuentran conjugadas, ya sea a pequeñas moléculas, como ácidos cinámicos e hidroxicinámicos (Martin-Tanguy 1997), o a macromoléculas, como proteínas (Tiburcio *et al.* 1997).

Una de sus características químicas más relevantes, desde el punto de vista biológico, es que, a pH fisiológico, sus grupos amino primarios y secundarios están cargados positivamente, por lo que pueden establecer interacciones electrostáticas con otras moléculas con carga negativa como DNA, RNA, fosfolípidos o algunas proteínas. Además de su carácter policatiónico, la

distribución de estas cargas también representa un factor muy importante, puesto que las cadenas de C entre los grupos amino son relativamente flexibles (Weiger *et al.* 1998; Dalla Via *et al.* 1999), lo cual hace que sean muy versátiles a la hora de interactuar con otras moléculas.

En el mundo vegetal, las poliaminas han sido consideradas como moduladores del crecimiento (Galston 1983) pero, en ningún caso pueden ser consideradas como hormonas vegetales pues, a diferencia de éstas, no tienen ni receptor ni ruta de señalización, no se sintetizan en una zona determinada de la planta sino que son ubicuas y, además, se encuentran a concentraciones celulares muy elevadas, del orden milimolar (Galston y Sawhney 1990).

1. Biosíntesis de poliaminas

La biosíntesis de las poliaminas se inicia con la descarboxilación de la L-ornitina para formar putrescina, una diamina. Esta reacción es catalizada por la ornitina descarboxilasa (ODC). En plantas y algunos procariotas existe una ruta alternativa que se inicia con la descarboxilación de la L-arginina por una arginina descarboxilasa (ADC) para formar agmatina, que es hidrolizada por una agmatina iminohidrolasa (AIH) dando lugar a N-carbamilputrescina que finalmente, es transformada en putrescina por una N-carbamilputrescina amidohidrolasa (CPA) (Figura 2). A su vez la L-ornitina y la L-arginina son convertibles entre sí; la L-ornitina se convierte en L-arginina a través de la vía de la citrulina mientras que, L-arginina se convierte en L-ornitina por la acción de la actividad arginasa.

A partir de la putrescina se produce la siguiente poliamina, la triamina espermidina, mediante la adición de un grupo aminopropilo a uno de los grupos amino. Esta reacción es catalizada por la espermidina sintasa (SPDS), siendo el dador del grupo aminopropilo la S-adenosilmetionina descarboxilada (AdoMetdc) que se forma a partir de la S-adenosilmetionina (AdoMet), siendo esta reacción realizada una S-adenosilmetionina descarboxilasa (SAMDC). Las tetraaminas alifáticas se sintetizan mediante la adición a la espermidina de otro grupo aminopropilo proveniente del AdoMetdc; según se produzca en un extremo u otro de la espermidina, se formarán dos tetraaminas distintas: la

tetraamina simétrica espermina, cuya generación es catalizada por la espermina sintasa (SPMS), o su isómero asimétrico, la termoespermina, catalizada por la termoespermina sintasa (tSMPS).

Además, la putrescina es usada en las plantas solanáceas como precursor de la síntesis de alcaloides, tras ser convertida en N-metilputrescina por la putrescina-N-metil transferasa (PMT), que acopla un grupo metilo del AdoMet a la putrescina.

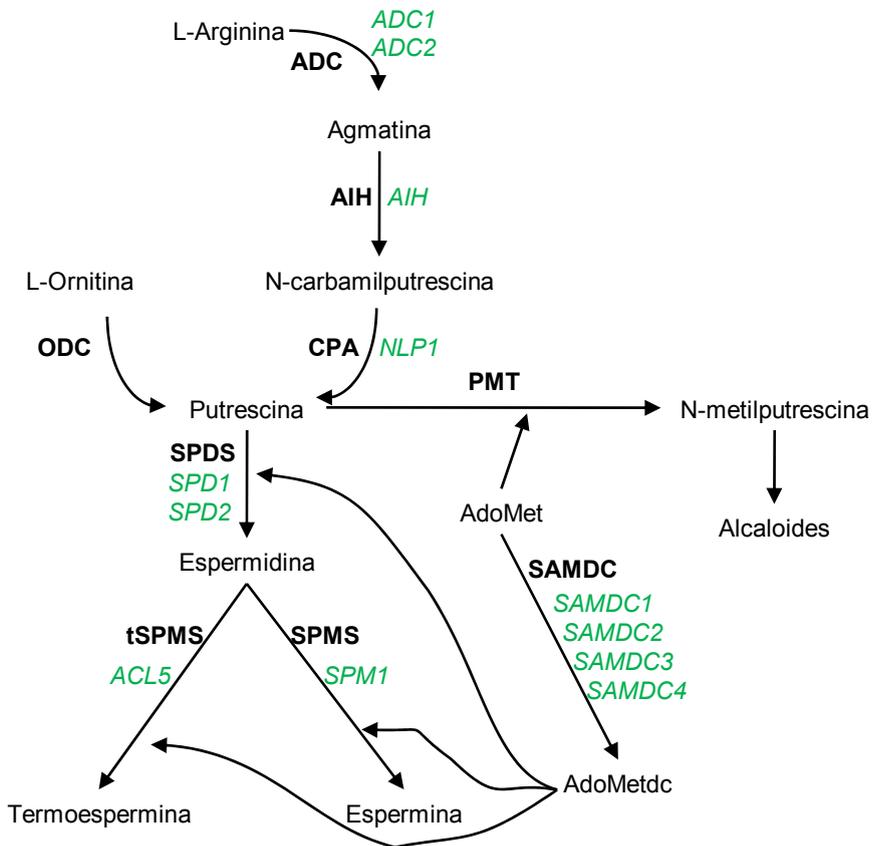


Figura 2. Ruta de biosíntesis de poliaminas. En negrita se marcan las actividades enzimáticas implicadas en cada paso de la síntesis. En verde se destacan los genes identificados en *A. thaliana*, responsables de cada actividad.

En *Arabidopsis thaliana* existe la particularidad de no haberse detectado la actividad ODC (Hanfrey *et al.* 2001) por lo que, la putrescina sólo puede

sintetizarse a través de la actividad ADC. En *A. thaliana* existen 2 genes (*ADC1* y 2) que codifican esta actividad, un gen que codifica la actividad AIH (*AIH*) (Janowitz *et al.* 2003) y otro la CPA (*NLPI*) (Piotrowski *et al.* 2003). También existen dos genes que codifican la actividad SPDS (*SPD1* y 2) (Hashimoto *et al.* 1998) uno para la SPMS (*SPM1*) (Panicot *et al.* 2002) y otro para la tSPMS (*ACL5*) (Knott *et al.* 2007). Por último, la actividad SAMDC es codificada por cuatro genes distintos (*SAMDC1*, 2, 3 y 4) (Franceschetti *et al.* 2001).

2. Las aminopropil transferasas

La síntesis de las triaminas y tetraaminas (espermidina, espermina y termoespermina) es realizada por las aminopropil transferasas, que son aquellas enzimas que usan como sustrato el AdoMetdc para transferir un grupo aminopropilo, formándose 5'-metiltioadenosina como subproducto de la reacción.

La primera aminopropil transferasa con una estructura cristalina resuelta fue la espermidina sintasa de *Thermotoga maritima* (Korolev *et al.* 2002). Además de esta estructura se conocen las de la espermidina sintasa de *Caenorhabditis elegans* (Dufe *et al.* 2005), *Plasmodium falciparum* (Dufe *et al.* 2007), *Helicobacter pylori* (Lu *et al.* 2007), humanos (Wu *et al.* 2007), *Arabidopsis thaliana* (código PDB: 2Q41) y *Trypanosoma cruzi* (código PDB: 3BWC), la termoespermina sintasa de *Thermus thermophilus* (código PDB: 1UIR) y la de la espermina sintasa de humanos (Wu *et al.* 2008). Incluso se ha propuesto un modelo de acción de las espermidina sintasas (Korolev *et al.* 2002; Wu *et al.* 2007). De todos estos trabajos se ha podido concluir que el centro activo de las aminopropil transferasas conocidas contiene una gran cantidad de residuos muy conservados (Hashimoto *et al.* 1998).

Además de las ya citadas, espermidina, espermina y termoespermina, existen algunas otras poliaminas menos comunes presentes en las plantas (Kuehn *et al.* 1990) como la noespermidina y noespermina en *Medicago sativa* (Rodríguez-Garay *et al.* 1989) o como la caldopentamina, homoespermidina y homoespermina en algunas plantas acuáticas (Hamana *et al.* 1998). Todas estas poliaminas poco frecuentes parecen provenir de reacciones, en las que las

aminopropil transferasas se comportan de modo poco específico y transfieren los grupos aminopropilo a sustratos menos comunes. Esta promiscuidad de sustratos de las aminopropil transferasas es muy común en las bacterias; por ejemplo, en *Thermus thermophilus*, el ortólogo de la termoespermina sintasa es capaz de transferir el aminopropilo a la agmatina y a la norespermidina, además de a la espermidina (Ohnuma *et al.* 2005) y, en *Pyrococcus furi* el ortólogo de la espermidina sintasa puede usar como sustratos la agmatina y la cadaverina (Cacciapuoti *et al.* 2007) (Figura 3). La combinación de una elevada similitud de secuencia con una cierta promiscuidad de sustrato sugiere que la especificidad de cada aminopropil transferasa no es perfecta y que, además, debe residir en unos pocos aminoácidos.

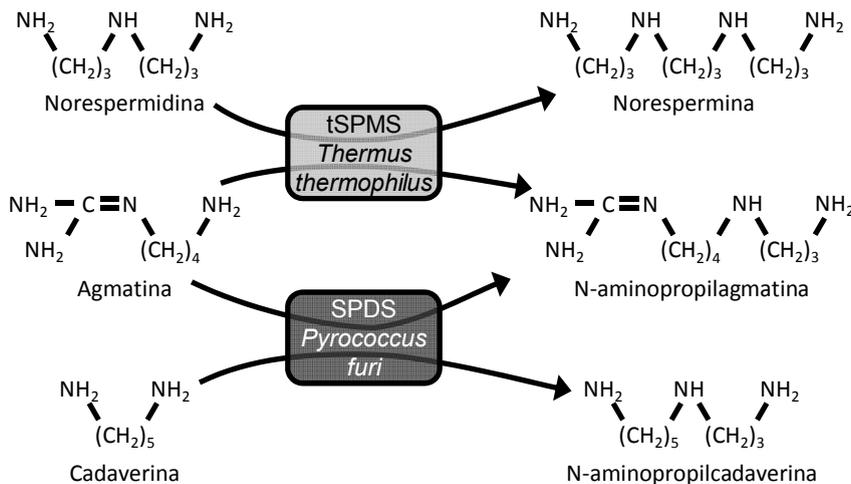


Figura 3. Reacciones de síntesis de poliaminas poco comunes, por parte de aminopropil transferasas con actividad para diversos sustratos.

3. Función y modo de acción de las poliaminas

A nivel celular, las poliaminas han sido relacionadas con el funcionamiento de numerosos procesos bioquímicos, desde la transcripción hasta el transporte de iones a través de la membrana plasmática (Williams 1997). En concreto, se ha propuesto que la espermidina participa en una modificación covalente del factor eIF4A de iniciación de la traducción (Park 2006) y en el ensamblaje de

ribosomas (Vila-Sanjurjo *et al.* 2004), resultando en modificaciones de la actividad transcripcional y traduccional (Childs *et al.* 2003).

Los cambios transcripcionales relacionados con el contenido de poliaminas también podrían deberse a otros mecanismos moleculares descritos, como la modificación de la estructura de B-DNA a Z-DNA (Rich *et al.* 1984) o a cambios conformacionales del RNA (Igarashi y Kashiwagi 2000; Amarantos *et al.* 2002).

Por otra parte, se han observado cambios en la fluidez de las membranas atribuidos a la interacción entre poliaminas y lípidos de la membrana (Roberts *et al.* 1986), lo que sugiere que no todas las acciones de las poliaminas se deben necesariamente a efectos transcripcionales.

Como consecuencia de estas actividades moleculares, las poliaminas afectan a numerosos procesos biológicos, tanto de desarrollo como de tolerancia a situaciones de estrés. Por ejemplo, han sido relacionadas con procesos fundamentales para la vida como el crecimiento y la muerte celular (Thomas y Thomas 2001). En concreto, la levadura presenta un requerimiento absoluto de espermidina para crecer (Hamasaki-Katagiri *et al.* 1997) y esta función esencial, parece responder a un papel ancestral de esta poliamina, puesto que un mutante sin actividad espermidina sintasa de *A. thaliana* es inviable (Imai *et al.* 2004). Otras poliaminas son también necesarias en mayor o menor medida para el correcto crecimiento del organismo, aunque no lleguen a ser esenciales. Así, la falta de espermina en levaduras provoca retrasos en la división celular (Hamasaki-Katagiri *et al.* 1998) y en ratas causa malformaciones en el desarrollo del sistema nervioso (Wang *et al.* 2004) mientras que, la carencia de termoespermina en *A. thaliana* impide el alargamiento de los tallos y el crecimiento general de otros órganos, sin afectar a la viabilidad (Hanzawa *et al.* 1997).

Las poliaminas también pueden modular la muerte celular programada aunque existen datos contradictorios con respecto a si la promueven o la inhiben (Seiler y Raul 2005). Además, las poliaminas son necesarias para la transición entre diferentes fases del ciclo celular (Thomas y Thomas 2001) y de hecho, los

inhibidores de su síntesis se han utilizado para el tratamiento del cáncer (Bachrach 2004).

Dada la gran diversidad de funciones que se han atribuido a las poliaminas en procesos fisiológicos de todos los organismos (Kumar *et al.* 1997; Igarashi y Kashiwagi 2000; Thomas y Thomas 2003), aquí mencionaré explícitamente sólo aquéllos que son relativos al desarrollo vegetal y otros procesos de la vida de las plantas, como por ejemplo:

- la deficiencia de putrescina provoca la formación de una raíz pivotante en tabaco (Ben-Hayyim *et al.* 1994).
- la rotura de la dominancia apical en tabaco está asociada a cambios en el balance entre las distintas poliaminas sin modificar su contenido global (Geuns *et al.* 2001).
- la sobre-expresión del gen *ADC2* en *A. thaliana*, genera plantas con altos niveles de putrescina que son incapaces de elongar los entrenudos del tallo (Alcázar *et al.* 2005).
- los niveles de espermina parecen determinar si el ovario se desarrolla como fruto o entra en un programa de senescencia (Carbonell y Navarro 1989).
- la adición exógena de espermidina promueven la transición floral en *A. thaliana* (Applewhite *et al.* 2000).

Además, las poliaminas también pueden participar en procesos de la respuesta al estrés, como por ejemplo:

- el doble mutante *acl5 spm1* es más sensible al estrés salino (Yamaguchi *et al.* 2006) y al hídrico (Alcázar *et al.* 2006; Yamaguchi *et al.* 2007) y, ambos fenotipos son revertidos por adiciones exógenas de espermina.
- la espermina induce la formación de proteína PR y protege al tabaco contra la infección del virus del mosaico del tabaco (Yamakawa *et al.* 1998).

Además de todos estos ejemplos, existe otro proceso de desarrollo regulado por las poliaminas: el desarrollo del sistema vascular, y más concretamente del xilema.

4. El xilema. Desarrollo vascular y poliaminas

Las células del xilema se desarrollan a partir de las células meristemáticas del cambium y el procambium. El xilema está compuesto por varios tipos celulares aunque los que realmente cumplen la función conductora son las traqueidas y las tráqueas, a las que denominaremos conjuntamente como elementos traqueidales. Estos elementos traqueidales sufren un complejo proceso de desarrollo y diferenciación que incluye la deposición de la pared celular secundaria para soportar las presiones negativas generadas por la transpiración, y un proceso de muerte celular programada para conseguir una célula completamente vacía a modo de conducto (Figura 4).

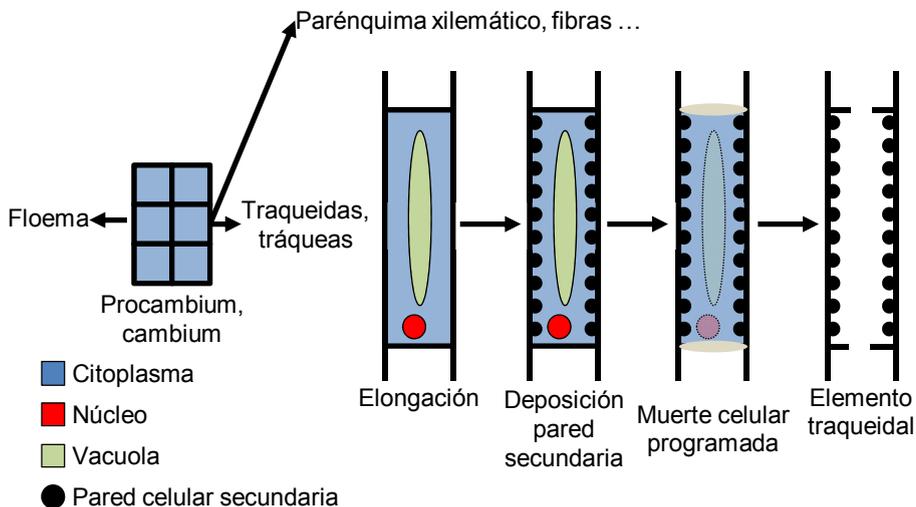


Figura 4. Proceso de diferenciación de los elementos traqueidales. Adaptado de Turner (Turner *et al.* 2007)

Este proceso de diferenciación es controlado por diversas hormonas vegetales (Turner *et al.* 2007). Una de ellas es la auxina, que es capaz de promover, junto con las citoquininas, la diferenciación de células del mesófilo de hoja de *Zinnia*

elegans en elementos traqueidales (Miloni *et al.* 2001). También los brasinoesteroides parecen ser imprescindibles para este proceso, pues la inhibición de su síntesis detiene el proceso de diferenciación en el sistema de *Z. elegans* (Iwasaki y Shibaoka 1991).

Dentro de este proceso de formación de la pared secundaria, la síntesis de lignina es esencial, y requiere la presencia de H₂O₂ (Grant y Loake 2000), que puede provenir de la acción de diversas enzimas del catabolismo de poliaminas que se expresan en los tejidos vasculares (Paschalidis y Roubelakis-Angelakis 2005).

Otra de las pruebas de la relación entre las poliaminas y el desarrollo vascular, es el fenotipo de algunos mutantes de la biosíntesis de poliaminas, como *bud2*, un mutante defectivo en una de las cuatro *SAMDC*, que posee unos haces vasculares de mayor tamaño y un mayor contenido en lignina que los de una planta silvestre (Ge *et al.* 2006). Otro mutante, *acl5*, presenta un fenotipo de sobreproducción de haces vasculares (Hanzawa *et al.* 1997), además de un mayor grosor de sus tráqueas xilemáticas, fenotipo por el cual el mutante *acl5* también fue aislado en otro trabajo independiente y denominado como *thickvein* (Clay y Nelson 2005).

Otros dos resultados relacionan a *ACL5* con el desarrollo del xilema:

- la expresión de *ACL5* es inducida por las auxinas (Hanzawa *et al.* 2000).
- esta expresión está localizada en células del procambium que han iniciado su diferenciación a xilema (Clay y Nelson 2005; Muñoz *et al.* 2008).

Pero la evidencia definitiva de la implicación de *ACL5* en la diferenciación del xilema es la ausencia de algunos tipos celulares xilemáticos en el mutante *acl5*. Durante la fase de crecimiento primario de la planta se desarrollan los elementos traqueidales de tipo protoxilema que, según la ornamentación de su pared, pueden ser de tipo anular o espiral; posteriormente, durante la fase de crecimiento secundario, se producen los de tipo metaxilema que se pueden

clasificar en dos tipos: reticulado o punteado según su ornamentación (Figura 5) (Kubo *et al.* 2005). En *acl5*, la distribución de estos tipos celulares está alterada, ya que carece de células metaxilemáticas de tipo punteado (Muñiz *et al.* 2008). Este dato, unido a que en el mutante *acl5* se produce una sobre-expresión de diversos genes de muerte celular y una incorrecta deposición de los elementos de la pared vegetal, indica que la causa primaria del fenotipo defectivo de *acl5* podría ser la muerte prematura de las células en proceso de diferenciación hacia metaxilema. Efectivamente, la expresión forzada de la toxina A de la difteria exclusivamente en el dominio de expresión de *ACL5*, fenocopia el enanismo de *acl5* (Muñiz *et al.* 2008), lo cual ha permitido atribuir un papel a la termoespermina en el proceso de desarrollo vascular, retrasando la muerte celular y permitiendo que se complete el desarrollo de las células del metaxilema (Muñiz *et al.* 2008).

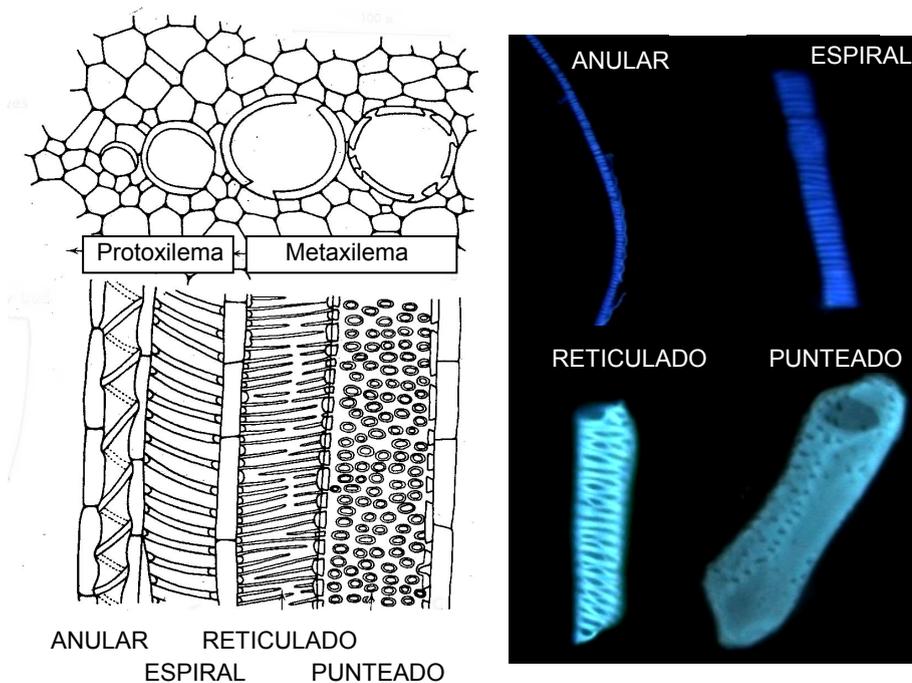


Figura 5. Tipos celulares del xilema. A la izquierda esquema ilustrativo (Esau 1977). A la derecha imágenes al microscopio óptico, bajo iluminación con luz ultravioleta, de elementos vasculares del xilema teñidos con calcofluor.

OBJETIVOS

El conocimiento de las poliaminas presenta una gran laguna en relación con su mecanismo de acción. El hecho de haber encontrado un proceso de desarrollo bien definido, como es la formación del xilema, en cuyo control participa la termoespermina, nos proporciona un modelo de estudio de las bases moleculares de la acción de las poliaminas.

Por otra parte, la alta similitud de secuencia entre las aminopropil transferasas y las putrescina-N-metil transferasas ha permitido establecer que todas ellas provienen de un ancestro común que ha sufrido cambios discretos en el centro activo que han resultado en los cambios de especificidad observados ahora. Este modelo evolutivo nos brinda la posibilidad de intentar modificar de forma dirigida las actividades de estas enzimas.

Los objetivos de este trabajo son dos:

- a) establecer los mecanismos moleculares por los cuales la termoespermina controla la correcta formación del xilema.
- b) encontrar las diferencias estructurales entre las diversas aminopropil transferasas, que les confieren a cada una de ellas su actividad específica.

Para alcanzar cada uno de estos objetivos nos planteamos dos abordajes distintos:

- a) obtención de supresores extragénicos del mutante *acl5* y caracterización de los nuevos mutantes.
- b) comparación estructural de los centros activos de diversas aminopropil transferasas y realización de un proceso de mutagénesis dirigida para modificar sus actividades enzimáticas.

RESULTADOS

MODO DE ACCIÓN DE LA
TERMOESPERMINA EN EL
DESARROLLO DE
Arabidopsis thaliana

Como se ha indicado en la Introducción general, las poliaminas regulan numerosos procesos del desarrollo de las plantas como floración (Havelange *et al.* 1996; Applewhite *et al.* 2000), fructificación (Carbonell y Navarro 1989), respuesta al estrés salino (Alcázar *et al.* 2006; Yamaguchi *et al.* 2006) o respuesta a patógenos (Takahashi *et al.* 2003). Normalmente, la mayoría de estos procesos han sido relacionados con cambios en las concentraciones de las poliaminas más comunes como putrescina, espermidina o espermina, mientras que la termoespermina no ha sido considerada. Aunque había datos previos de la presencia de termoespermina y sus derivados en algunas plantas (Hamana *et al.* 1992; Hamana *et al.* 1998), su relevancia en plantas se ha descubierto muy recientemente, al determinarse que el gen *ACL5* de *A. thaliana* tiene actividad termoespermina sintasa *in vitro* (Knott *et al.* 2007). Así pues, es razonable atribuir a la termoespermina una función en el proceso de elongación del tallo, ya que, el mutante *acl5* presenta alteraciones en este proceso (Kakehi *et al.* 2008) probablemente controlando el proceso de muerte celular de las células que dan origen al xilema (Muñiz *et al.* 2008).

Si se conoce poco sobre los procesos de desarrollo en los que participa la termoespermina en plantas, todavía es menos lo que se conoce sobre cómo puede ser su mecanismo de acción para desencadenar respuestas, y lo poco que podemos inferir es a través de mecanismos de acción conocidos de otras poliaminas. Su naturaleza de moléculas policatiónicas les permite interactuar con moléculas de carga negativa como DNA, RNA, proteínas o membranas plasmáticas (Wallace *et al.* 2003); pero aparte de estos mecanismos de interacción de cargas se sabe que la espermidina es capaz de producir fenómenos de cambios de la pauta de lectura +1 en la traducción (Matsufuji *et al.* 1995), y se cree que puede modificar los niveles de traducción de pequeños péptidos reguladores situados aguas arriba de un gen (Hanfrey *et al.* 2002; Hanfrey *et al.* 2005).

Como la presencia de termoespermina en plantas es un descubrimiento reciente, y conociendo que su deficiencia provoca graves alteraciones en el desarrollo vascular en *A. thaliana*, nos pareció éste un sistema interesante para intentar

dilucidar cuáles son los mecanismos de acción de las poliaminas y, más concretamente, el de la termoespermina.

1. Actividad bioquímica de ACL5

1.1. ACL5: ¿espermina o termoespermina sintasa?

El mutante *acaulis5* (*acl5*) perteneciente a la familia *acaulis* (Tsukaya *et al.* 1993), fue descrito en una búsqueda de plantas con un tallo floral de reducida longitud (Hanzawa *et al.* 1997). La mutación responsable de este fenotipo enano fue identificada por clonación posicional, concluyéndose que el locus de *ACL5* correspondía al gen At5g19530 (Hanzawa *et al.* 2000).

Inicialmente se asignó a *ACL5* una actividad espermina sintasa, basándose en dos observaciones (Hanzawa *et al.* 2000):

- su grado de similitud con otras aminopropil transferasas, especialmente con diversas espermina sintasas.
- la detección mediante HPLC de un pico con un tiempo de retención similar a la espermina, en extractos de un *Escherichia coli* (que *per se* carece de espermina) sobre-expresante de *ACL5*.

La conclusión de que el fenotipo enano de *acl5* podría deberse a una deficiencia total de espermina (Hanzawa *et al.* 2000) quedó invalidada al encontrarse una segunda espermina sintasa, SPM1, en *A. thaliana* (Panicot *et al.* 2002).

Además de la espermina, existen en las plantas otras tetraaminas menos abundantes y también menos estudiadas (Hamana *et al.* 1992; Hamana *et al.* 1998) como por ejemplo, la termoespermina, un isómero de la espermina. El descubrimiento reciente de que *ACL5* tiene actividad termoespermina sintasa *in vitro* (Knott *et al.* 2007) abre la posibilidad que en realidad *ACL5* sea la enzima responsable de sintetizar termoespermina, y no espermina, en plantas.

Los motivos de esta posible asignación errónea de la función de *ACL5* se derivan de la gran similitud entre espermina y termoespermina, y son:

- la secuencia de aminoácidos de los centros activos de espermina y termoespermina sintasas, son muy parecidos, un hecho que sin duda está relacionado con la utilización de los mismos sustratos (espermidina y AdoMetdc) para la síntesis de sus productos correspondientes. Este alto grado de similitud en la secuencia de las proteínas se extiende también a las espermidina sintasas y, de hecho, el gen *SPMI* fue considerado en un primer momento como una espermidina sintasa en *A. thaliana* y denominado como *SPD3* (Hanzawa *et al.* 2002).
- los métodos empleados habitualmente para determinar poliaminas en plantas están basados en una separación cromatográfica por HPLC de poliaminas dansiladas (Flores y Galston 1982), una técnica incapaz de discriminar entre espermina y termoespermina.

Con el fin de certificar *in vivo* la actividad termoespermina sintasa de *ACL5* y de determinar los niveles de termoespermina en extractos de *A. thaliana*, decidimos desarrollar un método que permitiera la separación efectiva de las tetraaminas y su posterior cuantificación.

1.2. Determinación de termoespermina en *Arabidopsis thaliana*

En el momento de acometer este proyecto se conocían únicamente dos técnicas que permitían la separación entre espermina y termoespermina: la Cromatografía de Gases acoplada a un Espectrómetro de Masas (GC-MS) (Hamana *et al.* 1998) y la Cromatografía en Capa Fina (TLC) (Knott *et al.* 2007). Mientras que esta última carecía de carácter cuantitativo, la primera presentaba el inconveniente de requerir una gran cantidad de material de partida (500 g de tejido fresco).

Por estos motivos, nos propusimos como objetivo el desarrollo, en colaboración con el Servicio de Metabolómica del IBMCP, de un método de alta sensibilidad capaz de cuantificar la termoespermina en extractos de *A. thaliana*. Como punto de partida decidimos adaptar un método de determinación de poliaminas utilizado previamente en muestras de zumo de uva (Fernandes y Ferreira 2000),

que combinaba una extracción de par iónico con GC-MS. Empleando una columna BPX35 (30m x 0,32 mm x 0,25 μ m) y analizando los iones 226 y 254 (ver Materiales y Métodos, página 115) conseguimos separar la termoespermina de la espermina, además de identificar también la putrescina y la espermidina (Figura 6).

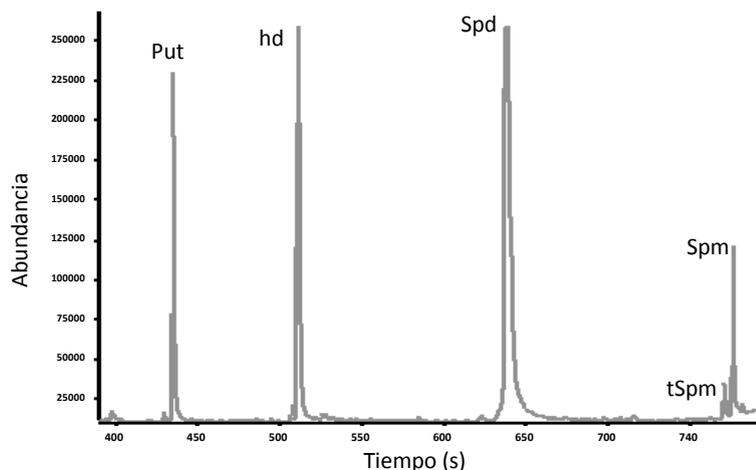


Figura 6. Cromatograma de iones específicos de las poliaminas (relación masa/carga de 226 y 254) de plántulas de *A. thaliana*, Put: putrescina, hd:1,6-diamina-hexano, Spd: espermidina, tSpm: termoespermina, Spm: espermina.

El método resultaba reproducible y presentaba un grado de sensibilidad equivalente al de otros empleados anteriormente, como el de HPLC de poliaminas dansiladas, con la ventaja de poder efectuar la cuantificación a partir de muestras de tamaño muy inferior, en comparación con otros métodos (Rambla *et al.* 2010).

La aplicación de este método en extractos de *A. thaliana* ha permitido por una parte, confirmar que *SPM1* y *ACL5* codifican las únicas actividades que sintetizan espermina y termoespermina respectivamente, y por otra, establecer por primera vez que el contenido de termoespermina en plántulas de *A. thaliana* es alrededor de cinco veces inferior al de espermina (Figura 7). Otros aspectos a destacar en estas cuantificaciones son:

- las trazas de espermina que se detectaron en el mutante *spm1* podrían provenir del medio de cultivo en el que crecieron las plantas, ya que eran del mismo orden que las detectadas directamente en el medio (resultados no mostrados).
- la observación de que el contenido total de termoespermina sea menor que el de espermina en extractos crudos de plántulas enteras, podría enmascarar el hecho de que la concentración local de termoespermina en las pocas células que expresan *ACL5* (Muñiz *et al.* 2008) podría ser mucho mayor.
- el mayor nivel de espermidina en los mutantes respecto al silvestre y, especialmente el de espermina en el mutante *acl5*, podría formar parte de un sistema compensatorio de la planta, como el de retroalimentación negativa de la expresión de *ACL5* (Hanzawa *et al.* 1997).

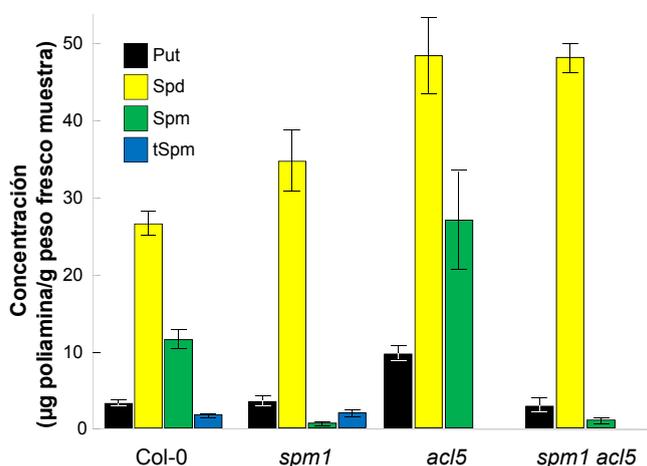


Figura 7. Niveles de poliaminas en los diversos mutantes de biosíntesis de espermina y termoespermina. Las medidas corresponden a plántulas de 14 días crecidas en medio MS. Las barras indican la desviación estándar de 3 muestras independientes

La expresión de los genes de biosíntesis de poliaminas está regulada por diversas hormonas vegetales (Hanzawa *et al.* 2002; Carbonell y Blazquez

2009). En concreto, está descrito que las auxinas inducen la expresión de *ACL5*, así como la de *ADC2* de forma transitoria, mientras que el ácido abscísico (ABA) induce la expresión de *ADC2* y *SPMI*. Para averiguar si esta inducción génica se traduce efectivamente en un aumento de los niveles de poliaminas decidimos cuantificarlas, en plántulas sometidas a tratamientos de 1 y 8 h con ABA o con ácido indolacético (IAA) (Figura 8). Tal y como se esperaba, los tratamientos con ABA indujeron la producción de putrescina, especialmente en las incubaciones más prolongadas. Sin embargo, la inducción de *SPMI* no repercutió en una acumulación de espermina. Esta aparente inconsistencia podría explicarse teniendo en cuenta que SPM1 se ha descrito como uno de los elementos de un complejo multienzimático o metabolón, en el que también participan las espermidina sintasas SPD1 y SPD2 (Panicot *et al.* 2002). En este contexto, es razonable pensar que la inducción de sólo uno de los componentes de este metabolón no sea suficiente para que el producto final se acumule durante los tiempos empleados en el tratamiento. Por otra parte, el tratamiento con IAA produjo el aumento de los niveles de termoespermina y putrescina, en consonancia con las inducciones de *ADC2* y *ACL5*.

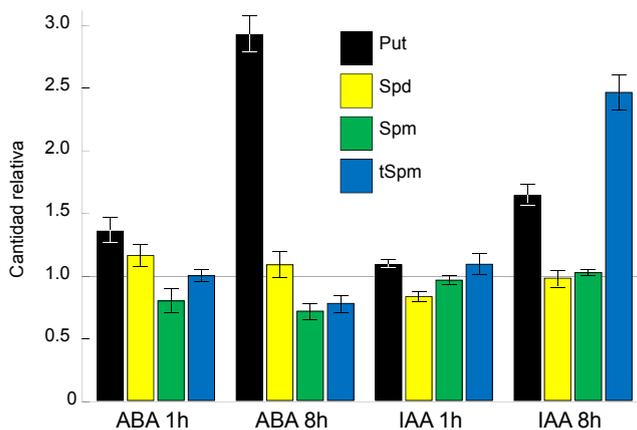


Figura 8. Variación de los niveles de poliaminas en plántulas de 12 días, tratadas con 50 μM de ácido indolacético o ácido abscísico. Los valores representados muestran la variación relativa respecto a una muestra sin tratar. Las concentraciones absolutas (μg de poliamina/g fresco) de las muestras sin tratar son, Put: 2,8, Spd: 56,5, Spm: 10,6, tSpm: 1,4.

2. Moduladores genéticos de la acción de ACL5

El fenotipo enano de *acl5*, hace razonable atribuir a la termoespermina una función en el proceso de elongación del tallo (Kakehi *et al.* 2008). Hasta la fecha no se conocen dianas moleculares para la acción de ACL5 o la termoespermina por lo que, uno de los objetivos principales de nuestro trabajo fue identificar genes que actuaran como mediadores de la regulación del crecimiento del tallo por parte de la termoespermina. Con este fin, entre las distintas estrategias a nuestra disposición decidimos abordar la búsqueda de mutaciones extragénicas que modificasen el fenotipo enano de los mutantes *acl5*. Para ello, nos centramos en dos aproximaciones concretas:

- el examen de la variación fenotípica natural de mutantes *acl5* en distintas variedades de *A. thaliana*.
- el rastreo de supresores extragénicos de *acl5* en poblaciones mutagenizadas.

En esta sección se describe el aislamiento y la caracterización de ambos tipos de modificadores genéticos.

2.1. Variación fenotípica natural del mutante *acl5*

En el momento de iniciar esta Tesis se disponía de cinco alelos mutantes para *ACL5* (Figura 9). El primero, *acl5-1*, se caracteriza por la mutación de un ácido glutámico por una lisina en el cuarto exón de *ACL5*; el segundo, *acl5-2*, resultó ser un alelo independiente con la misma lesión que *acl5-1*; el tercer alelo se describió a raíz de una búsqueda en una colección de plantas con inserciones de transposones, utilizando la estrategia de dos componentes Activator/Dissociation (Long *et al.* 1997); este alelo fue llamado *acl5-3* y tenía insertado el transposón en el sexto intrón de *ACL5*. En la progenie del cruce entre *acl5-3* y una línea que contenía una transposasa apareció otra línea, *acl5-4*, que había perdido la inserción del transposón pero mantenía el fenotipo enano; esto se debía a que durante la transposición se había escindido parte de *ACL5* generándose un mutante nulo. Más recientemente, en nuestro laboratorio

se ha caracterizado una línea de inserción de T-DNA de la colección generada en el Salk Institute (Alonso *et al.* 2003), localizada en el sexto exón del gen *ACL5*, y que denominamos *acl5-5*.

Los cuatro alelos distintos de *acl5* presentan una gradación en el defecto de crecimiento del mutante: mientras *acl5-3* y *acl5-4* presentan una altura muy inferior a la del silvestre, en *acl5-1* y *acl5-5* este efecto está un poco más atenuado (Figura 9). Además, otras características del fenotipo de *acl5* como el reducido tamaño de las hojas de roseta o la rugosidad de las silicuas están acentuadas en *acl5-3* y *acl5-4*.



Figura 9. Alelos del mutante *acl5*. El alelo *acl5-2* no se muestra por ser idéntico al *acl5-1*. Entre paréntesis se indica el fondo genético en el que se encuentra cada mutación.

Una causa que explicaría las diferencias de severidad del fenotipo, sería la diferente naturaleza de las mutaciones en cada alelo; así, un alelo nulo provocaría un efecto mayor que uno hipomorfo. Esta explicación concuerda con que uno de los alelos débiles, *acl5-1*, presenta una alteración molecular que consiste en tan sólo una sustitución aminoacídica, mientras que sus niveles de RNA no son inferiores a los de una planta silvestre (Hanzawa *et al.* 2000); sin embargo, esta hipótesis no parece concordar con el fenotipo de los otros tres alelos. Los mutantes *acl5-3*, *acl5-4* y *acl5-5* son mutantes nulos de RNA, pero

mientras el fenotipo de los dos primeros es muy severo, el de *acl5-5* es más leve.

Una explicación alternativa de la gradación sería la existencia de un modulador de *ACL5*, debido al distinto fondo genético de cada uno de los alelos. El alelo *acl5-1* fue encontrado en un fondo genético Landsberg *erecta* (La-*er*) y más tarde introgresado en un fondo Columbia-0 (Col-0) mediante 3 ciclos de retrocruces (Hanzawa *et al.* 2000); *acl5-5* también se encuentra en un fondo Col-0, mientras que *acl5-3* y *acl5-4* están en el fondo La-*er*. Así pues, los alelos más leves, *acl5-1* y *acl5-5*, se encuentran en fondo Col-0, mientras los más severos están en fondo La-*er*.

Una de las principales diferencias entre ambos fondos es la pérdida de función del gen *ERECTA* (*ER*), característica del fondo genético La-*er* (van Zanten *et al.* 2009) siendo esta mutación, la responsable de múltiples efectos pleiotrópicos que afectan, por ejemplo, a la arquitectura floral (Douglas *et al.* 2002), a la respuesta al estrés biótico (Godiard *et al.* 2003) o a la transpiración (Masle *et al.* 2005).

Para comprobar si la causa de la gradación del fenotipo de los alelos mutantes de *ACL5* era la mutación del gen *ER*, presente en las líneas en fondo La-*er*, decidimos analizar el fenotipo de enanismo en poblaciones en las que sólo estuvieran segregando las mutaciones de *acl5* y *er*. Para ello, cruzamos el alelo *acl5-4* (en fondo La-*er*), que tiene un genotipo doble mutante *acl5* y *er*, con una planta Landsberg (La-0), que tiene un genotipo doble silvestre *ACL5* y *ER*. Si nuestra hipótesis fuese correcta, en la generación F2 observaríamos un 18,75 % de plantas enanas con fenotipo leve (genotipo *acl5 ERECTA*) y un 6,25% de plantas enanas con fenotipo severo (genotipo *acl5 er*); mientras que si fuese errónea, encontraríamos únicamente plantas enanas con fenotipo severo. Como se puede ver en la Figura 10, en la generación F2 aparecieron tanto plantas enanas leves como severas, y en proporciones parecidas a las esperadas, lo cual indica que *ER* es un modulador del fenotipo de *acl5*, y sugiere que *ER* y *ACL5* interaccionan genéticamente para controlar el tamaño del tallo.

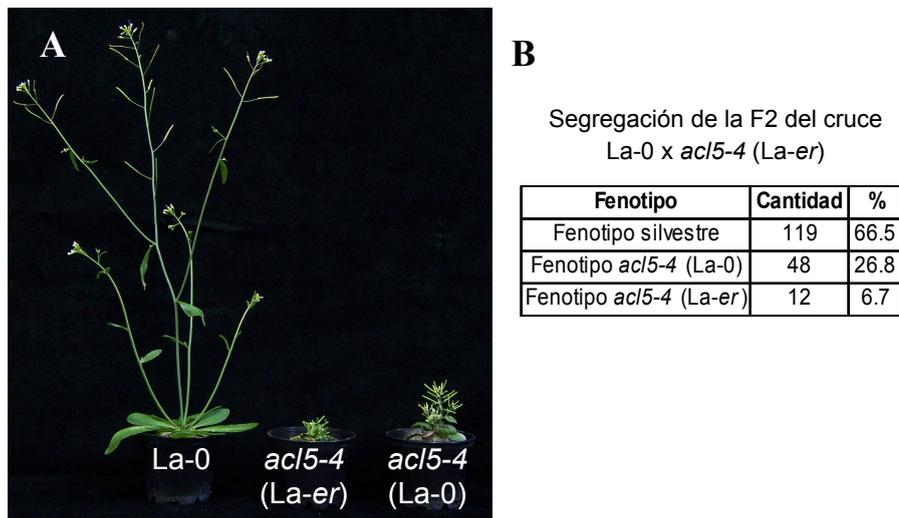


Figura 10. Cruce entre La-0 x *acl5-4* (La-er)

A- Plantas parentales y resultado de la segregación en la F2, *acl5-4* (La-0).

B- Tabla con la segregación en la F2 del cruce.

2.2. Caracterización genómica del alelo *acl5-4*

Otra estrategia para encontrar moduladores de *ACL5* sería la búsqueda de supresores extragenéticos del mutante *acl5* mediante un proceso de mutagénesis con metanosulfonato de etilo (EMS), siendo el criterio de búsqueda, la recuperación del fenotipo enano del mutante.

Para evitar la posible aparición de falsos positivos por reversión de la mutación *acl5*, decidimos utilizar el alelo *acl5-4* (mutante por deleción) en lugar de *acl5-1* (mutante puntual) para la mutagénesis. Además, el fenotipo más severo de *acl5-4* nos permitiría encontrar líneas supresoras más débiles del fenotipo enano. El único problema que planteaba *acl5-4*, era el desconocimiento de la secuencia del fragmento delecionado, del que únicamente sabíamos que debía tener un tamaño de 2,4 Kb (Hanzawa *et al.* 2000); por ello decidimos caracterizar la deleción, para poder diseñar un sistema de genotipado por PCR de las líneas supresoras y, además, para asegurarnos que la deleción no afectaba a ningún gen contiguo a *ACL5*.

Una primera aproximación para conocer con precisión la secuencia del fragmento deleciónado consistió en amplificar por PCR pequeños fragmentos en las regiones 5' y 3' de *ACL5* en el mutante *acl5-4*. De esta manera se determinó que la deleción afectaba a la zona 5' del gen. A continuación se digirió el DNA genómico del mutante *acl5-4* con *Xba I*, se forzó la formación de moléculas circulares de DNA mediante ligación intramolecular, y se realizó una PCR con los oligos inversos indicados en negro en la Figura 11, para determinar con precisión las secuencias flanqueantes a la deleción. De esta manera se pudo concluir que la deleción abarca desde la posición -693 hasta la +1370 tomando como referencia la posición de la adenina del codón de inicio de *ACL5*. La información obtenida mediante este análisis permite descartar que la deleción afecte a la región codificante de ningún gen vecino. Además, se pudo diseñar un método de genotipado por PCR, basado en la utilización de dos oligonucleótidos que flanquean la región deleciónada y, un tercero, dentro de dicha región (ver Materiales y Métodos, página 124).

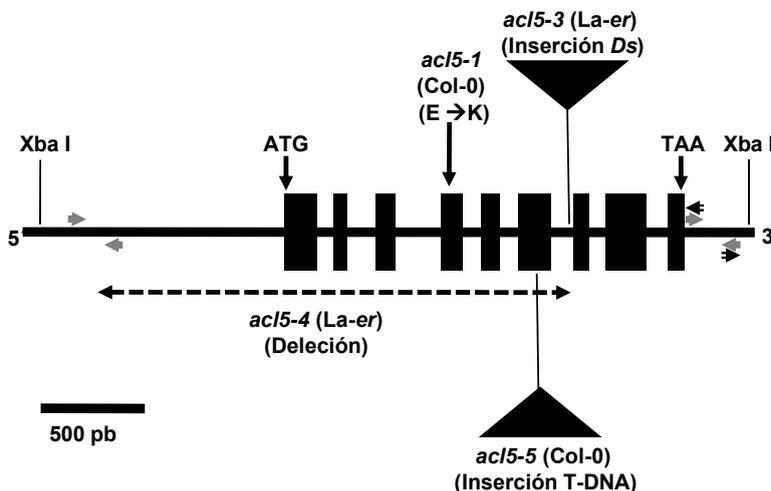


Figura 11. Caracterización genómica de los alelos del mutante *acl5*. Las cajas negras representan los exones del gen *ACL5*, estando indicados el codón de inicio (ATG) y el codón de parada (TAA). En el 4º exón se muestra el cambio de aminoácido del alelo *acl5-1*. Los triángulos indican las inserciones de los alelos *acl5-3* y *acl5-5*. La línea punteada abarca la deleción de 2 Kb del alelo *acl5-4*, las flechas grises indican los oligonucleótidos usados en las PCRs de las regiones 3' y 5'; las flechas negras dobles indican los oligonucleótidos usados en la PCR, en la que se usó como molde el producto de la autoligación.

2.3. Búsqueda de supresores del mutante *acl5-4*

Con la intención de encontrar mutaciones que suprimieran el defecto de crecimiento causado por la ausencia de termoespermina, se mutagenizaron con EMS alrededor de 20000 semillas de *acl5-4*. El análisis de la generación M1 indicó que la mortalidad causada por el tratamiento rondaba el 67%, y entre las 7000 plantas supervivientes encontramos 80 líneas con una mayor altura que el parental mutante (Figura 12). Las semillas de estas líneas fueron recogidas individualmente pues podrían tratarse de líneas supresoras dominantes, y las semillas del resto de plantas fueron recogidas en 86 grupos. El rastreo de las familias M2 se inició analizando 1250 semillas de cada uno de los ocho primeros grupos, encontrando 13 líneas supresoras recesivas (1 en el 1^{er} grupo, 3 en el 2^o, 2 en el 3^o, 1 en el 5^o, 1 en el 7^o y 5 en el 8^o).



Figura 12. Generación M1 de plantas *acl5-4* mutagenizadas con EMS; se pueden apreciar diversas líneas supresoras de mayor altura que el mutante *acl5-4*.

Ante la gran cantidad de supresores potenciales que habíamos identificado en el rastreo, decidimos cesar el análisis de la M2 y concentrar el esfuerzo en los obtenidos a partir de la M1, por su posible naturaleza dominante.

2.4. Caracterización fenotípica de los supresores dominantes de *acl5-4*

Para comprobar el fenotipo supresor de los mutantes aislados durante el rastreo de la M1, se sembraron alrededor de 30 semillas de cada una de las 80 líneas identificadas y se analizó la segregación del fenotipo de recuperación del tamaño del tallo. Esto permitió eliminar 40 líneas que no mantenían el fenotipo supresor en su progenie, o que simplemente no germinaron.

Para evitar que se diluyesen nuestros esfuerzos ante tan extenso número de líneas, decidimos priorizar el estudio de todas aquellas que cumplieran tres criterios de selección:

1°. Se descartarían aquellas líneas que fuesen contaminaciones de plantas silvestres y no supresores con genotipo *acl5-4*. Para ello, genotipamos cada una de las líneas siguiendo el método descrito previamente, comprobando que todas ellas eran portadoras del alelo *acl5-4* y no había ninguna contaminación (Figura 13).

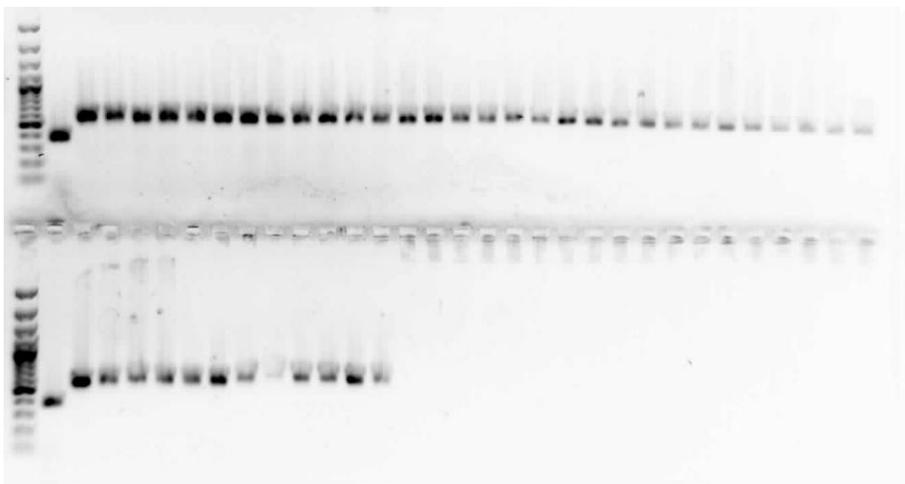


Figura 13. Gel de agarosa para genotipar la delección del alelo *ac15-4* mediante PCR con DNA genómico de las líneas supresoras, en el carril superior el orden de las muestras, de izquierda a derecha, es La-er, *ac15-4*, líneas I, IV, V, VI, VII, VIII, X, XII, XIV, XVI, XVII, XVIII, XX, XXI, XXIII, XXIV, XXVI, XXVII, XXVIII, XXIX, XXXI, XXXIX, XLVI, XLVIII, L, LI, LII y LIII; en el carril inferior el orden de las muestras, de izquierda a derecha, es Col-0, *ac15-4*, líneas LIV, LVIII, LIX, LX, LXV, LXVI, LXVII, LXIX, LXXVII, LXXIX y LXXX. Una banda de 548 pb corresponde al genotipo *ac15-4* y una banda de 376 pb corresponde a genotipo silvestre. El marcador de DNA es el GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder (Fermentas).

2°. Eliminar aquellas líneas que no segregasen del modo esperado para una mutación monogénica dominante. Así pues, analizamos la segregación del fenotipo supresor en la progenie de cada línea seleccionada en la M1 y descartamos todas aquéllas con menos de un 50% de individuos supresores (Tabla 1).

3°. Priorizar el estudio de las líneas que no presentaran problemas adicionales de germinación. Para establecer esta categoría consideramos que las líneas en las que germinaban menos de un tercio de 30 semillas sembradas presentaban graves defectos de germinación y, por tanto, fueron apartadas (Tabla 1).

Tabla 1. Tabla de segregación de la población M2 de las 80 líneas M1. Sólo se muestran las 40 líneas M1 que contenían plantas con fenotipo supresor en la M2, las otras 40 líneas fueron eliminadas al no volver a presentar fenotipo supresor en la M2. El color marrón señala aquellas líneas eliminadas por germinar menos de un tercio de las semillas. El color gris señala las líneas eliminadas por tener un porcentaje menor al 50% de plantas supresoras en la M2.

Línea	Fenotipo supresor	Fenotipo <i>acl5</i>	Porcentaje supresores	Línea	Fenotipo supresor	Fenotipo <i>acl5</i>	Porcentaje supresores
I	3	0	100	XXXI	18	9	67
IV	15	8	65	XXXIX	16	2	89
V	16	8	67	XLVI	1	6	14
VI	17	8	68	XLVIII	14	7	67
VII	19	7	73	L	12	14	46
VIII	15	4	79	LI	11	8	58
X	25	3	89	LII	2	0	100
XII	10	12	45	LIII	4	21	16
XIV	4	19	17	LIV	5	1	83
XVI	20	6	77	LVIII	20	4	83
XVII	27	2	93	LIX	2	17	11
XVIII	17	4	81	LX	18	5	78
XX	4	10	29	LXV	6	17	26
XXI	16	2	89	LXVI	19	5	79
XXIII	5	5	50	LXVII	1	3	25
XXIV	12	4	75	LXIX	18	9	67
XXVI	16	8	67	LXXVII	17	9	65
XXVII	12	6	67	LXXIX	18	6	75
XXVIII	18	3	86	LXXX	3	1	75
XXIX	3	1	75				

Una vez finalizado el proceso de selección, renombramos a estas 24 líneas dobles mutantes (*acl5-4* + mutación responsable del fenotipo supresor) con el nombre de *ajax* (*ajx*) en referencia a Ajax¹

¹ Ajax: Héroe mitológico griego. En *La Ilíada* de Homero se le describe como un guerrero de gran altura y fuerza colosal, que se suicidó tras una disputa con Ulises por la armadura de Aquiles.

Con el objetivo de seleccionar un número razonable de mutantes para someter a un cartografiado génico, decidimos aplicar un criterio de diversidad y clasificación fenotípica como alternativa al análisis de complementación, que habría sido un abordaje más ortodoxo, pero más complicado y dilatado en el tiempo al haber requerido la realización de 276 cruces entre las distintas líneas *ajax*. Este análisis fenotípico se centró en la capacidad de supresión del defecto causado por la pérdida de función de *ACL5* en diversos caracteres.

El primer carácter analizado fue la altura de cada línea. Atendiendo a este carácter, las distintas líneas presentaban una notable variación en el nivel de supresión (Figura 14).

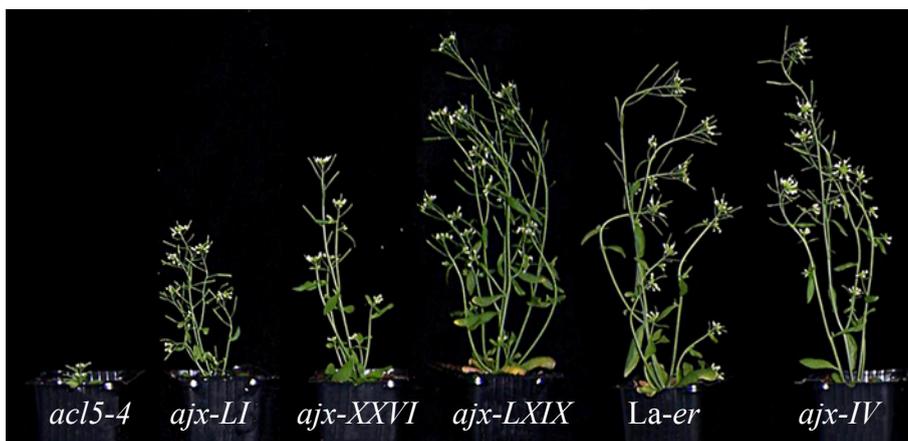


Figura 14. Líneas supresoras *ajax* de diversas alturas.

Esta gradación podía deberse a variaciones alélicas dentro de un mismo gen mutado (es decir, alelos distintos con distinta actividad supresora) o a mutaciones en genes distintos. En previsión de que se tratara de una combinación entre ambas posibilidades, establecimos tres categorías distintas en función de la altura final de 14 líneas representativas (Figura 15), razonando que sería más fácil evitar la duplicidad innecesaria del trabajo de cartografiado si nos centrábamos en un mutante de cada una de las distintas categorías.

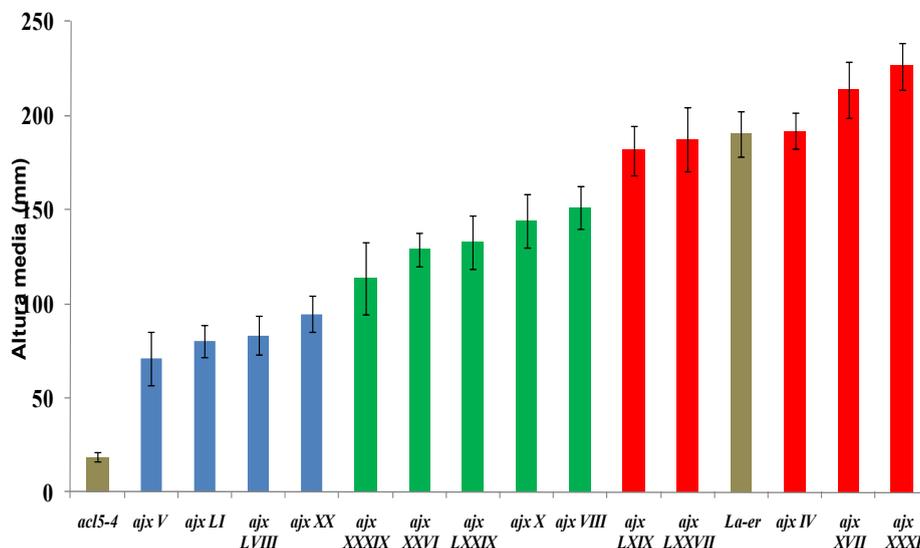


Figura 15. Altura de las líneas supresoras ordenadas de menor a mayor. En color gris las líneas control *acl5-4* y *La-er*, en color azul las líneas de altura sensiblemente menor al silvestre, en color verde las líneas de altura levemente inferior al silvestre, en color rojo las líneas de altura similar al silvestre. La altura media se calculó sobre un mínimo de 10 individuos, las barras de error representan la desviación estándar.

El segundo carácter analizado fue la capacidad de supresión de la proliferación de los haces vasculares mostrada por el mutante *acl5* (Hanzawa *et al.* 1997; Muñiz *et al.* 2008). Para ello se examinaron al microscopio secciones transversales de los tallos de las distintas líneas supresoras. Al igual que con la altura de la planta, se detectó una gradación entre las diferentes líneas *ajx* (Figura 16). Curiosamente, se apreció una relación directa entre la capacidad de supresión de la proliferación de haces vasculares y la altura de cada línea. Únicamente la línea *ajx-IV* escapó a esta regla, al tener una altura similar al silvestre y una gran cantidad de haces vasculares.

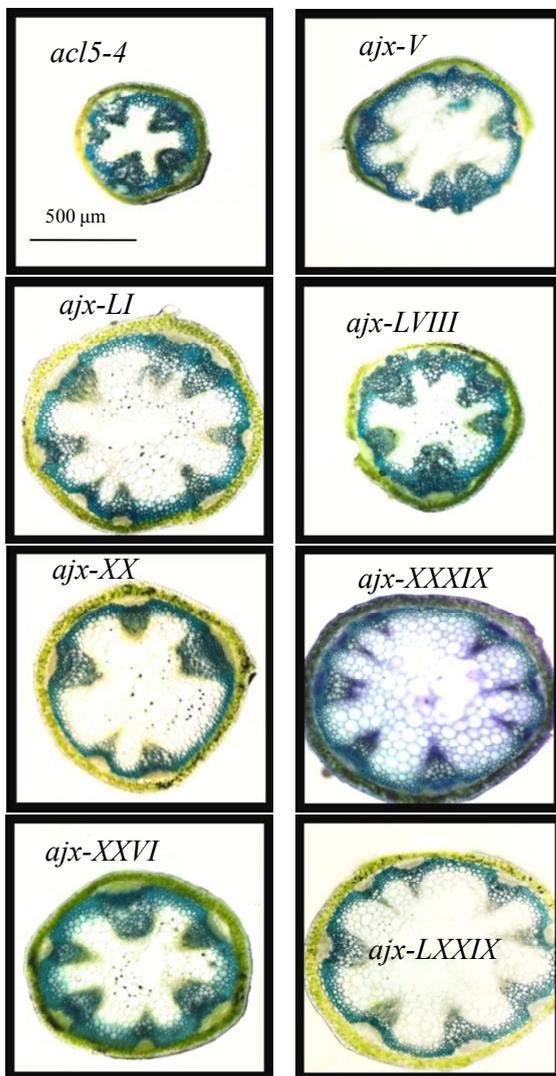


Figura 16 (I). Cortes histológicos de los supresores (I). Cortes transversales de tallos basales de plantas de 6 semanas teñidos con azul de toluidina. Las líneas están ordenadas al igual que en la figura anterior de menor a mayor altura.

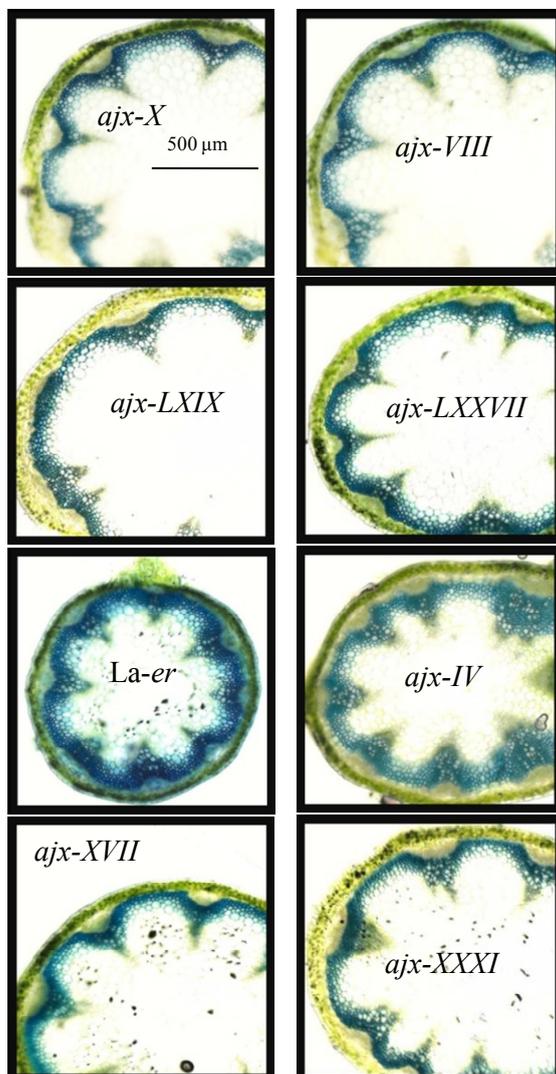


Figura 16 (II). Cortes histológicos de los supresores (II). Cortes transversales de tallos basales de plantas de 6 semanas teñidos con azul de toluidina. Las líneas están ordenadas al igual que en la figura anterior de menor a mayor altura.

A la vista de estos resultados, establecimos como prioridad la clonación posicional de los genes mutados en las líneas *ajx-X*, *ajx-XXXI* y *ajx-IV*. Las dos primeras correspondían a las dos categorías de mayor altura de tallo, mientras que la tercera presentaba un comportamiento especialmente atractivo en principio, por no coincidir perfectamente la altura de la planta con la capacidad de suprimir el defecto de los haces vasculares.

El particular fenotipo de *ajx-IV* nos llevó a analizar otro carácter defectivo de la mutación *acl5*, que además se ha propuesto como la causa primaria del defecto de dicho mutante: la incapacidad de formar metaxilema (Muñiz *et al.* 2008). Este tipo celular del xilema lo componen células muertas que forman la auténtica canalización funcional para el transporte de agua y sales minerales. Su identidad se reconoce principalmente por la ornamentación punteada de su pared celular. Puesto que *ajx-IV* parece mantener el defecto de hiperproliferación del tejido vascular, la cuestión a resolver era si dicha proliferación se producía a costa del metaxilema, como en *acl5*. Como se ve en la Figura 17, tanto *ajx-IV* como las otras dos líneas seleccionadas para la clonación posicional (*ajx-X* y *ajx-XXXI*) recuperaban con la misma eficiencia la proporción de células de metaxilema, hasta alcanzar valores equivalentes a los observados en el silvestre.

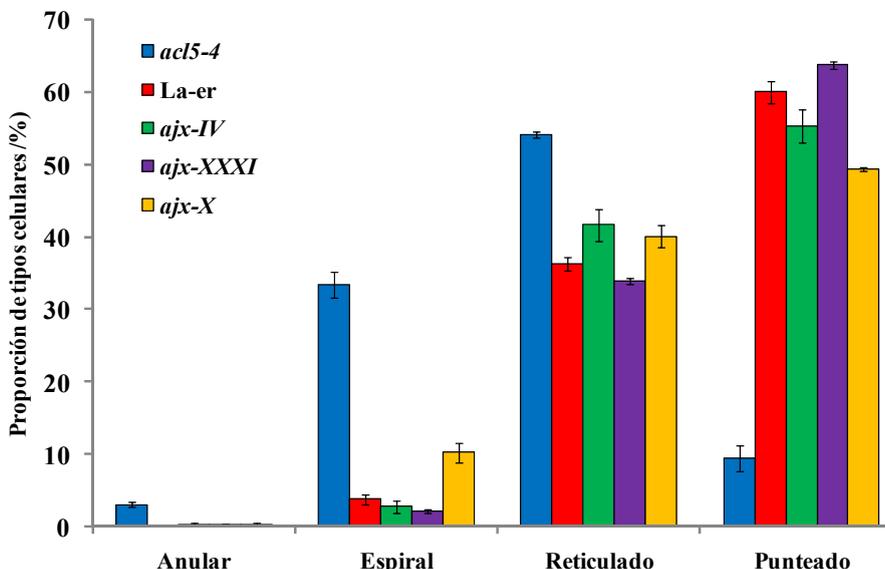


Figura 17. Cuantificación de los tipos celulares de protoxilema y metaxilema en las líneas supresoras. Las barras de error representan la desviación estándar.

2.5. Clonación posicional de *AJAX1* y *AJAX2*

Para llevar a cabo la clonación posicional de los genes mutados de las líneas *ajx-IV*, *ajx-X* y *ajx-XXXI*, se generaron mediante cruce, poblaciones F2 entre dichos mutantes (cuyo genotipo relevante sería *acl5-4 ajx-D* en fondo *La-er*) y el mutante *acl5-5* (en fondo *Col-0*). En una primera fase se seleccionaron 50 individuos con fenotipo enano (homocigotas para *acl5* y para el locus silvestre de *AJAX^{Col}*) de cada una de dichas poblaciones. Dichos individuos se utilizaron para realizar un cartografiado de baja resolución en el Servicio de Cartografiado Génico de la Universidad Miguel Hernández de Elche. Fruto de este análisis se pudo concluir que *ajx-IV* portaba una mutación supresora en el cromosoma 5, mientras que *ajx-X* y *ajx-XXXI* portaban mutaciones en una misma región del cromosoma 1. Puesto que este resultado sugería un probable alelismo entre estas dos últimas mutaciones, se decidió proseguir únicamente con el cartografiado de dos de las tres líneas, *ajx-IV* y *ajx-XXXI*, posponiendo la comprobación del

alelismo para cuando se conociera la identidad del gen mutado en esta última línea.

El cartografiado de alta resolución de *ajx-IV* y *ajx-XXXI* se efectuó a partir de mutantes enanos de la F2 de los cruces previamente mencionados, en los que se analizó la frecuencia de recombinación de diversos marcadores moleculares polimórficos para las accesiones Col-0 y La-er. Dicho análisis se llevó a cabo tanto en el Servicio de Cartografiado Génico de la Universidad Miguel Hernández de Elche, como en nuestro laboratorio (ver Materiales y Métodos, página 126). Como resultado, el intervalo para la presencia de los *loci* mutados quedó reducido a 81 y 93 Kb en las líneas *ajx-IV* y *ajx-XXXI*, respectivamente (Figuras 18 y 19).

Figura 18. Clonación posicional del gen *AJAX1*.

A- Representación del cromosoma 5 de *A. thaliana* entre 23 Mb y 29 Mb; α – marcador MUA2, β – marcador K8K14; los números indican las plantas recombinantes con al menos un alelo Col-0 para cada marcador.

B- Representación de la región de 136 Kb con 3 BACS solapantes, resultante del análisis de alta resolución; χ – Marcador Cer455797, δ – Marcador Cer458067, ε – Marcador Cer440084.

C- Representación de la región de 81 Kb con 22 genes candidatos, desde el At5g64230 hasta el At5g64440, resultante del análisis de dCAPS. En rojo el gen At5g64340 donde se encontró la mutación.

D- Representación de la secuencia genómica del gen At5g64340. En letra negra mayúscula, la ORF principal; en letra verde mayúscula, las uORF; en letra azul la secuencia de aminoácidos; en letra lila y subrayada base (C \rightarrow T) y aminoácido (P \rightarrow S) mutagenizados. Un triángulo negro indica un codón de inicio de traducción, un triángulo rojo indica un codón de continuación de traducción de un exón.

Para localizar las mutaciones correspondientes dentro de los intervalos, escogimos una estrategia de secuenciación de los genes comprendidos en dichos intervalos, a partir de DNA genómico de *ajax-IV* y *ajax-XXXI*. Tras secuenciar tres genes en *ajax-IV*, y doce en *ajax-XXXI*, localizamos en cada línea una mutación del tipo G/C → A/T, acorde a lo esperable para una mutación inducida por EMS (Greene *et al.* 2003).

La mutación en *ajax-IV* se encuentra en la región correspondiente a la 5'-UTR del gen At5g64340, que pasó a denominarse *AJAX1* (*AJXI*), mientras que el alelo mutante se renombró como *ajax1-4*. Sorprendentemente, la mutación de *ajax-XXXI* se localizaba asimismo en la región 5'-UTR del gen At1g29950, que pasó a denominarse *AJAX2* (*AJX2*); el correspondiente alelo mutante se renombró como *ajax2-31*. En los correspondientes RNA mensajeros, las mutaciones identificadas afectan a un pequeño marco abierto de lectura (uORF, upstream Open Reading Frame) diferente al marco abierto de lectura principal del gen (ORF, Open Reading Frame) y, en ambos casos, resultan en un cambio de aminoácido en el pequeño péptido supuestamente codificado por la uORF.

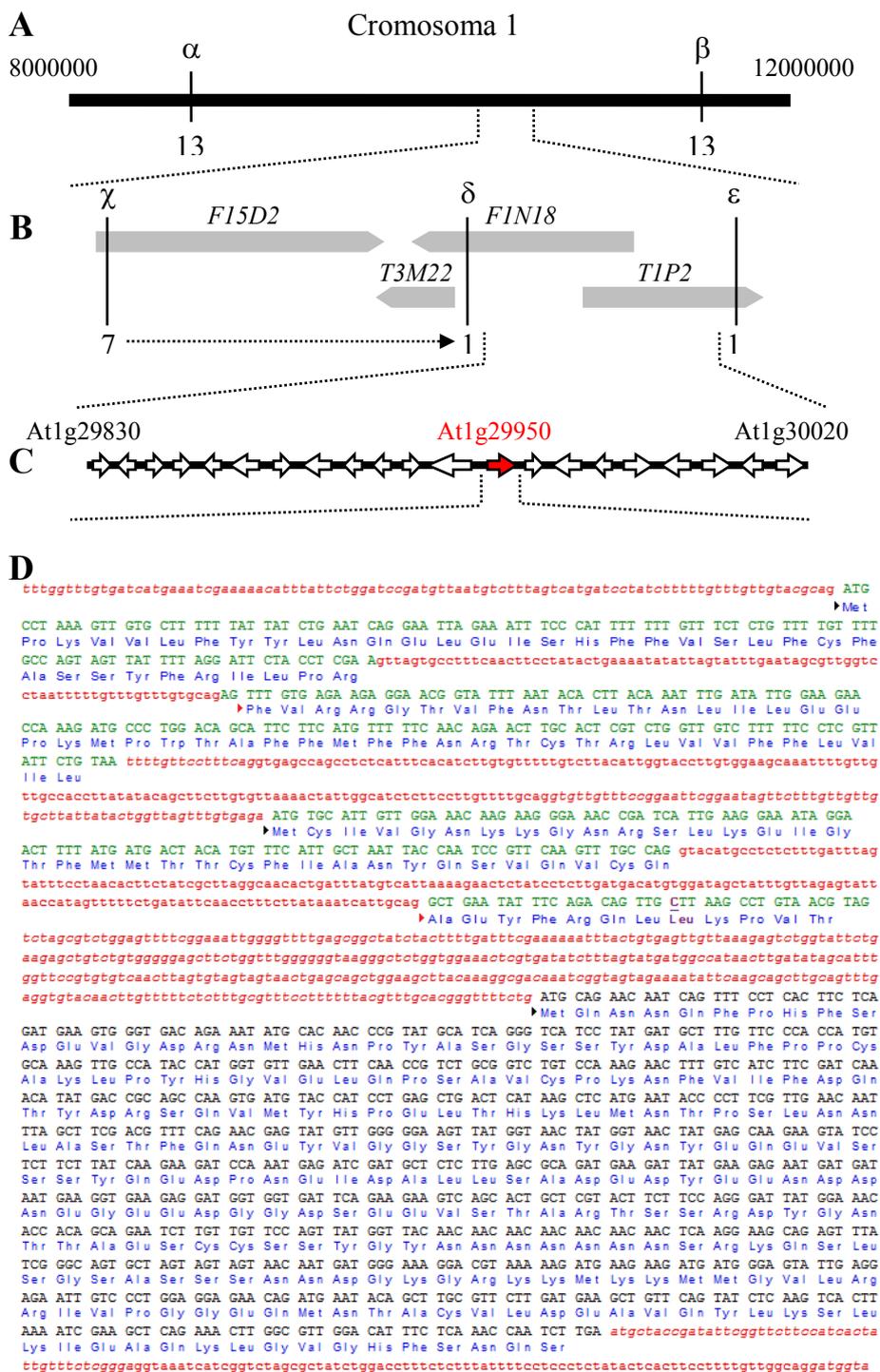
Figura 19. Clonación posicional del gen *AJAX2*.

A- Representación del cromosoma 1 de *A. thaliana* entre 8 Mb y 12 Mb; α – marcador AthZFPG, β – marcador SNP10026; los números indican las plantas recombinantes con al menos un alelo Col-0 para cada marcador.

B- Representación de la región de 222 Kb con 4 BACS solapantes, resultante del análisis de alta resolución; χ – Marcador Cer479911, δ – Marcador Cer480732, ε – Marcador Cer479895.

C- Representación de la región de 93 Kb con 21 genes candidatos, desde el At1g29830 hasta el At1g30020, resultante del análisis de dCAPS. En rojo el gen At1g29950 donde se encontró la mutación.

D- Representación de la secuencia genómica del gen At1g29950. En letra negra mayúscula, la ORF principal; en letra verde mayúscula, las uORF; en letra azul la secuencia de aminoácidos; en letra lila y subrayada base (C → T) y aminoácido (L → F) mutagenizados. Un triángulo negro indica un codón de inicio de traducción, un triángulo rojo indica un codón de continuación de traducción de un exón.



2.6. Caracterización molecular de los genes *AJAX*

AJAX1 y *AJAX2* codifican factores de transcripción de la familia básica-Hélice-Lazo-Hélice (bHLH), que están encuadrados dentro del subgrupo 13 según Toledo-Ortiz (Toledo-Ortiz *et al.* 2003) (Figura 20). Además de *AJAX1* (At5g64340) y *AJAX2* (At1g29950) en este grupo figuran también At5g09460 y At5g50010 a los que, a partir de ahora denominaremos *AJAX3* (*AJX3*) y *AJAX4* (*AJX4*) respectivamente. Los cuatro miembros de esta subfamilia destacan por ser los únicos bHLH que presentan una 5'-UTR larga con uORFs conservadas. Además carecen de un dominio básico bien definido (Figura 20C), por lo que podrían catalogarse como proteínas HLH. Este tipo de proteínas es incapaz de unirse directamente al DNA, sino que regulan la transcripción a través de la interacción física con otras proteínas con dominio de unión al DNA ,casi siempre un bHLH (Hornitschek *et al.* 2009). Durante el transcurso de esta Tesis, *AJAX1* fue también identificado en otro laboratorio como supresor de *ac15* y fue denominado *SAC51* (Imai *et al.* 2006).

Salvo en el caso de *AJAX4*, para el que no encontramos ninguna mutación entre las 37 líneas supresoras analizadas, la secuenciación permitió identificar nuevos alelos mutantes en *AJAX1/SAC51* y en *AJAX2*, así como mutaciones equivalentes en *AJAX3*, siempre en la misma uORF de la 5'-UTR (Figura 21). En varios de estos casos, las mutaciones provocaban la aparición de un codón de parada prematuro, mientras que en los casos en los que se producía una sustitución aminoacídica, ésta siempre se localizaba en la sección C-terminal altamente conservada del péptido supuestamente codificado por las uORF.

3. Análisis funcional de los genes *AJAX* en el desarrollo vascular

3.1. Superproducción de bHLH en los mutantes *ajax*

La coincidencia de todas las mutaciones identificadas en una uORF equivalente de las regiones 5'-UTR de los tres genes *AJAX* y el carácter dominante de la supresión, nos hicieron plantear la hipótesis de que la uORF ejercería un papel negativo sobre la traducción de la ORF principal que codifica el posible factor de transcripción con el dominio HLH, al igual que ocurre con otros genes de *A. thaliana* (David-Assael *et al.* 2005; Nishimura *et al.* 2005). Las mutaciones de la uORF anularían este efecto represor para permitir la acumulación de dicho factor de transcripción y, por consiguiente, la supresión de *acl5*. Para poner a prueba esta hipótesis, decidimos investigar el efecto de la presencia de diversas formas de la uORF sobre la traducción de *AJAX2* en un sistema de transcripción-traducción *in vitro*.

Las cuatro construcciones que examinamos contenían la ORF principal de *AJAX2* bajo el control de un promotor activo en el sistema de germen de trigo, como se indica en la Figura 22A. La primera carecía de la uORF; la segunda contenía la versión silvestre de la uORF justo antes de la ORF principal; la tercera contenía la versión del alelo *ajax2-31* de la uORF (una mutación que provoca el cambio de un aminoácido conservado); y la cuarta contenía el alelo *ajax2-48* de la uORF (provoca una parada prematura en la traducción de la uORF).

Aunque nunca pudimos detectar la presencia del pequeño péptido codificado por la uORF, sí que pudimos detectar cambios en la producción de la proteína codificada por la ORF principal, dependiendo de la versión clonada de la uORF en la región 5' (Figura 22B). Así, mientras que la presencia de la uORF silvestre reducía sensiblemente la traducción de la ORF principal, hasta a un 10% del nivel de proteína sin ninguna uORF, cualquiera de los dos alelos mutantes clonados permitió recuperar la capacidad de producción del bHLH hasta un 35% del nivel de proteína sin ninguna uORF.

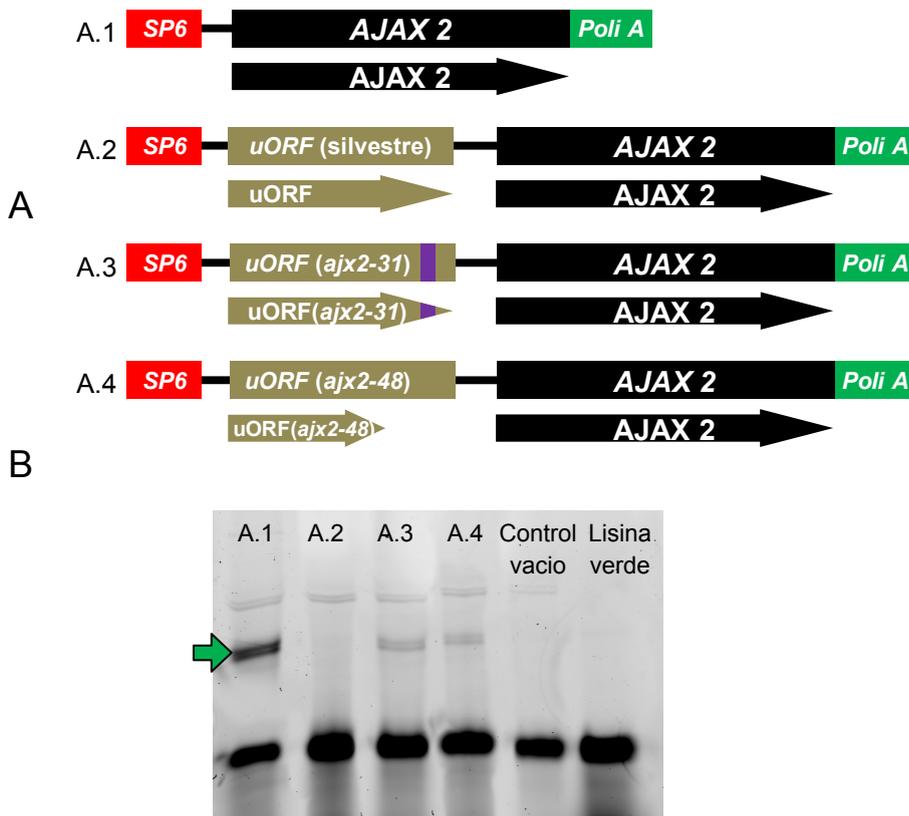


Figura 22. Transcripción-traducción *in vitro* de AJAX2.

A- Esquema de las construcciones generadas con el plásmido pSP64, que incorpora el sitio de reconocimiento de la RNA polimerasa SP6 en 5' y una caja Poli A en 3'. La construcción A1 contiene únicamente la ORF principal de AJAX2, las A2, A3 y A4 contienen esta ORF principal bajo el control de la uORF; en la A2 en su versión silvestre, en la A3 la versión mutante de *ajx2-31* (en morado la posición de la mutación) y en la A4 la versión truncada de *ajx2-48*.

B- Efecto de la uORF en la traducción de AJAX2. Productos del ensayo de transcripción-traducción *in vitro* marcados con FluoroTect™ Green_{Lys} (Promega), analizados en gels de mono:bisacrilamida (la flecha verde indica la posición de AJAX2).

Si el efecto inhibitorio de la traducción de la ORF principal por parte de la uORF observado en el sistema de transcripción/traducción *in vitro* es reflejo de lo que ocurre también *in vivo*, se podría concluir que la supresión de *acl5* por parte de las mutaciones *ajx* se debe a una superproducción del factor de transcripción bHLH codificado por los genes *AJAX*. En tal caso, una predicción que se puede

poner a prueba experimentalmente es que la expresión de la ORF principal de *AJAX2* (sin su región 5'-UTR) debería rescatar el fenotipo enano de *acl5* (Figura 23).

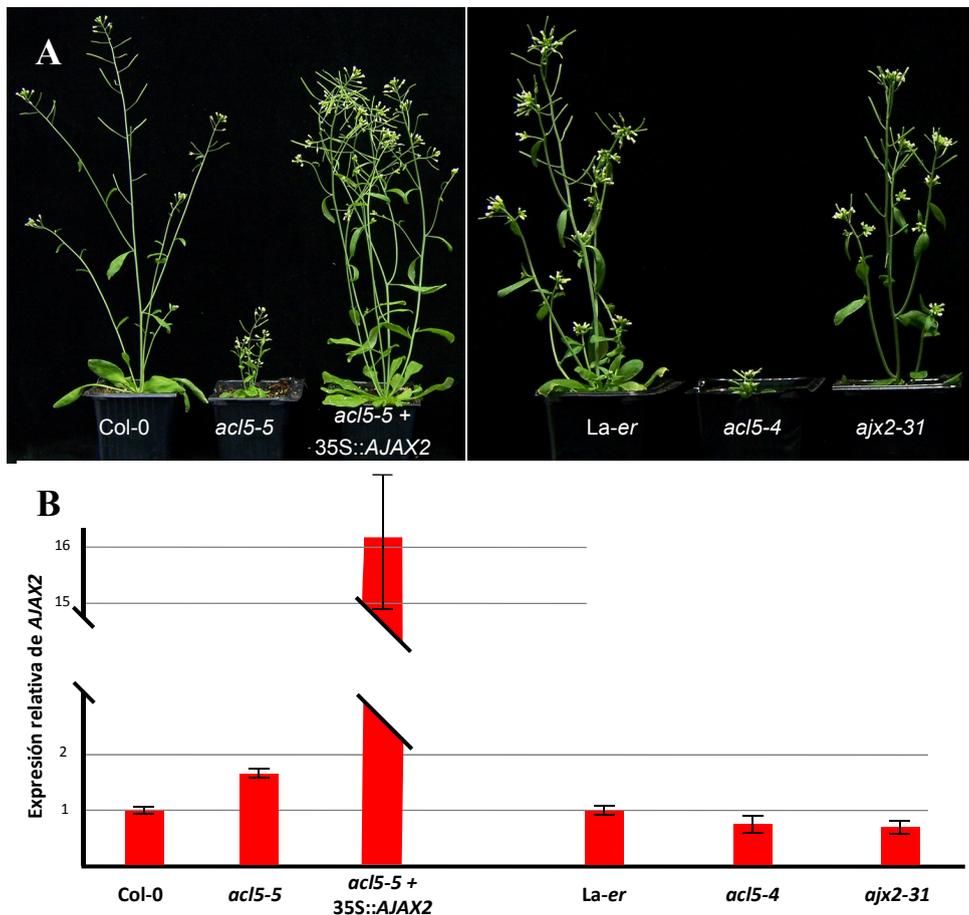


Figura 23. Sobre-expresión del gen *AJAX2*

A- Plantas Col-0, *acl5-5*, sobre-expresante *AJAX2* en fondo *acl5-5*, *La-er*, *acl5-4* y *ajax2-31*

B – Expresión relativa de *AJAX2* en hojas caulinares de plantas adultas de Col-0, *acl5-5*, *acl5-5 + 35S::AJAX2*, *La-er*, *acl5-4*, *ajax2-31*.

En efecto, las plantas *acl5* que fueron transformadas con *35S::AJAX2* recuperaron un tamaño comparable al de plantas silvestres y al de plantas *acl5 ajax2-31* (Figura 23A), en consonancia con su elevado nivel de expresión de la

ORF principal del gen *AJAX2* (Figura 23B). Es importante hacer notar que la expresión de *AJAX2* no estaba alterada en las plantas *ajx2-31*, lo cual concuerda con que el efecto de las mutaciones en la uORF de los genes *AJAX* no consiste en modificar su nivel de transcripción sino que, muy probablemente, se restringe al control traduccional de la ORF principal.

3.2. Relación funcional entre *ACL5* y los genes *AJAX*

Una vez establecido el mecanismo molecular de supresión por parte de las mutaciones en la uORF de los genes *AJAX*, surgía al menos una pregunta referente al papel de estos genes. En concreto, ¿son los genes *AJAX* parte integrante del mecanismo de control del desarrollo vascular por *ACL5* (o su producto, la termoespermina) o se debe la supresión a que las mutaciones activan un mecanismo paralelo que compensa la falta de *ACL5*?

En el primer caso, la función de *ACL5* sería permitir la producción de los factores de transcripción codificados por los genes *AJAX* y éstos se encargarían de impedir la activación prematura de la muerte celular durante la diferenciación del xilema (Muñiz *et al.* 2008). Las predicciones de este modelo serían:

- la termoespermina podría regular la traducción de la ORF principal de los genes *AJAX*.
- un mutante de pérdida de función de los genes *AJAX* mostraría un fenotipo parecido al del mutante *acl5* (dependiendo de una posible redundancia funcional con otros genes no identificados).
- las modificaciones causadas por la mutación *acl5* sobre la expresión génica estarían mediadas, en primer lugar, por la falta de actividad de los HLH codificados por los genes *AJAX*.

Para comprobar la primera de nuestras predicciones, estudiamos el efecto de la adición de termoespermina al sistema de germen de trigo de transcripción-traducción *in vitro* de la construcción que expresa ambas ORFs en tándem (Figura 22A). En contra de lo esperado, la adición de hasta 0,5 mM de termoespermina no sólo no mejoró el nivel de traducción de la ORF principal,

sino que se redujo la traducción de la proteína HLH (Figura 24). No obstante, es probable que este efecto no tenga relevancia fisiológica, sino que sea un artefacto provocado al alterar algún parámetro físico del proceso de traducción con la presencia de una alta concentración de poliaminas, ya que se observó la misma reducción en la traducción cuando se añadió espermina en lugar de termoespermina (Figura 24). Por lo tanto, este experimento no permitía extraer conclusiones acerca de la relación funcional entre la termoespermina y los genes *AJAX*.

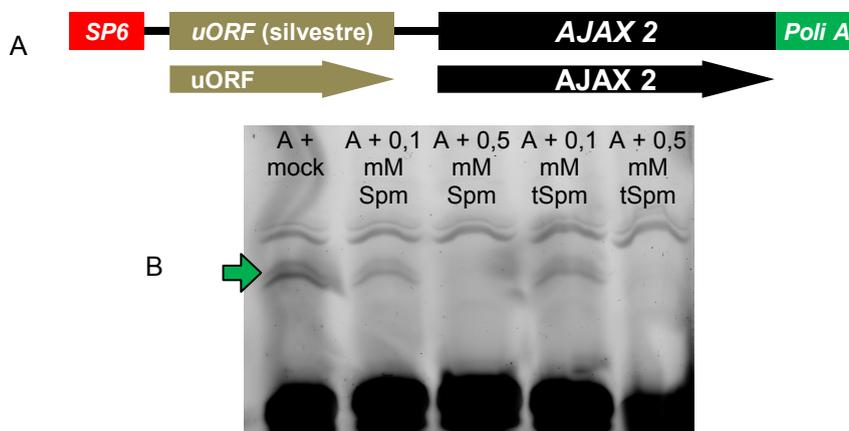


Figura 24. Efecto de la adición de espermina y termoespermina en la transcripción-traducción *in vitro* de *AJAX2*.

A- Esquema de la construcción, con la uORF y ORF de *AJAX2*, en tándem.

B- Productos del ensayo de transcripción-traducción *in vitro*, con adición de 0,1 mM y 0,5 mM de espermina (Spm) y termoespermina (tSpm).

Con respecto a nuestra segunda predicción, el alto parecido de secuencia entre los cuatro genes *AJAX*, su relación filogenética, y el hecho de haber encontrado mutaciones supresoras de *acl5* en *AJAX1*, *AJAX2* y *AJAX3*, sugería una muy probable redundancia funcional entre ellos. Por tanto, para conseguir un mutante de pérdida de la función *AJAX* era necesario obtener como mínimo el triple mutante *ajx1 ajx2 ajx3*. En las colecciones de líneas de inserción de T-DNA a disposición pública figuraban al menos dos para *AJAX1* y dos para *AJAX2*, dentro de la secuencias correspondientes a sus cDNAs (Figura 25A). Sin embargo, sólo había una línea de inserción cercana al locus de *AJAX3* que,

probablemente no inactivaría a dicho gen ya que estaba situada 845 pb aguas arriba del codón de inicio de *AJAX3* (Figura 25A). Puesto que una estrategia alternativa de construir un microRNA artificial (Schwab *et al.* 2006) dirigido a *AJAX3* no tuvo éxito (resultados no mostrados), la única herramienta con la que podíamos contar sería una triple línea de T-DNA obtenida mediante cruces a partir de una de las inserciones en *AJAX1* y *AJAX2*, y la única disponible para *AJAX3*. Dicha línea mostró una reducción casi total en la expresión de *AJAX1* y de *AJAX2*, pero sólo del 50% para el gen *AJAX3* (Figura 25B). Como era de esperar, esta línea no mimetizo ni el fenotipo enano de *acl5* (Figura 25C) ni en la incorrecta formación de los haces vasculares (resultados no mostrados). Por consiguiente, no es posible concluir si la pérdida real de función AJAX fenocopia a la mutación *acl5*.

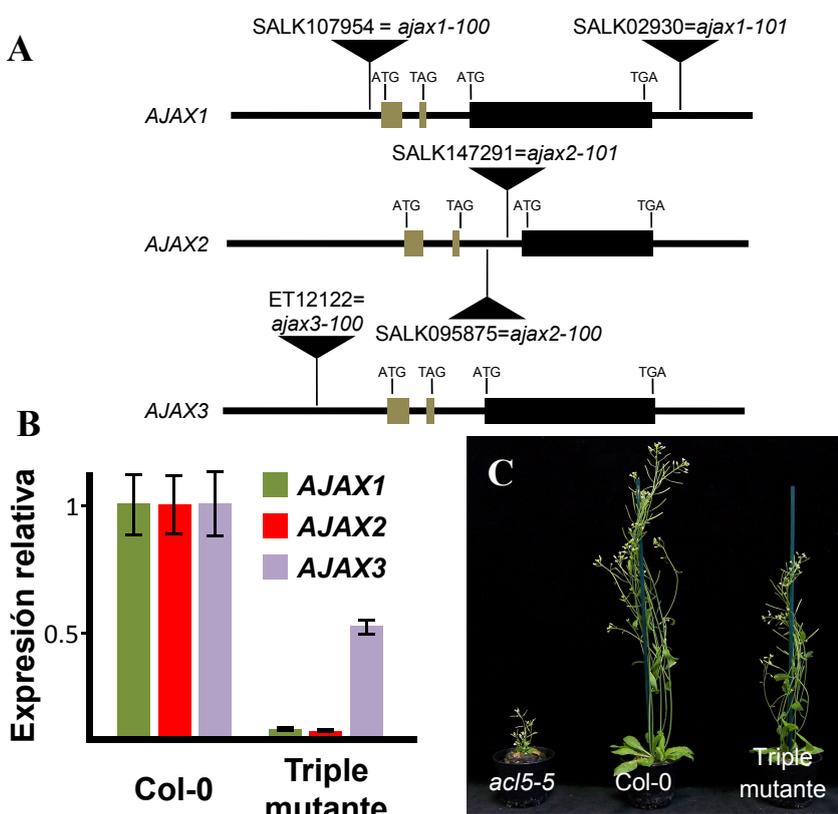


Figura 25. Generación del triple mutante de los genes supresores *AJAXs*.
 A- Líneas de inserción de T-DNA de los genes *AJAX1*, *AJAX2* y *AJAX3*; las cajas negras representan el exón de la ORF principal, las cajas grises representan los exones de las uORFs, los triángulos indican la posición de cada una de las líneas de inserción, identificándose cada una de ellas con su número y el nombre que les hemos asignado; además se representa el codón de inicio y de parada de cada ORF.
 B- Expresión de los genes *AJAX1*, *AJAX2* y *AJAX3* en plántulas de Col-0 y un triple mutante *ajax1-100 + ajax2-100 + ajax3-100*.
 C- Plantas de *acl5-5*, Col-0, triple mutante *ajax1-100 + ajax2-100 + ajax3-100*.

Por último, para averiguar si los factores de transcripción bHLH codificados por los genes *AJAX* median la regulación de la expresión génica ejercida por *ACL5*, decidimos realizar un abordaje transcriptómico, comparando mediante hibridación de micromatrices de DNA el fenotipo molecular de *acl5* con el de tres formas distintas de supresión del fenotipo enano:

- un alelo *ACL5* silvestre, de una línea Col-0.
- la supresión de *acl5* por *35S::AJAX2* (sólo la ORF principal), generado previamente en esta Tesis.
- la aplicación exógena de 0,1 mM de termoespermina, que alivia ligeramente el enanismo de *acl5* (Takehi *et al.* 2008).

De la comparación entre los grupos de genes afectados en cada una de las condiciones podríamos a continuación, inferir el grado de implicación de al menos *AJAX2* (y por extensión, todos los *AJAX*) en la regulación del desarrollo vascular por *ACL5*.

Los análisis de micromatrices se realizaron con muestras de RNA de tres réplicas biológicas de plántulas de 14 días cultivadas en placas de MS (ver Materiales y Métodos, página 132). Cada micromatriz se hibridó con mezclas de RNAs marcados con fluoróforos distintos dependiendo de la muestra, según el siguiente esquema:

- *acl5* vs. Col-0
- *acl5* vs. *acl5* + *35S::AJAX2*
- *acl5* vs. *acl5* + 0,1 mM termoespermina

Las medias de las tres réplicas biológicas en cada caso fueron filtradas según los siguientes criterios:

- sólo se consideraron los valores con presencia en, al menos, dos de las réplicas.
- se etiquetaron como genes diferencialmente aumentados o reprimidos los que se expresaban al menos 1,75 veces más en una condición que en otra. Los resultados de los análisis para las condiciones individuales se pueden consultar en el CD anexo a esta Tesis.

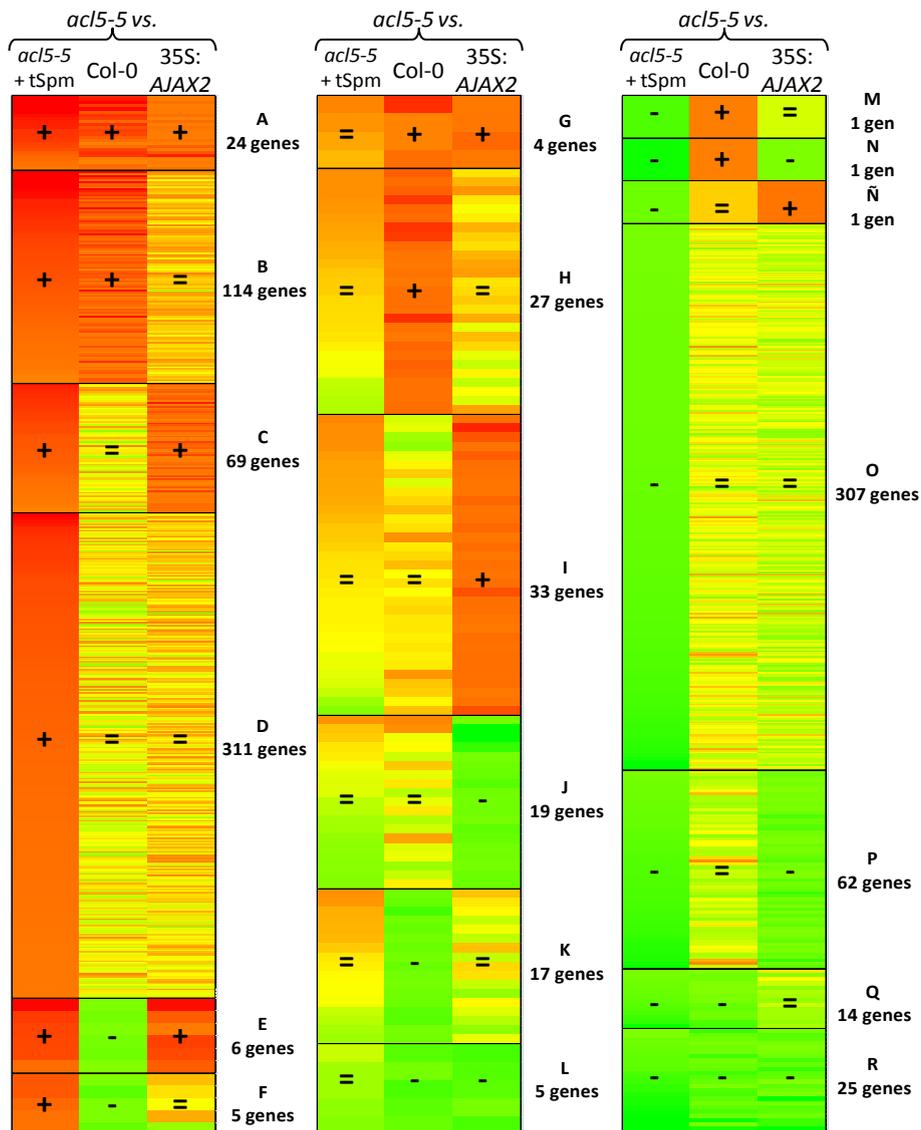


Figura 26(I). Esquema de los resultados obtenidos con micromatrices. El nivel de expresión está representado según la gradación de colores: el rojo indica genes inducidos (también señalados con el signo +) en el mutante *acl5*, el amarillo indica genes con un nivel de expresión parecido entre *acl5* y la otra condición (señalados como =), y el color verde indica genes reprimidos en *acl5* (señalados como -). Los genes están divididos en grupos, de tamaño no proporcional al número de genes que contienen, según su comportamiento entre las tres condiciones; siendo nombrados alfabéticamente indicando su número de genes.

Para comparar los efectos causados sobre el fenotipo molecular de *acl5* se realizó un análisis de agrupamiento de los genes considerando, como criterio mínimo, que en cada grupo sus genes estuviesen diferencialmente aumentados o reprimidos en al menos una de las tres comparaciones. El resultado fueron 19 grupos de genes diferencialmente expresados frente a *acl5* en, al menos, una de las condiciones (Col-0, *35S::AJAX2*, o 0,1 mM termoespermina) (Figura 26).

Cuando analizamos la figura 26 podemos sacar dos grandes conclusiones:

- Las agrupaciones más grandes de genes, D y O (311 y 301 genes respectivamente), corresponden a las alteraciones causadas exclusivamente por el tratamiento con termoespermina. Es probable que se trate de artefactos generados por la presencia de una poliamina cualquiera en gran cantidad, o en particular por la termoespermina; en ninguno de los dos casos parecería tener relevancia fisiológica para el desarrollo de la vasculatura, considerando que dichos genes no están alterados en el mutante *acl5*.
- Los grupos A y R (24 y 25 genes respectivamente) podrían contener aquellas dianas con especial relevancia para la regulación del desarrollo vascular por *ACL5*, ya que son los genes regulados en el mismo sentido por las tres condiciones. Teniendo en cuenta que la complementación por termoespermina en las condiciones del tratamiento no es perfecta (Takehi *et al.* 2008), esta lista podría extenderse a los grupos G y L (4 y 5 genes respectivamente), cuya expresión está alterada en *acl5* y se recupera tanto en Col como en *35S::AJAX2*, pero no de forma aparente en el tratamiento con termoespermina.

Para comprender mejor como suprime *AJAX2* el fenotipo enano, comparamos los genes alterados en la hibridación *acl5-5 vs. Col-0*, con respecto a las otras dos hibridaciones (Figura 27).

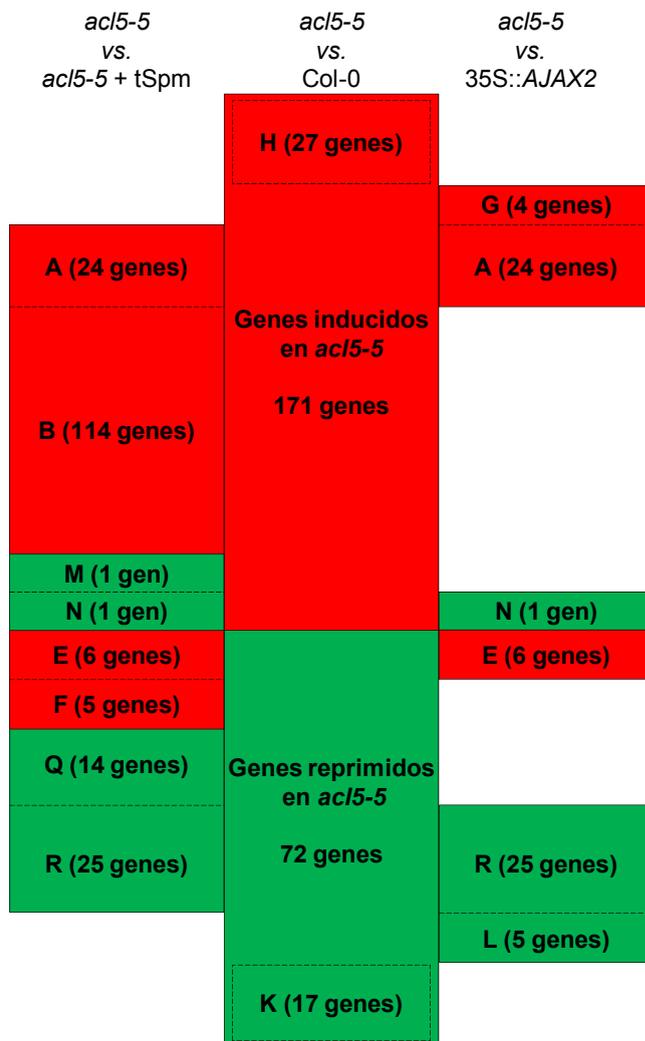


Figura 27. Esquema comparativo de los genes inducidos y reprimidos en *acI5-5* con un silvestre Col-0, con respecto a las otras dos comparaciones, en verde se indican los genes reprimidos y en rojo los genes inducidos en *acI5*. En la columna central se representan los genes diferenciales de la micromatriz entre *acI5-5* y Col-0, en las columnas laterales se muestran los genes comunes a dos o tres de las comparaciones.

Analizando la figura 27 pudimos concluir que:

- De los 171 genes inducidos y 72 genes reprimidos en la comparación *acl5-5* vs. Col-0, sólo hay 28 genes entre los inducidos (grupos G y A) y 30 de los reprimidos (grupos R y L), que sean comunes a la comparación *acl5-5* vs. *35S::AJAX2*. Este bajo número nos indica que gran parte de los fenotipos moleculares de *acl5* no son recuperados por la expresión constitutiva de *AJAX2*.
- A pesar de la importancia ya mencionada de los grupos A y R como posibles dianas de la regulación del desarrollo vascular por *ACL5*, si tenemos en cuenta que la complementación por termoespermina es muy parcial (Kakehi *et al.* 2008), podríamos considerar a los grupos G y L (4 y 5 genes respectivamente) como también posibles dianas muy importantes, pues su alteración provocada una supresión completa del enanismo de *acl5*.

Al analizar la identidad de los genes expresados diferencialmente en el mutante *acl5* mediante GO (ontología génica) se encontró un enriquecimiento particularmente acusado en aquéllos cuyos productos se localizan (y cumplen una función) en la pared celular y en el apoplasto (o espacio intercelular) (Figura 28). Este resultado extiende las observaciones anatómicas del mutante *acl5* en las que se detectaban graves defectos en la estructura de la pared celular durante la diferenciación del xilema (Muñiz *et al.* 2008). Pero lo que es aún más interesante es que son precisamente esas dos categorías funcionales las mismas que mejor se recuperan en las plántulas que expresan *35S::AJAX2* en un fondo *acl5*.

En definitiva, se observa que la supresión por parte de *AJAX2* de los defectos de crecimiento del tallo y de la diferenciación del xilema provocados por *acl5*, está acompañada por una supresión parcial respecto al número e identidad concreta de los genes afectados, pero perfectamente coincidente respecto a las categorías funcionales afectadas.

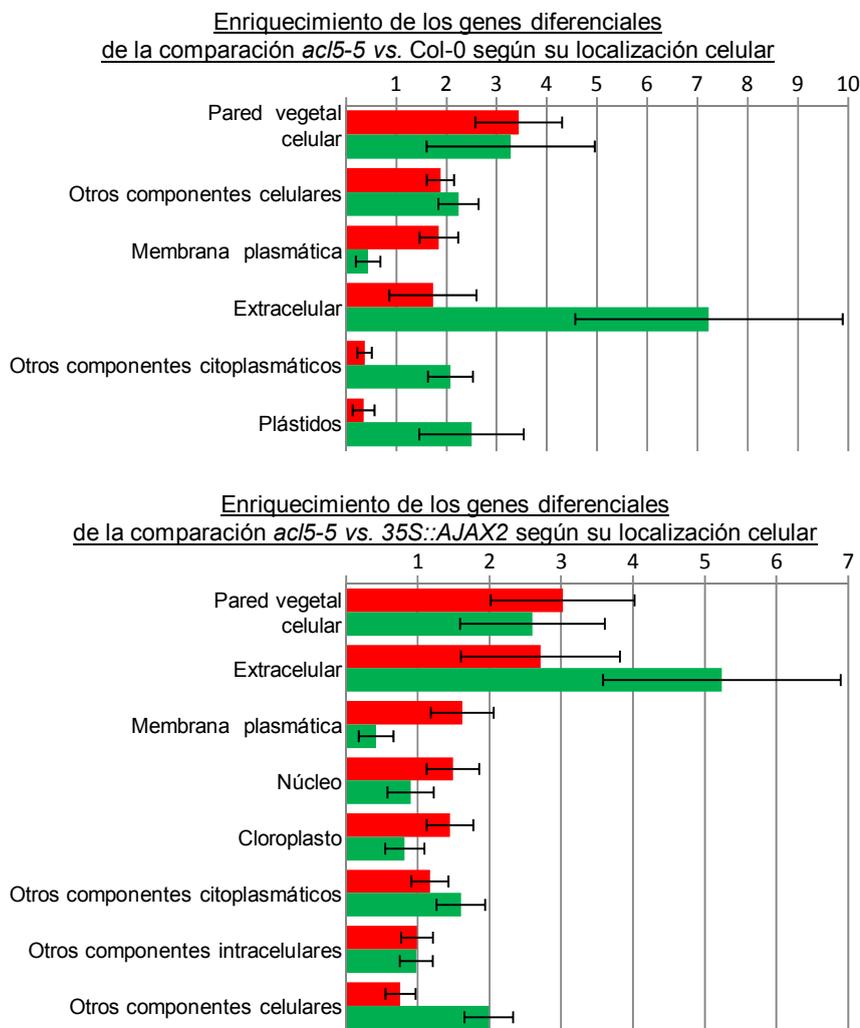


Figura 28. Esquema de genes sobre-representados según su localización celular; en rojo se indican los genes inducidos en el mutante *ac15*, y en verde los reprimidos. El grado de sobre-representación está referido a su proporción en el genoma de *A. thaliana*. Únicamente se representan aquellos grupos con una sobre-representación estadísticamente significativa y superior a 1.

INGENIERÍA ENZIMÁTICA
DE LAS AMINOPROPIL
TRANSFERASAS DE
PLANTAS

Las aminopropil transferasas catalizan la síntesis de tri- y tetraaminas mediante la incorporación de un grupo aminopropilo cedido por la AdoMetdc a una di- o triamina, respectivamente. En plantas, las aminopropil transferasas más características son la SPDS, SPMS y tSPMS. Estas enzimas presentan un alto grado similitud de secuencia entre sí (Hanzawa *et al.* 2002; Panicot *et al.* 2002), compartido además con las putrescina-N-metil transferasas (PMT) (Teuber *et al.* 2007). Al contrario que las aminopropil transferasas, las PMT, están exclusivamente presentes en las plantas solanáceas y catalizan la síntesis de N-metilputrescina por la adición de un grupo metilo proveniente del AdoMet a una molécula de putrescina (Figura 29).

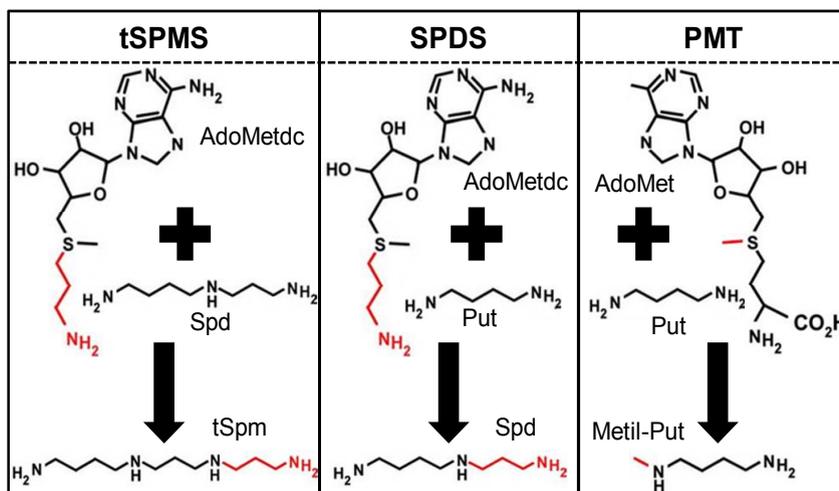


Figura 29. Esquema de las reacciones enzimáticas catalizadas por dos aminopropil transferasas (tSPMS y SPDS) y una putrescina-N-metil transferasa (PMT). En rojo se marca el grupo que es transferido del AdoMetdc o el AdoMet, a la poliamina correspondiente.

Estudios filogenéticos han mostrado que las aminopropil transferasas y las PMT están emparentadas evolutivamente (Minguet *et al.* 2008). De hecho, este análisis indica que las actividades SPDS, SPMS, tSPMS y PMT provienen de una SPDS ancestral que ha sufrido diversos episodios independientes de duplicación y neofuncionalización en cada uno de los reinos de los seres vivos (Minguet *et al.* 2008). Lógicamente, los cambios de función suponen cambios en la capacidad de las enzimas para reconocer nuevos sustratos y ejecutar las

reacciones catalíticas correspondientes. Por ello, la investigación del mecanismo molecular que ha permitido estos cambios de función nos pareció interesante desde al menos, dos puntos de vista:

- para entender la facilidad aparente con la que las SPDS generan nuevas actividades enzimáticas, dado el alto número de sucesos independientes en que esto ha sucedido, durante la evolución.
- para aprender a diseñar enzimas con propiedades catalíticas deseadas (ingeniería enzimática).

Con esta intención decidimos identificar los aminoácidos del centro activo de SPDS, tSPMS y PMT que podrían justificar sus preferencias de sustrato (Put vs. Spd; AdoMet vs. AdoMetdc), y comprobar experimentalmente el efecto de sustituir dichos residuos sobre las afinidades y la capacidad de trabajo de cada una de esas enzimas.

1. Purificación de las enzimas SPDS, tSPMS y PMT

Puesto que las enzimas SPDS y tSPMS de *A. thaliana* no habían sido descritas anteriormente desde el punto de vista de sus parámetros cinéticos, el primer objetivo de esta parte del trabajo fue expresar en bacterias versiones recombinantes de una espermidina sintasa, *AtSPD1*, y una termoespermina sintasa, *AtACL5*, y purificarlas para su posterior análisis. El sistema empleado para la producción de estas proteínas, fue el de expresar fusiones C-terminales de una etiqueta de 6 histidinas (6xHis), de *AtSPD1* (At1g23820) y *AtACL5* (At5g19530) (ver Materiales y Métodos, página 117). Para la producción de la PMT, empleamos una construcción equivalente cedida por la Dra. Birgit Dräger (Universidad Martin Lutero de Halle-Wittenberg) conteniendo la PMT de *Datura stramonium* (Biastoff *et al.* 2006).

Los protocolos concretos de inducción y de purificación con columnas de níquel a partir de extractos crudos de *E. coli*, se pusieron a punto para cada una de las proteínas. Como resultado, pudimos contar con preparaciones aceptablemente enriquecidas en cada una de las enzimas (Figura 30), a concentraciones que variaron entre 0,2 y 1 mg/ml.

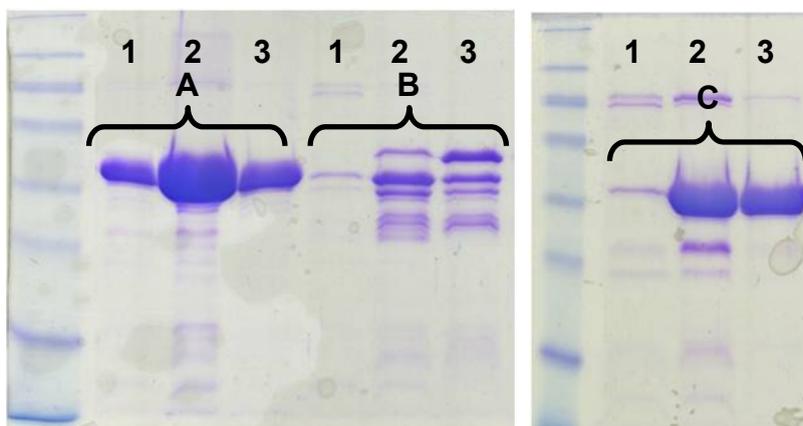


Figura 30. Purificación de *AtACL5*, *AtSPD1* y *DsPMT*. Geles de mono:bisacrilamida, con el marcador de proteínas SeeBlue® Pre-Stained (Invitrogen) y los resultados de diferentes eluciones (1-10% imidazol, 2-20% imidazol, 3- 30% imidazol) de la purificación de las construcciones:

- A- pET28b + *AtACL5*
- B- pET28b + *AtSPD1*
- C- pET21d + *DsPMT*

2. Características cinéticas de SPDS, tSPMS y PMT

El cálculo de los parámetros cinéticos de *AtSPD1* y *AtACL5* se realizó como se indica en Materiales y Métodos, página 117. Como resumen cabe indicar que en los ensayos enzimáticos se empleó una concentración de proteína de 10 mg/ml, y que uno de los dos sustratos (la poliamina Put o Spd, y el AdoMetdc) se mantenía a concentración fija y saturante, mientras que el otro variaba entre los siguientes valores: 0,25-50 mM para Put, 0,25-50 mM para Spd, y 0,05-2 mM para AdoMetdc. La determinación de las velocidades iniciales de reacción se efectuó tomando alícuotas de la mezcla de reacción a intervalos de 15 min y valorando en ellas el contenido de producto, por derivatización de las poliaminas y posterior cuantificación por HPLC.

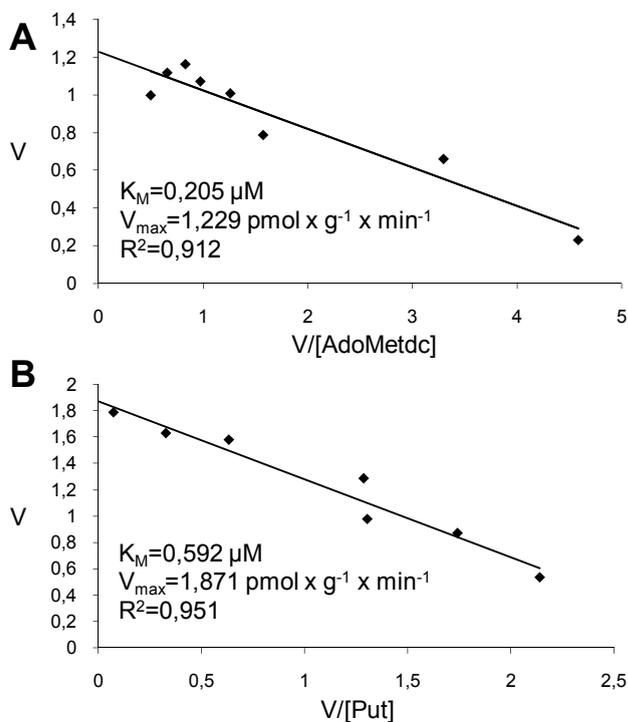


Figura 31. Gráficos de Eddie-Hofstee para el cálculo de las k_M y las V_{max} de *AtSPD1*. En el eje de las ordenadas se expresa la velocidad inicial de la reacción como picomol de espermidina producido por gramo de muestra y por minuto, en el eje de las abscisas se expresa el cociente de la velocidad inicial partido la concentración inicial del sustrato variable, esta última expresada como mM
 A-Gráfico de reacción con concentración de Put fija, y AdoMetdc variable.
 B-Gráfico de reacción con concentración de AdoMetdc fija, y Put variable.

De esta manera pudimos determinar que *AtSPD1* presentaba unos valores de K_M de 592 μM para la putrescina y 205 μM para el AdoMetdc (Figura 31), mientras que *AtACL5* mostraba unos valores de K_M de 775 μM para la espermidina y 230 μM para el AdoMetdc (Figura 32).

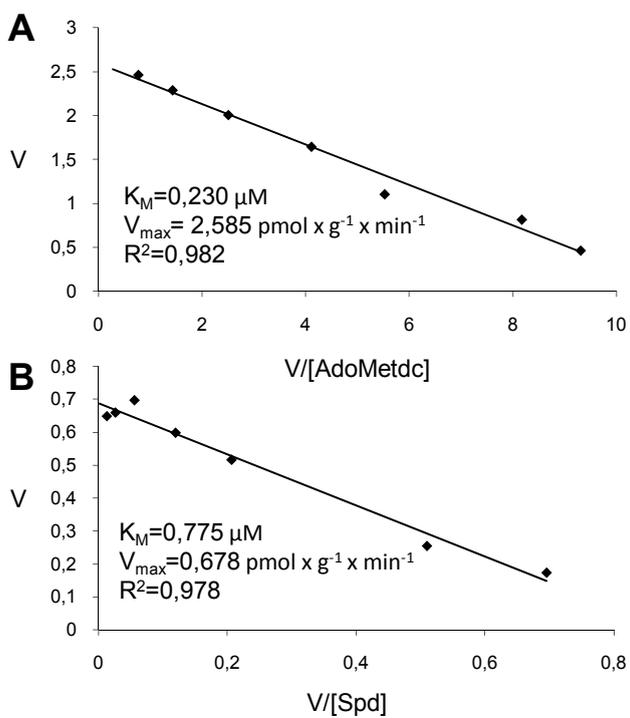


Figura 32. Gráficos de Eddie-Hofstee para el cálculo de las k_M y las V_{max} de *AtACL5*. En el eje de las ordenadas se expresa la velocidad inicial de la reacción como picomol de termoespermina producido por gramo de muestra y por minuto, en el eje de las abscisas se expresa el cociente de la velocidad inicial partido la concentración inicial del sustrato variable, esta última expresada como mM
 A-Gráfico de reacción con concentración de Spd fija, y AdoMetdc variable.
 B-Gráfico de reacción con concentración de AdoMetdc fija, y Spd variable.

El valor de la K_M de *AtSPD1* para la putrescina resulta ser de los más elevados entre los descritos en la literatura, tanto entre las SPDS (Tabla 2) como entre las PMT (Tabla 3) de diversos organismos estudiados. Lo mismo sucede para la K_M del AdoMetdc (Tabla 2). Son varias las posibles explicaciones para esta observación. En primer lugar, podría resultar que la cola de 6xHis interfiriese en el caso de la SPD1 de *A. thaliana* con su actividad enzimática, o que la proteína requiriese cierta modificación postraduccional que no se produce en *E. coli*, aunque este fenómeno no se aprecia en otras SPDS recombinantes caracterizadas (Biastoff *et al.* 2009b); en segundo lugar, podría suceder que el ensayo enzimático *in vitro* no se esté efectuando en las condiciones óptimas, en

las que normalmente actúa la SPD1 de *A. thaliana*. Aunque el pH del ensayo era el óptimo (resultados no mostrados), sí es cierto que se ha descrito que *AtSPD1* participa en un complejo multienzimático, o metabolón, junto con *AtSPD2* (la otra SPDS de *A. thaliana*) y *AtSPM1* (la SPMS de *A. thaliana*) (Panicot *et al.* 2002). Por lo tanto, no sería extraño que en el contexto del metabolón variasen los parámetros cinéticos de *AtSPD1*.

Tabla 2. Tabla con los valores de k_M para diversas SPDS.

Origen SPDS	K_M^{Put} (μM)	$K_M^{AdoMetdc}$ (μM)	Referencia
<i>Arabidopsis thaliana</i>	592	205	Este trabajo
Bazo humano	80	7	(Kajander <i>et al.</i> 1989)
<i>Brassica pekinensis</i>	32	6,7	(Sindhu y Cohen 1984) (Yamanoha y Cohen 1985)
<i>Caenorhabditis elegans</i>	158	110	(Dufe <i>et al.</i> 2005)
Cerebro oveja	40	0,3	(Raina <i>et al.</i> 1984)
<i>Datura stramonium</i>	33	64	(Biastoff <i>et al.</i> 2009b)
<i>Escherichia coli</i>	15	2,2	(Bowman <i>et al.</i> 1973)
<i>Glycine max</i>	32	0,4	(Yoon <i>et al.</i> 2000)
<i>Plasmodium falciparum</i>	52	35	(Haider <i>et al.</i> 2005)
Próstata rata	100	1,1	(Samejima y Yamanoha 1982)
Próstata rata	15	-	(Pegg <i>et al.</i> 1981)
<i>Senecio vulgaris</i>	21	4	(Graser y Hartmann 2000)
<i>Sulfolobus solfataricus</i>	3850	7,9	(Bachrach U 1989)
<i>Thermotoga maritima</i>	20	-	(Korolev <i>et al.</i> 2002)
<i>Trypanosoma brucei</i>	200	0,1	(Bitonti <i>et al.</i> 1984)

Tabla 3. Tabla con los valores de k_M para diversas PMT.

Origen PMT	K_M^{Put} (μM)	K_M^{AdoMet} (μM)	Referencia
<i>Calystegia sepium</i>	120	-	(Teuber <i>et al.</i> 2007)
<i>Datura stramonium</i>	281	-	(Teuber <i>et al.</i> 2007)
<i>Datura stramonium</i>	108	42	(Biastoff <i>et al.</i> 2006)
<i>Datura stramonium</i>	310	100	(Walton <i>et al.</i> 1994)
<i>Hyoscyamus albus</i>	277	203	(Hibi <i>et al.</i> 1992)
<i>Lycopersicon esculentum</i>	113	-	(Teuber <i>et al.</i> 2007)
<i>Solanum dulcamara</i>	169	-	(Teuber <i>et al.</i> 2007)
<i>Solanum tuberosum</i>	242	-	(Stenzel <i>et al.</i> 2006)

En el caso de *AtACL5* es más difícil juzgar sus parámetros cinéticos debido a que la nuestra es la primera caracterización de una tSPMS. Al compararlo con las afinidades descritas de algunas SPMS (Tabla 4), también resultan bastante elevadas. Quizás *ACL5* requiere también una modificación postraduccional que no se produce en *E. coli*.

Tabla 4. Tabla con los valores de K_M para diversas SPMS.

Origen SPMS	K_M^{Spd} (μM)	$K_M^{AdoMetdc}$ (μM)	Referencia
Bazo humano	200	1	(Kajander <i>et al.</i> 1989)
Bazo oveja	84	-	(Jean <i>et al.</i> 1988)
Cerebro oveja	60	0,1-1	(Pajula y Raina 1979) (Pajula 1983)
Próstata rata	20	-	(Pegg <i>et al.</i> 1981)
<i>Sulfolobus solfataricus</i>	1540	7,9	(Bachrach U 1989)

Con respecto a la *DsPMT* no fue necesario realizar ningún ensayo pues sus K_M eran ya conocidas, 108 μM para la putrescina y 42 μM para el AdoMet (Biastoff *et al.* 2006).

3. Modificación del centro activo de SPDS y tSPMS

La comparación directa de las secuencias primarias de las cuatro aminopropil transferasas de *A. thaliana* (*AtSPD1*, *AtSPD2*, *AtSPM1* y *AtACL5*) y la PMT de *D. stramonium* (*DsPMT*) (Figura 33) muestra un grado de similitud tan alto a lo largo de toda la proteína, que resultaba imposible determinar los aminoácidos esenciales para la actividad enzimática, y mucho menos seleccionar los residuos diferenciales entre las distintas enzimas, que justificasen la especificidad de sustrato de cada una de ellas.

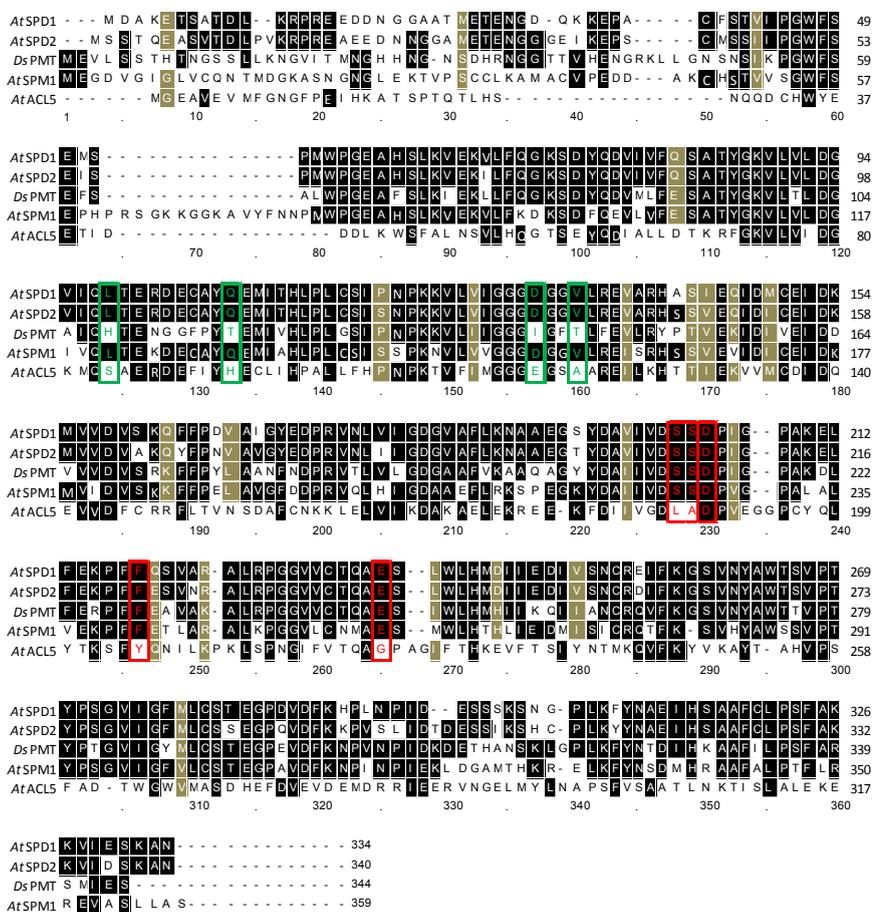


Figura 33. Alineamiento de los aminoácidos de las aminopropil transferasas de *A. thaliana* y de la PMT de *D. stramonium*. En negro se marcan los aminoácidos completa o mayoritariamente conservados y en gris los parcialmente conservados. En verde se resaltan los aminoácidos mutagenizados para convertir una SPDS en una PMT, y en rojo los aminoácidos mutagenizados para convertir una ACL5 en SPD1.

Por ello, parecía una estrategia más apropiada elaborar modelos tridimensionales de estas enzimas, para comparar las estructuras y las identidades de los distintos aminoácidos que componen sus centros activos. Este abordaje *in silico* fue facilitado por la disponibilidad de la estructura tridimensional de una SPDS de *T. maritima* obtenida por cristalografía de rayos X (Korolev *et al.* 2002), así como otras estructuras con evidencia experimental,

como las SPDS y SPMS de humanos (códigos PDB: 2O06 y 2O0L) y la tSPMS de *Thermus thermophilus* (código PDB: 1UIR). A pesar de la distancia evolutiva, estas estructuras muestran un alto grado de similitud conformacional en el centro activo, lo que indicaba que la modelización sería una estrategia razonable para obtener información tridimensional sobre la estructura de la PMT, cuyo punto de divergencia respecto a SPDS es incluso más reciente.

Con la colaboración del Dr. Alberto Marina (Unidad de Cristalografía de Macromoléculas del Instituto de Biomedicina de Valencia, CSIC), obtuvimos los modelos de las estructuras tridimensionales de las cuatro aminopropil transferasas y la PMT (ver Materiales y Métodos, página 135). Las comparaciones de SPDS frente a PMT (Figura 34), y de SPDS frente a tSPMS (Figura 35), nos permitió sacar las siguientes conclusiones:

- En los sitios de unión para AdoMet y AdoMetdc en PMT y SPDS, respectivamente, pueden detectarse cambios significativos. En concreto, los aminoácidos D131 y Q107 de la *AtSPD1*, ambos cargados negativamente, son incompatibles con el grupo carboxilo del AdoMet (Korolev *et al.* 2002). En la PMT, estos dos aminoácidos son sustituidos por I141 y T117, ampliando la cavidad en la que debe situarse este extremo de la molécula. Otras sustituciones importantes serían las de V134 y L98 por T144 y H108 respectivamente, que cambian residuos hidrofóbicos por residuos polares, que parecen necesarios para estabilizar el grupo carboxilo del AdoMet (Figura 27).
- En el centro activo de ACL5 (tSPMS) es más difícil identificar los residuos diferenciales que justifiquen la preferencia de la espermidina como sustrato, frente a la putrescina de SPD1. Parece ser que la putrescina podría acomodarse perfectamente en el espacio utilizado en ACL5 para la espermidina, pero esta putrescina quedaría poco fijada, por lo que no podría realizarse la reacción. Una de las diferencias más notables entre ambas estructuras, con respecto a la fijación del sustrato, es la del aminoácido D204 de SPD1 que, aunque está conservado en ACL5 (como D189), se encuentra más alejado de la espermidina permitiendo su correcto acomodo, pero sin llegar a interactuar con

ella; la posición de este ácido aspártico (D) puede ser debida a los aminoácidos previos, que en SPD1 son los aminoácidos S202 y S203, mientras que en ACL5 son L187 y A188 y, también, otro modo de aproximar dicho residuo sería la sustitución de este ácido aspártico por un ácido glutámico (E), con una cadena lateral un poco más larga, que podría aproximarse el grupo carboxilo a la poliamina. Otra diferencia que puede explicar el acoplamiento de la poliamina, es la posición de la cadena D189-A188-L187-D186 en ACL5, comparada con D204-S203-S202-D201 en SPD1. En ACL5 la presencia del Y205 podría interactuar con el D186 creando una rigidez en toda la cadena, alejándola de la poliamina, mientras en SPD1 esa posición está ocupada por F218, siendo la fenilalanina un aminoácido que al carecer del grupo hidroxilo no puede interactuar con la cadena. Por último, estaría la posición E236 de la SPD1 que, aunque se encuentra un poco alejada de la putrescina, podría estabilizarla, mientras que, en ACL5, este aminoácido es la G224, sin ningún tipo de cadena lateral.

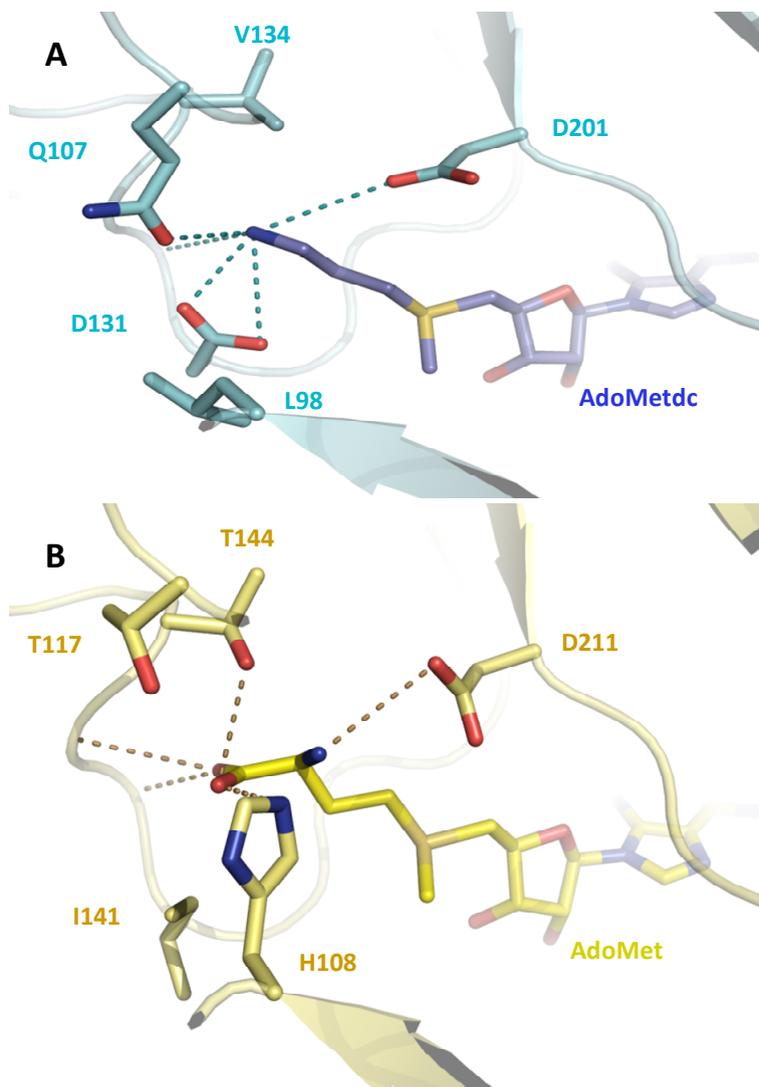


Figura 34. Comparación del centro activo de la SPD1 de *A. thaliana* modelizada con el AdoMetdc (A) y la PMT de *Nicotiana tabacum* con el AdoMet (B) (Figura cedida por Eugenio Gómez Minguet).

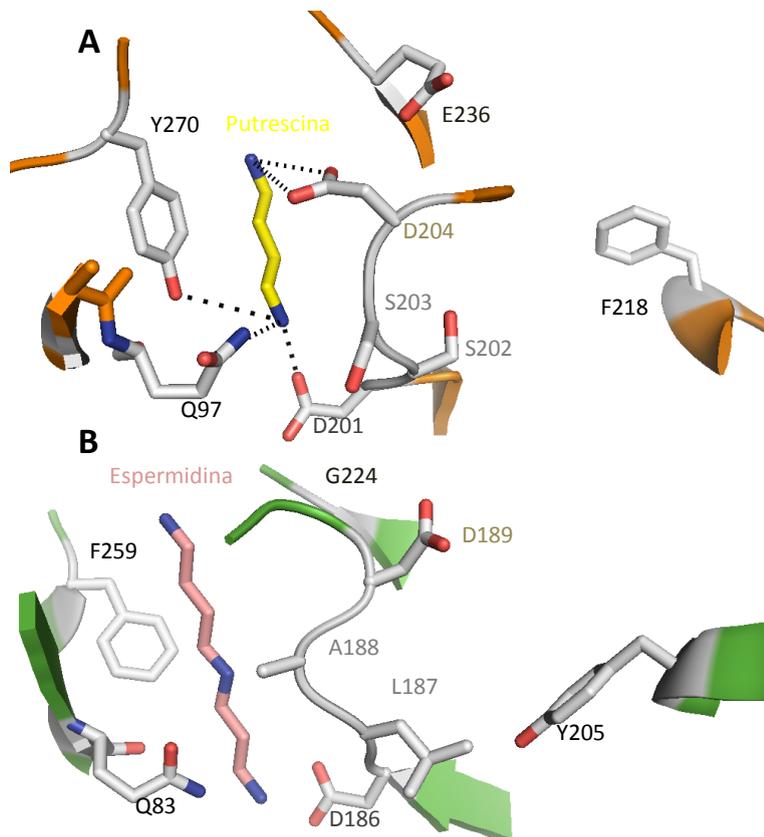


Figura 35. Comparación del centro activo de la SPD1 de *A. thaliana* modelizada con la putrescina (A) y ACL5 de *A. thaliana* con la espermidina (B).

Una vez analizados los centros activos de los enzimas, decidimos realizar las mutagénesis dirigidas indicadas en la tabla 5, para intentar conferir actividad espermidina sintasa a *AtACL5*, y para intentar conferir actividad putrescina-N-metil transferasa a la *AtSPD1*.

Comenzamos construyendo las versiones mutantes de *AtACL5*, de las cuales $ACL5_{L187S + A188S}$ y $ACL5_{G224E}$, generaron versiones insolubles y por lo tanto, hubo que descartarlas. Mientras tanto, las versiones $ACL5_{D189E}$ y $ACL5_{Y205F}$, sí dieron lugar a proteínas solubles pero que carecían de cualquier tipo de actividad espermidina sintasa y que además habían perdido por completo su actividad nativa. El hecho de que cualquier cambio que realicemos provoque

una pérdida total de la actividad enzimática nos indica que, probablemente, los aminoácidos mutagenizados son esenciales para el correcto funcionamiento del enzima, y que su modificación aislada no debe ser suficiente para cambiar la actividad.

Con respecto a las mutagénesis de SPD1 para convertirla en una putrescina-N-metil transferasa sabíamos que, cambios puntuales en uno o dos aminoácidos eran incapaces de modificar la actividad (Biastoff *et al.* 2009a), por lo que construimos el tetramutante SPD1_{L98H + Q107T + D131I + V134T}, que no presentó ningún tipo de actividad putrescina-N-metil transferasa y, que además, perdió su actividad nativa como espermidina sintasa; por lo que razonablemente podemos concluir que la especificidad de sustrato no reside exclusivamente en los aminoácidos del centro activo.

Tabla 5. Nombres de las proteínas mutantes y aminoácidos mutagenizados, para convertir AtACL5 en una SPDS, y AtSPDS en una PMT.

Nombre	AtACL5	AtSPD1	Mutagénesis sobre AtACL5
ACL5 _{L187S + A188S}	L187, A188	S202, S203	L187, A188→S187, S188
ACL5 _{D189E}	D189	D204	D189→E189
ACL5 _{Y205F}	Y205	F218	Y205→F205
ACL5 _{G224E}	G224	E236	G224→E224
Nombre	AtSPD1	DsPMT	Mutagénesis sobre AtSPD1
SPD1 _{L98H}	L98	H108	L98→H98
SPD1 _{Q107T}	Q107	T117	Q107→T107
SPD1 _{D131I}	D131	I141	D131→I131
SPD1 _{V134T}	V134	T144	V134→T134

DISCUSIÓN

Desde que comenzó la aplicación de aproximaciones de genética molecular al estudio de la función de las poliaminas en plantas, dos ideas fundamentales han ido consolidándose: 1) no todas las poliaminas cumplen funciones equivalentes a pesar de su similitud estructural, y 2) la ruta de biosíntesis de poliaminas se encuentra sujeta a una tasa elevada de evolución y selección. Esta Tesis ha contribuido experimentalmente a ilustrar ambos conceptos de la siguiente manera:

- hemos podido confirmar la función de ACL5 como una termoespermina sintasa *in vivo*, incluso cuantificando los niveles normales de termoespermina en distintos tejidos y condiciones de crecimiento de *Arabidopsis*.
- hemos identificado una pequeña familia de factores de transcripción de la clase bHLH (los genes *AJAX*), como mediadores más probables para la regulación por ACL5 de la diferenciación del xilema.
- hemos determinado los parámetros cinéticos de varias aminopropil transferasas de *A. thaliana* y confirmado experimentalmente, la importancia de ciertos residuos del centro activo para la funcionalidad de la espermidina sintasa.

Todos estos hallazgos dan pie a interpretaciones de distinto signo y a la propuesta de lo que consideramos es el modelo molecular más probable para la función de la termoespermina en el desarrollo de *A. thaliana*, como se discute a continuación.

1. ACL5, AJAX y desarrollo vascular: ¿una ruta única o dos vías paralelas?

Al iniciar esta Tesis, nada hacía sospechar que la termoespermina, un metabolito presente en bacterias termófilas y otros procariontes (Oshima 1979; Hosoya *et al.* 2004), también estuviese presente en las plantas. La atribución inicial de una actividad espermina sintasa, y no termoespermina sintasa, a ACL5 (Hanzawa *et al.* 2000) justificaba la propuesta de que la espermina

controlaba la formación del xilema evitando la muerte prematura de las células durante el proceso de diferenciación (Muñiz *et al.* 2008). La confirmación de que *ACL5* presenta actividad termoespermina sintasa permite refinar el modelo inicial, pero no proporciona por sí misma un mecanismo molecular que explique cómo se ejerce el control de la muerte celular.

La metodología que hemos empleado en esta Tesis para diseccionar este mecanismo ha sido la búsqueda de supresores extragénicos, una aproximación que ya ha demostrado su utilidad en la resolución de las vías de señalización hormonal de plantas (McCourt 1999). Aunque el éxito de este abordaje puede medirse por el elevado número de supresores encontrados, la cuestión fundamental es dilucidar la relevancia fisiológica de estos nuevos mutantes; es decir, discriminar si el mecanismo de supresión se debe a:

- la alteración de una función controlada por *ACL5* (en ese caso los genes supresores serían mediadores de la acción de *ACL5*).
- la compensación de la ausencia de *ACL5* mediante la activación de una ruta paralela (en ese caso los genes supresores identificarían una vía alternativa para el control de la muerte celular durante la diferenciación del xilema)
- la compensación de la falta de *ACL5* mediante una mutación neomórfica en algún elemento no relacionado con la función fisiológica de *ACL5* (en ese caso la supresión se podría considerar como un artefacto).

Aunque nuestros resultados no resuelven inequívocamente la relación entre *ACL5* y *AJAX*, sí que proporciona evidencia a favor de un modelo en el que los genes *AJAX* actúan como mediadores de *ACL5* en el control de la diferenciación del xilema:

- la supresión de *acl5* por parte de los supresores *ajax* afecta a todas las características observadas del fenotipo del mutante, lo cual sería muy difícil de explicar con dos rutas de señalización paralelas no solapantes.

- las mutaciones de los genes *AJAX*, en un fondo genético silvestre para *ACL5* no presentan ningún fenotipo aparente (datos no mostrados), por lo que no parece haber un efecto aditivo más propio de dos rutas independientes.
- los patrones de expresión de *ACL5* y *AJAX* solapan en la región de los haces vasculares atendiendo a los datos publicados (Figura 36), lo cual refuerza la idea de que actúan coordinadamente sobre los mismos tipos celulares.

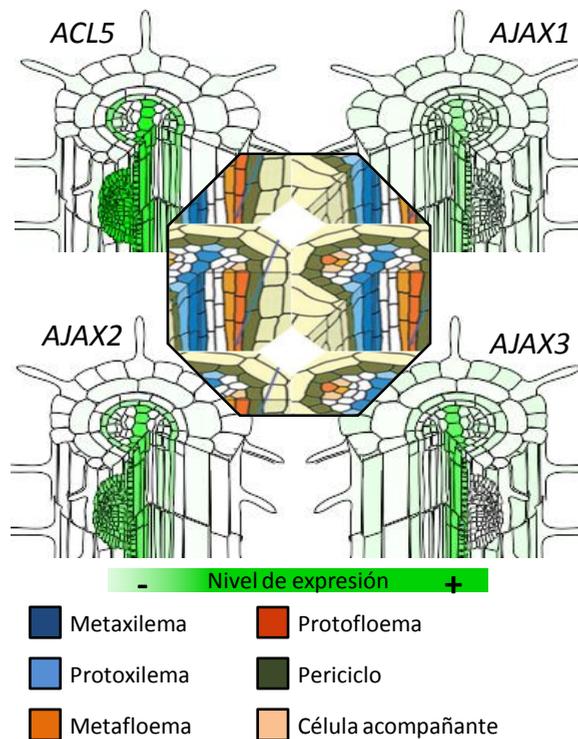


Figura 36. Patrones de expresión en la raíz de *ACL5*, *AJAX1*, *AJAX2* y *AJAX3*, según la herramienta “Deconvolved Root Expression Map Visualizer” (Cartwright *et al.* 2009). En la parte central se muestra un esquema de la estructura de los haces vasculares de la raíz.

- Las mutaciones en la uORF de, al menos, *AJAX1* suprimen el fenotipo enano de *acl5*, pero no el de otros mutantes enanos afectados en

diversas rutas de señalización hormonal como *axr2*, *gai1* o *dim* (Imai *et al.* 2006).

Para consolidar el modelo en el que los genes *AJAX* son mediadores de la señal de *ACL5*, sería necesaria alguna evidencia experimental adicional. Por ejemplo, que un mutante nulo para los tres genes *AJAX* fenocopie a *acl5*; o determinar el mecanismo bioquímico por el que la termoespermina regula la traducción de *AJAX*; o que la expresión de los genes *AJAX*, bajo el control del promotor de *ACL5* sea capaz de revertir el fenotipo mutante de *acl5*.

2. Las poliaminas y el control traduccional de *AJAX*.

El descubrimiento de que las mutaciones supresoras encontradas afectan al control traduccional de los factores de transcripción *AJAX* es especialmente interesante, porque sugiere que dicho control podría representar el nexo de unión entre *ACL5* y los *AJAX*.

El control traduccional de una ORF principal por parte de su 5'-UTR, y más concretamente, por alguna pequeña uORF allí contenida, es una de las formas más eficientes de regulación de la expresión génica (Morris y Geballe 2000; Hernandez-Sanchez *et al.* 2003). El estudio de estos procesos ha permitido identificar varios mecanismos a través de los cuales se ejerce dicho control. Por ejemplo:

- en la 5'-UTR, el mRNA puede presentar una estructura secundaria que dificulte el avance del ribosoma hacia el codón de inicio (Wang y Wessler 2001).
- aunque el AUG de la uORF no se encuentre en un contexto adecuado, algunos ribosomas, por el mecanismo de escaneo permeable, inician la traducción en este primer AUG, rebasando el AUG de la ORF principal, y generando una proteína diferente (Souciet *et al.* 1999).
- en caso de que se inicie la traducción de una uORF y ésta no sobrepase al AUG de la ORF principal, el ribosoma podrá acabar de traducir la uORF y después realizar un proceso de reiniciado para traducir la ORF

principal. La eficacia de este proceso de reiniciado depende del tamaño/tiempo de traducción de la propia uORF (Kozak 2001), del tamaño de fragmento intercistónico (Abastado *et al.* 1991) y de otros factores.

- la traducción de la uORF genera un pequeño péptido que actúa *in cis*, bloqueando al ribosoma, dificultando la traducción de la ORF principal (Law *et al.* 2001).

Los resultados de nuestros ensayos de transcripción-traducción *in vitro* muestran inequívocamente que la región 5'-UTR de los genes *AJAX* controla la traducción de la ORF principal. Con los datos que disponemos no se puede descartar completamente, que este control se ejerza mediante la modificación de la estructura secundaria de la región 5'-UTR, aunque nos parece más probable que la regulación implique a un pequeño péptido codificado por una de las uORFs allí contenidas. Los argumentos que hacen inclinarnos por dicho modelo son varios:

- 1) Todas las mutaciones encontradas suponen un cambio de aminoácido o la introducción de un codón de parada prematura, en la secuencia del pequeño péptido codificado por la uORF. Es decir, no hemos encontrado en ningún caso mutaciones silenciosas respecto al péptido que alterasen la estructura secundaria.
- 2) Los péptidos codificados por la uORF afectada en cada gen *AJAX* presentan un alto grado de conservación de secuencia en su extremo C-terminal, precisamente donde se localizan las mutaciones de cambio de aminoácido.
- 3) La existencia de mutaciones supresoras de *ac15* en el gen que codifica la proteína ribosomal RPL10A (Imai *et al.* 2008), que es diana de diversos inhibidores del ribosoma (Xia *et al.* 2005), relaciona la función ribosomal con la regulación de *AJAX* y permite imaginar que dicha proteína del ribosoma podría ser la diana natural del pequeño péptido codificado en la 5'-UTR de los genes *AJAX*.

Un modelo muy atractivo que se intuye a partir de los resultados de nuestro trabajo es que la termoespermina, o la propia proteína ACL5, regulen la traducción de los factores de transcripción AJAX interfiriendo con la actividad del pequeño péptido. Mecanismos similares de regulación en una ruta de señalización se han descrito, por ejemplo, para la sacarosa y *ATB2* (Wiese *et al.* 2004; Rahmani *et al.* 2009), y para la espermidina/espermina y *SAMDC* (Raney *et al.* 2000; Hanfrey *et al.* 2005).

Existen antecedentes que conectan las poliaminas con el control traduccional. El primero de ellos es el mecanismo de autorregulación de la biosíntesis de poliaminas, exclusivo de mamíferos, ejercido a través de la regulación postraduccional de la ornitina descarboxilasa (ODC) por parte de una proteína llamada antizima (OAZ) (Hayashi *et al.* 1996) que secuestra la ODC y la transporta a la maquinaria de degradación del proteosoma 26S. El control traduccional de la OAZ es realizado por las propias poliaminas puesto que *OAZ* está compuesto por dos ORFs parcialmente solapadas, siendo la que está aguas abajo la que contiene la actividad funcional aunque, para poder ser traducida, debe producirse previamente la traducción de la situada aguas arriba, seguido de un cambio de la pauta de lectura +1, que es mediado por altos niveles de poliaminas (Ivanov y Atkins 2007).

El segundo caso es un ejemplo muy similar al de nuestro modelo: el control traduccional de la *SAMDC* en plantas (Franceschetti *et al.* 2001), por parte de dos uORFs, en función de los niveles de poliaminas. En la 5'-UTR de la *SAMDC* existen dos uORFs parcialmente solapantes, de las cuales la segunda, situada aguas abajo, inhibe la traducción de la ORF principal a través de su péptido, mientras la primera, situada aguas arriba, impide la traducción de la segunda al solapar su secuencia con la de la segunda (Figura 37). A niveles bajos de poliaminas se traduce la primera uORF y por lo tanto se salta la segunda, mientras que a niveles altos se traduce la segunda uORF que inhibe la traducción de la ORF principal (Ivanov *et al.* 2010).

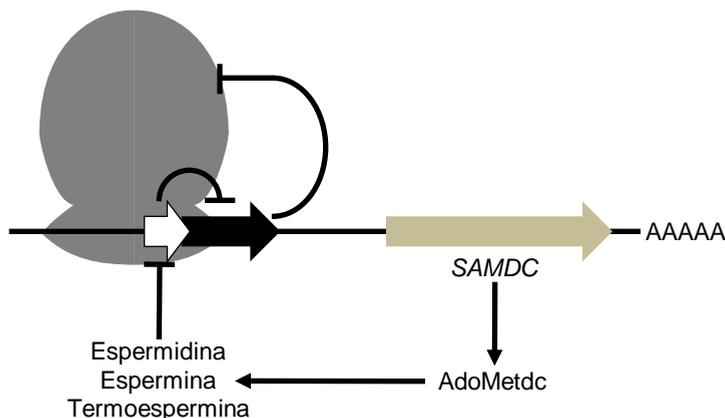


Figura 37. Modelo de traducción de la SAMDC. La flecha gris representa el fragmento de mRNA que contiene la pauta de lectura abierta del SAMDC, la flecha negra representa el primer péptido que inhibe la traducción de SAMDC, la flecha blanca representa el segundo péptido que inhibe la acción del primero.

Por tanto, el modelo de trabajo sobre el que realizar el trabajo futuro del laboratorio se representa en la Figura 38. Se basa en que el péptido codificado por uORF inhibe en *cis* la traducción de la ORF principal de AJAX, siendo la diana de este péptido, el componente ribosomal RPL10. La termoespermina sintetizada por ACL5 elimina esta inhibición, ya sea interaccionando con RPL10 y/o el péptido, o generando un cambio de la pauta de lectura +1, que evite la síntesis del péptido. Nuestros intentos por encontrar variaciones en la traducción *in vitro* de la ORF principal de AJAX2 tras la adición de termoespermina no nos han proporcionado pruebas al respecto, bien porque este efecto esté enmascarado por otros efectos “tóxicos” derivados de la concentración utilizada; bien porque la síntesis de termoespermina deba producirse *in situ*, asociada a la traducción; bien porque la modificación de la actividad del pequeño péptido o la protección de RPL10A requieran una modificación enzimática implicando a la termoespermina, pero dicha enzima no está presente en nuestro sistema experimental de traducción *in vitro*; o bien porque no exista dicho vínculo entre ACL5 y los AJAX. También existe la posibilidad de que sea la proteína ACL5, y no el producto de su actividad enzimática, la que interfiera con la traducción de los AJAX. Se trataría entonces de una proteína multifuncional; en este sentido se han documentado casos de “moonlighting” para enzimas (Gancedo y Flores 2008), pero en este momento

no existe ningún indicio que lo apoye, más allá de que la complementación que se puede conseguir del fenotipo *acl5*, mediante la adición de termoespermina, es muy leve (Takehi *et al.* 2008).

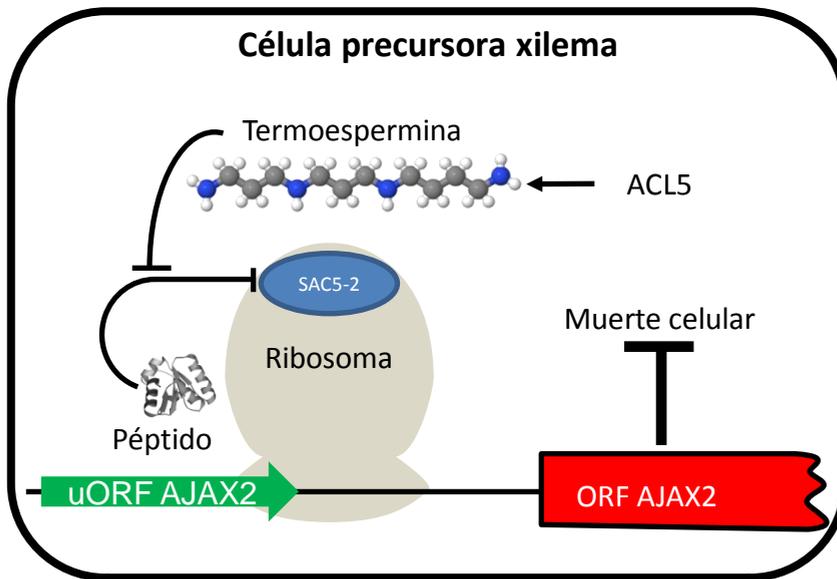


Figura 38. Modelo de traducción de AJAX2 en las células precursoras del xilema donde se expresa ACL5.

Por último, el modelo contempla que los genes *AJAX* codificarían factores de transcripción que regularían genes implicados en la muerte celular durante la diferenciación del xilema, algo que nuestros análisis transcriptómicos apoyan parcialmente. En términos mecanísticos, es importante hacer notar que las proteínas *AJAX* parecen carecer del dominio básico característico de los factores de transcripción bHLH (Toledo-Ortiz *et al.* 2003). Esto sugiere que las proteínas *AJAX* serían reguladores transcripcionales incapaces de unirse al DNA directamente, y requerirían la interacción con otros factores de transcripción. En *A. thaliana* se ha descrito al menos un caso en el que una proteína HLH (HFR1) regula la transcripción a través de la formación de heterodímeros con otros factores de transcripción de la familia bHLH (Hornitschek *et al.* 2009). Por supuesto, la identificación de interactores de las proteínas *AJAX* permitiría sustentar experimentalmente esta hipótesis.

En este modelo, las dianas reguladas por los genes *AJAX* determinarían la muerte celular de las células del metaxilema y el correcto desarrollo de los haces vasculares. Así pues, la termoespermina jugaría un papel de retardante de la muerte de estas células del metaxilema, permitiendo que se completase el proceso de diferenciación y formación del mismo. En un mutante *acl5*, la ausencia de termoespermina, provoca la muerte prematura del metaxilema impidiendo su correcto desarrollo. En un doble mutante *acl5 ajax*, la deficiencia en termoespermina sería compensada por la inexistencia o la modificación del péptido, que ya no podría inhibir la traducción de *AJAX*.

3. Los genes *AJAX* y el origen del xilema

El xilema es un tejido conductor, que surgió por las nuevas necesidades que tenían los organismos fotosintéticos y acuáticos que comenzaron a colonizar el medio terrestre. Estas plantas terrestres primigenias debieron conciliar dos efectos biofísicos opuestos; por un lado, el beneficio de aumentar la superficie del organismo dedicada a la captación de CO₂ y luz para el proceso fotosintético y, por otro, el perjuicio que representa el aumento de la ratio área:volumen en pérdidas de agua. Fueron tres innovaciones vitales las que resolvieron este conflicto: el desarrollo de estomas, la generación de cutículas y el desarrollo de un nuevo tejido capaz de transportar el agua desde el suelo hacia las partes aéreas (Raven 1993). Este tejido, el xilema, está formado por un nuevo tipo celular, las traqueidas, cuyo desarrollo está caracterizado por la formación de una pared celular secundaria, la lignificación de la misma y, finalmente, un proceso de muerte celular programada.

¿Cómo fueron estas plantas primigenias capaces de colonizar el medio terrestre y generar este nuevo tejido? Para encontrar una respuesta podemos analizar algunos de estos procesos de desarrollo como la síntesis de lignina. La capacidad de sintetizar lignina ya estaba presente en las algas aunque con funciones de protección contra ataques microbianos y daño por luz ultravioleta (Martone *et al.* 2009), por lo que puede decirse que estas primeras plantas pudieron readaptar una función ya existente a una nueva función. ¿Pudo ocurrir algo parecido con la termoespermina? La biosíntesis de termoespermina debe de ser relativamente importante para las plantas, puesto que se ha conservado

desde que la adquirieron por transferencia horizontal a partir de los procariontes (Minguet *et al.* 2008); esta conservación podría justificarse por su importante papel en el desarrollo del xilema, tal como se ha puesto de manifiesto en este trabajo; sin embargo, existen plantas no vasculares, como el musgo *Physcomitrella patens* o el alga *Chlamydomonas reinhardtii*, que parecen tener en su genoma una copia de una termoespermina sintasa, lo que sugiere que la termoespermina debería jugar otro papel en las plantas primigenias y que fue reclutada en el momento de la aparición de los tejidos vasculares para desempeñar una nueva función.

Con respecto al proceso de muerte celular programada de las traqueidas en *A. thaliana*, se cree que ésta puede ser controlada por los genes *VND6* (Ohashi-Ito *et al.* 2010) y *VND7* (Ohashi-Ito y Fukuda 2010), el cual regula positivamente algunas enzimas hidrolíticas como XCP1, XCP2 y XSP1 (Ohashi-Ito y Fukuda 2010; Yamaguchi *et al.* 2010), de modo indirecto a través de un elemento *cis* de 11 pb, la secuencia TERE, presente en sus promotores (Pyo *et al.* 2007). El promotor de *ACL5* posee una pseudocaja TERE, que difiere en un solo nucleótido de la secuencia consenso, por lo que quizás también podría ser una diana de estos genes, que controlarían el proceso de muerte celular programada a través de *ACL5* y de los *AJAX*, además de inducir los enzimas hidrolíticos ya citados.

¿Qué ocurrió a nivel evolutivo con los genes *AJAX*? ¿También fueron reclutados como *ACL5* para una nueva función, o pudieron originarse *de novo* coincidiendo con la aparición del xilema? Parte de la respuesta podría encontrarse en nuestro estudio sobre la conservación de los *AJAX* en el reino vegetal, basado en las 731 secuencias recopiladas a partir de las bases de datos de genomas vegetales, comprendiendo desde las plantas superiores como *A. thaliana* o arroz, hasta algas unicelulares como *C. reinhardtii*, pasando por musgos como *P. patens*.

Asimismo, teniendo en cuenta que los *AJAX* son los únicos miembros de la familia de bHLHs que tienen una uORF, decidimos también buscar secuencias teóricas de uORFs que codificasen péptidos similares a los de los *AJAX*. Así encontramos que existían 12 secuencias uORFs de este tipo, en otras 9 plantas

superiores (*Medicago truncatula*, arroz, manzano, caña de azúcar, algodón, pomelo, vid, *Adiantum capillus-veneris* y *Welwitschia mirabilis*) (Hayden y Jorgensen 2007). De estas 12 uORFs, 6 de ellas, las de *M. truncatula*, arroz y vid, están situadas aguas arriba de un bHLH, mientras que las otras 6 resultaron ser secuencias truncadas, sin información sobre las ORFs contiguas.

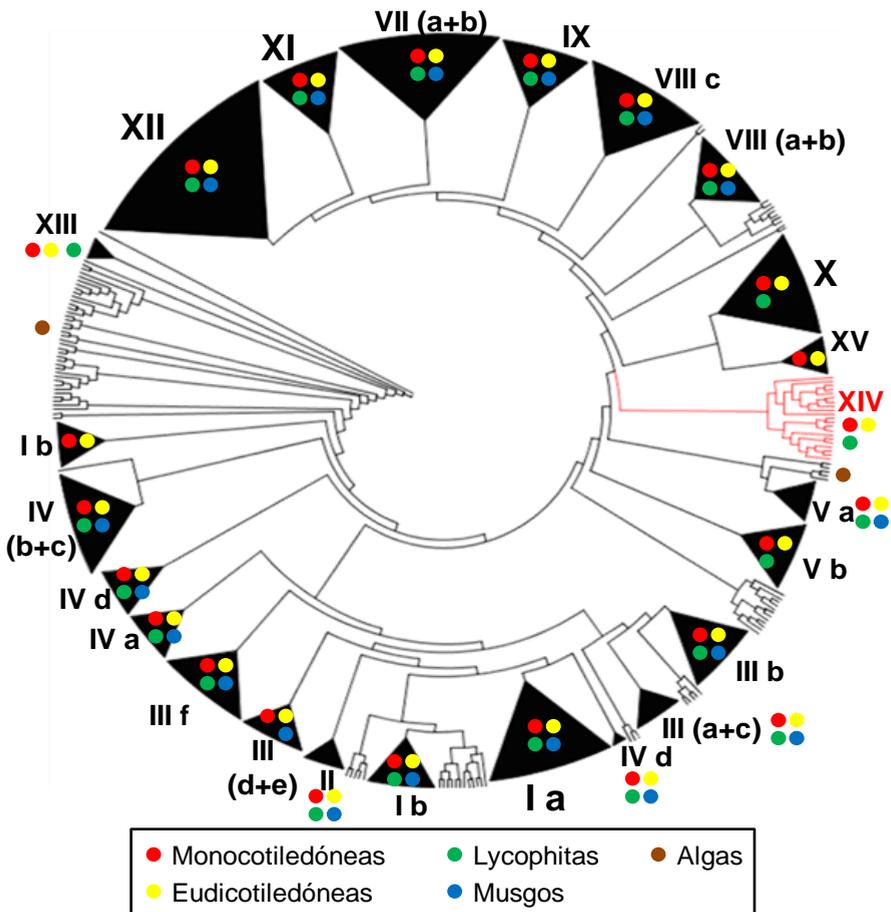


Figura 39. Árbol filogenético de las proteínas bHLH de plantas. Los grupos en los que se dividen los bHLH están basados en (Pires y Dolan 2009). Los triángulos negros representan todas las secuencias de cada grupo condensadas, la amplitud de cada triángulo es proporcional al número de secuencias del grupo. Todos los grupos se muestran condensados excepto el grupo XIV donde se incluyen los genes AJAX (en color rojo); el resto de líneas no condensadas (en negro) representan las secuencias huérfanas que no pertenecen a ningún grupo. El código de colores representa la taxonomía de las secuencias incluidas en cada grupo.

Con estas 731 secuencias realizamos un árbol filogenético (Figura 39), en el cual las secuencias de los 4 genes *AJAX* de *Arabidopsis* junto con otras 17, entre las que se encuentran las 6 de *Medicago*, arroz y vid ya citadas, quedaban incluidas dentro del subgrupo XIV. Este subgrupo contiene 21 secuencias pertenecientes a 10 especies distintas (Figura 40), siendo todas ellas de plantas superiores o licofitas, pero en ningún caso musgos o algas. De estas 21 secuencias, sabíamos que 10 de ellas tenían una estructura genómica de tipo *AJAX*, una uORF aguas arriba de un bHLH. Al revisar la secuencia genómica de las 11 restantes encontramos que todas ellas tenían esta misma estructura y que además, todos los péptidos codificados por estas uORFs presentan un alto grado de similitud (Figura 41), especialmente en la región C-terminal, que es donde se concentran las mutaciones de cambio de aminoácido de los alelos supresores de *AJAX*.

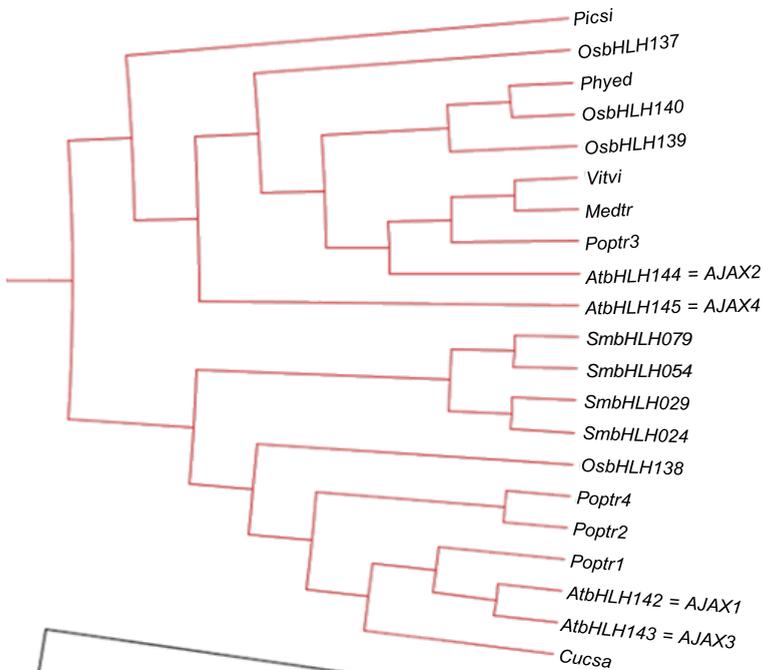


Figura 40. Detalle del subgrupo XIV de la figura anterior. Las abreviaturas quieren decir: *Piccsi* – *Picea sitchensis*, *Os* – *Oryza sativa*, *Phyed* – *Phyllostachys edulis*, *Vitvi* – *Vitis vinifera*, *Medtr* – *Medicago truncatula*, *Poptr* – *Populus trichocarpa*, *At* – *Arabidopsis thaliana*, *Sm* – *Selaginella moellendorffii*, *Cucsa* – *Cucumis sativa*.

Así pues, los genes *AJAX* están conservados exclusivamente entre las plantas vasculares (incluyendo a la más primitiva, *Selaginella moellendorffii*), y siempre presentan una uORF también conservada en sus 5'-UTR respectivas.

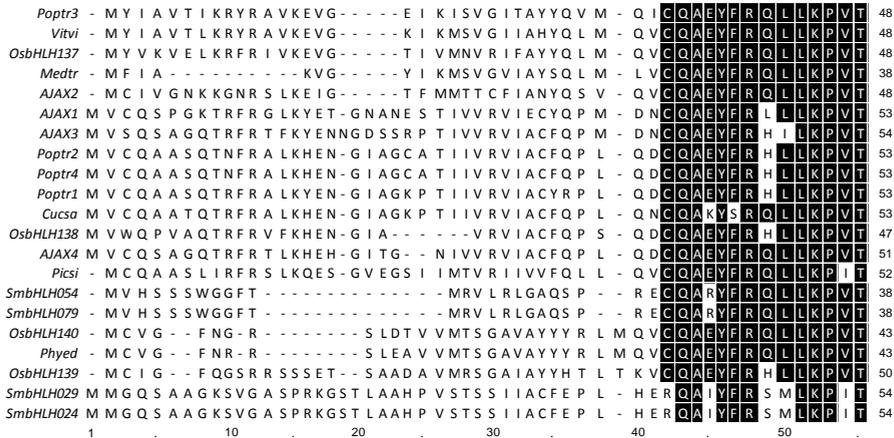


Figura 41. Alineamiento de los aminoácidos de los péptidos codificados por las uORFs situadas aguas arriba de los genes bHLH del subgrupo XIV. En negro se marcan los aminoácidos completa o mayoritariamente conservados en el extremo C-terminal.

Hay pues dos hechos que parecen apoyar la teoría de que los genes *AJAX* se originaron de forma coincidente con el de la regulación de la formación del xilema por *ACL5*:

- el hecho de que no aparezcan homólogos de *AJAX* en plantas no vasculares (Figura 42), especialmente en *P. patens*, un musgo con el genoma completamente secuenciado y que posee 98 bHLH, un número del mismo orden de magnitud que *A. thaliana* o arroz.
- la gran mayoría de las subfamilias en que se dividen los bHLH en el reino vegetal tienen miembros entre los diversos tipos de plantas, mientras que el grupo XIV es exclusivo de plantas vasculares

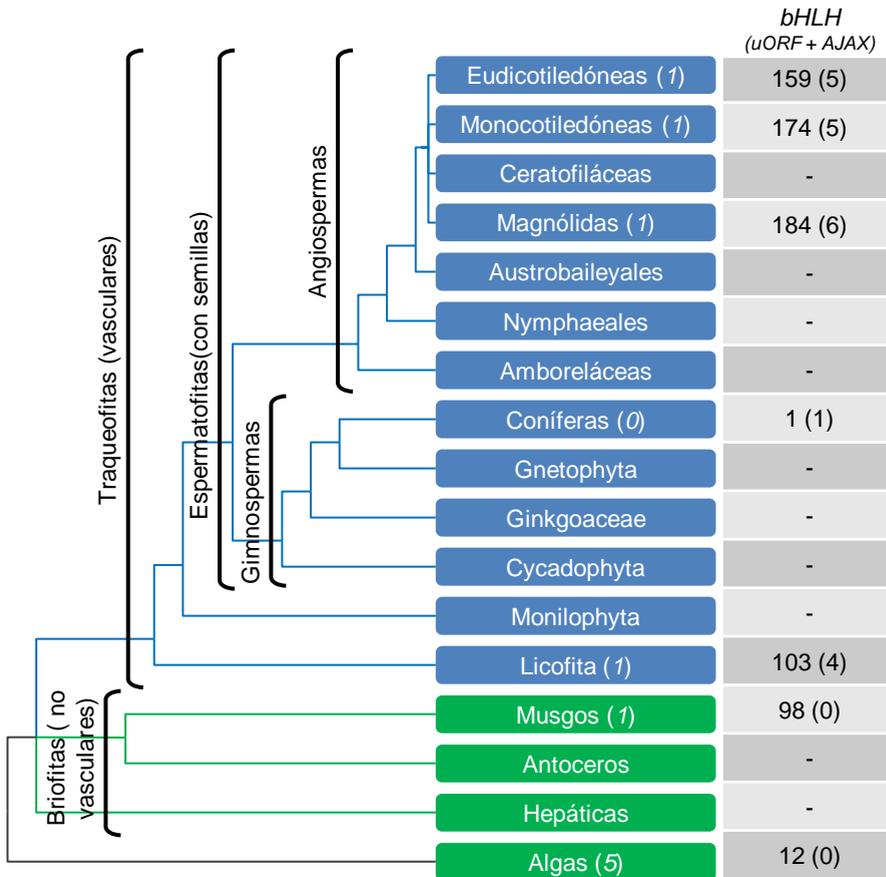


Figura 42. Esquema evolutivo del reino vegetal, indicando el número de genes *bHLH* y *AJAX*. Al lado de cada clado, se indica en cursiva, el número de especies con su genoma secuenciado que hemos utilizado en la búsqueda. En la columna de los genes *bHLH* se indica cuántos de ellos hemos encontrado y, entre paréntesis, cuántos de ellos se parecen a un gen *AJAX* y además tienen una uORF en su 5'-UTR.

4. Mecanismos bioquímicos de las aminopropil transferasas

La familia de las aminopropil transferasas (SPDS, SPMS y tSPMS) y la de las putrescina-N-metil transferasas (PMT) constituyen un grupo de enzimas con un alto grado de similitud entre ellas, tanto a nivel de secuencia como de estructura. Este alto grado de parecido en enzimas con funciones divergentes,

nos pareció un modelo adecuado para reproducir aquellos cambios hipotéticos que han sufrido durante la evolución y comprobar experimentalmente su efecto.

Así pues, era necesaria la determinación de las constantes cinéticas de las enzimas analizadas, como testigo de los cambios en las actividades. Este resultado significó una cierta sorpresa, ya que los parámetros de K_M observados en nuestras proteínas purificadas presentaron, en algunos casos, valores relativamente alejados de los obtenidos para las mismas enzimas de otros organismos. Además de las posibles explicaciones avanzadas en los resultados de esta Tesis, en el apartado de “Características cinéticas de SPDS, tSPMS y PMT” (Página 73), también habría que considerar que en las reacciones de biosíntesis de poliaminas, además de la propia poliamina, se genera un producto secundario, el 5'-metiltioadenosina (MTA), que es la molécula resultante de eliminación del grupo aminopropilo del AdoMetdc. En condiciones fisiológicas, este MTA es degradado por MTA quininas (Sauter *et al.* 2004), pero en condiciones *in vitro* se acumula y actúa como un inhibidor tanto de las SPDS (Dufe *et al.* 2005) como de las SPMS (Ikeguchi *et al.* 2006), por lo que puede afectar a nuestras determinaciones de las constantes cinéticas.

Una base importante de nuestros estudios relacionando la estructura y la función es la asunción de que las aminopropil transferasas y las putrescina-N-metil transferasas, son proteínas de naturaleza modular, es decir, que diferentes partes de las proteínas se encargan de funciones diferentes. De hecho, la espermina sintasa de *Homo sapiens* se puede dividir en diversos módulos, de los cuales el N-terminal es muy parecido al de una S-adenosilmetionina descarboxilasa, mientras que el C-terminal, es muy similar al de las espermidina sintasas, con la diferencia de poseer un espacio mayor para el anclaje de sustratos, lo cual le permite acomodar una triamina como sustrato y generar una tetraamina como producto (Wu *et al.* 2008).

Esta visión modular parece confirmarse cuando comparamos las actividades SPDS y PMT en *D. stramonium*: proteínas en las que la zona de unión a la putrescina parece encontrarse en la región C-terminal, mientras que la región de reconocimiento de AdoMetdc o del AdoMet respectivamente, se encuentra en la región N-terminal. De acuerdo con esta observación, las actividades enzimáticas

de las proteínas quiméricas, realizadas entre la SPD1 y la PMT de *D. stramonium*, quedan definidas en este caso por la especificidad para reconocer el AdoMetdc o del AdoMet, que determina la región N-terminal (Figura 37) (Biastoff *et al.* 2009). De manera análoga, cuando se comparan las actividades ACL5 y SPMS, la región C-terminal reconoce siempre la espermidina como sustrato, pero con orientaciones opuestas, siendo ésta la razón por la que cada enzima produce específicamente una de las dos tetraaminas posibles.

Sin embargo, los resultados de nuestras mutagénesis dirigidas sobre los residuos diferenciales entre SPDS y PMT no han servido para confirmar el modelo hipotético de evolución de la función, aunque tampoco los desmienten. El hecho de que la mutación de cada aminoácido del centro activo afecte fundamentalmente a la funcionalidad completa de la enzima ya ha sido observado en anteriores ocasiones para residuos similares y distintos de los seleccionados en base a nuestro análisis informático. Por ejemplo:

- Las mutaciones D201A, D201N, D276N y E353Q en la SPMS de humanos reducen drásticamente su actividad enzimática (Wu *et al.* 2008).
- Las mutaciones G56S, V132G y I150T, en la SPMS de humanos, reducen los niveles de espermina y son la causa del síndrome de Synder-Robinson (de Alencastro *et al.* 2008; Becerra-Solano *et al.* 2009).
- Las versiones mutantes de Y76F, D101I, D170A y D173A en *T. maritima*, presentan valores las K_M entre 12 y 100 veces superiores a las versiones silvestres (Wu *et al.* 2007).
- El intento de convertir la PMT de *D. stramonium* en una SPDS, mediante las mutaciones T117Q, I136V y I141D, resultó, en el mejor de los casos, en el mantenimiento de la mitad de la actividad PMT, sin la aparición de ninguna actividad SPDS (Teuber *et al.* 2007).
- Diferentes combinaciones de mutaciones (L70H, R73N, D74G, E75G, C76F, A77P, Q79T, D103I, G105F, R108F) generando mutantes simples, dobles, triples... hasta un decamutante, en el cual se intentaba

determinar cuántos y cuáles son los aminoácidos que debemos cambiar para conseguir la interconversión. Y habrá que tener en cuenta el “camino” seguido por la evolución. Es decir, es probable que aunque los cambios predichos por nuestros análisis sean los responsables últimos de la diferencia en actividades, también sean necesarios cambios “preparativos” en otros lugares fuera del centro activo que permitan la fijación de los nuevos cambios sin causar efectos deletéreos en la actividad.

CONCLUSIONES

Si recordamos los objetivos que nos habíamos planteado al iniciar este trabajo, estos eran: intentar comprender cuáles son los mecanismos moleculares de control de la termoespermina sobre el desarrollo del xilema, y encontrar qué diferencias estructurales confieren especificidad a las aminopropil transferasas.

Con respecto a los objetivos planteados, podríamos decir que las conclusiones de esta Tesis son:

1. El papel de ACL5 es impedir la muerte prematura durante la diferenciación del xilema. El mecanismo más probable es la promoción de la traducción de los genes *AJAX*, que codifican factores de transcripción bHLH.
2. La discriminación de sustratos por parte de las aminopropil transferasas y putrescina-N-metil transferasas no se explica únicamente por diferencias en los centros activos.

Además, durante el desarrollo de este trabajo hemos llegado también a las siguientes conclusiones adicionales:

3. La termoespermina presente en *Arabidopsis thaliana* se sintetiza a través de la actividad ACL5.
4. El origen evolutivo del mecanismo regulatorio de los genes *AJAX* sobre el desarrollo del xilema coincide con la aparición de la vasculatura en las plantas.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Características y manejo del material biológico

1.1. Material vegetal

En esta Tesis se ha usado como sistema experimental la planta *Arabidopsis thaliana*, más concretamente sus ecotipos Col-0, La-er, La-0 y diversos mutantes cuyos fondos genéticos eran Col-0 y La-er.

El cultivo de las plantas de *A. thaliana* se realizó habitualmente en el invernadero y en cámaras de cultivo con un rango de temperatura 21-23°C, humedad relativa entre 50-80%, un fotoperíodo de día largo (16 horas de luz y 8 horas de oscuridad) y se iluminaron mediante tubos fluorescentes que proporcionan luz blanca con una intensidad de 120 mmol/m²s. El sustrato de cultivo consistió en una mezcla de turba:perlita:vermiculita (2:1:1), que más adelante llamamos "tierra". Las plantas se regaron con una mezcla nutritiva, según fue descrito por Hoagland (Hoagland 1920).

Cuando el cultivo de las plantas se realizó *in vitro*, se utilizó un medio MS (Murashige y Skoog 1962) manteniendo las mismas condiciones de luz, fotoperíodo, temperatura y humedad, descritas previamente.

1.1.1. Esterilizado y preparación de las semillas

Se utilizaron dos protocolos para la siembra:

- a) Para la siembra directa en tierra, las semillas eran sumergidas en un tubo con una solución de agarosa 0,05% y se agitaba para repartir homogéneamente las semillas. Posteriormente se vernalizaban, dándoles un tratamiento de 3 días en oscuridad a 4°C.
- b) Si las semillas se sembraban *in vitro*, eran esterilizadas y posteriormente se depositaban en placas petri con el medio de cultivo MS. Una vez cerradas las placas con cinta porosa, se vernalizaban con un tratamiento en oscuridad de 3 días a 4°C. Para esterilizar las semillas se emplearon 2 protocolos descritos a continuación :

b.1) Esterilizado por tratamiento en atmósfera de cloro: se coloca en un tubo “eppendorf” un volumen equivalente a 100 µl de semillas y se deja abierto dentro de una campana de gases en la cual, hay un vaso de precipitados con 100 ml de lejía; se añaden 3 ml de ácido clorhídrico a la solución de lejía y se cierra la campana. Se dejan las semillas durante 5 horas y posteriormente se siembran.

b.2) Esterilizado por etanol: se coloca en un tubo “eppendorf” un volumen equivalente a 100 µl de semillas, se añaden 200 µl de etanol 70% + 0,05% Tritón X-100 y se lavan las semillas con esta solución durante 3 minutos; se retira lo anterior, se añaden 200 µl de etanol 96% y se lavan las semillas durante 1 minuto; se recogen y se dejan secar en un papel estéril.

1.1.2. Mutagénesis de semillas de *Arabidopsis thaliana*

Se recogieron 20000 semillas del mutante *acl5-4* de *A. thaliana*, se embebieron mediante agitación en 45 ml de una solución 25 mM Na₂HPO₄ pH 7 + Tween 20 0,005 %. Pasadas 4 horas se añadieron 90 µl del agente mutagénico etilmetilsulfonato (EMS); se dejaron durante 15 horas en agitación, transcurrido este tiempo se realizaron 10 lavados con agua destilada para eliminar los restos de EMS.

1.1.3. Transformación de *Arabidopsis thaliana*

Se siguió el protocolo de transformación de Clough y Bent modificado (Clough y Bent 1998). Se cultivaron las plantas hasta que empezaban a desarrollar los tallos florales; en ese momento se sumergieron los tallos durante un minuto, en una suspensión de *Agrobacterium tumefaciens* cepa C58 proveniente de un cultivo saturado. Este medio de suspensión está compuesto por sacarosa 1,5% (p/v) + silwett 0,02% (v/v). Las plantas se escurrieron para eliminar el medio de suspensión y se dejaron durante 24 h en oscuridad; posteriormente se restauraron las condiciones de cultivo normales hasta obtener semillas.

Para seleccionar líneas T1 transformadas con el vector pFP101 (Bensmihen *et al.* 2004) se colocaron las semillas transformadas bajo la lupa con luz

ultravioleta, puesto que el vector de transformación lleva como marcador la proteína GFP regulada por un promotor específico de semillas, por lo que las semillas transformadas emiten fluorescencia verde.

1.1.4. Maceración y cuantificación de elementos del xilema

Se recolectaron hipocotilos de plantas de 2 meses. Se incubaron a 95°C durante 4 horas en una solución de ácido acético 50% + H₂O₂ 3%; posteriormente se realizaron 2 lavados con agua destilada y se neutralizó con Na₂CO₃ sólido. Se disgregó el hipocotilo mediante la agitación con un vórtex. Las células disgregadas se tiñeron con una solución de calcoflúor 0,01% (p/v), se visualizaron bajo un microscopio óptico Zeiss Axioplan II y se fotografiaron con una cámara digital adjunta al microscopio. Por cada línea se analizaron 3 hipocotilos, con unas 100 células por hipocotilo.

1.1.5. Microscopía

Se recolectaron tallos basales de plantas de 6 semanas; se fijaron durante toda una noche en una solución etanol 50% + ácido acético 5% + formaldehído 4%. Posteriormente se deshidrataron los tejidos con una serie de pases en etanol de concentración creciente (70% etanol toda una noche, 80 % etanol durante 3 horas, 90% etanol durante 3 horas, 95 % etanol durante 1 hora, 100% etanol durante una noche); tras las deshidrataciones se embebieron en resina LR White (London REsin Company) durante 2 días, haciendo un cambio de resina tras el primer día. Por último se dejaron en LR White durante una noche a 60°C.

De las muestras incluidas en resina se obtuvieron secciones de 8-10 µm con un microtomo rotatorio (MicromHM330). Las secciones se tiñeron con una solución de azul de toluidina 0,1% (p/v).

1.2. Cepas bacterianas

Se utilizaron tres tipos de cepas:

- Cepas de *E. coli* como vehículo de almacenamiento y producción de diversos vectores, como por ejemplo TOP10, XL1Blue o DH5α.

- Cepas de *E. coli* para producir proteínas recombinantes de *A. thaliana* que posteriormente son purificadas, como por ejemplo RIL o BL21.
- Cepa C58 de *A. tumefaciens* para transformar plantas.

Los cultivos de *E. coli* y el de *A. tumefaciens* se realizaron en medio LB (extracto de levadura 0,5% p/v + triptona 1% p/v + NaCl 1% p/v) suplementado con el antibiótico correspondiente a cada construcción. Si el cultivo se realizaba en medio sólido se añadía agarosa 1,5% p/v. Los cultivos de *E. coli* se incubaron a 37°C y los de *A. tumefaciens* a 28°C, ambos durante una noche. En caso de poder seleccionarse las colonias transformantes por su color blanco/azul se añadían al medio 40 µl de IPTG (100mM) y 40 µl de X-Gal (40 mg/ml) por placa.

1.2.1. Transformación de bacterias

Se emplearon dos métodos de transformación de bacterias, según los siguientes protocolos:

- Por choque térmico: se toma una alícuota de células quimiocompetentes, se mantiene a 4°C en hielo, se añade el DNA con el que se quiere transformar (al menos 50 µg en caso de que se trate de una ligación) y se deja durante 30 min en el hielo. Después se realiza el choque térmico (1 min a 42°C para *E. coli* y 5 min a 37°C para *A. tumefaciens*). Nada más realizado el choque se añaden 500 µl fríos de medio LB y se incuba durante 1 h a 37°C (*E.coli*) o 3 h a 28°C (*A. tumefaciens*). Tras este tiempo de incubación se vierten los 500 µl en una placa de LB sólido con los antibióticos adecuados.
- Por electroporación: se toma una alícuota de células electrocompetentes, se mantiene a 4° C en hielo, se añade el DNA y se coloca toda la mezcla en una cubeta de electroporación seca y fría. Se le da un pulso eléctrico de 1500 V, se añaden inmediatamente 500 µl de LB frío y se incuba durante 1 h a 37°C (*E.coli*) o 3 h a 28°C (*A. tumefaciens*). Tras este tiempo de incubación se vierten los 500 µl en una placa de LB sólido con los antibióticos adecuados.

2. Técnicas de bioquímica

2.1. Extracción, identificación y cuantificación de poliaminas por GC-MS

Se realizó la extracción, identificación y cuantificación de poliaminas según el método desarrollado en cooperación con el Servicio de Metabolómica del IBMCP (Rambla *et al.* 2010).

Las muestras de tejido fresco de *A. thaliana* se trituraron con nitrógeno líquido y se conservaron a -80°C hasta el momento de su empleo. A la muestra congelada se le añadieron 4 volúmenes (4 $\mu\text{l}/\text{mg}$ de peso fresco) de ácido perclórico 0,2 N y 1 volumen de 1,6-diamina-hexano como patrón interno (152,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Se homogeneizaron las muestras mediante vórtex; se centrifugaron a 13000 rpm durante 5 minutos a 4°C ; se recuperaron los sobrenadantes y se conservaron a -20°C hasta el momento de su uso.

Para purificar las poliaminas de la muestra mediante una extracción por iónico, se tomó el sobrenadante de la centrífuga, se llevó su pH a un rango de 7,0-7,4 con KOH 0,1 M; se ajustó a un volumen total de 4 ml adicionando agua miliQ y se añadió 1 ml de tampón fosfato potásico 0,2 M pH 7,4. Se mezcló mediante vórtex con 5 ml de una solución de cloroformo + BEHPA 0,1 M; se separaron las fases centrifugando a 3500 g durante 5 minutos y se recogieron 4 ml de la fase orgánica. Esta fase se mezcló mediante vórtex con 4 ml de HCl 0,1 M; se volvieron a separar las fases centrifugando a 3500 g durante 5 minutos y se recogieron 3 ml de la fase acuosa. De estos 3 ml, se secó 1 ml en un bloque térmico a 70°C bajo una corriente de N_2 .

Para derivatizar la muestra, se resuspendió el residuo seco en 200 μl de acetonitrilo, y posteriormente se mezcló mediante vórtex con 200 μl de HFBA. Se incubó esta mezcla a 80°C durante 1 hora, se dejó enfriar y se añadieron 500 μl de metanol. La muestra se secó a temperatura ambiente bajo una corriente de N_2 . Se resuspendió el residuo seco con 1 ml de tampón fosfato potásico 0,5 M pH 7,0, que fue mezclado mediante vórtex con 3 ml de diclorometano. Se recogió la fase orgánica y se secó a temperatura ambiente bajo una corriente de

N₂. Se resuspendió el residuo en 100 µl de acetato de etilo, y la suspensión se trasvasó al inserto de un vial de inyección de GC.

Para la separación cromatográfica por GC, se inyectaron 2 µl del derivado heptafluorado en una columna BPX35 30m x 0,32 mm x 0,25 µm, usando como gas portador helio a 2 ml/min y aplicando una rampa de temperatura 85-280°C, a 15°C/min. El liner del inyector estaba a una temperatura de 250°C. Para la detección en el MS, se tomaron 6,25 espectros/s, en un rango de masa/carga de 35 a 900, y con una energía de ionización de 70 eV. Los iones seleccionados para la cuantificación fueron, 226 para la putrescina y el 1,6-diamina-hexano, y 226+254 para la espermidina, la espermina y la termoespermina; todas las cantidades fueron corregidas en función del patrón interno.

2.2. Extracción, identificación y cuantificación de poliaminas por HPLC

Se realizó la extracción, identificación y cuantificación de poliaminas utilizando un procedimiento descrito previamente (Carbonell y Navarro 1989).

La homogenización de la muestra, extracción con ácido perclórico, adición del patrón interno y centrifugación son idénticas a las realizadas para el GC-MS

Para la reacción de dansilación se pipetearon 100 µl del sobrenadante en un vial de vidrio de color topacio, se mezclaron con 200 µl de Na₂CO₃ en solución saturada y con 400 µl de cloruro de dansilo (10 mg/ml en acetona). Se incubó la mezcla a 60°C durante una hora en oscuridad, posteriormente se añadió 100 µl de prolina (100 mg/ml en agua miliQ) y se dejó durante 30 minutos a 60°C en oscuridad. Se añadió 1 ml de tolueno y tras agitación mediante vórtex, se esperó a que se separaran las 2 fases, recogiendo la fase orgánica en otro vial de vidrio de color topacio. Esta fase orgánica se secó en corriente de N₂ a 37°C. Una vez secadas las muestras se mantuvieron a -20°C hasta que fueron resuspendidas en 100 µl de acetonitrilo. Previamente a su inyección en el HPLC las muestras se filtraron en un filtro Millex-HV de 0,45 µm (Millipore).

En el análisis de HPLC se usó una columna de reparto en fase inversa de Hypersil ODS C18, 200 x 4'6 mm, 5 μ m de partícula (Tracer Analítica, Teknokroma) equilibrada con acetonitrilo:agua al 60% v/v. Se inyectaron 30 μ l de cada muestra. Los derivados dansilados se separaron en un gradiente de acetonitrilo:agua 60%-40% hasta 90%-10% v/v en 30 minutos, con un flujo de 1,5 ml/min. La columna se mantuvo a 37° C durante todo el análisis. Para la detección se utilizó un fluorímetro 420 Waters con filtros de excitación y emisión de 365 y 425 nm, respectivamente. La cuantificación se realizó utilizando el 1,6-diamina-hexano como patrón interno.

2.3. Purificación de proteínas

2.3.1. Inducción de proteínas

Se dejó creciendo durante toda una noche un preinóculo de la cepa de *E.coli* con la construcción a purificar. Este preinóculo saturado se usó como inóculo para un cultivo de volumen 100 veces mayor, que fue inducido con un tratamiento 1 mM de IPTG cuando su OD a 600 nm alcanzó un valor de 0,5-0,6. Una vez inducido se dejó crecer durante tres horas, se centrifugó durante 30 min a 12000 rpm, se descartó el sobrenadante y se conservó el precipitado a -20°C.

2.3.2. Purificación de proteínas

Para la purificación de las proteínas en estado nativo por columnas de níquel se empleó el sistema Ni-NTA Fast Start Kit (Qiagen), siguiendo las instrucciones del fabricante.

2.4. Ensayos enzimáticos

Según cada enzima los ensayos enzimáticos fueron:

- Para el cálculo la k_M^{Put} de la SPD1, realizamos 7 reacciones, cada una de ellas en un volumen total de 250 μ l, con un contenido 100 mM de tampón fosfato potásico pH 7,4, 2 mM de AdoMetdc, 10 mg/ml de proteína purificada y una concentración variable de putrescina (entre

0,25 - 50 mM). Recogimos cuatro muestras de 50 μ l a intervalos de 15 minutos. Cada muestra fue derivatizada y analizada mediante HPLC.

- Para el cálculo la k_M^{AdoMetdc} de la SPD1, usamos las mismas condiciones que para la k_M^{Put} , modificando el 2 mM de AdoMetdc por una 5 mM de putrescina, y las concentraciones variables de putrescina (0,25 - 50 mM) por concentraciones variables de AdoMetdc (0,05 - 2 mM). Las muestras fueron recogidas y procesadas de modo similar al caso anterior.
- Para el cálculo la k_M^{Spd} de la ACL5, usamos las mismas condiciones que para la k_M^{Put} de la SPD1, modificando el pH del tampón de 7,4 a 7, y las concentraciones variables de putrescina por concentraciones variables de espermidina. Las muestras fueron recogidas y procesadas de modo similar al caso anterior.
- Para comprobar la actividad PMT, realizamos una reacción con un volumen total de 250 μ l, con un contenido 100 mM de tampón HEPES pH 8, 1 mM de AdoMet, 5mM de putrescina y 10 mg/ml de proteína purificada. Recogimos cuatro muestras de 50 μ l a intervalos de 15 minutos. Cada muestra fue derivatizada y analizada mediante HPLC.

3. Técnicas de biología molecular

3.1. Extracción de ácidos nucleicos

3.1.1. Extracción de RNA

Las extracciones de mRNA total se realizaron partiendo de unos 100 mg de tejido, utilizando el sistema RNAeasy (QIAGEN) según las indicaciones del fabricante. En caso de usar las muestras para realizar qRT-PCR, se eliminó el DNA genómico con un tratamiento con DNasa (DNase digestión, QIAGEN) según las instrucciones del fabricante. La concentración del RNA se determinó mediante un espectrofotómetro Nanodrop (Thermo Scientific). Una vez purificados los RNAs fueron almacenados a -80°C hasta su utilización.

3.1.2. Extracción de DNA genómico

Las extracciones de DNA genómico para su posterior uso como molde para PCR se realizaron según el método descrito por Edwards (Edwards *et al.* 1991). Se cortó un disco de 1 cm de diámetro por cada muestra, y se trituró en N₂ líquido. Se añadieron 400 µl del tampón de extracción (200mM Tris-HCl pH 7,5 + 250 mM NaCl + 25 mM EDTA + 0,5% SDS p/v) se mezclaron mediante vórtex y se centrifugaron 1 minuto a 13000 rpm; se tomaron 300 µl del sobrenadante y se añadieron 300 µl de isopropanol; se mezclaron mediante vórtex y se dejaron 2 minutos a temperatura ambiente para que precipitaran; se centrifugó 5 min a 13000 rpm, se eliminó todo el sobrenadante y se dejó secar al aire. El precipitado se resuspendió en 50 µl de agua destilada y se almacenó a -20°C hasta su utilización.

3.1.3. Extracción de DNA plasmídico

La extracción de DNA plasmídico se realizó a partir de 1,5 ml de cultivo saturado, con el sistema Plasmid Mini Kit I (E.Z.N.A.), siguiendo las indicaciones del fabricante.

3.2. Generación de construcciones en vectores plasmídicos

3.2.1. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Realizamos las PCRs en tubos de 0,2 ml con un termociclador TC-152 (Techne). El volumen final era 50 μ l, con una concentración final de 1x del tampón de reacción, 0,2 μ M de cada oligonucleótido, 0,2 mM de nucleótidos y 1 unidad de la polimerasa (Biotools). Los programas de amplificación constan de 30-40 ciclos con 30 s a 94°C, 30 s a 50-60°C (según la T_m de los oligonucleótidos) y un tiempo variable (según el tamaño de producto a amplificar 1min/Kb) a 72°C. Los productos amplificados por PCR se analizaron en geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio.

3.2.2. Digestiones

Las digestiones se realizaron utilizando el tampón indicado por el fabricante de cada enzima, y con un número de unidades de enzima calculadas a partir de la siguiente fórmula:

$$\text{N}^\circ \text{ unidades} = \frac{\text{kb DNA referencia}}{\text{kb DNA diana}} \times \frac{\text{n}^\circ \text{ cortes DNA diana}}{\text{n}^\circ \text{ cortes DNA referencia}} \times \mu\text{g DNA diana}$$

3.2.3. Purificación de bandas de DNA separadas en geles de agarosa

El DNA contenido en las bandas de agarosa se purificó con el sistema de extracción de bandas QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN). Para bandas de tamaño superior a 5 Kb se usó el QIAEX II Gel Extraction Kit (QIAGEN).

3.2.4. Ligaciones

Las reacciones de ligación se realizaron con una proporción molar entre inserto y plásmido de 5:1. Para cada reacción se emplearon unos 50-200 ng de plásmido linearizado; mientras que para calcular la cantidad de inserto se aplicó la siguiente fórmula:

$$\frac{\mu\text{l inserto}}{\mu\text{l vector}} = 5 \times \frac{\text{ng}/\mu\text{l vector} \times \text{tamaño inserto (kb)}}{\text{ng}/\mu\text{l inserto} \times \text{tamaño vector (kb)}}$$

Cada reacción contenía tampón de ligación 1x (Roche) y 1 unidad de ligasa T4.

3.2.5. Mutagénesis dirigidas

Para cada mutagénesis se diseñaron dos oligonucleótidos complementarios y parcialmente solapantes que incorporaban la mutación a introducir; se realizaba una PCR con estos dos oligonucleótidos con un tiempo de extensión en función del tamaño del plásmido a mutagenizar. El producto de la PCR fue digerido con *Dpn I* para eliminar las copias de plásmido original no mutagenizado. Este producto de digestión fue utilizado, para transformar por choque térmico células competentes de *E.coli*.

3.3. Construcciones generadas

3.3.1. Sobre-expresión de *AJAX* en el mutante *acl5*

Los fragmentos de las secuencias codificantes principales de *AJAX1*, 2 y 3 fueron amplificados por PCR (Tabla 6). Los productos de PCR fueron digeridos con *Bam HI* y *Sal I*, al igual que el plásmido pFP101 (Bensmihen *et al.* 2004) y posteriormente purificados de una banda aislada de un gel de agarosa y ligados.

Tabla 6. Oligonucleótidos para clonar los *AJAX*s en el pFP101

Oligonucleótido	Gen	Secuencia (5' a 3')	Enzima de restricción
FVS249	<i>AJAX1</i>	CCGGATCCCTGCTAAGAGCATGCCTCTGGA	<i>BamH I</i>
FVS245	<i>AJAX2</i>	CCGGATCCACGTTTGCACGGGTTTTCTGAT	
FVS251	<i>AJAX3</i>	CCGGATCCCAAGAGCATGCCTCTTGATACCA	
FVS250	<i>AJAX1</i>	CCGTCGACTTTCACGCCTTATCTGTCTGCA	<i>Sal I</i>
FVS246	<i>AJAX2</i>	CCGTCGACATCGGTAGCATTCAAGATTGGT	
FVS252	<i>AJAX3</i>	CCGTCGACAGGGTTGTAGGTTTTTCACCA	

3.3.2. Transcripción *in vitro* de *AJAX2*

Se amplificó por PCR (tabla 7) un fragmento de 1868 pb, que corresponde al cDNA completo de *AJAX2*, de las que, 756 pb corresponden a la secuencia codificante principal de *AJAX2* y 1112 pb que corresponden a la 5'-UTR del mismo gen, incluida la uORF. Se digirieron tanto este fragmento como el vector pSP64 (Promega) con *Pst I* y *Xba I*, se purificaron y se ligaron. Al no conseguir transcribir *in vitro* esta construcción, la digerimos con *Hind III* para eliminar gran parte de la 5'-UTR y religamos el vector en el cual sólo transcribíamos la ORF principal.

Después amplificamos por PCR (Tabla 7) la uORF, y lo subclonamos en un vector pCR2.1 (Invitrogen), para luego clonarlo en el vector que contenía la ORF de *AJAX2*, mediante un corte con *Hind III* y ligación para generar una construcción para transcribir *AJAX2* bajo el control del uORF.

Tabla 7. Oligonucleótidos para clonar los *AJAX2* en el pSP64

Oligonucleótido	Gen	Secuencia (5' a 3')	Enzima de restricción
FVS265	<i>c-DNA</i> <i>AJAX2</i>	GGCTGCAGGCTGAATTTGATTTTTC	<i>Pst I</i>
FVS266	<i>c-DNA</i> <i>AJAX2</i>	CCTCTAGAGGTATAAGCGTGACTTTTC	<i>Xba I</i>
FVS272	<i>uORF</i> <i>AJAX2</i>	TTCTTTCAGGTGTTGTTCCGGAATTCGG	-
FVS226	<i>uORF</i> <i>AJAX2</i>	TTCTACTACCGATTTGTCGCCT	-

Por último, generamos las versiones mutantes de la uORF, realizando mutagénesis dirigida sobre el vector de transcripción de *AJAX2* controlado por la uORF (Tabla 8).

Tabla 8. Oligonucleótidos de mutagénesis de pSP64 + *uORF* + *AJAX2*.

Oligonucleótido	Secuencia (5' a 3')	Mutación generada
FVS309	CAGTTGTTTAAGCCTGTAACGTAGA	L44→F44 (<i>ajx2-31</i>)
FVS282	GCTTAAACAACCTGTCTGAAATATTCAG	
FVS283	GGAAACTGATCATTGAAGGAAATAG	R11→STOP (<i>ajx2-48</i>)
FVS284	ATGATCAGTTTCCCTTCTTGTTTC	

3.3.3. Purificación de proteínas

En la purificación de proteínas se utilizó el vector pET28b (Novagen) para realizar una fusión traduccional de nuestra proteína de interés a un epítipo de seis histidinas en el extremo C terminal. Amplificamos por PCR las CDS completas (excepto el triplete del codón de parada) de *ACL5* y *SPD1*, mediante los oligos mostrados en la tabla 9, digerimos estos productos de PCR y el vector con los enzimas de restricción indicados en la tabla 9, ligamos y transformamos con células competentes de *E.coli*. Una vez comprobado que la construcción era correcta, se extrajo el plásmido y se retransformó en una cepa de *E.coli* adecuada para la producción de proteínas como BL21.

Tabla 9. Oligonucleótidos para clonar *ACL5* y *SPD1* en el pET28b

Oligonucleótido	Gen	Secuencia (5' a 3')	Enzima de restricción
FVS006	<i>ACL5</i>	CCCCATGGGTGAAGCCGTAGAGGTCATGT	<i>Nco I</i>
FVS019	<i>ACL5</i>	ATGTGCTCGAGAATATGCCGGTACGCCACA	<i>Xho I</i>
FVS027	<i>SPD1</i>	GCGGAATTCATGGACGCTAAAGAAACCTCT	<i>Eco RI</i>
FVS026	<i>SPD1</i>	CGTGCTCGAGATTGGCTTTTGACTCAATGAC	<i>Xho I</i>

La purificación de la *DsPMT* se realizó a partir de una construcción con la CDS de la *PMT* en el vector pET21d, cedido amablemente por la Dra. Birgit Dräge.

Para generar las versiones mutantes *ACL5* y *SPD1*, realizamos mutagénesis dirigida sobre las construcciones generadas previamente (Tabla 10a y 10b).

Tabla 10a. Oligonucleótidos de mutagénesis de pET28b + *ACL5*

Oligonucleótido	Secuencia (5' a 3')	Mutación generada
FVS105	GGGAGATTCATCTGATCCAGTGG	L187 A188 → S187 S188
FVS106	CTGGATCAGATGAATCTCCCACTATG	
FVS039	TAGCTGAGCCCGTGGAAGGTGGACCTTGTTATC	D189 → E189
FVS040	CTTCCACGGGCTCAGCTAAATCTCCCACTATG	
FVS103	AATCCTTCTTCCAAAACATTCTC	Y205 → F205
FVS104	ATGTTTTGGAAGAAGGATTTGG	
FVS101	CCAGGCTGAACCAGCAGGAATATTC	G224 → E224
FVS102	CCTGCTGGTTCAGCCTGGGTGAC	

Tabla 10b. Oligonucleótidos de mutagénesis de pET28b + *SPD1*

Oligonucleótido	Secuencia (5' a 3')	Mutación generada
FVS301	GTAATCCAACATACGGAGAGAGATG	L98 → H98
FVS302	TCTCTCCGTATGTTGGATTACTCC	
FVS299	TGTGCTTATACGAAATGATCACTC	Q107 → T107
FVS300	TCATTTCGGTATAAGCACATTCATC	
FVS261	GAGGAGGAATTGGAGGTGCCTGC	D131 → I131
FVS262	GACACCTCCAATTCCTCCTCCAATG	
FVS297	TGGAGGTACCCTGCGGGAAGTTG	V134 → T134
FVS298	CCGCAGGGTACCTCCAATTCCTC	

3.4. Genotipados

3.4.1. Genotipado de la delección del mutante *acl5-4*

Para comprobar el genotipo de una planta problema se realizaba una PCR con 3 oligonucleótidos; dos de ellos, FVS013 y EGM044, son flanqueantes a la delección; mientras que el tercero, FVS017, es un oligonucleótido interno que hibrida dentro de ella. En caso de ser una planta *acl5-4*, los oligonucleótidos flanqueantes amplificaban un producto de 548 pb; pero si la planta era silvestre el producto era de 376 pb.

Tabla 11. Oligonucleótidos para genotipar la delección del *acl5-4*. *acl5acl5*mutante

Oligonucleótido	Secuencia (5' a 3')
FVS013	GTCGAGAGGGAACTGACAAGTGTACA
FVS017	CTCCCACCCAAAATCTCAGTCCTTGT
EGM044	GCAAATGATGGCACATGTGCTGTGTAAG

3.4.2. Genotipado de mutantes de inserción de T-DNA

Los mutantes por inserción de T-DNA utilizados en este trabajo provinieron de dos colecciones; 4 líneas de la colección conocida como líneas SALK (Alonso

et al. 2003) y una línea de la colección conocida como Gene Trap del Cold Spring Harbor (Sundaresan *et al.* 1995). Las líneas empleadas fueron:

- SALK_147291. Con inserción en la 5'-UTR de *AJAX2*.
- SALK_095875. Con inserción en la 5'-UTR de *AJAX2*.
- SALK_107954. Con inserción en la 5'-UTR de *AJAX1*.
- SALK_02930. Con inserción en la 3'-UTR de *AJAX1*.
- ET12122.Ds5.08.28.2003.jx25.459. Con inserción en la 5'-UTR de *AJAX3*.

Para el genotipado de una planta problema, se realizaron dos PCRs. En la primera de ellas se utilizaron dos oligonucleótidos flanqueantes al punto de inserción de T-DNA; en la segunda, se utilizaron un oligonucleótido flanqueante (Tabla 12) y otro que hibrida exclusivamente dentro de la inserción (el oligonucleótido EGMLB1 para las líneas del SALK y el oligonucleótido FVS303 para la línea del Cold Spring Harbor). Según se obtuvo un producto de PCR en la primera, en la segunda o en ambas; teníamos una planta silvestre, heterocigota u homocigota para la inserción, respectivamente. En todos los genotipados, se llevó en paralelo una muestra de una planta silvestre Col-0 como control positivo.

Tabla 12. Oligonucleótidos flanqueantes para genotipar las inserciones de T-DNA.

Oligonucleótido	Secuencia (5' a 3')	Gen
FVS195	CTTACATTGGTACCTTGTGGAAGC	<i>AJAX2</i>
FVS227	TTGTTGCCACTCACCTCTTTAGA	<i>AJAX1</i>
FVS228	CCCGTTGCCTCTTATCCAGA	<i>AJAX1</i>
FVS239	GAGCATCGATCTCATTTGGATCT	<i>AJAX2</i>
FVS244	CATTGTTTGTGCTGTGCTCTCT	<i>AJAX3</i>
FVS296	CCCTCGCTCTGCATCCATAG	<i>AJAX3</i>

Tabla 13. Oligonucleótidos internos a la inserción de T-DNA..

Oligonucleótido	Secuencia (5' a 3')	Inserción
FVS303	CCGTCGCCGAAGTTAAATATG	Cold Spring Harbor
EGMLB1	CAAACCAGCGTGGACCGCTTGCTGCA	SALK

3.5. Cartografiado de las líneas *ajx1-4*, *ajx2-10* y *ajx2-31*

Para localizar en el genoma de *A. thaliana*, la posición física de las mutaciones de las 3 líneas, cruzamos cada una de las líneas, que se encuentran en fondo *La-er*, con una planta *acl5-5* en fondo *Col-0*. En la F2 seleccionamos 50 plantas de fenotipo enano *acl5*, de las que se enviaron muestras congeladas al Servicio de Cartografía Génica de la Universidad Miguel Hernández. En esta primera fase se analizaron estos 50 individuos mediante un análisis de ligamiento con 32 microsatélites polimórficos entre *Col-0* y *La-er*, distribuidos por los 5 cromosomas de *A. thaliana*. De los resultados de este cartografiado de “baja resolución”, se concluyó que:

- las mutaciones de las líneas *ajx2-10* y *ajx2-31* están localizadas en una región de unas 3 megabases situada en el cromosoma 1, delimitada por los marcadores AthZFPG y SNP10026. Como ambas mutaciones se encuentran en la misma región, supusimos que son alélicas y únicamente continuamos con el mapeo de la línea *ajx2-31*.
- la mutación de *ajx1-4* está en una región de unas 4,5 megabases situada en el cromosoma 5, entre los marcadores MUA2 y K8K14.

Para continuar delimitando la posición, enviamos muestras de otros 600 individuos enanos de la F2, al Servicio de Cartografía Génica de la Universidad Miguel Hernández. Con estas muestras se realizó un cartografiado de “alta resolución” a través del análisis de otros microsatélites, incluidos dentro de la región delimitada previamente para cada línea. De los resultados se concluyó que:

- la mutación de la línea *ajx1-4* está situada en una región de 136 Kb que incluye 3 BAC parcialmente solapantes comprendidos entre los marcadores Cer455797 (con 1 individuo recombinante para este marcador de la población inicial de 650) y Cer458067 (con 1 individuo recombinante para este marcador de la población inicial de 650).
- la mutación de la línea *ajx2-31* está situada en una región de 222 Kb que incluye 4 BAC parcialmente solapantes comprendidos entre los marcadores Cer479911 (con 7 individuos recombinantes para este

marcador de la población inicial de 650) y Cer479988 (con 1 individuo recombinante para este marcador de la población inicial de 650).

Desde el Servicio de Cartografía Génica nos reenviaron estos individuos recombinantes, en los que analizamos más marcadores, CAPs y dCAPs. Con este trabajo redujimos los intervalos a:

- en la línea *ajx1-4*, un tamaño de 81 Kb comprendidos entre los marcadores Cer458067 y Cer440084; con 22 genes dentro del intervalo.
- en la línea *ajx2-31*, un tamaño de 93 Kb comprendidos entre los marcadores Cer480732 y Cer479895; con 21 genes dentro del intervalo.

Para terminar de localizar las mutaciones pasamos a amplificar por PCR los genes internos de cada intervalo usando como molde el DNA genómico de cada línea supresora. Estos productos de PCR se purificaron por fenolización seguida de una precipitación, y fueron secuenciados por el Servicio de Secuenciación del IBMCP. En la línea *ajx1-4* secuenciamos 3 genes antes de encontrar la mutación en el gen At5g64340, mientras que en *ajx2-31* secuenciamos 12 genes antes de encontrar la mutación en el gen At1g29950.

Tabla 14. Oligonucleótidos para genotipar microsatélites utilizados en el mapeo de *ajx1-4*

Marcador	Oligonucleótido	Secuencia (5' a 3')	Tamaño amplificado	
			Col	La-er
Cer455797	455797-1	GAACCTGTAACATTTCAACTAAG	244 pb	270 pb
	455797-2	TGTCTCATCCAGGTCATGGAC		
Cer458067	458067-1	AGAATTTCTCCATCTCTCCGC	288 pb	305 pb
	458067-2	ATTCACAGTGTCCCCAAAAGTC		

Tabla 15. Oligonucleótidos para genotipar CAPS utilizados en el mapeo de *ajx1-4*

Marcador	Oligonucleótido	Secuencia (5' a 3')	Enzima de restricción
Cer437611	FVS182	CACGACGCAGAAATTATGGGA	Acc I
	FVS183	ATTTTGTACGAATAATTTGCGTT	
Cer440074	FVS186	CAATGGAATCTACTAGATACGGGGA	Nsp I
	FVS187	AACGACATTTGGTGTGTGGATACA	

Cer440109	FVS190	CGGTTCCCTTTCTTCTTTGGT	Taq I
	FVS191	CGAGCTCTTAAAATCGTCTCCG	
Cer440084	FVS193	TCAGGGAGGATACTGTCGCTGT	Taq I

Tabla 16. Oligonucleótidos para amplificar y secuenciar el gen At5g64340 en el mapeo de *ajx1-4*. Los oligonucleótidos del resto de genes secuenciados se muestran en el CD de anexos.

Gen	Oligonucleótido	Secuencia (5' a 3')
At5g64340	FVS218	GTTCCATAATTCTGAGAGACTACTCCC
	FVS219	GCCAAATCCAAGTTCTGGTTAGT
	FVS220	GATAAATTCGCCGTTCTCCATC
	FVS221	CAATACGAATTCCCATTCTCTGTG
	FVS227	CGCAGTGAGTTCCTCTCTCAT
	FVS228	GCTCTAATCGTACCGTATTCATGG

Tabla 17. Oligonucleótidos para genotipar microsatélites utilizados en el mapeo de *ajx2-31*

Marcador	Oligonucleótido	Secuencia (5' a 3')	Tamaño amplificado	
			Col	La-er
Cer479911	479911-1	CAAATAGAACCAACACCGTAAA	227 pb	221 pb
	479911-2	ATTCACCTTCCAATAGATCACTC		
Cer479988	479988-1	CAACGGCTCACACTTCCCTT	222 pb	227 pb
	479988-2	CTGTAAAGATGGAACACACTATG		

Tabla 18. Oligonucleótidos para genotipar dCAPS utilizados en el mapeo de *ajx2-31*

Marcador	Oligonucleótido	Secuencia (5' a 3')	Enzima de restricción
Cer481348	FVS062	AGCCACTATGTGGAGGTACATCGA	Cla I
	FVS063	ATATATCCCACAGCCAATAGAAC	
Cer480732	FVS064	CAGTTTGCTCTGGCTTGAAATAGT	Mae III
	FVS065	TGTCTGAACAAGACGAATAGGGTC	
Cer480737	FVS060	AAGCAGCTCCTATCAGGAGAATGAT	Bcl I
	FVS061	GCGAAGAACTTCTTAGTTCCGTG	
Cer479897	FVS089	ATGCGACTTTAAGTTATTCCTCA	Dde I
	FVS090	AAACTCTAAATATAGAACTAGACCG	

Cer479895	FVS082	TTGGACCAAAGCCCCATGAAGGC	Hae III
	FVS083	CGCCGTCGGCAACGAACTATACA	

Tabla 19. Oligonucleótidos para amplificar y secuenciar el gen At1g29950 en el mapeo de *ajx2-31*. Los oligonucleótidos del resto de genes secuenciados se muestran en el CD de anexos.

Gen	Oligonucleótido	Secuencia (5' a 3')
At1g29950	FVS195	CTTACATTGGTACCTTGTGGAAGC
	FVS196	CTCTGGTGGAACTCGTGATATCT
	FVS197	CCTGCCAACAAAAGGAAGTGAG

3.6. Secuenciación de los alelos supresores de *AJAX1*, *AJAX2*, *AJAX3* y *AJAX4*

Para secuenciar las uORFs de los 4 genes bHLH candidatos a suprimir la mutación de *acl5*, realizamos PCR de cada una de las uORFs, en cada uno de los genes *AJAX*, usando como molde el DNA genómico de las 40 líneas supresoras que obtuvimos en la búsqueda de supresores. Estos productos de PCR fueron purificados por fenolización seguida de una precipitación y posteriormente secuenciados por el servicio de secuenciación del IBMCP. Los oligonucleótidos empleados para amplificar las uORFs fueron:

Tabla 20. Oligonucleótidos para amplificar y secuenciar las uORFs de los genes *AJAX1*, 2, 3 y 4

Gen	Oligonucleótido	Secuencia (5' a 3')
At5g64340 <i>AJAX1</i>	FVS218	GCTGATGAGATTCTTCCTTCGACT
	FVS228	CCCGTTGCCTCTTATCCAGA
At5g09460 <i>AJAX3</i>	FVS230	TGCTGTTTGGTATCAAGAGGCA
	FVS244	CATTGTTTGTGCTGTGCTCTCT
At1g29950 <i>AJAX2</i>	FVS226	TTCTACTACCGATTTGTCGCCCT
	FVS231	TTATCAGATGATTGCTGAATTTGAT
At5g50010 <i>AJAX4</i>	FVS232	TTCCGTTAGCTGAATTTGTTTACA
	FVS233	ACGATCTTGTCATCCAACA

3.7. Análisis de expresión de genes

3.7.1. Obtención de cDNA

A partir de 1 µg de RNA total, se produjo cDNA, usando el sistema SuperScript II First-Strand cDNA Synthesis System (Invitrogen), según las indicaciones del fabricante.

3.7.2. Análisis qRT-PCR

Los oligonucleótidos utilizados para estas reacciones se diseñaron con el programa Primer Express 2.0 (Tabla 21). Las reacciones de PCR cuantitativa se realizaron en un volumen de 20 µl, empleando 10 µl de SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems), 1 µl de c-DNA y 1 µl de cada oligo 5 µM. Por cada muestra se realizaron tres PCRs idénticas, utilizando un termociclador 7000 Real-Time PCR System o un 7500 Real-Time PCR System. Los valores de expresión génica se calcularon mediante la cuantificación de la fluorescencia en un punto de la fase exponencial asociado a un número de ciclos (C_t). A partir de este C_t se calculó la expresión relativa de cada gen respecto a una muestra control, siendo previamente normalizados todos los valores en función del gen constitutivo *EIFα1*.

Tabla 21. Oligonucleótidos de qRT-PCR.

Gen	Oligonucleótido	Secuencia (5' a 3')
AJAX1	EGM qAJAX1 01F	GGATAATTGCCAGGCTGAGTACTT
	EGM qAJAX1 01R	GAACGAAAAACAATCACAGATTGAA
AJAX2	qPCR-AJAX2-F	GATGAAGTGGGTGACAGAAATATG
	qPCR-SSS31-R	GCACATGGTGGGAACAAAGC
AJAX3	FVS295	GGGAGAGCAGACTCGTTTGTTAC
	FVS296	CCCTCGCTCTGCATCCATAG
<i>EIFα1</i>	EF-1α F	CCCAGGCTGATTGTGCTGT
	EF-1α R	GGGTAGTGGCATCCATCTTGT

3.8. Transcripción-traducción *in vitro*

Se digirieron 10 µg de plásmido pSP64 con la construcción correspondiente, con el enzima de restricción *EcoRI*; esta digestión que linealizaba el plásmido fue purificada por fenolización y precipitación. La reacción de transcripción se realizó en 20 µl totales con 3 µg de plásmido linealizado, 20 unidades de SP6 RNA polimerasa (Roche), 20 unidades de inhibidor de RNasa (Roche), 2 µl de buffer 10x y ATP, GTP, CTP y UTP a 0,5 mM, se incubó 2 horas a 37°C; pasado este tiempo se trató con 20 unidades de DNasa I (Roche) 30 min a 37°C, y finalmente se purificó por fenolización y precipitación.

La traducción *in vitro* se realizó en 20 µl totales con 12 µg de RNA como molde, 12 µl de Wheat Germ Extract Plus (Promega) y 0,5 µl de Fluorotect™ Green Lys tRNA (Promega); la reacción fue incubada durante 2 horas a 25°C. El resultado de la reacción fue separado en un gel SDS-PAGE al 12% de acrilamida. El gel fue escaneado en un Typhoon TRIO (Amersham Biosciences) con un filtro de excitación de 488 nm y uno de emisión de 520 nm de longitud de onda.

3.9. Análisis de expresión génica mediante micromatrices

3.9.1. Extracción de RNA total

Se sembraron semillas de los genotipos indicados, *acl5-5*, Col-0, *acl5-5* + 35S::*AJAX2*, en placas de MS y MS + 0,1 mM termoespermina. Se recolectaron las plántulas a las 2 semanas y se pulverizaron con N₂ líquido. El RNA total se extrajo usando el sistema RNeasy Plant Minikit (QIAGEN) según las instrucciones del fabricante. La cantidad de RNA fue cuantificada mediante un espectrofotómetro Nanodrop.

3.9.2. Amplificación de RNA

Se amplificó el RNA extraído mediante el sistema MessageAmp™ aRNA Kit (Ambion). Para ello a partir de un 1 µg de RNA total, sintetizamos c-DNA de

doble cadena usando el oligonucleótido T7-Oligo-dT como cebador, siguiendo las instrucciones del fabricante. Este cDNA fue purificado usando el sistema DNA Clear (Ambion) siguiendo las instrucciones del fabricante y fue usado como molde para generar nuevo aRNA, con una mezcla de ribonucleótidos con aminoalil-UTP, mediante el MessageAmpTM aRNA Kit (Ambion). Este aRNA fue purificado con el sistema Mega Clear (Ambion) según las instrucciones del fabricante y fue cuantificado mediante el espectrofotómetro Nanodrop.

3.9.3. Marcaje fluorescente del RNA amplificado

Se tomaron 10 µg de aRNA para cada muestra, y fueron marcados con Cy3 y Cy5 (Amersham/GE Healthcare). Cada vial de fluoróforo fue resuspendido en 15 µl de DMSO, de los cuales se usaron 5 µl por marcaje. Se secaron los 10 µg de aRNA mediante “speed-vacuum” y fueron resuspendidos en 2 µl de Na₂CO₃ 1M; se añadieron los 5 µl del fluoróforo correspondiente y 13 µl de agua miliQ. Se dejó incubar la reacción a temperatura ambiente, durante una hora en oscuridad. Se detuvo la reacción añadiendo 35 µl de acetato sódico pH 5,2 100 mM. Los aRNAs de las muestras Col-0, *acl5-5* + 35S::*AJAX2*, y *acl5-5* + 0,1 mM termoespermina se marcaron con Cy3 y las muestras de *acl5-5* se marcaron con Cy5. Todos estos Cy dye-aRNA fueron purificados mediante el sistema Mega Clear (Ambion). El rendimiento del marcaje (pM de fluoróforo/µl) fue determinado mediante el espectrofotómetro Nanodrop.

3.9.4. Hibridación de Cy-dy-aRNA con las micromatrices

Se emplearon micromatrices de DNA de oligonucleótidos largos del conjunto del *A. thaliana* Genome Oligo Set Versión 3.0, generadas en la Universidad de Arizona (<http://ag.arizona.edu/microarray>). Para cada una de las tres comparaciones se realizaron tres réplicas biológicas.

Se preparó el cristal, entrecruzando su DNA mediante un tratamiento de 65 mJ de luz ultravioleta en un horno de entrecruzamiento UV Stratalinker 1800. Tras este paso, se prehibridó el cristal durante 30 min a 42°C con la solución de prehibridación (3x SSC + 001%(p/v) SDS + 0,016%(p/v) BSA). Posteriormente se hicieron dos lavados al cristal con agua miliQ y uno con isopropanol. Se secó

el cristal por centrifugación a 2000 rpm durante un minuto, y se dejó en la cámara de hibridación.

Paralelamente se preparó la sonda mezclando 300 pM de cada uno de los dos Cy dye-aRNA, se secaron mediante “speed-vacuum”, se resuspendieron en 5 μ l de agua miliQ, y se le añadieron 1 μ g de tRNA de levadura (Ambion), 1 μ g de polyA (roche), y 1 μ l de tampón de fragmentación (Ambion), hasta un total de 10 μ l. Se incubó a 70°C durante 15 min para conseguir la fragmentación de la sonda, tras los cuales se interrumpió la reacción añadiendo 1 μ l de tampón de parada (Ambion) y dejándola en hielo. Posteriormente se colocó la sonda en un baño hirviendo durante 5 min. Se dejó enfriar y se añadió 55 μ l de solución de hibridación (formamida desionizada 62,5%(v/v) + 6,66x SSC + SDS 0,55%(p/v) + 5,55x de solución Dendhardt’s). La sonda ya preparada se colocó sobre el cristal y se tapó con un cubre LifterSlip (Eries Scientific Company).

Se dejó el cristal con la sonda encerrado en la cámara de hibridación, incubando a 37°C durante 16 h.

3.9.5. Lavado de las micromatrices

Trascurridas las 16 h, se quitó el cubre y se realizaron los siguientes lavados a la micromatriz:

- Un lavado con 2x SSC + 0,1 % (p/v) SDS a 30°C durante 5 min.
- Un lavado con 0,2x SSC + 0,1 % (p/v) SDS a 30°C durante 5 min.
- Seis lavados con 0,1x SSC a temperatura ambiente durante 2 min.
- Un lavado con 0,01x SSC a temperatura ambiente durante 2 min.

Se secó el cristal mediante centrifugación de 1 min a 2000 rpm.

3.9.6. Escaneo y análisis de las micromatrices

El escaneo se realizó en un escáner Genepix 4000B (Axon Instruments), usando la aplicación informática Genepix 4.0. Las imágenes se escanearon a 635 y 532 nm, ajustado la ganancia de los fotomultiplicadores de modo que el número de pocillos saturados fuese inferior al 0,1% y que el cociente entre el

sumatorio de las señales totales para cada fluoróforo, tuviese un valor entorno a 1.

El análisis de las imágenes se realizó utilizando la aplicación informática Genepix 6.0 (Axon Instruments) y para el análisis estadístico se utilizó el programa Acuity 4.0 (Axon Instruments). Para el análisis de enriquecimiento de categorías se usó la aplicación Classification SuperViewer Tool w/ Bootstrap (<http://bar.utoronto.ca/>).

4. Análisis filogenético y estructural

4.1. Rastreo y análisis de secuencias

Todas las secuencias de *A. thaliana* empleadas en los diversos alineamientos se obtuvieron de la base de datos del TAIR (www.arabidopsis.org). En el caso del estudio evolutivo de los genes *AJAX* y sus uORFs, utilizamos las secuencias *AJAX1*, *AJAX2* y *AJAX3* para realizar una búsqueda mediante BLAST en las bases de datos del NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov) y PHYTOZOME (www.phytozome.net). Además, también obtuvimos más secuencias aprovechando los datos suplementarios de diversos artículos científicos (Toledo-Ortiz *et al.* 2003; Hayden y Jorgensen 2007; Pires y Dolan 2009).

Para los análisis filogenéticos, el alineamiento de las secuencias se generó utilizando el programa CLUSTALX utilizando los parámetros definidos por defecto (Thompson *et al.* 1997); excepto para la figura 33 en la cual se empleó el programa MUSCLE (Edgar 2004) utilizando los parámetros por defecto, este último alineamiento fue analizado utilizando el programa PhyMLv3.0 (Guindon y Gascuel 2003) utilizando el modelo de sustitución aminoacídica WAG y los parámetros por defecto.

La representación de los alineamientos obtenidos se realizó con el programa CLUSTALX, mientras que para los árboles filogenéticos empleamos el programa FIGTREE (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>).

4.2. Análisis estructural

La estructura tridimensional de la PMT de *Nicotiana tabacum* fue generada con el servidor MODWEB (<http://salilab.org/modweb>) (Pieper *et al.* 2004). La PMT modelada y la estructura de la SPDS de *A. thaliana* (código PDB 1XJ5) se superpusieron utilizando el programa LSQKAB del paquete CCP4 (CCP4 1994). La molécula de AdoMet en el centro activo de la PMT fue generada utilizando como molde la molécula del AdoMetdc de la estructura de la SPDS. Para mejorar la modelización del complejo AdoMet-PMT se aplicó dinámicas de ángulos de torsión y minimización de energía con el programa CNS (Brunger *et al.* 1998).

Para evaluar los sitios de unión de las poliaminas en las proteínas SPDS, SPMS y tSPMS, se superpusieron las estructuras de la tSPMS de *Thermus thermophilus* (código PDB 1UIR), la de la SPDS de *Thermotoga marítima* (código PDB 1INL) y la SPDS de *A. thaliana*, utilizando el programa LSQKAB. El análisis de las interacciones de las poliaminas en los diferentes centros activos se realizó con el paquete CCP4. Para la representación estructural de esta comparación se utilizaron la estructura de la SDPS de *A. thaliana* y la estructura de ACL5 de *A. thaliana*, predicha por el programa PHYRE (Kelley y Sternberg 2009) y extraída de la página web EPLANT (<http://bar.utoronto.ca/eplant/>).

La representación gráfica de todos los modelos se llevó a cabo con el programa PyMOL (www.pymol.org).

BIBLIOGRAFÍA

Abastado, J. P., Miller, P. F., Jackson, B. M. and Hinnebusch, A. G. (1991). "Suppression of ribosomal reinitiation at upstream open reading frames in amino acid-starved cells forms the basis for GCN4 translational control." *Mol Cell Biol* 11(1): 486-96.

Alcázar, R., Cuevas, J. C., Patron, M., Altabella, T. and Tiburcio, A. F. (2006a). "Abscisic acid modulates polyamine metabolism under water stress in *Arabidopsis thaliana*." *Physiologia Plantarum* 128(3): 448-55.

Alcázar, R., Garcia-Martinez, J. L., Cuevas, J. C., Tiburcio, A. F. and Altabella, T. (2005). "Overexpression of ADC2 in *Arabidopsis* induces dwarfism and late-flowering through GA deficiency." *Plant J* 43(3): 425-36.

Alcázar, R., Marco, F., Cuevas, J. C., Patron, M., Ferrando, A., Carrasco, P., Tiburcio, A. F. and Altabella, T. (2006b). "Involvement of polyamines in plant response to abiotic stress." *Biotechnol Lett* 28(23): 1867-76.

Alonso, J. M., Stepanova, A. N., Leisse, T. J., Kim, C. J., Chen, H., Shinn, P., Stevenson, D. K., Zimmerman, J., Barajas, P., Cheuk, R., Gadrinab, C., Heller, C., Jeske, A., Koesema, E., Meyers, C. C., Parker, H., Prednis, L., Ansari, Y., Choy, N., Deen, H., Geralt, M., Hazari, N., Hom, E., Karnes, M., Mulholland, C., Ndubaku, R., Schmidt, I., Guzman, P., Aguilar-Henonin, L., Schmid, M., Weigel, D., Carter, D. E., Marchand, T., Risseuw, E., Brogden, D., Zeko, A., Crosby, W. L., Berry, C. C. and Ecker, J. R. (2003). "Genome-wide insertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*." *Science* 301(5633): 653-7.

Amarantos, I., Zarkadis, I. K. and Kalpaxis, D. L. (2002). "The identification of spermine binding sites in 16S rRNA allows interpretation of the spermine effect on ribosomal 30S subunit functions." *Nucleic Acids Res* 30(13): 2832-43.

Applewhite, P. B., Kaur-Sawhney, R. and Galston, A. W. (2000). "A role for spermidine in the bolting and flowering of *Arabidopsis*." *Physiologia Plantarum* 108(3): 314-20.

Bachrach, U. (2004). "Polyamines and cancer: minireview article." *Amino Acids* 26(4): 307-9.

Bachrach U, H. Y. (1989). Propylamine transfer reactions in thermophilic archaeobacteria: enzymological aspects and comparative biochemistry. *The Physiology of Polyamines*, CRC Press. Volume II.

Becerra-Solano, L. E., Butler, J., Castaneda-Cisneros, G., McCloskey, D. E., Wang, X., Pegg, A. E., Schwartz, C. E., Sanchez-Corona, J. and Garcia-Ortiz, J. E. (2009). "A missense mutation, p.V132G, in the X-linked spermine synthase gene (SMS) causes Snyder-Robinson syndrome." *Am J Med Genet A* 149A(3): 328-35.

Ben-Hayyim, G., Damon, J. P., Martin-Tanguy, J. and Tepfer, D. (1994). "Changing root system architecture through inhibition of putrescine and feruloyl putrescine accumulation." *FEBS Lett* 342(2): 145-8.

Bensmihen, S., To, A., Lambert, G., Kroj, T., Giraudat, J. and Parcy, F. (2004). "Analysis of an activated ABI5 allele using a new selection method for transgenic Arabidopsis seeds." *FEBS Lett* 561(1-3): 127-31.

Biastoff, S., Brandt, W. and Drager, B. (2009a). "Putrescine N-methyltransferase-the start for alkaloids." *Phytochemistry* 70(15-16): 1708-18.

Biastoff, S., Reinhardt, N., Reva, V., Brandt, W. and Drager, B. (2009b). "Evolution of putrescine N-methyltransferase from spermidine synthase demanded alterations in substrate binding." *FEBS Lett* 583(20): 3367-74.

Biastoff, S., Teuber, M., Zhou, Z. S. and Drager, B. (2006). "Colorimetric activity measurement of a recombinant putrescine N-methyltransferase from *Datura stramonium*." *Planta Med* 72(12): 1136-41.

Bitonti, A. J., Kelly, S. E. and McCann, P. P. (1984). "Characterization of spermidine synthase from *Trypanosoma brucei brucei*." *Mol Biochem Parasitol* 13(1): 21-8.

Bowman, W. H., Tabor, C. W. and Tabor, H. (1973). "Spermidine biosynthesis. Purification and properties of propylamine transferase from *Escherichia coli*." *J Biol Chem* 248(7): 2480-6.

Brunger, A. T., Adams, P. D., Clore, G. M., DeLano, W. L., Gros, P., Grosse-Kunstleve, R. W., Jiang, J. S., Kuszewski, J., Nilges, M., Pannu, N. S., Read, R. J., Rice, L. M., Simonson, T. and Warren, G. L. (1998). "Crystallography & NMR system: A new software suite for macromolecular structure determination." *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 54(Pt 5): 905-21.

Cacciapuoti, G., Porcelli, M., Moretti, M. A., Sorrentino, F., Concilio, L., Zappia, V., Liu, Z. J., Tempel, W., Schubot, F., Rose, J. P., Wang, B. C., Brereton, P. S., Jenney, F. E. and Adams, M. W. (2007). "The first agmatine/cadaverine aminopropyl transferase: biochemical and structural characterization of an enzyme involved in polyamine biosynthesis in the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*." *J Bacteriol* 189(16): 6057-67.

Carbonell, J. and Blazquez, M. A. (2009). "Regulatory Mechanisms of Polyamine Biosynthesis in Plants." *Genes & Genomics* 31(2): 107-18.

Carbonell, J. and Navarro, J. L. (1989). "Correlation of spermine levels with ovary senescence and with fruit set and development in *Pisum sativum* L." *Planta* 178(4): 482-87.

Cartwright, D. A., Brady, S. M., Orlando, D. A., Sturmfels, B. and Benfey, P. N. (2009). "Reconstructing spatiotemporal gene expression data from partial observations." *Bioinformatics* 25(19): 2581-7.

CCP4 (1994). "The CCP4 suite: programs for protein crystallography." *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 50(Pt 5): 760-3.

Clay, N. K. and Nelson, T. (2005). "Arabidopsis thickvein mutation affects vein thickness and organ vascularization, and resides in a provascular

cell-specific spermine synthase involved in vein definition and in polar auxin transport." *Plant Physiol* 138(2): 767-77.

Clough, S. J. and Bent, A. F. (1998). "Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*." *Plant J* 16(6): 735-43.

Childs, A. C., Mehta, D. J. and Gerner, E. W. (2003). "Polyamine-dependent gene expression." *Cell Mol Life Sci* 60(7): 1394-406.

Dalla Via, L., Di Noto, V. and Toninello, A. (1999). "Binding of spermidine and putrescine to energized liver mitochondria." *Arch Biochem Biophys* 365(2): 231-8.

David-Assael, O., Saul, H., Saul, V., Mizrachy-Dagri, T., Berezin, I., Brook, E. and Shaul, O. (2005). "Expression of AtMHX, an *Arabidopsis* vacuolar metal transporter, is repressed by the 5' untranslated region of its gene." *J Exp Bot* 56(413): 1039-47.

de Alencastro, G., McCloskey, D. E., Kliemann, S. E., Maranduba, C. M., Pegg, A. E., Wang, X., Bertola, D. R., Schwartz, C. E., Passos-Bueno, M. R. and Sertie, A. L. (2008). "New SMS mutation leads to a striking reduction in spermine synthase protein function and a severe form of Snyder-Robinson X-linked recessive mental retardation syndrome." *J Med Genet* 45(8): 539-43.

Douglas, S. J., Chuck, G., Dengler, R. E., Pelecanda, L. and Riggs, C. D. (2002). "KNAT1 and ERECTA regulate inflorescence architecture in *Arabidopsis*." *Plant Cell* 14(3): 547-58.

Dufe, V. T., Luersen, K., Eschbach, M. L., Haider, N., Karlberg, T., Walter, R. D. and Al-Karadaghi, S. (2005). "Cloning, expression, characterisation and three-dimensional structure determination of *Caenorhabditis elegans* spermidine synthase." *FEBS Lett* 579(27): 6037-43.

Dufe, V. T., Qiu, W., Muller, I. B., Hui, R., Walter, R. D. and Al-Karadaghi, S. (2007). "Crystal structure of *Plasmodium falciparum* spermidine synthase in complex with the substrate decarboxylated S-adenosylmethionine and the potent inhibitors 4MCHA and AdoDATO." *J Mol Biol* 373(1): 167-77.

Edgar, R. C. (2004). "MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput." *Nucleic Acids Res* 32(5): 1792-7.

Edwards, K., Johnstone, C. and Thompson, C. (1991). "A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis." *Nucleic Acids Res* 19(6): 1349.

Esau, K. (1977). *Anatomy of seed plants* 2^o Edition E. J. W. Sons.

Fernandes, J. O. and Ferreira, M. A. (2000). "Combined ion-pair extraction and gas chromatography-mass spectrometry for the simultaneous determination of diamines, polyamines and aromatic amines in Port wine and grape juice." *J Chromatogr A* 886(1-2): 183-95.

Flores, H. E. and Galston, A. W. (1982). "Analysis of Polyamines in Higher Plants by High Performance Liquid Chromatography." *Plant Physiol* 69(3): 701-06.

Franceschetti, M., Hanfrey, C., Scaramagli, S., Torrigiani, P., Bagni, N., Burtin, D. and Michael, A. J. (2001). "Characterization of monocot and dicot plant S-adenosyl-l-methionine decarboxylase gene families including identification in the mRNA of a highly conserved pair of upstream overlapping open reading frames." *Biochem J* 353(Pt 2): 403-9.

Galston, A. W. (1983). "Polyamines as modulators of plant development." *Bioscience* 33(6): 382-88.

Galston, A. W. and Sawhney, R. K. (1990). "Polyamines in plant physiology." *Plant Physiol* 94(2): 406-10.

Gancedo, C. and Flores, C. L. (2008). "Moonlighting proteins in yeasts." *Microbiol Mol Biol Rev* 72(1): 197-210, table of contents.

Ge, C., Cui, X., Wang, Y., Hu, Y., Fu, Z., Zhang, D., Cheng, Z. and Li, J. (2006). "BUD2, encoding an S-adenosylmethionine decarboxylase, is required for Arabidopsis growth and development." *Cell Res* 16(5): 446-56.

Geuns, J. M., Smets, R., Struyf, T., Prinsen, E., Valcke, R. and Van Onckelen, H. (2001). "Apical dominance in Pssu-ipt-transformed tobacco." *Phytochemistry* 58(6): 911-21.

Godiard, L., Sauviac, L., Torii, K. U., Grenon, O., Mangin, B., Grimsley, N. H. and Marco, Y. (2003). "ERECTA, an LRR receptor-like kinase protein controlling development pleiotropically affects resistance to bacterial wilt." *Plant J* 36(3): 353-65.

Grant, J. J. and Loake, G. J. (2000). "Role of reactive oxygen intermediates and cognate redox signaling in disease resistance." *Plant Physiol* 124(1): 21-9.

Graser, G. and Hartmann, T. (2000). "Biosynthesis of spermidine, a direct precursor of pyrrolizidine alkaloids in root cultures of *Senecio vulgaris* L." *Planta* 211(2): 239-45.

Greene, E. A., Codomo, C. A., Taylor, N. E., Henikoff, J. G., Till, B. J., Reynolds, S. H., Enns, L. C., Burtner, C., Johnson, J. E., Odden, A. R., Comai, L. and Henikoff, S. (2003). "Spectrum of chemically induced mutations from a large-scale reverse-genetic screen in Arabidopsis." *Genetics* 164(2): 731-40.

Guindon, S. and Gascuel, O. (2003). "A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood." *Syst Biol* 52(5): 696-704.

Haider, N., Eschbach, M. L., Dias Sde, S., Gilberger, T. W., Walter, R. D. and Luersen, K. (2005). "The spermidine synthase of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*: molecular and biochemical characterisation of the polyamine synthesis enzyme." *Mol Biochem Parasitol* 142(2): 224-36.

Hamana, K., Niitsu, M., Samejima, K. and Matsuzaki, S. (1992). "N4-Methylthermospermine in leguminous seeds." *Phytochemistry* 31(4): 1410-12.

Hamana, K., Niitsu, M. and Samejima, K. (1998). "Unusual polyamines in aquatic plants: the occurrence of homospermidine, norspermidine, thermospermine, norspermine, aminopropylhomospermidine, bis(aminopropyl)ethanediamine, and methylspermidine." *Canadian Journal of Botany* 76(1): 130-33.

Hamasaki-Katagiri, N., Katagiri, Y., Tabor, C. W. and Tabor, H. (1998). "Spermine is not essential for growth of *Saccharomyces cerevisiae*: identification of the SPE4 gene (spermine synthase) and characterization of a spe4 deletion mutant." *Gene* 210(2): 195-201.

Hamasaki-Katagiri, N., Tabor, C. W. and Tabor, H. (1997). "Spermidine biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*: polyamine requirement of a null mutant of the SPE3 gene (spermidine synthase)." *Gene* 187(1): 35-43.

Hanfrey, C., Elliott, K. A., Franceschetti, M., Mayer, M. J., Illingworth, C. and Michael, A. J. (2005). "A dual upstream open reading frame-based autoregulatory circuit controlling polyamine-responsive translation." *J Biol Chem* 280(47): 39229-37.

Hanfrey, C., Franceschetti, M., Mayer, M. J., Illingworth, C. and Michael, A. J. (2002). "Abrogation of upstream open reading frame-mediated translational control of a plant S-adenosylmethionine decarboxylase results in polyamine disruption and growth perturbations." *J Biol Chem* 277(46): 44131-9.

Hanfrey, C., Sommer, S., Mayer, M. J., Burtin, D. and Michael, A. J. (2001). "Arabidopsis polyamine biosynthesis: absence of ornithine decarboxylase and the mechanism of arginine decarboxylase activity." *Plant J* 27(6): 551-60.

Hanzawa, Y., Imai, A., Michael, A. J., Komeda, Y. and Takahashi, T. (2002). "Characterization of the spermidine synthase-related gene family in *Arabidopsis thaliana*." *FEBS Lett* 527(1-3): 176-80.

Hanzawa, Y., Takahashi, T. and Komeda, Y. (1997). "ACL5: an *Arabidopsis* gene required for internodal elongation after flowering." *Plant J* 12(4): 863-74.

Hanzawa, Y., Takahashi, T., Michael, A. J., Burtin, D., Long, D., Pineiro, M., Coupland, G. and Komeda, Y. (2000). "ACAULIS5, an *Arabidopsis* gene required for stem elongation, encodes a spermine synthase." *Embo J* 19(16): 4248-56.

Hashimoto, T., Tamaki, K., Suzuki, K. and Yamada, Y. (1998). "Molecular cloning of plant spermidine synthases." *Plant Cell Physiol* 39(1): 73-9.

Havelange, A., Lejeune, P., Bernier, G., Kaur-Sawhney, R. and Galston, A. W. (1996). "Putrescine export from leaves in relation to floral transition in *Sinapis alba*." *Physiologia Plantarum* 96(1): 59-65.

Hayashi, S., Murakami, Y. and Matsufuji, S. (1996). "Ornithine decarboxylase antizyme: a novel type of regulatory protein." *Trends Biochem Sci* 21(1): 27-30.

Hayden, C. A. and Jorgensen, R. A. (2007). "Identification of novel conserved peptide uORF homology groups in Arabidopsis and rice reveals ancient eukaryotic origin of select groups and preferential association with transcription factor-encoding genes." *BMC Biol* 5: 32.

Hernandez-Sanchez, C., Mansilla, A., de la Rosa, E. J., Pollerberg, G. E., Martinez-Salas, E. and de Pablo, F. (2003). "Upstream AUGs in embryonic proinsulin mRNA control its low translation level." *Embo J* 22(20): 5582-92.

Hibi, N., Fujita, T., Hatano, M., Hashimoto, T. and Yamada, Y. (1992). "Putrescine N-Methyltransferase in Cultured Roots of Hyoscyamus albus: n-Butylamine as a Potent Inhibitor of the Transferase both in Vitro and in Vivo." *Plant Physiol* 100(2): 826-35.

Hoagland (1920). "Optimum nutrient solutions for plants." *Science* 52(1354): 562-64.

Hornitschek, P., Lorrain, S., Zoete, V., Michielin, O. and Fankhauser, C. (2009). "Inhibition of the shade avoidance response by formation of non-DNA binding bHLH heterodimers." *Embo J* 28(24): 3893-902.

Hosoya, R., Hamana, K., Niitsu, M. and Itoh, T. (2004). "Polyamine analysis for chemotaxonomy of thermophilic eubacteria: Polyamine distribution profiles within the orders Aquificales, Thermotogales, Thermodesulfobacteriales, Thermales, Thermoanaerobacteriales, Clostridiales and Bacillales." *J Gen Appl Microbiol* 50(5): 271-87.

Igarashi, K. and Kashiwagi, K. (2000). "Polyamines: mysterious modulators of cellular functions." *Biochem Biophys Res Commun* 271(3): 559-64.

Ikeguchi, Y., Bewley, M. C. and Pegg, A. E. (2006). "Aminopropyltransferases: function, structure and genetics." *J Biochem* 139(1): 1-9.

Imai, A., Hanzawa, Y., Komura, M., Yamamoto, K. T., Komeda, Y. and Takahashi, T. (2006). "The dwarf phenotype of the Arabidopsis *acl5* mutant is suppressed by a mutation in an upstream ORF of a bHLH gene." *Development* 133(18): 3575-85.

Imai, A., Komura, M., Kawano, E., Kuwashiro, Y. and Takahashi, T. (2008). "A semi-dominant mutation in a ribosomal protein L10 gene suppresses the dwarf phenotype of the *acl5* mutant in Arabidopsis thaliana." *Plant J*.

Imai, A., Matsuyama, T., Hanzawa, Y., Akiyama, T., Tamaoki, M., Saji, H., Shirano, Y., Kato, T., Hayashi, H., Shibata, D., Tabata, S., Komeda, Y. and Takahashi, T. (2004). "Spermidine synthase genes are essential for survival of Arabidopsis." *Plant Physiol* 135(3): 1565-73.

Ivanov, I. P. and Atkins, J. F. (2007). "Ribosomal frameshifting in decoding antizyme mRNAs from yeast and protists to humans: close to 300 cases reveal remarkable diversity despite underlying conservation." *Nucleic Acids Res* 35(6): 1842-58.

Ivanov, I. P., Atkins, J. F. and Michael, A. J. (2010). "A profusion of upstream open reading frame mechanisms in polyamine-responsive translational regulation." *Nucleic Acids Res* 38(2): 353-9.

Iwasaki, T. and Shibaoka, H. (1991). "Brassinosteroids Act as Regulators of Tracheary-Element Differentiation in Isolated Zinnia Mesophyll Cells." *Plant Cell Physiol.* 32(7): 1007-14.

Janowitz, T., Kneifel, H. and Piotrowski, M. (2003). "Identification and characterization of plant agmatine iminohydrolase, the last missing link in polyamine biosynthesis of plants." *FEBS Lett* 544(1-3): 258-61.

Jean, G. B., Pierre, S. M., Joseph, W., Fritz, G. and Philippe, L. U. X. (1988). "Fluorinated analogues of spermidine as substrates of spermine synthase." *European Journal of Biochemistry* 176(2): 237-42.

Kajander, E. O., Kauppinen, L. I., Pajula, R. L., Karkola, K. and Eloranta, T. O. (1989). "Purification and partial characterization of human polyamine synthases." *Biochem J* 259(3): 879-86.

Takehi, J., Kuwashiro, Y., Niitsu, M. and Takahashi, T. (2008). "Thermospermine is required for stem elongation in *Arabidopsis thaliana*." *Plant Cell Physiol* 49(9): 1342-9.

Kelley, L. A. and Sternberg, M. J. (2009). "Protein structure prediction on the Web: a case study using the Phyre server." *Nat Protoc* 4(3): 363-71.

Knott, J. M., Romer, P. and Sumper, M. (2007). "Putative spermine synthases from *Thalassiosira pseudonana* and *Arabidopsis thaliana* synthesize thermospermine rather than spermine." *FEBS Lett* 581(16): 3081-6.

Korolev, S., Ikeguchi, Y., Skarina, T., Beasley, S., Arrowsmith, C., Edwards, A., Joachimiak, A., Pegg, A. E. and Savchenko, A. (2002). "The crystal structure of spermidine synthase with a multisubstrate adduct inhibitor." *Nat Struct Biol* 9(1): 27-31.

Kozak, M. (2001). "Constraints on reinitiation of translation in mammals." *Nucleic Acids Res* 29(24): 5226-32.

Kubo, M., Udagawa, M., Nishikubo, N., Horiguchi, G., Yamaguchi, M., Ito, J., Mimura, T., Fukuda, H. and Demura, T. (2005). "Transcription switches for protoxylem and metaxylem vessel formation." *Genes Dev* 19(16): 1855-60.

Kuehn, G. D., Rodriguez-Garay, B., Bagga, S. and Phillips, G. C. (1990). "Novel Occurrence of Uncommon Polyamines in Higher Plants." *Plant Physiol* 94(3): 855-57.

Kumar, A., Taylor, M., Altabella, T. and Tiburcio, A. F. (1997). "Recent advances in polyamine research." *Trends in Plant Science* 2(4): 124-30.

Law, G. L., Raney, A., Heusner, C. and Morris, D. R. (2001). "Polyamine regulation of ribosome pausing at the upstream open reading frame of S-adenosylmethionine decarboxylase." *J Biol Chem* 276(41): 38036-43.

Long, D., Goodrich, J., Wilson, K., Sundberg, E., Martin, M., Puangsomlee, P. and Coupland, G. (1997). "Ds elements on all five Arabidopsis chromosomes and assessment of their utility for transposon tagging." *Plant J* 11(1): 145-8.

Lu, P. K., Tsai, J. Y., Chien, H. Y., Huang, H., Chu, C. H. and Sun, Y. J. (2007). "Crystal structure of *Helicobacter pylori* spermidine synthase: a Rossmann-like fold with a distinct active site." *Proteins* 67(3): 743-54.

Martin-Tanguy, J. (1997). "Conjugated polyamines and reproductive development: Biochemical, molecular and physiological approaches." *Physiologia Plantarum* 100(3): 675-88.

Martone, P. T., Estevez, J. M., Lu, F., Ruel, K., Denny, M. W., Somerville, C. and Ralph, J. (2009). "Discovery of lignin in seaweed reveals convergent evolution of cell-wall architecture." *Curr Biol* 19(2): 169-75.

Masle, J., Gilmore, S. R. and Farquhar, G. D. (2005). "The ERECTA gene regulates plant transpiration efficiency in Arabidopsis." *Nature* 436(7052): 866-70.

Matsufuji, S., Matsufuji, T., Miyazaki, Y., Murakami, Y., Atkins, J. F., Gesteland, R. F. and Hayashi, S. (1995). "Autoregulatory frameshifting in decoding mammalian ornithine decarboxylase antizyme." *Cell* 80(1): 51-60.

McCourt, P. (1999). "Genetic Analysis of Hormone Signaling." *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 50: 219-43.

Milioni, D., Sado, P. E., Stacey, N. J., Domingo, C., Roberts, K. and McCann, M. C. (2001). "Differential expression of cell-wall-related genes during the formation of tracheary elements in the *Zinnia* mesophyll cell system." *Plant Mol Biol* 47(1-2): 221-38.

Minguet, E. G., Vera-Sirera, F., Marina, A., Carbonell, J. and Blazquez, M. A. (2008). "Evolutionary diversification in polyamine biosynthesis." *Mol Biol Evol* 25(10): 2119-28.

Morris, D. R. and Geballe, A. P. (2000). "Upstream open reading frames as regulators of mRNA translation." *Mol Cell Biol* 20(23): 8635-42.

Muñiz, L., Minguet, E. G., Singh, S. K., Pesquet, E., Vera-Sirera, F., Moreau-Courtois, C. L., Carbonell, J., Blazquez, M. A. and Tuominen, H. (2008). "ACAULIS5 controls Arabidopsis xylem specification through the prevention of premature cell death." *Development* 135(15): 2573-82.

Murashige, T. and Skoog, F. (1962). "A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures." *Physiologia Plantarum* 15(3): 473-97.

Nishimura, T., Wada, T., Yamamoto, K. T. and Okada, K. (2005). "The Arabidopsis STV1 protein, responsible for translation reinitiation, is required for auxin-mediated gynoecium patterning." *Plant Cell* 17(11): 2940-53.

Ohashi-Ito, K. and Fukuda, H. (2010). "Transcriptional regulation of vascular cell fates." *Curr Opin Plant Biol* 13: 7.

Ohashi-Ito, K., Oda, Y. and Fukuda, H. (2010). "Arabidopsis VASCULAR-RELATED NAC-DOMAIN6 Directly Regulates the Genes That Govern Programmed Cell Death and Secondary Wall Formation during Xylem Differentiation." *Plant Cell* Epub ahead of print.

Ohnuma, M., Terui, Y., Tamakoshi, M., Mitome, H., Niitsu, M., Samejima, K., Kawashima, E. and Oshima, T. (2005). "N1-aminopropylagmatine, a new polyamine produced as a key intermediate in polyamine biosynthesis of an extreme thermophile, *Thermus thermophilus*." *J Biol Chem* 280(34): 30073-82.

Oshima, T. (1979). "A new polyamine, thermospermine, 1,12-diamino-4,8-diazadodecane, from an extreme thermophile." *J Biol Chem* 254(18): 8720-2.

Pajula, R. L. (1983). "Kinetic properties of spermine synthase from bovine brain." *Biochem J* 215(3): 669-76.

Pajula, R. L. and Raina, A. (1979). "Methylthioadenosine, a potent inhibitor of spermine synthase from bovine brain." *FEBS Lett* 99(2): 343-5.

Panicot, M., Minguet, E. G., Ferrando, A., Alcazar, R., Blazquez, M. A., Carbonell, J., Altabella, T., Koncz, C. and Tiburcio, A. F. (2002). "A polyamine metabolon involving aminopropyl transferase complexes in Arabidopsis." *Plant Cell* 14(10): 2539-51.

Park, M. H. (2006). "The post-translational synthesis of a polyamine-derived amino acid, hypusine, in the eukaryotic translation initiation factor 5A (eIF5A)." *J Biochem* 139(2): 161-9.

Paschalidis, K. A. and Roubelakis-Angelakis, K. A. (2005). "Sites and regulation of polyamine catabolism in the tobacco plant. Correlations with cell division/expansion, cell cycle progression, and vascular development." *Plant Physiol* 138(4): 2174-84.

Pegg, A. E., Shuttleworth, K. and Hibasami, H. (1981). "Specificity of mammalian spermidine synthase and spermine synthase." *Biochem J* 197(2): 315-20.

Pieper, U., Eswar, N., Braberg, H., Madhusudhan, M. S., Davis, F. P., Stuart, A. C., Mirkovic, N., Rossi, A., Marti-Renom, M. A., Fiser, A., Webb, B., Greenblatt, D., Huang, C. C., Ferrin, T. E. and Sali, A. (2004). "MODBASE, a database of annotated comparative protein structure models, and associated resources." *Nucleic Acids Res* 32(Database issue): D217-22.

Piotrowski, M., Janowitz, T. and Kneifel, H. (2003). "Plant C-N hydrolases and the identification of a plant N-carbamoylputrescine

amidohydrolase involved in polyamine biosynthesis." *J Biol Chem* 278(3): 1708-12.

Pires, N. and Dolan, L. (2009). "Origin and diversification of basic-helix-loop-helix proteins in plants." *Mol Biol Evol* 27(4): 862-74.

Pyo, H., Demura, T. and Fukuda, H. (2007). "TERE; a novel cis-element responsible for a coordinated expression of genes related to programmed cell death and secondary wall formation during differentiation of tracheary elements." *Plant J* 51(6): 955-65.

Rahmani, F., Hummel, M., Schuurmans, J., Wiese-Klinkenberg, A., Smeekens, S. and Hanson, J. (2009). "Sucrose control of translation mediated by an upstream open reading frame-encoded peptide." *Plant Physiol* 150(3): 1356-67.

Raina, A., Hyvonen, T., Eloranta, T., Voutilainen, M., Samejima, K. and Yamanoha, B. (1984). "Polyamine synthesis in mammalian tissues. Isolation and characterization of spermidine synthase from bovine brain." *Biochem J* 219(3): 991-1000.

Rambla, J. L., Vera-Sirera, F., Blazquez, M. A., Carbonell, J. and Granell, A. (2010). "Quantitation of biogenic tetraamines in *Arabidopsis thaliana*." *Anal Biochem* 397(2): 208-11.

Raney, A., Baron, A. C., Mize, G. J., Law, G. L. and Morris, D. R. (2000). "In vitro translation of the upstream open reading frame in the mammalian mRNA encoding S-adenosylmethionine decarboxylase." *J Biol Chem* 275(32): 24444-50.

Raven, J. A. (1993). "The evolution of vascular plants in relation to quantitative functioning of dead water conducting cells and stomata." *Biological Reviews* 68(3): 337-63.

Rich, A., Nordheim, A. and Wang, A. H. (1984). "The chemistry and biology of left-handed Z-DNA." *Annu Rev Biochem* 53: 791-846.

Roberts, D. R., Dumbroff, E. B. and Thompson, J. E. (1986). "Exogenous polyamines alter membrane fluidity in bean leaves — a basis for potential misinterpretation of their true physiological role." *Planta* 167(3): 395-401.

Rodriguez-Garay, B., Phillips, G. C. and Kuehn, G. D. (1989). "Detection of Norspermidine and Norspermine in *Medicago sativa* L. (Alfalfa)." *Plant Physiol* 89(2): 525-29.

Samejima, K. and Yamanoha, B. (1982). "Purification of spermidine synthase from rat ventral prostate by affinity chromatography on immobilized S-adenosyl(5')-3-thiopropylamine." *Arch Biochem Biophys* 216(1): 213-22.

Sauter, M., Cornell, K. A., Beszteri, S. and Rzewuski, G. (2004). "Functional analysis of methylthioribose kinase genes in plants." *Plant Physiol* 136(4): 4061-71.

Schwab, R., Ossowski, S., Riester, M., Warthmann, N. and Weigel, D. (2006). "Highly specific gene silencing by artificial microRNAs in Arabidopsis." *Plant Cell* 18(5): 1121-33.

Seiler, N. and Raul, F. (2005). "Polyamines and apoptosis." *J Cell Mol Med* 9(3): 623-42.

Sindhu, R. K. and Cohen, S. S. (1984). "Propylamine Transferases in Chinese Cabbage Leaves." *Plant Physiol* 74(3): 645-49.

Souciet, G., Menand, B., Ovesna, J., Cosset, A., Dietrich, A. and Wintz, H. (1999). "Characterization of two bifunctional Arabidopsis thaliana genes coding for mitochondrial and cytosolic forms of valyl-tRNA synthetase and threonyl-tRNA synthetase by alternative use of two in-frame AUGs." *Eur J Biochem* 266(3): 848-54.

Stenzel, O., Teuber, M. and Drager, B. (2006). "Putrescine N-methyltransferase in Solanum tuberosum L., a calystegine-forming plant." *Planta* 223(2): 200-12.

Sundaresan, V., Springer, P., Volpe, T., Haward, S., Jones, J. D., Dean, C., Ma, H. and Martienssen, R. (1995). "Patterns of gene action in plant development revealed by enhancer trap and gene trap transposable elements." *Genes Dev* 9(14): 1797-810.

Takahashi, Y., Berberich, T., Miyazaki, A., Seo, S., Ohashi, Y. and Kusano, T. (2003). "Spermine signalling in tobacco: activation of mitogen-activated protein kinases by spermine is mediated through mitochondrial dysfunction." *Plant J* 36(6): 820-9.

Teuber, M., Azemi, M. E., Namjoyan, F., Meier, A. C., Wodak, A., Brandt, W. and Drager, B. (2007). "Putrescine N-methyltransferases--a structure-function analysis." *Plant Mol Biol* 63(6): 787-801.

Thomas, T. and Thomas, T. J. (2001). "Polyamines in cell growth and cell death: molecular mechanisms and therapeutic applications." *Cell Mol Life Sci* 58(2): 244-58.

Thomas, T. and Thomas, T. J. (2003). "Polyamine metabolism and cancer." *J Cell Mol Med* 7(2): 113-26.

Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. and Higgins, D. G. (1997). "The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools." *Nucleic Acids Res* 25(24): 4876-82.

Tiburcio, A. F., Teresa, A., Antoni, B. and Carles, M. (1997). "Polyamine metabolism and its regulation." *Physiologia Plantarum* 100(3): 664-74.

Toledo-Ortiz, G., Huq, E. and Quail, P. H. (2003). "The Arabidopsis basic/helix-loop-helix transcription factor family." *Plant Cell* 15(8): 1749-70.

Torrigiani, P., Maria Maddalena, A., Gabriella, P., Barbara, M., Donatella, S.-F. and Nello, B. (1987). "Free and conjugated polyamines during

de novo floral and vegetative bud formation in thin cell layers of tobacco." *Physiologia Plantarum* 70(3): 453-60.

Tsukaya, H., Naito, S., Redei, G. P. and Komeda, Y. (1993). "A new class of mutations in *Arabidopsis thaliana*, *acaulis1*, affecting the development of both inflorescences and leaves." *Development* 118(3): 751-64.

Turner, S., Gallois, P. and Brown, D. (2007). "Tracheary element differentiation." *Annu Rev Plant Biol* 58: 407-33.

van Zanten, M., Snoek, L. B., Proveniers, M. C. and Peeters, A. J. (2009). "The many functions of ERECTA." *Trends Plant Sci*.

Vila-Sanjurjo, A., Schuwirth, B. S., Hau, C. W. and Cate, J. H. (2004). "Structural basis for the control of translation initiation during stress." *Nat Struct Mol Biol* 11(11): 1054-9.

Walton, N. J., Peerless, A. C. J., Robins, R. J., Rhodes, M. J. C., Boswell, H. D. and Robins, D. J. (1994). "Purification and properties of putrescine N-methyltransferase from transformed roots of *Datura stramonium* L." *Planta* 193(1): 9-15.

Wallace, H. M., Fraser, A. V. and Hughes, A. (2003). "A perspective of polyamine metabolism." *Biochem J* 376(Pt 1): 1-14.

Wang, L. and Wessler, S. R. (2001). "Role of mRNA secondary structure in translational repression of the maize transcriptional activator Lc(1,2)." *Plant Physiol* 125(3): 1380-7.

Wang, X., Ikeguchi, Y., McCloskey, D. E., Nelson, P. and Pegg, A. E. (2004). "Spermine synthesis is required for normal viability, growth, and fertility in the mouse." *J Biol Chem* 279(49): 51370-5.

Weiger, T. M., Langer, T. and Hermann, A. (1998). "External action of di- and polyamines on maxi calcium-activated potassium channels: an electrophysiological and molecular modeling study." *Biophys J* 74(2 Pt 1): 722-30.

Wiese, A., Elzinga, N., Wobbes, B. and Smeekens, S. (2004). "A conserved upstream open reading frame mediates sucrose-induced repression of translation." *Plant Cell* 16(7): 1717-29.

Williams, K. (1997). "Interactions of polyamines with ion channels." *Biochem J* 325 (Pt 2): 289-97.

Wu, H., Min, J., Ikeguchi, Y., Zeng, H., Dong, A., Loppnau, P., Pegg, A. E. and Plotnikov, A. N. (2007). "Structure and mechanism of spermidine synthases." *Biochemistry* 46(28): 8331-9.

Wu, H., Min, J., Zeng, H., McCloskey, D. E., Ikeguchi, Y., Loppnau, P., Michael, A. J., Pegg, A. E. and Plotnikov, A. N. (2008). "Crystal structure of human spermine synthase: implications of substrate binding and catalytic mechanism." *J Biol Chem* 283(23): 16135-46.

Xia, X., Hou, F., Li, J. and Nie, H. (2005). "Ribosomal protein L10a, a bridge between trichosanthin and the ribosome." *Biochem Biophys Res Commun* 336(1): 281-6.

Yamaguchi, K., Takahashi, Y., Berberich, T., Imai, A., Miyazaki, A., Takahashi, T., Michael, A. and Kusano, T. (2006). "The polyamine spermine protects against high salt stress in *Arabidopsis thaliana*." *FEBS Lett* 580(30): 6783-8.

Yamaguchi, K., Takahashi, Y., Berberich, T., Imai, A., Takahashi, T., Michael, A. J. and Kusano, T. (2007). "A protective role for the polyamine spermine against drought stress in *Arabidopsis*." *Biochem Biophys Res Commun* 352(2): 486-90.

Yamaguchi, M., Goue, N., Igarashi, H., Ohtani, M., Nakano, Y., Mortimer, J. C., Nishikubo, N., Kubo, M., Katayama, Y., Kakegawa, K., Dupree, P. and Demura, T. (2010). "VASCULAR-RELATED NAC-DOMAIN6 and VASCULAR-RELATED NAC-DOMAIN7 effectively induce transdifferentiation into xylem vessel elements under control of an induction system." *Plant Physiol* 153(3): 906-14.

Yamakawa, H., Kamada, H., Satoh, M. and Ohashi, Y. (1998). "Spermine is a salicylate-independent endogenous inducer for both tobacco acidic pathogenesis-related proteins and resistance against tobacco mosaic virus infection." *Plant Physiol* 118(4): 1213-22.

Yamanoha, B. and Cohen, S. S. (1985). "S-Adenosylmethionine Decarboxylase and Spermidine Synthase from Chinese Cabbage." *Plant Physiol* 78(4): 784-90.

Yoon, S. O., Lee, Y. S., Lee, S. H. and Cho, Y. D. (2000). "Polyamine synthesis in plants: isolation and characterization of spermidine synthase from soybean (*Glycine max*) axes." *Biochim Biophys Acta* 1475(1): 17-26.

ANEXOS

Los anexos incluidos en el disco compacto que acompaña esta Tesis son los siguientes archivos:

- Anexo oligos.doc→Relación de oligonucleótidos empleados en la secuenciación de diversos genes, durante el cartografiado de *ajx1-4* y *ajx2-31*.
- Anexo resumen resultados microarrays.xlsx→Listado de genes diferencialmente expresados de las micromatrices de esta Tesis.
- Anexo Secuencias Figura 20, 21, 33, 39, 41 y 43.txt→Relación de secuencias empleadas en la figuras 20, 21, 33, 39, 41 y 33 de esta Tesis, respectivamente.
- Anexo ACAULIS5 controls Arabidopsis xylem specification through the prevention of premature cell death, anexo Evolutionary Diversification in Polyamine Biosynthesis, anexo Quantitation of biogenic tetraamines in Arabidopsis thaliana y anexo Role of polyamines in plant vascular development.pdf→Relación de las cuatro publicaciones en la que participa el autor de la Tesis y realizados durante la misma.

