

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

