

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA

MECANISMOS DE TOXICIDAD DE POLIAMINAS: INHIBICIÓN DEL RECAMBIO DE PROTEÍNAS



Tesis doctoral realizada por
Enric Sayas Montañana

Y dirigida por
Prof. Ramón Serrano Salom
Dr. Alejandro Ferrando Monleón

Abril, 2014

*When I Heard the learn'd astronomer
When the proofs, the figures, were ranged in columns before me
When I was shown the charts and the diagrams, to add, divide, and measure them
When I, sitting, heard the astronomer, where he lectured with much applause in the
lecture-room
How soon, unaccountable, I became tired and sick
Till rising and gliding out, I wander'd off by myself
In the mystical moist night-air, and from time to time
Look'd up in perfect silence at the stars*

Walt Whitman (1819-1892)

AGRAIMENTS

RESUMEN

Las poliaminas son pequeñas moléculas de naturaleza policatiónica presentes en todos los organismos, en donde tienen funciones esenciales que aún no se comprenden en su totalidad. Por otro lado, altas concentraciones de poliaminas son tóxicas mediante mecanismos también desconocidos (Alejandro et al., 2007, EMBO J). El objetivo de este trabajo ha sido elucidar los mecanismos de toxicidad de la Norespermidina (NE), una triamina que no está presente en la mayoría de especies estudiadas, utilizando los organismos modelo *Arabidopsis thaliana*, *Saccharomyces cerevisiae* y líneas celulares HeLa. Los resultados preliminares mostraron que esta sustancia induce genes de respuesta a estrés oxidativo, osmótico y de choque térmico. Estas observaciones nos llevaron a evaluar el efecto de esta sustancia a nivel de proteínas poliubiquitiladas, en donde se vio que la NE reduce los niveles de estas proteínas, seguramente a partir de una inhibición de la reacción de poliubiquitilación. Recientemente Suraweera et al. (2012, Mol Cell) observaron que la inhibición del proteasoma causa una reducción letal de los niveles intracelulares de aminoácidos, y que la adición de aminoácidos confiere tolerancia frente a dicha inhibición. De manera similar, hemos observado que el tratamiento con NE induce la ruta GCN, una ruta que responde a la ausencia de aminoácidos y que la suplementación con aminoácidos confiere tolerancia a esta sustancia. Además también existen indicios de que esta sustancia inhiba al complejo TOR1, otra ruta capaz de sentir la ausencia de aminoácidos. Esto sugiere que la NE, al inhibir la poliubiquitilación, tiene un efecto similar a los inhibidores del proteasoma, ya que causa una reducción letal de los niveles de aminoácidos internos. Además se ha observado que la espermidina, una triamina natural presente en los organismos estudiados, tiene un efecto a dosis altas muy similar a la NE. Finalmente, se ha estudiado el efecto de estas sustancias en la longevidad de la levadura y la posible implicación de la ruta GCN y TOR1 en dicho proceso.

RESUM

Les poliamines són petites molècules de naturalesa policatònica presents a tots els organismes, on realitzen funcions essencials que encara no és comprenen a la seva totalitat. Nogensmenys, altes concentracions de poliamines són tòxiques mitjançant mecanismes també desconeguts (Alejandro *et al.*, 2007, EMBO J). L'objectiu d'aquest treball ha estat elucidar els mecanismes de toxicitat de la norespermidina (NE), una triamina que no està present en al majoria de espècies estudiades, utilitzant els organismes model *Arabidopsis thaliana*, *Saccharomyces cerevisiae* i línies cel·lulars *HeLa*. Els resultats preliminars demostraren que aquesta substància indueix gens de resposta a estrès oxidatiu, osmòtic i de xoc tèrmic. Aquestes observacions ens portaren a avaluar l'efecte d'aquesta substància a nivell de proteïnes poliubiquïtilades, on es va veure que la NE redueix els nivells d'aquest tipus de proteïnes, segurament a partir d'una inhibició de la reacció de poliubiquïtilació. Recentment Suraweera *et al.*, (2012, Mol Cell) han observat que la inhibició del proteasoma causa una reducció letal dels nivells intracel·lulars d'aminoàcids, i que l'addició d'amino àcids confereix tolerància front a aquesta inhibició. De manera similar, hem observat que el tractament amb NE indueix la ruta GCN, una ruta que respon a l'absència d'amino àcids, i que la suplementació amb aminoàcids confereix tolerància front a aquesta substància. A més, també hi ha indicis de que aquesta substància inhibeix al complex TOR1, una altra ruta de senyalització que respon als aminoàcids. Açò suggereix que la NE, al inhibir la poliubiquïtilació, té un efecte similar als inhibidors del proteasoma, ja que causa una reducció letal dels nivells d'amino àcids interns. A continuació s'ha observat que l'espermidina, una triamina natural present als organismes estudiats, posseeix un efecte a dosis altes molt similar a la NE. Finalment s'han estudiat els efectes d'aquestes substàncies en la longevitat del llevat i la possible implicació de la ruta GCN i TOR1 en aquest procés.

ABSTRACT

Polyamines are small polycationic molecules present in all organisms whose essential functions are not yet completely understood. On the other hand, high concentrations of polyamines are toxic through mechanisms also unknown (Alejandro *et al.*, 2007, EMBO J). The objective of this work was to elucidate the toxicity mechanisms of norespermidine (NE), an uncommon triamine which is not present in the majority of studied organisms, by studying its toxic effect in *Arabidopsis thaliana*, *Saccharomyces cerevisiae* and *HeLa* human cell lines. Preliminary results showed that this substance induces response genes to oxidative, osmotic and heat shock stress. This observations led us to evaluate the effect of NE at the level of polyubiquitylated proteins, where we demonstrated that this substance reduces the levels of this proteins, most probably via an inhibition of the polyubiquitylation cascade. Recently Suraweera *et al.*, (2012, Mol Cell) observed that proteasomal inhibition caused a lethal depletion of intracellular amino acids, and that supplementation of amino acids restored normal growth. Similarly, we've demonstrated that NE treatment induces the GCN pathway, a signal transduction pathway which gets activated in the absence of amino acids, and that supplementation with amino acids confers tolerance to NE. In addition, there are several evidences that hint that NE could also be inhibiting the TOR1 complex pathway, another signal transducing cascade that responds to amino acids. Taken together, all this data suggests that NE, by inhibiting polyubiquitylation, has a similar effect to other proteasomal inhibitors, causing an intracellular lethal depletion of amino acids. Furthermore, we observed that spermidine, a natural triamine in the organisms studied, has a similar effect at high concentrations as the NE. Finally, we've studied the effect of these substances promoting yeast lifespan and the possible implication of the GCN and TOR1 pathways.

Nota: ¿Cómo debe traducirse *Ubiquitin*?

Cuando fue descubierta en 1975, esta proteína se encontró en todos los tejidos estudiados, por ese motivo se le dio un nombre derivado de *ubiquitous*, y de ahí se le denominó *ubiquitin*. En muchas traducciones al español se utiliza una traducción directa de *ubiquitin* y se le denomina ubiquitina a esta proteína, tal y como se puede observar en la tercera edición del Vocabulario Científico y Técnico de la Real Academia de Ciencias (3ª edición, 1996). No obstante, *ubiquitin* es un vocablo derivado del término *ubiquitous*, término que sí existe en español, ubicuo. De este modo, al escribir ubiquitina se deja constancia de que justamente es una proteína ubicua, tal y como fue la intención inicial de sus descubridores. Este es el principal motivo por el cual en este trabajo se ha optado por traducir *ubiquitin* como ubiquitina.

Por otro lado, la función de esta proteína implica su unión a otras proteínas mediante un enlace isopeptídico entre el carboxilo terminal de la ubiquitina y los grupos ϵ -amino de las lisinas de la otra proteína. Este tipo de enlace ester o amida siempre da lugar a un grup *amil*-derivado. De modo que en la transferencia de ubiquitinas a una proteína se transfiere un grupo ubiquitilo, por lo que el nombre correcto de dicha reacción sería reacción de ubicuitilación.

Para más información sobre este tema me remito al apunte publicado por Luis Franco en la SEBBM nº162 (2009), texto sobre el que está basada esta nota.

Índice

INTRODUCCIÓN	1
1 ANTECEDENTES DEL PRESENTE TRABAJO.....	3
2 HOMEOSTASIS DE PROTEÍNAS.....	4
2.1 Causas de desnaturalización de proteínas.	7
2.2 Las proteínas chaperonas.....	8
2.3 El sistema ubiquitina proteasoma 26S (UPS).....	11
2.4 Autofagia	18
2.5 Mecanismos de agregación de proteínas.....	19
2.6 Efectos tóxicos de la agregación de proteínas.	19
3 HOMEOSTASIS DE AMINOÁCIDOS.....	20
3.1 La ruta GAAC o ruta GCN2.....	21
3.2 La ruta TORC1	25
4 POLIAMINAS	29
4.1 Metabolismo y regulación de poliaminas.....	30
4.2 Transporte de poliaminas.....	34
4.3 Distribución intracelular de poliaminas.....	36
4.4 Funciones de las poliaminas	37
4.5 Poliaminas y enfermedades humanas.....	40
4.6 Norespermidina.....	42
5 LONGEVIDAD	43
5.1 Longevidad cronológica versus longevidad replicativa	45
5.2 Autofagia, homeostasis de aminoácidos y longevidad	45
5.3 Efecto de la espermidina en la longevidad.....	47
5.4 Efecto del ácido acético en la longevidad cronológica.....	48

6	ORGANISMOS MODELO	48
6.1	Saccharomyces cerevisiae	49
6.2	Arabidopsis thaliana	49
6.3	Líneas celulares HeLa.....	50
	OBJETIVOS	51
	MATERIALES Y MÉTODOS.....	55
1	MATERIALES.....	57
1.1	Cepas y condiciones de cultivo de bacterias	57
1.2	Cepas y condiciones de cultivo de levadura.....	57
1.3	Ecotipos, mutantes y medios de cultivo de plantas	59
1.5	Cepas y condiciones de cultivo de líneas celulares	60
1.6	Vectores de clonación, expresión y transformación	60
1.7	Anticuerpos empleados para la inmunodetección de proteínas	61
1.8	Norespermidina.....	61
2	ENSAYOS DE CRECIMIENTO Y SENSIBILIDAD EN <i>S. CEREVISIAE</i>	62
2.1	Ensayo de crecimiento en medio sólido (goteos).....	62
2.2	Ensayo de crecimiento en medio líquido (bioscreen).	62
2.3	Ensayo de viabilidad	63
2.4	Ensayo de longevidad cronológica	63
2	MANIPULACIÓN Y CRECIMIENTO DE <i>A. THALIANA</i>	63
2.1	Esterilización de semillas	63
2.2	Cultivo in vitro en medio sólido.....	64
2.3	Cultivo en invernadero	64
2.4	Ensayo de aparición de cotiledones	64
3	CITOMETRÍA DE FLUJO CON LINEAS CELULARES.....	64
4	PURIFICACIÓN Y MANIPULACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS.....	65
4.1	Aislamiento de DNA plasmídico en <i>E. coli</i>	65
4.2	Aislamiento de DNA genómico de <i>A. thaliana</i>	66

4.3	Electroforesis de DNA.....	66
4.4	Aislamiento de RNA de <i>A. thaliana</i>	67
4.5	Electroforesis de RNA	67
4.6	Síntesis de cDNA.....	67
4.7	Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	68
4.8	PCR cuantitativa.....	69
5	TÉCNICAS DE TRANSFERENCIA GÉNICA	70
5.1	Transformación de <i>E. coli</i>	70
5.2	Transformación de <i>S. cerevisiae</i>	71
6	EXTRACCIÓN, ELECTROFORESIS Y TÉCNICAS DE DETECCIÓN DE PROTEÍNAS	
	71	
6.1	Obtención de extractos proteicos	71
6.2	Electroforesis y técnicas de detección de proteínas	73
6.3	Cuantificación de proteína total.....	75
7	ENSAYO DE UBICUITILACIÓN <i>IN VITRO</i>	76
7.1	Expresión de proteínas recombinantes en <i>E. coli</i>	76
7.2	Ensayo de ubicuitilación	77
8	ENSAYO DE TOMA DE LEUCINA.....	78
9	ENSAYO DE INHIBICIÓN DE SÍNTESIS DE PROTEÍNAS <i>IN VITRO</i>	78
10	CUANTIFICACIÓN DE LA ACTIVIDAD β -GALACTOSIDASA	79
11	TÉCNICAS DE MICROSCOPIA.....	79
11.1	Técnicas de microscopía confocal	79
11.2	Técnicas de microscopía de fluorescencia	80
12	ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA EN <i>A. THALIANA</i> TRATADA CON	
	NORESPERMIDINA MEDIANTE MICROMATRICES DE OLIGOS.....	80
12.1	Características de los microarrays empleados	80
12.2	Preparación de las muestras	80
12.3	Preparación de la sonda de RNA para la hibridación	81

12.4	Preparación de los microarrays para la hibridación	82
12.5	Prehibridación e hibridación de los microarrays	82
12.6	Lavado y escaneado de los microarrays	82
12.7	Preprocesamiento de los datos con el software Genepix	83
12.8	Procesamiento de los datos con el software Accuity y análisis estadístico.....	83
RESULTADOS.....		85
1	ANÁLISIS DE LA RESPUESTA TRANSCRIPCIONAL EN PLANTAS TRATADAS CON NORESPERMIDINA.....	87
2	IDENTIFICACIÓN DE LAS DIANAS DE TOXICIDAD DE LA NORESPERMIDINA EN <i>A. THALIANA</i>	95
2.1	Efecto de la NE en los mutantes PAO	95
2.2	Estudio de la expresión de las isoformas de <i>hsfa2</i> en respuesta a la NE 97	
2.3	Interacción de la NE con la droga geldanamicina.....	99
2.4	Estudio de la expresión de <i>eIF5A</i> en respuesta a la NE.....	100
3	EFFECTO DE LA NORESPERMIDINA EN EL CRECIMIENTO EN PLANTAS, LEVADURA Y CÉLULAS <i>HeLa</i>	101
4	LA NORESPERMIDINA REDUCE LOS NIVELES DE PROTEINAS POLIUBICUITILADAS EN PLANTAS, LEVADURA Y LINEAS CELULARES HUMANAS 106	
5	LA NORESPERMIDINA INHIBE LA POLIUBICUITILACIÓN <i>IN VITRO</i>	108
6	ACCIÓN DE LA NORESPERMIDINA EN LA ESTABILIDAD DE PROTEINAS EN PLANTAS, LEVADURA Y LÍNEAS CELULARES HUMANAS	111
7	EFFECTO DE LA NORESPERMIDINA EN LA SÍNTESIS DE PROTEÍNAS.....	118
8	EFFECTO DE LA NORESPERMIDINA EN LA HOMEOSTASIS DE AMINOÁCIDOS 119	
9	EFFECTO DE LA NORESPERMIDINA EN LA LONGEVIDAD CRONOLÓGICA EN LEVADURA	128
DISCUSIÓN.....		133

1	ANÁLISIS DE LA RESPUESTA TRANSCRIPCIONAL EN PLANTAS TRATADAS CON NORESPERMIDINA.....	135
2	IDENTIFICACIÓN DE LAS DIANAS DE TOXICIDAD DE LA NORESPERMIDINA EN <i>A. THALIANA</i>	136
3	EFFECTO DE LA NORESPERMIDINA Y LA ESPERMIDINA EN EL CRECIMIENTO EN PLANTAS, LEVADURA Y CÉLULAS <i>HeLa</i>	138
4	LA NORESPERMIDINA INHIBE LA REACCIÓN DE POLIUBICUITILACIÓN	140
5	ACCIÓN DE LA NORESPERMIDINA EN LA ESTABILIDAD DE PROTEÍNAS ...	144
6	EFFECTO DE LA NORESPERMIDINA EN LA HOMEOSTASIS DE AMINOÁCIDOS 146	
7	EFFECTO DE LA NORESPERMIDINA EN LA LONGEVIDAD CRONOLÓGICA EN LEVADURA	150
	CONCLUSIONES	155
	BIBLIOGRAFÍA	159
	ANEJOS	185

Índice de Tablas:

Tabla I.1: Distribución intracelular de poliaminas en linfocitos bovinos, hígado de rata y <i>E. coli</i>	36
Tabla M.1: Cepas mutantes de levadura empleadas.....	58
Tabla M.2: Plantas transgénicas empleadas.....	59
Tabla M.3: Plásmidos utilizados en el presente trabajo.....	60
Tabla M.4: Anticuerpos primarios y secundarios utilizados para la inmunodetección de proteínas.....	61
Tabla M.5: Cebadores empleados en las reacciones de PCR.....	70
Tabla R.1: Categorías funcionales destacadas estadísticamente significativas en el tratamiento de 3h.....	89
Tabla R.2: Categorías funcionales destacadas estadísticamente significativas en el tratamiento de 24h.....	90
Tabla R.3: Categorías funcionales inducidas en ambos tratamientos (3 y 24h)	92

Índice de figuras:

Figura I.1: Etapas en el plegamiento de proteínas.....	6
Figura I.2: Modelo para el mecanismo de desagregación de proteínas...	10
Figura I.3: El sistema ubiquitina-26S-proteasoma.....	12
Figura I.4: Estructura del proteasoma 26S.....	13
Figura I.5: Tipos de enzimas E3.....	14
Figura I.6: Estructura de la ubiquitina y sus distintas modificaciones.....	17
Figura I.7: Ruta de inicio de la traducción eucariota.....	22
Figura I.8: Modelo del control traduccional de GCN4.....	24
Figura I.9: Estructura de TOR y sus dos complejos.....	26
Figura I.10: El complejo EGO.....	28
Figura I.11: Las principales poliaminas naturales junto con la noespermidina	30
Figura I.12: Rutas de síntesis y degradación de las Poliaminas.....	32
Figura I.13: Mecanismos de transporte de poliaminas en <i>E. coli</i>	35
Figura I.14: Biosíntesis de hipusina en el factor eIF5A.....	39
Figura I.15: Los signos característicos del envejecimiento.....	44
Figura R.1: Clusters seleccionados del análisis de la respuesta transcripcional a la NE en función del tiempo.....	94
Figura R.2: Los mutantes de sobreexpresión de enzimas PAO son tolerantes a la NE.....	96
Figura R.3: La NE induce ambas isoformas de HsfA2.....	98
Figura R.4: La geldanamicina aumenta la toxicidad de la NE.....	99
Figura R.5: Efecto de la NE sobre las isoformas de eIF5A.....	100
Figura R.6: La NE y la SPD inhiben la germinación de <i>A. thaliana</i>	101
Figura R.7: NE y SPD inhiben el crecimiento de la levadura en función del medio de crecimiento.....	102
Figura R.8: La NE provoca muerte celular en levadura.....	103

Figura R.9: La NE aumenta la sensibilidad a choque térmico pero no a la <i>Unfolded Stress Response</i>	104
Figura R.10: El tratamiento con NE induce muerte celular en células <i>HeLa</i>	105
Figura R.11: NE reduce los niveles de proteínas poliubiquitiladas en <i>A. thaliana</i>	107
Figura R.12: NE reduce los niveles de proteínas poliubiquitiladas en levadura y líneas celulares <i>HeLa</i>	108
Figura R.13: La NE inhibe la poliubiquitilación <i>in vitro</i>	110
Figura R.14: La NE estabiliza la proteína RGA-GFP en presencia de giberelinas en <i>A. thaliana</i>	112
Figura R.15: NE estabiliza la proteína VHL-GFP en levadura.....	114
Figura R.16: NE induce HSP104 y provoca su acumulación en puntos específicos del interior celular.....	116
Figura R.17: La NE no estabiliza proteínas con alta tasa de recambio ni en levadura ni en células <i>HeLa</i>	117
Figura R.18. La NE inhibe la síntesis de proteínas <i>in vitro</i>	119
Figura R.19: La adición de AAs confiere tolerancia a la NE y la SPD.....	120
Figura R.20: La adición de AAs a muestras tratadas con NE o SPD no afecta a los niveles de proteínas poliubiquitiladas pero sí a los niveles de fosforilación de eIF2 α	121
Figura R.21: La NE no interfiere en la toma de AA.....	123
Figura R.22: Efecto de la NE en los mutantes de la ruta GCN.....	125
Figura R.23: La cicloheximida reduce el efecto tóxico de la NE.....	126
Figura R.24: Mutantes de la ruta TORC1 son sensibles a la NE.....	127
Figura R.25: La NE transloca la proteína msn2 al núcleo mediante la inhibición de TORC1.....	128
Figura R.26: La NE y la SPD aumentan la longevidad cronológica de la levadura	129
Figura R.27: Efecto de la NE en la longevidad cronológica de mutantes de la ruta GAAC.....	130

Figura R.28: Efecto de la NE en la longevidad cronológica de mutantes de la ruta TORC1.....	131
Figura D.1: Modelo hipotético de inhibición de la ubiquitilación por la NE.....	143
Figura D.2: Modelo de la toxicidad de la NE/SPD.....	148
Figura D.3: Modelo propuesto del aumento de la longevidad mediada por NE/SPD.....	153

Abreviaciones utilizadas en este trabajo:

AAs: Aminoácidos
ADC: Adenina Descarboxilasa
AdoMet: S-Adenosilmetionina
ATP: Adenosín Trifosfato
AZC: L-azetidine-2-carboxylic acid
 β -Gal: β -Galactosidasa
BSA: Seroalbúmina Bovina
Cdks: *Cyclin dependent kinases*
cDNA: DNA complementario
CFP: *Cyan Fluorescent Protein*
CFU: Unidad Formadora de Colonias
CHX: Cicloheximida
CP: *Core Particle*
CPR: *Cytosolic Protein Response*
CRL: *Cullin RING ligases*
CS: Control Silvestre
DcAdoMet: S-Adenosilmetionina Descarboxilada
DHS: Deoxihipusina sintasa
DMEM: Medio Eagle modificado por Dulbecco
DNA: *Deoxyribonucleic Acid*
DOHH: Deoxihipusina hidroxilasa
DTT: Ditioneitol
E1: *Ubiquitin Activating Enzyme*
E2: *Ubiquitin Conjugating Enzyme*
E3: *Ubiquitin Ligase Enzyme*
GA: Giberelina
GAAC: *General Amino Acid Control*
GDM: Geldanamicina
GDP: *Guanine Biphosphate*
GEF: *Guanine Exchange Factor*
GFP: *Green Fluorescent Protein*
GTP: *Guanine Triphosphate*
HAT: *Histone Acetyltransferase*
HSF: *Heat Shock Factor*

HSP: *Heat Shock Protein*
IC50: el 50% de la concentración inhibitoria máxima
iCdk: Inhibidores de las Cdk
IPTG: Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside
LC: Longevidad Cronológica
MBP: *Maltose Binding Protein*
MIPS: *Munich Information Center for Protein Sequences*
MS: Medio Murashige-Skooog
mRNA: RNA mensajero
NE: Norespermidina
NMDA: *N-methyl-D-aspartate*
NT: No Tratado
OD: Densidad Óptica
ODC: Ornitina Descarboxilasa
ORF: *Open Reading Frame*
ROS: *Reactive Oxygen Species*
SAMDC: S-adenosilmetionina descarboxilasa
SCD: Medio mínimo completo
SCDmod: Medio mínimo completo modificado
SD: Medio mínimo
smHSP: *small Heat Shock Proteins*
SMO: espermina oxidasa
SPD: Espermidina
SPM: Espermina
SSAT: espermidina/espermina N¹-acetiltransferasa
PAs: Poliaminas
PAO: Poliamina Oxidasa
PBS: *Phosphate Buffered Saline*
PCI: Fenol Cloroformo Isoamílico
PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa
PQS: *Protein Quality Control System*
PUT: Putrescina
RC: Restricción Calórica
RNA: *Ribonucleic Acid*
RP: *Regulatory Particle*
RT-PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real

TC: *Ternary Complex*
TCA: *Ácido tricloracético*
TOR: *Target of Rapamycin*
TORC1: *Target of Rapamycin Complex 1*
tRNA: *RNA de transferencia*
Tun: *Tunicamicina*
Ub: *Ubicuitina*
uORF: *upstream ORF*
UPS: *Ubiquitin 26S Proteasome System*
YPD: *Yeast extract Peptone Dextrose*

INTRODUCCIÓN

1 ANTECEDENTES DEL PRESENTE TRABAJO

El grupo de Ramón Serrano, en donde se ha realizado esta tesis doctoral en colaboración con el laboratorio de Alejandro Ferrando, investiga desde hace años las bases moleculares de la homeostasis de cationes monovalentes (H^+ o pH, K^+ , Na^+) y su relación con el crecimiento y muerte celular en células eucarióticas. Los sistemas modelo utilizados son la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, la planta *Arabidopsis thaliana* y células de mamífero en cultivo. Por otro lado, la herramienta principal es la perturbación de la homeostasis mediante el uso de ácidos débiles (que provocan acidificación intracelular) y de cationes tóxicos como el Na^+ , Li^+ , antibióticos aminoglicosídicos y poliaminas, que interfieren con el K^+ . Se estudian las respuestas fisiológicas y moleculares de los organismos a estas perturbaciones y se seleccionan y caracterizan mutantes resistentes (ver <http://www.ibmcp.upv.es/RamonSerranoLab>)

Un aspecto importante de la homeostasis iónica es el potencial eléctrico de la membrana plasmática, positivo fuera y que está determinado por el balance entre la bomba electrógena de la membrana plasmática (H^+ -ATPase en hongos y plantas; Na^+,K^+ -ATPasa en animales) y la actividad de canales de entrada de cationes y de salida de aniones (Goossens et al, 2000). Los canales de cationes permiten la entrada en las células de cationes fisiológicos tales como K^+ , Mg^{2+} y Ca^{2+} pero también de cationes tóxicos como el Na^+ y de otros cationes no fisiológicos como el Li^+ , los antibióticos aminoglucósidos y las poliaminas. Los policationes tóxicos como las poliaminas son particularmente atractivos para ser utilizados como herramientas experimentales para obtener mutantes en genes reguladores del potencial eléctrico ya que su difusión al interior de las células es mucho más sensible a cambios del potencial que en el caso de cationes monovalentes, según se deduce de la ecuación de Nernst-Planck (Nobel, 1991):

$$J_j = - \frac{u_j RT}{\gamma_j} \frac{\partial \gamma_j c_j}{\partial x} - u_j c_j z_j F \frac{\partial E}{\partial x}$$

en donde " J_j " es el flujo del ión " j ", u_j es su movilidad, γ_j su coeficiente de actividad, c_j su concentración, δx el recorrido del canal transmembrana, z_j su carga eléctrica y δE la diferencia de potencial eléctrico entre un lado y otro de la membrana. El efecto del potencial es directamente proporcional al número de cargas (z_j) y ello justifica la utilización de la triamina noespermidina (NE) para

seleccionar mutantes tolerantes con menor potencial. Se prefirió esta poliamina porque en levadura no es metabolizable (Hamana *et al.*, 1989), aunque parece que en plantas sí lo es (Maiale *et al.*, 2008).

De acuerdo con estas premisas durante la tesis de Santiago Alejandro se realizó con éxito un rastreo de una colección de mutantes marcados de *A. thaliana* usando la NE como agente de selección (Alejandro *et al.*, 2007). El primer resultado de este abordaje fue identificar una quiescín-sulfidril oxidasa que regula la carga de K^+ al xilema y cuya sobreexpresión confiere tolerancia a poliaminas y otros cationes tóxicos, como el litio probablemente por alterar el potencial eléctrico en la interfaz celular con el xilema (Alejandro *et al.*, 2007). Debido al éxito de esta aproximación y anticipando el frecuente uso futuro de la NE como agente de selección, resultó conveniente investigar el mecanismo de toxicidad de esta poliamina, ya que junto al potencial eléctrico y los sistemas de transporte utilizados por la NE, los genes de sus dianas de toxicidad podrían dar lugar a mutantes resistentes. Para ello Santiago Alejandro comenzó un análisis de la respuesta transcripcional de la planta al tratamiento con NE que se ha completado en la presente tesis doctoral y que es el punto de partida de la misma.

Los resultados del análisis transcriptómico indicaron que la NE induce muchos genes regulados por acumulación de proteínas desnaturalizadas. Ello nos llevó a centrar el trabajo de nuestra tesis en el efecto de NE sobre la homeostasis celular de proteínas y por tanto de aminoácidos, así como el efecto de estos procesos sobre la longevidad. Por tanto en esta introducción revisaremos brevemente estos campos.

2 HOMEOSTASIS DE PROTEÍNAS

Las proteínas son moléculas biológicas formadas por una o varias cadenas de aminoácidos, y que desempeñan una gran variedad de funciones en los organismos: catalizan reacciones metabólicas, intervienen en la replicación del DNA y en la respuesta a estímulos y transportan moléculas entre compartimentos celulares, entre otras. De hecho se puede decir que si el DNA guarda la información de la célula, las proteínas son la mano de obra celular (nanomaquinas).

Para ser funcionales, las proteínas deben adoptar una estructura tridimensional definida llamada estructura nativa. El plegamiento de las proteínas empieza cuando están siendo sintetizadas por el ribosoma, y antes de estabilizarse en su estructura nativa la proteína naciente pasa por varios estados de plegamiento intermedios (Figura I.1). Debido a que las barreras energéticas (la cantidad de energía que hay que aportar para cambiar la conformación de una proteína) que separan la estructura nativa de una estructura no nativa pueden ser muy leves, incluso las proteínas que se estabilizan en su estructura nativa están en permanente riesgo de desnaturalizarse, especialmente bajo condiciones de estrés, tales como las altas temperaturas o el estrés oxidativo (Dobson, 2003). Tanto los estados de plegamiento intermedios así como las proteínas mal plegadas suelen tener expuestos residuos hidrofóbicos que en la estructura nativa se encontrarían en el interior de la proteína, o asociados a membranas. Cuando una proteína mal plegada presenta dominios hidrofóbicos expuestos, puede interactuar con otras proteínas y/o con compartimientos celulares con los que no interactúa en su estructura nativa, modificando su actividad. Si bien es cierto que las proteínas desnaturalizadas tienden a agregarse con el mismo tipo de proteínas (Gidalevitz *et al.*, 2006), la agregación de un tipo de proteínas puede influir en la agregación de otras (Ben-Zvi y Goloubinoff, 2002), y esto puede provocar la co-agregación de gran parte del proteoma. Dicho fenómeno es postulado como la causa de la toxicidad asociada a enfermedades neurodegenerativas en las que interviene la agregación de proteínas poliglutaminicas (Chai *et al.*, 2002).

Debido a esto, los organismos a lo largo de la evolución han desarrollado varios mecanismos para prevenir la acumulación de proteínas mal plegadas, que en conjunto forman el llamado sistema de control de calidad de proteínas (*protein quality-control system*, PQS). Dicho sistema actúa a tres niveles. Por un lado controlando el plegamiento correcto de las proteínas hasta adquirir su estructura nativa a través de una serie de proteínas, llamadas proteínas chaperonas (preferimos esta traducción del inglés *chaperone* en lugar de 'proteínas carabina' utilizado frecuentemente) cuya función es interactuar con proteínas nacientes o proteínas mal plegadas y asistirles en su correcto plegamiento y transporte. Por otro lado, destruyendo proteínas mal plegadas mediante una degradación proteolítica, a través del sistema ubiquitina proteasoma 26S (*ubiquitin 26S proteasome system*, UPS) o por mecanismos de autofagia, previniendo de este modo sus efectos dañinos sobre los procesos celulares y liberando aminoácidos para sintetizar nuevas proteínas. La última vía consiste en la agregación de

proteínas mal plegadas en agregados solubles o insolubles, minimizando de esta forma la interacción de las proteínas mal plegadas con el resto del proteoma y disminuyendo su capacidad tóxica.

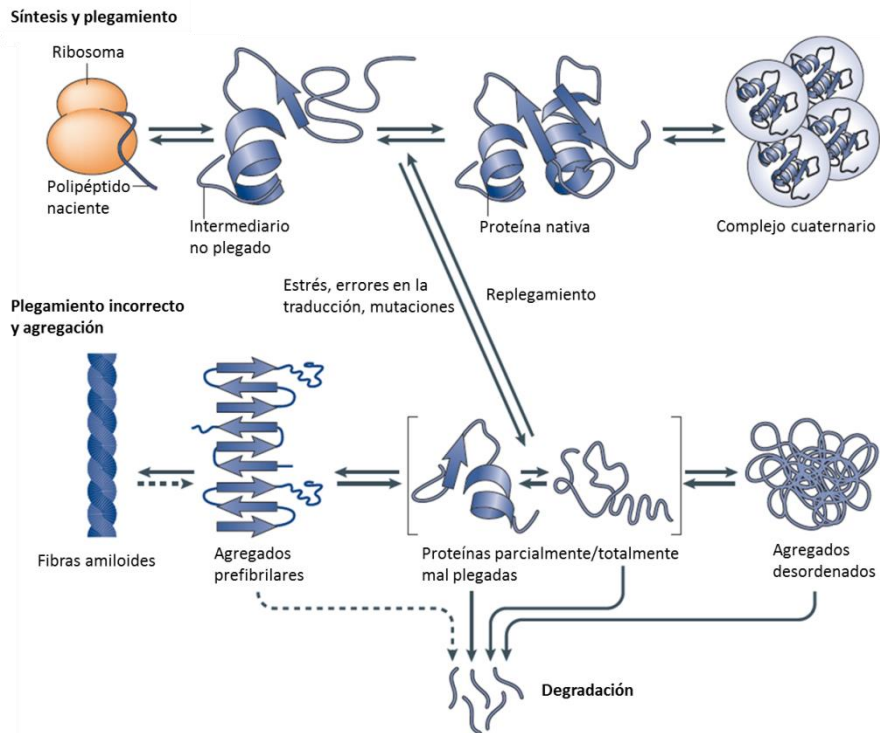


Figura 1.1: Etapas en el plegamiento de proteínas. Las proteínas, tanto durante su síntesis como a posteriori, son correctamente plegadas a través de distintas etapas intermedias hasta adquirir su estructura nativa. Diferentes estreses, mutaciones en la proteína o errores en la traducción de ésta pueden provocar un mal plegamiento de la proteína, provocando que ésta sea incapaz de adquirir su estructura nativa, dando pie a una proteína mal plegada. Dicha proteína puede ser plegada de nuevo en su estructura nativa o bien debe ser degradada por los distintos sistemas proteolíticos que previenen la acumulación de proteínas mal plegadas. Si los sistemas de control de calidad se saturan, las proteínas mal plegadas se acumulan en forma de agregados, cuya formación puede ser mediada por proteínas con función chaperona. Estos agregados pueden tener distintos grados de complejidad, encontrándose desde agregados totalmente desestructurados a estructuras amiloides altamente ordenadas. Los agregados desordenados y estructuras con poca complejidad pueden ser disueltos y degradados pero no las fibras amiloides altamente complejas. Adaptado de Tyedmers *et al.* (2010).

2.1 Causas de desnaturalización de proteínas.

El sistema PQS puede adaptarse a la severidad del daño a proteínas a través de la inducción de respuestas a estreses que ajustan los niveles de proteínas chaperonas y proteasas (Goldberg, 2003). Los efectos capaces de causar proteínas dañadas o mal plegadas son varios y se pueden clasificar en cuatro clases. La primera clase consiste en mutaciones que ocasionan una producción continuada de proteínas con tendencia a plegarse de forma incorrecta y agregarse. Estas mutaciones son la causa de varias enfermedades conformacionales como la diabetes de tipo II y enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Huntington, el Parkinson y el Alzheimer (Powers *et al.*, 2009). De igual forma, mutaciones en el sistema PQS también pueden provocar una acumulación de proteínas mal plegadas o dañadas ya que éstas no pueden ser contenidas de forma eficaz (Kitada *et al.*, 1998). La segunda clase estaría formada por aquellos factores que causan defectos en la síntesis de proteínas, como antibióticos que interaccionan con el ribosoma, dando como resultado errores en la traducción que impiden el correcto plegamiento de la proteína, o que causan errores en la formación de complejos proteicos. Ambas cosas dan como resultado proteínas mal plegadas no funcionales que deben ser degradadas (Drummond y Wilke, 2008). La tercera clase estaría formada por estreses ambientales tales como las altas temperaturas y el estrés oxidativo. Un tratamiento por calor o una temperatura por encima del rango óptimo puede provocar la desnaturalización masiva del proteoma celular. Mientras que la desnaturalización producida por altas temperaturas puede ser reversible, el estrés oxidativo provoca daños irreparables en la estructura de las proteínas que impedirán a éstas adquirir de nuevo su forma nativa. Entre los daños causados por estrés oxidativo se encuentran la fragmentación de la cadena de aminoácidos por efecto de los radicales libres, o la modificación de las cadenas laterales de algunos aminoácidos específicos por grupos carbonilo (Stadtman y Levine, 2000). La cuarta y última clase está formada por los procesos inducidos durante el envejecimiento celular. Varias observaciones en distintos organismos sugieren que a medida que las células van envejeciendo tienen una menor capacidad para lidiar con las proteínas mal plegadas. Esta menor capacidad del sistema PQS se postula, junto con la expresión crónica de proteínas mal plegadas, como una de las causas de la mayor ocurrencia de enfermedades neurodegenerativas en individuos de edad avanzada (Powers *et al.*, 2009).

2.2 Las proteínas chaperonas

Todos los aspectos de la homeostasis de proteínas dependen de proteínas chaperonas (Bukau *et al.*, 2006). Además de las funciones descritas anteriormente, estas proteínas también juegan un papel importante en la degradación de proteínas mal plegadas por el sistema UPS y en la prevención de la agregación de proteínas. En las células eucariotas, este tipo de proteínas se dividen en dos grandes familias. En primer lugar están las chaperonas asociadas a la síntesis de proteínas (*chaperones linked to protein synthesis*, CLIPs), que están conectadas física y funcionalmente a la maquinaria de traducción, y cuya función es asistir en el correcto plegamiento de las proteínas a medida que éstas están siendo sintetizadas (Albanese *et al.*, 2006). En segundo lugar están las chaperonas llamadas *Heat Shock* (proteínas de choque térmico, HSPs), llamadas así debido a que se inducen en respuesta a altas temperaturas y otros estreses, y cuya función es la protección del proteoma frente a estreses dañinos (Haslbeck *et al.*, 2005).

La célula tiene distintas clases de HSPs y éstas normalmente se clasifican en función de su masa molecular, de este modo existen las familias HSP100, HSP90, HSP70, HSP60 y otras proteínas de pequeño tamaño (llamadas *small heat shock proteins*, sHSPs). A continuación se expondrá brevemente la estructura y funcionamiento de estos tipos de HSPs.

Las HSP60s, también llamadas chaperoninas, se encuentran en todos los organismos y consisten en dos grandes subunidades cilíndricas formadas por dos anillos que están en contacto uno con otro. Cada anillo contiene una cavidad central en las que las proteínas en forma no nativa son encapsuladas para su correcto plegamiento con consumo de ATP (Frydman, 2001). Cada subunidad posee tres dominios importantes: el dominio ecuatorial, que contiene una zona de unión a nucleótidos y hace el contacto entre los anillos; el dominio intermedio y el dominio apical, donde se localizan los residuos que interactúan con el sustrato (Mayer, 2010).

Las chaperonas de la familia HSP70 son esenciales para los organismos eucariotas, y tienen varias funciones en el plegamiento de proteínas, entre ellas el plegamiento de polipéptidos sintetizados *de novo*, el plegamiento de proteínas desnaturalizadas, la solubilización de agregados proteicos, la translocación de proteínas a través de membranas y el ensamblaje/desensamblaje de complejos proteicos (Mayer y Bukau, 2005). Para conseguir esta versatilidad, el modo de acción de estas proteínas es bastante distinto de las HSP60s. A diferencia de éstas, las HSP70s interactúan con las proteínas sustrato de manera local a través de un

dominio situado en su extremo C-terminal (*Substrate Binding Domain*, SBD). De esta forma, su actividad es a nivel local y no está influenciada por el tamaño de la proteína sustrato (Mayer, 2010).

Las proteínas de tipo HSP90, al igual que las anteriores, pueden unirse a proteínas mal plegadas, previniendo de este modo su agregación. No obstante, su función más importante y en el caso de las eucariotas esencial, es la de interactuar con una serie de proteínas específicas, llamadas clientes, previniendo su desnaturalización. Gran parte de estas proteínas cliente son factores de transcripción y proteínas con función quinasa involucradas en el control de la homeostasis celular, la proliferación, la diferenciación y la apoptosis (Richter y Buchner, 2006). De este modo esta familia de proteínas *Heat Shock* está especializada en “cuidar” de proteínas cuya función es vital para la célula.

Las proteínas de tipo HSP100 contienen uno o dos dominios conservados AAA+ (*ATPases Associated with various cellular Activities*) y su principal función es desplegar y solubilizar proteínas desnaturalizadas que se han agregado. Estas proteínas se dividen en dos clases: aquellas cuya función principal es el desplegamiento de proteínas sustrato para su posterior degradación por

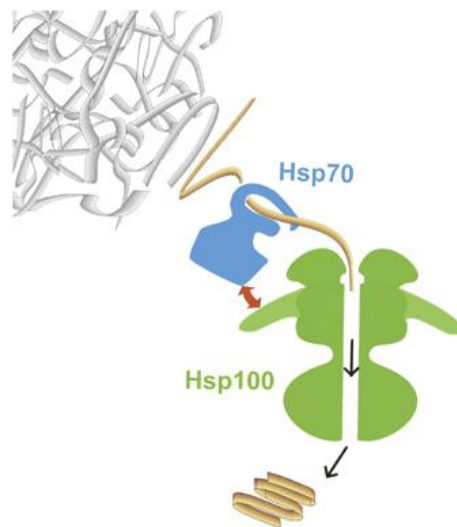


Figura 1.2: Modelo para el mecanismo de desagregación de proteínas. En primer lugar, la chaperona hsp70 reconoce y solubiliza los polipéptidos de los agregados insolubles. A continuación la chaperona Hsp100 linealiza el polipéptido con consumo de ATP. Éste es finalmente plegado en su estructura nativa de forma espontánea o con la ayuda de otras chaperonas. Adaptado de Liberek et al., 2008.

proteasas, y aquellas (como HSP104 o HSP101) cuya función principal es la solubilización de proteínas desnaturalizadas que se han agregado. Esta última función es realizada junto con las chaperonas HSP70 (Figura 1.2) y permite recuperar proteínas que forman parte de agregados tanto desordenados como amiloides. La respuesta celular a estímulos proteotóxicos a nivel del citoplasma, como las altas temperaturas, el estrés oxidativo, los metales pesados o las infecciones virales/bacterianas, se controlan en humanos y levadura a través de la activación de HSF1 (*Heat Shock Factor 1*; Sorger y Pelham, 1987). Esta proteína es un factor transcripcional que en condiciones normales está en forma de monómero inactivo interactuando con HSP40/HSP70 y HSP90. En presencia de un estrés, como las altas temperaturas, HSF1 es liberado del complejo de chaperonas y se trimeriza. Este complejo HSF1x3 es transportado al núcleo donde es activado, mediante una hiperfosforilación, y promueve la expresión de genes que codifican proteínas con función chaperona (Shamovsky y Nudler, 2008). Aunque la mayor parte de los genes bajo control de HSF1 codifican proteínas chaperonas, este factor también induce genes que codifican proteínas involucradas en otros aspectos, tales como la degradación de proteínas, el transporte de iones, transducción de la señal, generación de energía, metabolismo de carbohidratos, transporte vesicular y la formación del citoesqueleto (Hahn *et al.*, 2004).

En levadura se conoce únicamente un gen HSF1 y en humanos existe el gen mHSF1 que forma parte de una familia de otros tres genes con función similar. Sin embargo el número de este tipo de genes en plantas es extraordinariamente alto. Debido a su carácter sésil, las plantas han desarrollado unos complejos sistemas de respuesta a los distintos estreses ambientales frente a los que se ven sometidas. Una de las respuestas más importantes en la modulación del proteoma en la respuesta a estrés es la reprogramación dinámica de la actividad transcripcional. Debido a esto, existen diversas familias de factores de transcripción implicadas en complejas y a menudo solapantes respuestas frente a distintos estreses (Singh *et al.*, 2002). En el caso de *Arabidopsis thaliana*, se conocen 21 genes con función *Heat Shock Factor* divididos en tres clases y catorce grupos (Nover *et al.*, 2001). Entre todos estos genes, es necesario destacar HSFA2 que es un *Heat Shock Factor* cuya inducción provoca termotolerancia en *Arabidopsis* (Charng *et al.*, 2006).

2.3 El sistema ubiquitina proteasoma 26S (UPS).

La mayor parte de las proteínas mal plegadas solubles son degradadas a través del sistema UPS, que supone la principal vía de proteólisis en las células eucariotas (Ciechanover, 1998). El actor principal en este sistema es una proteína llamada ubiquitina, que como su nombre sugiere está presente en todo tipo de células. Dicha proteína está conservada en todos los organismos eucariotas y tiene como principal función marcar las proteínas que deben ser degradadas (Wilkinson *et al.*, 1980; Ciechanover *et al.*, 1980) a través de una serie de pasos que se describen a continuación (Figura 1.3). En primer lugar, la ubiquitina es activada por un grupo de enzimas llamadas E1 o *ubiquitin activating enzyme*, estas proteínas son capaces de formar un enlace tioester rico en energía entre una cisteína de la E1 y la glicina del extremo carboxi-terminal de la ubiquitina, consumiendo una molécula de ATP en el proceso. Este grupo ubiquitilo activado es transferido a otro grupo de enzimas llamado E2 o *ubiquitin conjugating enzyme* mediante una *trans*-esterificación, formando otro enlace tioester con una cisteína de la E2. En la mayoría de los casos la enzima E2 es la encargada de transferir el grupo ubiquitilo a la proteína diana, que es reconocida por un tercer grupo de enzimas llamadas E3 o *ubiquitin ligase enzyme*, que además cataliza la transferencia del grupo ubiquitilo a un residuo de lisina libre de la proteína diana, formando un enlace peptídico. El destino de la proteína diana ubiquitilada depende del número y la conformación de los grupos ubiquitilo asociados a ella. En este caso, a través de distintos ciclos de ubiquitilación se forma una cadena lineal de ubiquitinas unidas entre ellas mediante enlaces peptídicos en una de las 7 lisinas libres de la ubiquitina (Figura 1.6.E). Este tipo de señal de ubiquitilación hace que la proteína diana sea sustrato del proteasoma 26S, donde será degradada en pequeños péptidos y ubiquitinas libres con consumo de ATP.

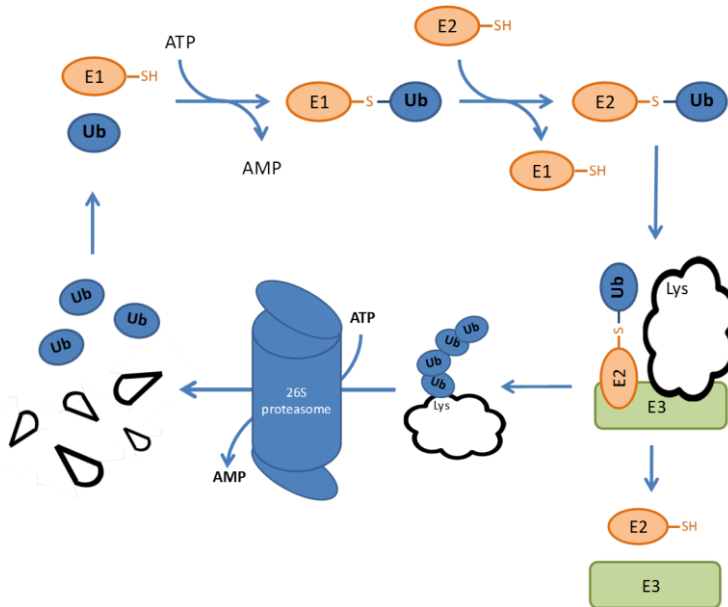


Figura 1.3: El sistema ubiquitina-26S-proteasoma. La ubiquitina (Ub) es activada por la enzima E1 consumiendo una molécula de ATP en el proceso. A continuación es transferida a la enzima E2, que transfiere el grupo ubiquitilo a una lisina libre del sustrato, que es identificado por la enzima E3. Repitiendo este proceso se crea una cadena de poliubiquitina que mandará al sustrato al proteasoma, donde será digerido en pequeños péptidos y ubiquitina libre con consumo de ATP.

El proteasoma 26S es una compleja proteasa dependiente de ATP compuesta de unas 30 subunidades, con un tamaño aproximado de 2,5 MDa y que está presente tanto en el citosol como en el núcleo (Waxman *et al.*, 1987; Hough *et al.*, 1987). Este complejo está formado por la partícula central 20S (*core particle*, CP) en la que se localizan los sitios activos con actividad proteasa y cuya entrada es lo suficientemente estrecha como para que solamente puedan entrar proteínas desplegadas (Arrigo *et al.*, 1988); y la partícula reguladora 19S (*regulatory particle*, RP), que puede estar localizada a un extremo o a ambos de la CP 20S (Figura 1.4). Este complejo es capaz de reconocer las cadenas de ubiquitina, hidrolizarlas y desplegar la proteína a la cual estaban asociadas, de forma esta última pueda entrar en el sitio activo del complejo CP 20S (Voges *et al.*, 1999).

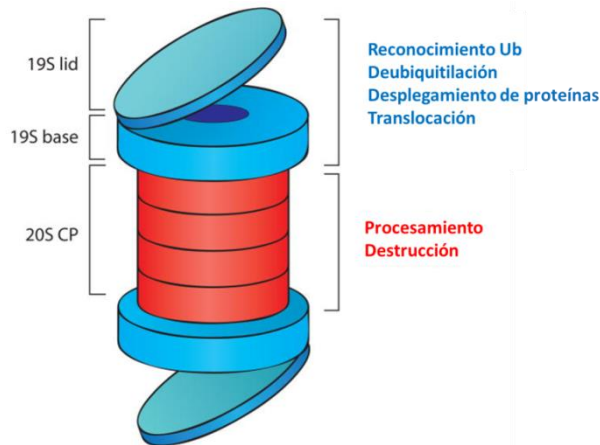


Figura 1.4: Estructura del proteasoma 26S. El proteasoma está compuesto por dos partículas. La partícula principal 20S (CP), que presenta tres actividades proteolíticas distintas en su interior y la partícula reguladora 19S (RP). Esta última a su vez presenta dos complejos proteicos. La tapa (*lid*) 19S, capaz de reconocer y deubiquitinar las proteínas sustrato y la base 19S, cuya función es desplegar las proteínas sustrato con consumo de ATP y pasarlas al interior del 20S CP. Adaptado de Geng *et al.*, 2012.

Todas las funciones del RP 19S requieren ATP, por ese motivo en la base del RP 19S se encuentran seis ATPasas homólogas del tipo AAA, que tienen funciones esenciales en el proteasoma. Finalmente, las proteínas sustrato son digeridas en pequeños péptidos que presentan de 2 a 15 residuos, la mayor parte de los cuales son rápidamente hidrolizados a aminoácidos por las peptidasas del citosol (Kisselev y Goldberg, 2001).

Las enzimas E3 son las que reconocen la proteína diana a ubiquitilar y son las causantes de la alta especificidad del UPS. Debido a esto son la familia de enzimas relacionadas con la ubiquitilación más grande y variada (en levadura hay 1 E1, 11 E2s y 60-100 E3s; Finley *et al.*, 2012) (Figura 1.5). Éstas se pueden clasificar en enzimas compuestas por una sola o varias subunidades. Las que están compuestas por una sola subunidad se clasifican en función del dominio de unión a la enzima E2, de tal modo se pueden distinguir las enzimas E3 que poseen un dominio RING (*Really Interesting New Gene*, 1.5.A), las que tienen un dominio U-Box (1.5.B) o las que tienen un dominio HECT (*Homologous to the E6AP Carboxyl Terminus*, 1.5.C), éstas últimas son bastante peculiares ya que en su caso, a diferencia del resto, el grupo ubiquitilo es transferido a una cisteína libre de la E3 en el dominio HECT antes de ser transferido a la proteína sustrato. Las enzimas E3

que están compuestas por más de una subunidad se llaman CRLs (*Cullin-RING ligases*), en el que la proteína culina forma el armazón sobre el que se adhieren las otras proteínas que contienen los dominios de reconocimiento del sustrato y de unión a la E2. Éstas se clasifican en función del tipo de proteína que reconoce al sustrato. De este modo se pueden distinguir las CRLs que tienen una proteína con dominio F-BOX (I.5.D), aquellas que tienen una proteína con dominio BTB (*Bric-a-brac-Tramtrack-Broad complex*, I.5.E) y aquellas que tienen una proteína con dominio DDB1 (*DNA Damage-Binding* I.5.F) (Santner y Estelle, 2010).

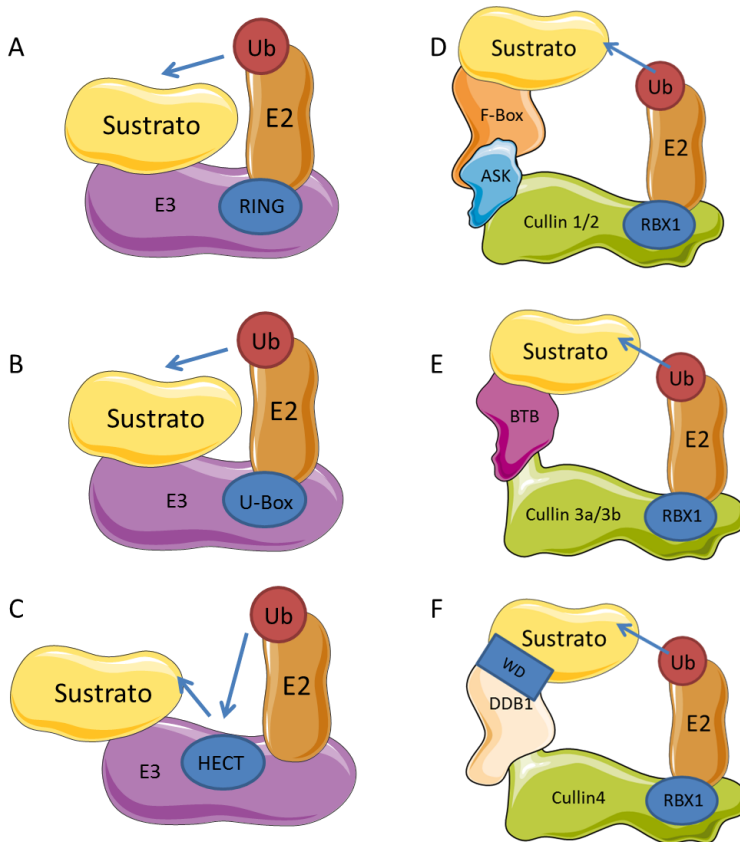


Figura I.5: Tipos de enzimas E3. Enzimas E3 compuestas por una única subunidad (A,B,C), o más de una subunidad (D,E,F). Las flechas azules indican cómo se realiza la transferencia del grupo ubiquitilo y las elipses azules indican dominios destacados de las enzimas E3.

Además existe un subgrupo de enzimas E3 (normalmente de tipo HECT) conocidas como enzimas E4, cuya función es extender las cadenas de ubiquitina a partir de una monoubiquitilación en la proteína sustrato, sin embargo a día de hoy se sabe muy poco de esta subfamilia (Koege *et al.*, 1999).

Como se ha comentado anteriormente, una de las principales funciones del UPS es la degradación de proteínas mal plegadas o dañadas. Por ese motivo hay una serie de enzimas E3 especializadas en degradar este tipo de proteínas. Algunas de las más relevantes son la enzima nuclear SAN1 (Gardner *et al.*, 2005) y las enzimas asociadas con la degradación de proteínas del retículo endoplásmico HRD1 y DOA10. Sin embargo las más importantes con diferencia, que se conozcan a día de hoy, son las E3 citoplasmáticas UBR1 y HUL5, y la E3 asociada al ribosoma RKR1/LTN1 (Eisele y Wolf, 2008; Bengtson y Joazeiro, 2010; Fang *et al.*, 2011). Cada una de estas E3 reconoce proteínas mal plegadas por distintos mecanismos. SAN1 es capaz de unirse a proteínas mal plegadas, sin ayuda de proteínas chaperonas, reconociendo zonas hidrofóbicas expuestas a través de unos dominios intrínsecamente desordenados (Fredrickson *et al.*, 2011). Por el contrario UBR1 está asociada a proteínas chaperonas, y reconoce las proteínas sustrato a través de ellas (Nillegoda *et al.*, 2010). En el caso de RKR1/LTN1, esta enzima es capaz de reconocer proteínas nacientes aberrantes cuyos mRNAs carecen de codón de parada (Bengtson y Joazeiro, 2010). Finalmente, el mecanismo de actuación de HUL5 es desconocido, sin embargo se sabe que esta enzima tiene actividad E4 y es capaz de producir cadenas de poliubiquitina a partir de una monoubiquitilación en la proteína sustrato por lo que se postula que ésta pueda interactuar con otras E3 para realizar correctamente su función (Fang *et al.*, 2011).

Además de degradar proteínas desnaturalizadas o mal plegadas, el UPS también se encarga de regular la composición del proteoma en conjunción con los procesos de transcripción y traducción. Entre ellos es notable el papel del UPS en el ciclo celular. El progreso del ciclo celular en células eucariotas depende de oscilaciones de la actividad de las quinasas dependientes de ciclinas (*cyclin-dependent kinases*, Cdk). La actividad Cdk es controlada por la síntesis y degradación periódica de subunidades reguladoras positivas, las ciclinas, así como de las fluctuaciones en los niveles de los reguladores negativos, los inhibidores de las Cdk (iCdk) (Nigg, 1995). Las ciclinas específicas de las distintas fases del ciclo celular se acumulan, activando las Cdk, en el momento apropiado del ciclo celular, y luego son posteriormente degradadas. De igual forma, los niveles de

algunos iCdk's, capaces de inhibir complejos ciclina/Cdk, también suben y bajan en momentos muy precisos del ciclo celular. Todas estas enzimas (ciclinas, iCdk's, Cdk's y otras reguladoras del ciclo celular) son degradadas en el momento adecuado por el sistema UPS (Hershko y Ciechanover, 1998), demostrando así el papel crítico que juega este sistema en el control del ciclo celular.

De igual modo el UPS tiene un papel muy importante modulando la actividad de muchas proteínas reguladoras de vida media corta con funciones en la transcripción, la supresión tumoral o con funciones oncoprotectoras. Entre ellas cabe destacar el papel del UPS en la regulación de la actividad de la proteína P53 (Ciechanover *et al.*, 1991). Dicha proteína es una proteína supresora de tumores, capaz de regular el ciclo celular en función de los daños al DNA, previniendo de este modo la aparición de tumores (Read y Strachan, 1999).

El caso de las plantas es especialmente interesante en este aspecto, ya que el UPS tiene un rol prominente en la regulación de la respuesta hormonal. En concreto el UPS regula la percepción de las auxinas, el jasmonato, las giberelinas, el etileno y el ácido abscísico. Debido a esto, en las plantas existen más de 1200 enzimas potenciales con actividad E3 (Santner y Estelle, 2010). En el caso de las giberelinas, la presencia de esta hormona activa el receptor GID1, que a su vez estimula la acción de unos complejos SCF E3 que contienen las proteínas F-BOX SLEEPY1 y SNEEZY1, capaces de degradar a una familia de proteínas llamada DELLA. Estas proteínas DELLA actúan reprimiendo la respuesta a giberelinas, por lo que tras su degradación se dispara la respuesta a esta hormona (Shimada *et al.*, 2008; Murase *et al.*, 2008).

Tal y como se ha comentado anteriormente, la función más relevante de la ubiquitilación de proteínas es la degradación de éstas. En este caso, la señal que envía al sustrato a su degradación vía proteasoma es una cadena de al menos 4 ubiquitinas en las que el residuo de glicina terminal de la primera se une a la lisina 48 de la segunda y así sucesivamente (Figura I.6.E; Hicke 2001). Sin embargo, hay otros tipos de señalización por ubiquitilación que pueden determinar otros destinos para el sustrato. La modificación más simple por ubiquitilación es la llamada mono-ubiquitilación (Figura I.6.B), en la que un único grupo ubiquitilo es adherido a una lisina libre del sustrato.

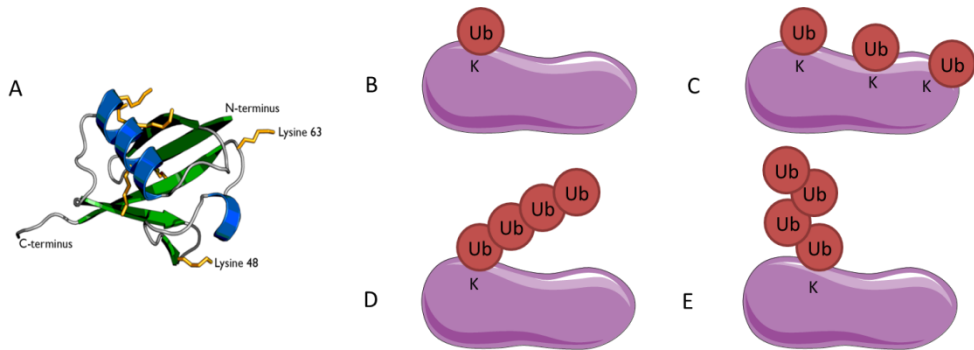


Figura I.6: Estructura de la ubiquitina y sus distintas modificaciones. A) Estructura de la proteína ubiquitina. En amarillo se muestran los siete residuos libres de lisina que contiene. El acoplamiento de un grupo ubiquitilo (Ub) a una lisina (K) libre del sustrato provoca una mono-ubiquitilación (B), mientras que múltiples acoplamientos de Ub en distintas lisinas provocan una multi-ubiquitilación (C). La poliubiquitilación (D y E) se consigue acoplando una cadena de Ub sobre una lisina libre de la ubiquitina unida a la proteína sustrato. Dicha cadena puede formarse sobre la lisina 63 de la Ub, formando una cadena lineal (D); o sobre la lisina 48, formando una cadena en zig-zag (E).

Este tipo de señalización es vital para el tráfico vesicular, ya que muchas proteínas de membrana son mono-ubiquitiladas para ser internalizadas (Kölling y Hollenberg, 1994). Además, este tipo de ubiquitilación también se ha visto implicada en la regulación de la cromatina, reparación del DNA y exporte nuclear (Haglund y Dikic, 2005). Otro tipo de modificación dependiente de la ubiquitina es la llamada multi-ubiquitilación (Figura I.6.C), en la que varios grupos ubiquitilo se adhieren a otros tantos residuos libres de lisina. Esta modificación también se ha visto implicada en la internalización de proteínas de membrana (Hicke, 2001). Por otro lado está la poliubiquitilación de proteínas, en la que se forma una cadena de ubiquitinas sobre un residuo de lisina de la ubiquitina unida al sustrato, dicha cadena tiene una naturaleza distinta en función de la lisina de la ubiquitina sobre la que se crea la cadena de ubiquitinas. Las más estudiadas son las cadenas de poliubiquitina en la lisina 48 (Figura I.6.E) que como se ha comentado es la señal de degradación vía proteasoma, y la cadena de poliubiquitina en la lisina 63 (Figura I.6.D) que forma una cadena lineal que está implicada en la reparación del DNA, la endocitosis y la modulación de la actividad proteína quinasa (Haglund y Dikic, 2005). Finalmente hay otro tipo de cadenas de poliubiquitina, ramificadas y de gran complejidad, aunque de momento la función de este tipo de cadenas es desconocida (Komander y Rape, 2012).

Finalmente, para completar el ciclo de la ubiquitina se requieren una serie de enzimas llamadas deubiquitilasas, unas proteasas específicas capaces de liberar

grupos ubiquitilo. Estas proteasas reciclan la ubiquitina en el proteasoma 26S y además son capaces de revertir la reacción de poliubiquitilación liberando las ubiquitinas de la proteína sustrato y previniendo la degradación de ésta (Finley *et al.*, 2012).

2.4 Autofagia

La autofagia es un proceso catabólico básico cuya principal función es la degradación de componentes innecesarios o no funcionales en la célula a través de la vacuola. De este modo la degradación de parte de los componentes celulares permite la supervivencia de la célula en condiciones adversas como ayuno de nutrientes. La autofagia puede ser inducida bajo condiciones específicas pero en la mayoría de las células está activa constitutivamente a bajos niveles (Nakatogawa *et al.*, 2009). Existen tres tipos de autofagia comúnmente descritos: la macroautofagia, la microautofagia y la autofagia mediada por chaperonas. La macroautofagia (a partir de ahora autofagia) es un proceso por el cual una vesícula de doble membrana, llamada autofagosoma, envuelve una región del citoplasma (que puede incluir o no organelos). Una vez formada, la membrana externa del autofagosoma se fusiona con la membrana de la vacuola, liberando una vesícula con su contenido citoplasmático en el interior de la vacuola, en donde será degradada y los nutrientes serán reciclados y devueltos al citosol (Yang *et al.*, 2006).

La autofagia tiene un papel clave en la degradación de agregados insolubles de proteínas causantes de enfermedades neurodegenerativas. (Ravikumar *et al.*, 2004), así como de la degradación de agregados de proteínas mal plegadas en general (Fortun *et al.*, 2003). Debido a esto, se cree que la autofagia supone un mecanismo de emergencia de degradación de proteínas que se activa una vez que el sistema UPS se ha visto sobrepasado. Además, ambos sistemas están interconectados, ya que se ha visto que la inhibición del sistema UPS activa la autofagia (Pandey *et al.*, 2007) y que la inhibición de la autofagia inhibe la actividad del sistema UPS (Korolchuk *et al.*, 2009).

2.5 *Mecanismos de agregación de proteínas*

La agregación de proteínas mal plegadas o dañadas es un mecanismo por el cual la célula es capaz de agregar, de manera soluble o insoluble proteínas que han sido desnaturalizadas, para de esta forma disminuir su efecto negativo en el resto de procesos celulares. Este es el mecanismo del sistema PQS del que más desconocimiento se tiene, sin embargo la comunidad científica tiene un gran interés en este campo debido a su relación con las enfermedades neurodegenerativas y enfermedades relacionadas con priones. De hecho las pocas nociones que se tenían de este proceso apuntaban a que la agregación de proteínas era un proceso sobre el que la célula tenía muy poco control y que éste solamente se activaba cuando el resto de mecanismos del PQS se veían sobrepasados (Tyedmers *et al.*, 2010), ya que aunque la agregación de proteínas mal plegadas minimiza los daños causados por éstas, la agregación de proteínas en forma de fibras amiloides ha sido relacionada con enfermedades neurodegenerativas, por lo que no se tenía claro si esta agregación de proteínas era beneficiosa o no para la célula. No obstante recientemente la visión que se tiene de este proceso ha cambiado radicalmente. Por un lado, un estudio reciente ha demostrado que la agregación de proteínas en unas estructuras llamadas “cuerpos” Q (*Q bodies*) ocurre simultáneamente con los otros dos procesos de mantenimiento de proteínas, incluso en el caso de que dichos sistemas no se vean sobrepasados (Escusa-Toret *et al.*, 2013). De esta manera, la agregación de proteínas no ocurre únicamente cuando el resto de rutas del PQS se ve sobrepasado, sino que actúa de manera simultánea con las otras. Por otro lado, hay varios estudios recientes que muestran que la célula es capaz de regular dónde y cómo se agregan las proteínas mal plegadas (Alberti, 2012). Estos recientes avances ponen en jaque las nociones que se tenían de la agregación de proteínas y apuntan a que este mecanismo puede tener más relevancia de lo que anteriormente se pensaba, no obstante los mecanismos exactos de la activación y control de la agregación de proteínas se desconocen.

2.6 *Efectos tóxicos de la agregación de proteínas.*

Tal y como se ha comentado anteriormente, la acumulación de proteínas mal plegadas resulta tóxica para la célula, sin embargo los mecanismos de dicha toxicidad resultaban desconocidos hasta ahora. No obstante, recientemente Suraweera *et al.* (2012), han demostrado que la inhibición de la actividad UPS es

letal no debido al efecto de la acumulación de proteínas mal plegadas, sino debido a una carencia extrema de aminoácidos. En concreto, al inhibir el proteasoma, las proteínas mal plegadas no pueden ser recicladas en aminoácidos y tienden a acumularse en el citosol y/o en agregados insolubles. Sin embargo la causa de la toxicidad no es dicha acumulación de proteínas mal plegadas, sino que dichas proteínas no se reciclan en aminoácidos, por lo que la célula no tiene suficientes aminoácidos disponibles para sintetizar proteínas nuevas que suplan a aquellas desnaturalizadas. Dicha carencia de aminoácidos (como se verá a continuación) provoca una parada general de la síntesis de proteínas, induce la autofagia y eventualmente provoca muerte celular. De este modo, si se suple la carencia de aminoácidos por otras vías (por ejemplo por la adición externa), las células con actividad UPS reducida son capaces de crecer con relativa normalidad, aunque mantengan el exceso de proteínas mal plegadas. Esto demuestra que la acumulación de proteínas mal plegadas (exceptuando los casos extremos de las enfermedades neurodegenerativas) no es letal en sí misma, sino que lo es la carencia de aminoácidos que se deriva de ella.

3 HOMEOSTASIS DE AMINOÁCIDOS

El éxito de un organismo a la hora de adaptarse a un medio externo radica en su capacidad de adaptarse a condiciones de cambio continuo. Dentro de los mecanismos de adaptación, uno de los más importantes es la capacidad de inhibir la síntesis de proteínas en respuesta a un estrés. La síntesis de proteínas es uno de los procesos celulares que más consumo energético requiere, de modo que la inhibición de éste responde a la necesidad de un organismo de racionalizar sus recursos en condiciones no óptimas. Además esta parada permite reorganizar el conjunto de mRNAs disponible, para así adaptar la síntesis de proteínas a las nuevas condiciones.

Los aminoácidos son compuestos orgánicos de gran importancia biológica compuestos de un grupo amino ($-NH_2$), un grupo carboxílico ($-COOH$) y una cadena lateral específica a cada amino ácido. Los aminoácidos son las unidades estructurales de las proteínas, éstos son unidos en el ribosoma formando las cadenas lineales que conformarán las proteínas. Aunque existen más de 500 tipos de aminoácidos, solamente 20 forman parte de las proteínas (Wagner y Musso, 1983). Debido a que los aminoácidos son necesarios para formar las proteínas, el

mantenimiento y la obtención de dichos compuestos son vitales para el correcto funcionamiento de la célula. Las células han desarrollado complejas rutas de control que regulan la homeostasis de los aminoácidos disponibles en el citosol, las más importantes son la ruta GAAC (*General Amino Acid Control*) también conocida como ruta GCN, y la ruta TORC1 (*Target Of Rapamycin Complex 1*).

3.1 La ruta GAAC o ruta GCN

En condiciones normales, la reacción de inicio de la traducción en células eucariotas es la siguiente: por un lado, el tRNA de metionina cargado ($\text{Met-tRNA}_i^{\text{Met}}$) se asocia a eIF2 unido a una molécula de guanósín trifosfato (eIF2-GTP) formando el llamado complejo ternario (*Ternary Complex, TC*), que a continuación es reclutado por la subunidad 40S del ribosoma, formando el complejo iniciador 43S. Por otro lado, el mRNA se asocia a los factores de inicio de la traducción eIF4E, eIF4G, eIF4A formando el complejo eIF4F. Dicho complejo reconoce y se une a la caperuza (*cap*) del extremo 5' del mRNA, mientras que la proteína PABP (*poly A Binding Protein*) reconoce y se une al extremo 3' del mRNA que contiene la cola de poliadeninas. A continuación la proteína PABP interacciona con el complejo eIF4F circularizando el mRNA, de modo que el mRNA circularizado de este modo se une al complejo 43S formando el complejo 48S, que empieza a "leer" la secuencia del mRNA hasta encontrar un codón de inicio AUG (que codifica para la metionina). Una vez encontrado el codón de inicio, el GTP del TC es hidrolizado a guanósín bifosfato (GDP) liberando eIF2-GDP del complejo e incorporando la subunidad ribosomal 60S, formando de este modo el complejo iniciador 80S con capacidad de síntesis proteica. El eIF2-GDP liberado tras la formación del complejo 80S es reciclado a eIF2-GTP de nuevo por el GEF (*Guanine Exchange Factor*) eIF2B para poder volver a formar un TC y empezar el proceso de inicio de la traducción (Figura 1.7).

En este complejo proceso, existen dos puntos críticos de control de la translación, uno dependiente de GCN2 y otro dependiente de la ruta TORC1, de la que se hablará más adelante pero que vamos a incluir aquí para una mayor claridad. En primer lugar, en condiciones de ayuno de aminoácidos, el incremento de tRNAs no cargados activa la quinasa GCN2 con la ayuda del complejo Gcn1-Gcn20 (García-Barrio *et al.*, 2000). Una vez GCN2 está activo, fosforila la Serina 51 de eIF2 α (Hinnebusch, 2005). Esta fosforilación hace que eIF2(α P) pase de ser sustrato a inhibidor competitivo de GEF eIF2B, de forma que la cantidad de eIF2-GTP es reducida drásticamente, disminuyendo de este modo la tasa de iniciación

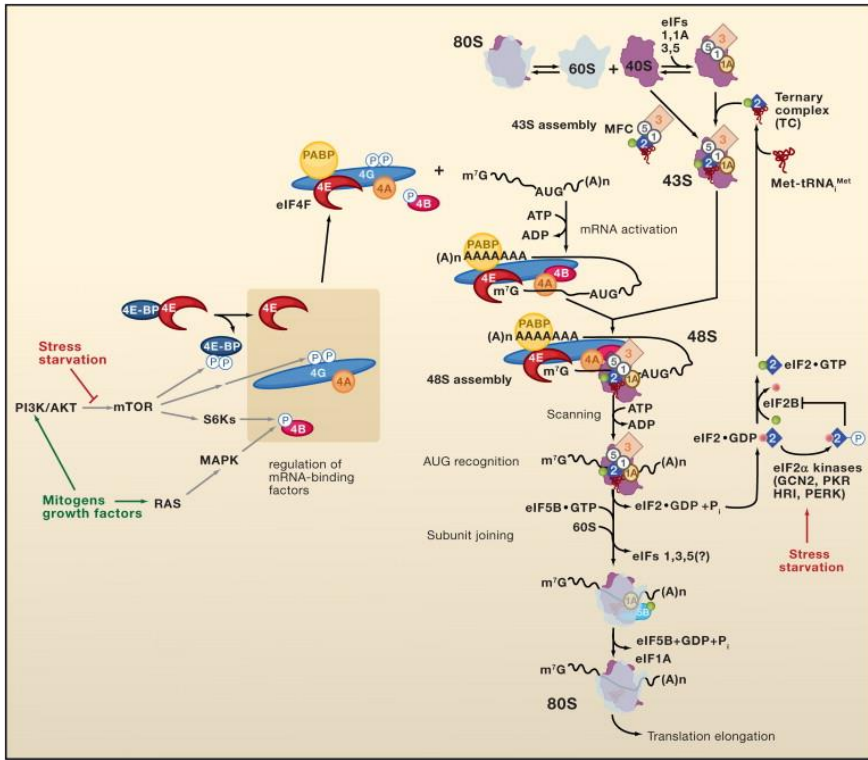


Figura I.7: Ruta de inicio de la traducción eucariota. eIF1, 1A y 3 promueven la disociación de los ribosomas 80S y, junto con eIF5 y el complejo ternario (eIF2-GTP-Met-tRNA_{Met}), forman el complejo 43S junto con la subunidad 40S ribosomal. Por otro lado, el mRNA es activado por la interacción de eIF4F (eIF4E, eIF4G, eIF4A) con la caperza del extremo 5' del mRNA y la interacción de la proteína PABP a la cadena de poliadeninas del extremo 3' del mRNA, circularizando de este modo el mRNA. El complejo 43S se une a eIF4F, formando el complejo 48S y empieza a buscar el codón de inicio. Una vez encontrado el codón de inicio, el GTP es hidrolizado a GDP y eIF2-GDP se separa del complejo, al que entonces se une la subunidad 60S ribosomal formando el complejo 80S, que puede empezar la fase de elongación de la traducción. En condiciones normales eIF2-GDP es regenerado a eIF2-GTP por eIF2B (GEF) y puede volver a iniciar el ciclo formando el TC. En condiciones de ayuno de aminoácidos, GCN2 fosforila a eIF2 α , impidiendo la regeneración de eIF2(α)-GDP a eIF2(α)-GTP de modo que el ciclo de inicio de la traducción no puede reiniciarse. Por otro lado, cuando TORC1 está inhibido, la proteína 4E-BP no se fosforila, de modo que se reduce la cantidad de eIF4E disponible para la formación del complejo eIF4F y se inhibe el proceso de traducción. Adaptado de Sonenberg y Hinnebusch (2009).

de síntesis de proteínas ya que el TC no puede formarse. Por otro lado la formación del complejo eIF4 es dependiente de la actividad TORC1, ya que cuando TORC1 está activo, fosforila a unas proteínas capaces de interactuar con eIF4E llamadas 4E-BP (4E Binding Proteins), impidiendo de este modo la

interacción. En respuesta a varios estreses, TORC1 se inhibe, de modo que las proteínas 4E-BP no se fosforilan y pueden interactuar con eIF4E, inhibiendo de este modo la formación de del complejo eIF4F y disminuyendo la tasa de síntesis de proteínas (Raught y Gingras, 2007).

No obstante, hay una serie de mRNAs cuya expresión no se ve reducida, sino aumentada, cuando GCN2 está activo, siendo el más importante de ellos GCN4. La inducción traduccional de GCN4 es regulada por cuatro ORFs situados aguas arriba del ORF principal (uORFs, *upstream Open Reading Frames*). En condiciones de ayuno de aminoácidos, el complejo 48S reconoce el uORF1 (el primer uORF), recluta la subunidad 60S y empieza su traducción. Sin embargo, este ORF tiene una secuencia terminadora inusual que ocasiona que una parte importante de los ribosomas no se disocian tras su traducción, de forma que algunos complejos 48S continúan unidos al mRNA y reinician la traducción en los uORF2-4. Estos ORF sí que tienen una secuencia terminadora normal que provoca la disociación del ribosoma tras su traducción, de modo que el ribosoma no puede formarse de nuevo en el ORF principal de GCN4, por lo que únicamente aquellos ribosomas que se disociaron de manera correcta tras la síntesis del uORF1 son capaces de formarse de nuevo en el ORF principal. En condiciones de ayuno de aminoácidos, la fosforilación de eIF2 α ocasiona una disminución de la cantidad de TC, de modo que tras la síntesis del uORF1 el complejo 40S no se forma con tanta facilidad en los uORF2-4, de este modo se favorece la formación del complejo 40S en el ORF de GCN4, aumentando su tasa de traducción (Figura 1.8).

Gcn4 es un activador transcripcional de la familia bZIP (*basic leucine-zipper*) y se une al DNA como un homodímero (Hinnebusch y Fink, 1983). Este activador reconoce la secuencia consenso TGACTC, localizada aguas arriba de muchos genes inducidos durante el ayuno de aminoácidos. GCN4 activa la expresión de genes implicados en la biosíntesis de 19 (de 20) aminoácidos, además también regula la expresión de genes relacionados con el transporte de aminoácidos, la biosíntesis de purinas y de organelos, autofagia, homeostasis del glicógeno y regula la respuesta a distintos estreses (Natarajan *et al.*, 2001).

Aunque los roles más importantes de GCN2 son la parada general de la síntesis de proteínas y la regulación traduccional de GCN4 en respuesta al ayuno de nutrientes, esta proteína posee otras funciones importantes. Por un lado, GCN2 regula el ciclo celular retrasando la entrada en la fase S cuando hay daños en el DNA (por ejemplo con luz ultravioleta o metil metanosulfonato) (Menacho-Marquez *et al.*, 2007). De este modo la célula no pasa a la fase de replicación del

DNA si detecta daños en éste, sin embargo el mecanismo exacto de este proceso es desconocido. Por otro lado, en células cancerígenas la activación de GCN2 es importante para que estas células no entren en apoptosis, además GCN2 también regula la función mitocondrial, que en este tipo de células suele estar alterada (Murguía y Serrano, 2012). Finalmente, se ha observado que la inhibición de la actividad GCN2 aumenta la longevidad cronológica de la levadura, y que la activación de GCN4 la reduce (Alvers *et al.*, 2009).

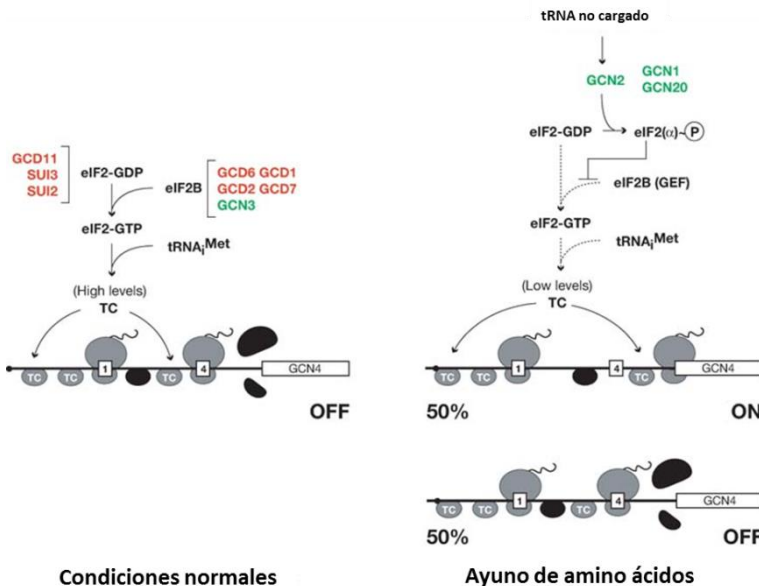


Figura 1.8: Modelo del control traduccional de GCN4. Tras la traducción del uORF1 (1), aproximadamente el 50% de la subunidad 40S del ribosoma permanece unida al mRNA y continúa buscando otro ORF. En condiciones normales, la subunidad 40S del ribosoma se une rápidamente al complejo ternario (TC) y reinicia la traducción del uORF4 (4), ya que la concentración de TC es alta. En condiciones de ayuno de aminoácidos, aproximadamente el 50% de subunidades 40S son incapaces de reiniciar la traducción en el uORF4, debido a la disminución de TC, y continúan buscando otra ORF hasta llegar a la ORF de GCN4; el resto de subunidades logra reiniciar la traducción en el uORF4 y es incapaz de reiniciar la traducción en GCN4. Los factores reguladores positivos están marcados en verde y los negativos en rojo. Adaptado de Hinnebusch, 2005.

3.2 La ruta TORC1

El crecimiento celular (acumulación de masa) es un proceso altamente coordinado regulado de forma tanto espacial como temporal. Cuando se reúnen las condiciones adecuadas de presencia de nutrientes y otros estímulos para el crecimiento (como la ausencia de estreses), la célula induce la síntesis macromolecular y de este modo aumenta su tamaño. De manera inversa, las células son capaces de responder a la ausencia de nutrientes u otro tipo de estreses reduciendo la síntesis de macromoléculas, promoviendo el reciclaje del exceso de masa e induciendo genes de respuesta a estrés. Dentro de este ámbito, TOR (*Target Of Rapamycin*) es una proteína quinasa capaz de integrar información tanto intra como extracelular y “decidir” en base a ella si la célula debe entrar o no en una etapa de crecimiento.

TOR fue identificado por primera vez en levadura en rastreos genéticos frente a la rapamicina, un macrólido usado como agente inmunosupresor usado en trasplantes de órganos, ya que mutaciones en el gen TOR conferían resistencia a la rapamicina (Heitman *et al.*, 1991). TOR es una proteína quinasa altamente conservada con un tamaño relativamente grande (280 kDa) y que pertenece a la familia de quinasas PIKK (*phosphatidylinositol kinase-related kinase*). Las quinasas de esta familia se caracterizan por su dominio quinasa del tipo serina/treonina en su extremo carboxi-terminal. Flanqueando dicho dominio quinasa se encuentra el dominio de unión a FKBP12 con rapamicina (*FKBP12-Rapamycin Binding site*, FRB) y el dominio FATC. Finalmente, en el extremo N-terminal se encuentran los dominios HEAT y FAT de interacción proteína-proteína (Figura I.9.A). A diferencia de la levadura, que posee dos genes TOR (TOR1 y TOR2), la mayoría de los organismos eucariotas posee un único gen TOR esencial (Crespo y Hall, 2002).

TOR posee dos funciones esenciales relacionadas con el crecimiento celular, la primera de ellas es regular *cuándo* debe de crecer la célula y la segunda *hacia dónde* debe de crecer. Para ello, TOR forma dos complejos proteicos: el complejo TOR 1 (TORC1), encargado de regular el crecimiento temporal; y el complejo TOR 2 (TORC2), encargado de regular el crecimiento espacial. TORC1 está formado por KOG1, TCO89, LST8 y TOR1 o TOR2 (Figura I.9.B), mientras que TORC2 está formado por AVO1, AVO2, AVO3, BIT61, LST8 y TOR2, pero no TOR1 (Figura I.9.C; Wullshleger *et al.*, 2006).

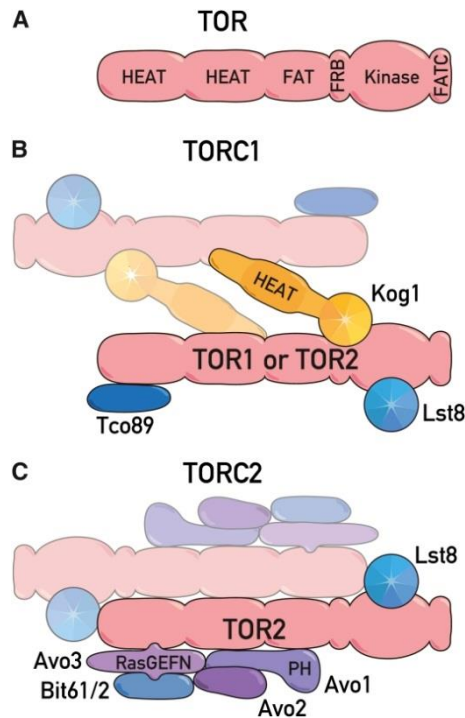


Figura I.9: Estructura de TOR y sus dos complejos. A) Dominios conservados de la proteína TOR. La mitad N-terminal de TOR está compuesta de dos bloques con unos 20 dominios HEAT repetidos, que forman parejas de α -helices antiparalelas. A continuación está el dominio FAT, que presenta unas repeticiones HEAT modificadas, y el dominio FRB, que es donde se une la rapamicina. Finalmente en el extremo C-terminal se encuentra el dominio quinasa y el dominio FATC que es esencial para la actividad quinasa. B) Estructura del complejo TOR1. TORC1 es un complejo de 2 MDa que contiene Kog1, Tco89, Lst8 y TOR1 o TOR2. Kog1 une las proteínas TOR1/2 a través de los dominios HEAT mediante una unión compleja en la que intervienen varios dominios de cada proteína. Lst8 se une al dominio quinasa de TOR1/2. Cada componente posiblemente se encuentra duplicado. C) Estructura del complejo TOR2. TORC2 es un complejo de 2 MDa que contiene Avo1, Avo2, Avo3, Bit61 y/o su parólogo Bit2, Lst8 y TOR2 pero no TOR1. Cada componente posiblemente se encuentra duplicado. Adaptado de Loewith y Hall (2011).

Cuando las condiciones nutricionales son óptimas y en ausencia de estrés, TORC1 está activo y promueve el crecimiento, mientras que cuando las condiciones ambientales no son óptimas, TORC1 se inhibe provocando una dramática bajada en la tasa de síntesis de proteínas, una inducción de la autofagia y la salida del ciclo celular para entrar en la fase quiescente (Beck y Hall, 1999). En concreto TORC1 es capaz de responder al ayuno de fuentes de carbono, nitrógeno, fosfato o aminoácidos, además este complejo también es capaz de

responder a condiciones de estrés tales como el estrés salino, y el estrés oxidativo. La regulación de la actividad de TORC1 se realiza a través de una compleja red de señalización empezando por los dos sustratos más importantes de TORC1, que son la quinasa SCH9 y las fosfatasa TAP42-PP2As, si bien las vías de señalización que son dependientes de TORC1 aún no se han caracterizado por completo (Loewith y Hall, 2011). Sch9 es una proteína quinasa de la familia AGC (cuyo nombre proviene de las quinasas A, G y C de mamíferos) que al igual que muchos de los miembros de esta familia de quinasas está regulada por TORC1. SCH9 es requerida para la regulación dependiente de TORC1 de la biogénesis de ribosomas, la iniciación de la traducción y la entrada en la fase G₀ del ciclo celular (Urban *et al.*, 2007). Cuando TORC1 está activo, este complejo fosforila a SCH9 en 6 sitios diferentes en su extremo C-terminal, de modo que el estudio del estado de fosforilación de esta quinasa es uno de los métodos más efectivos para evaluar la actividad de TORC1 (Wanke *et al.*, 2008). Por su parte, TORC1 también regula a las fosfatasas de la familia 2A Pph21, Pph22 y Pph3 así como a las fosfatasas relacionadas con la familia 2A Sit4 y Ppg1; en conjunto conocidas como fosfatasas TAP42-PP2As (debido a su interacción con la proteína reguladora TAP42) (Di Como y Arndt, 1996). Cuando TORC1 está activo, Tap42 está fosforilado y forma un complejo con las fosfatasas PP2As, mientras que cuando TORC1 se inhibe, se defosforila TAP42 disminuyendo la afinidad de esta proteína por las fosfatasas, de forma que éstas se liberan del complejo y pueden actuar (Yan *et al.*, 2006).

En cuanto a los niveles de aminoácidos, TORC1 es capaz de responder a una bajada de éstos gracias al complejo EGO (*Exit from Growth Arrest*) (Binda *et al.*, 2009). Este complejo está formado por cuatro proteínas (Ego1, Ego3, Gtr1 y Gtr2) y está localizado en la membrana vacuolar (Figura I.10). Gtr1 y Gtr2 son GTPasas pertenecientes a la familia Ras, y son ortólogas de las Rag GTPasas presentes en los metazoos (Kim *et al.*, 2008). Por otro lado, Ego1 y Ego3 son posiblemente los homólogos funcionales de las proteínas de vertebrados p18 (LAMTOR1) y p14+MP1 (LAMTOR2 +LAMTOR3) respectivamente, que juntas forman el sistema *Ragulator*, sistema que media las señales derivadas de los aminoácidos al complejo TOR1 de mamíferos (Kim y Guan, 2011). A diferencia de la ruta GAAC, la actividad de TORC1 parece ser especialmente sensible a los niveles de glutamina (Crespo *et al.*, 2002) y de leucina (Binda *et al.*, 2009). En concreto, el complejo EGO es capaz de reaccionar a los niveles de leucina citoplasmáticos a través del intercambiador de guanina Vam6 y las proteínas Gtr1 y Gtr2.

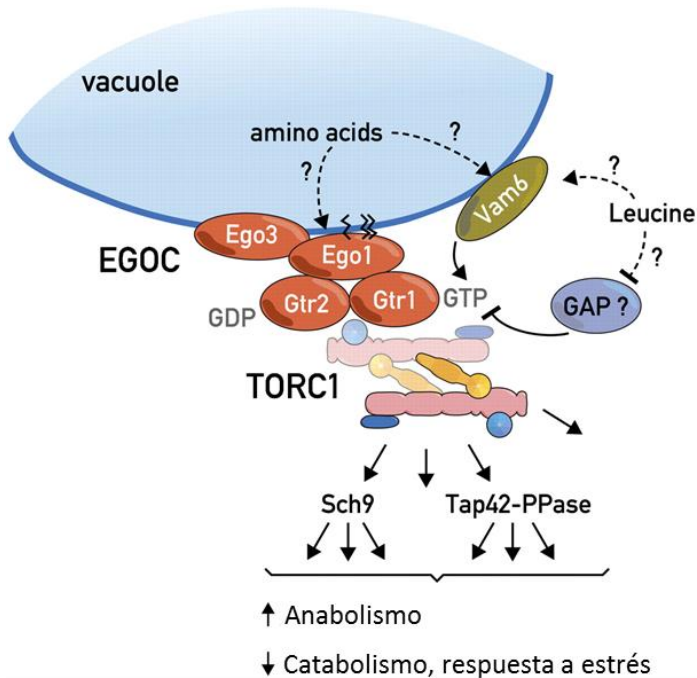


Figura 1.10: El complejo EGO. El complejo EGO está compuesto de cuatro proteínas: la proteína palmitoilada y miristolada Ego1, la proteína transmembrana Ego3 y dos GTPasas de la familia RAS, Gtr1 y Gtr2. Tanto TORC1 como EGO están localizados en la membrana vacuolar, donde este complejo es capaz de sentir los niveles de leucina libre, y potencialmente los niveles de aminoácidos en la vacuola. Vam6 ha sido identificado como un factor intercambiador de guanina para Gtr1. Con la configuración $Gtr1^{GTP} Gtr2^{GDP}$, EGO activa TORC1; mientras que la configuración inversa inhibe TORC1. Cuando TORC1 está activo, estimula el anabolismo y reprime el catabolismo y la respuesta a estrés a través de sus dos efectores más importantes: la quinasa SCH9 y la fosfatasa TAP42-PPasa. Adaptado de Loewith y Hall (2011).

Aunque se desconocen muchos detalles de este mecanismo, en presencia de leucina Vam6 transfiere GTP a Gtr1 dando lugar a una configuración $Gtr1^{GTP} Gtr2^{GDP}$ que de algún modo activa TORC1. De manera inversa, en ausencia de leucina predomina la configuración $Gtr1^{GDP} Gtr2^{GTP}$ que inhibe TORC1 (Gong *et al.*, 2011). Actualmente también se postula que, dada su localización vacuolar, el complejo EGO pueda sentir los niveles de aminoácidos en la vacuola y transducir dicha señal a TORC1, sin embargo aún no se tienen evidencias concretas de dicho efecto. Por otro lado, TORC1 también puede afectar a la actividad de eIF2 α , puesto que las dos rutas más importantes de señalización por TORC1, SCH9 y TAP42-PP2As afectan al estado de fosforilación de GCN2. Por un lado, la

fosforilación de GCN2 en la Serina 577 (Ser577) reduce la afinidad de esta quinasa por los tRNAs no cargados, y cuando TORC1 está inhibido, las fosfatasa PP2As son liberadas y defosforilan la Ser577, aumentando la afinidad de GCN2 por los rRNAs no cargados (Cherkasova y Hinnebusch, 2003). Por otro lado, la inhibición de SCH9 también aumenta la fosforilación de eIF2 α , sin embargo dicho mecanismo aún no ha sido caracterizado (Urban *et al.*, 2007).

4 POLIAMINAS

Las poliaminas son pequeñas moléculas orgánicas con carga positiva (a pH fisiológico) que contienen dos o más grupos amino primarios, presentes en todos los organismos. Fueron descubiertas por primera vez en 1678 por van Leeuwenhoek, el padre del microscopio, como cristales en muestras de semen. Debido a que esta primera poliamina se encontraba en altas concentraciones en el esperma, se le dio el nombre de espermina (N,N'-Bis(3-aminopropyl)butane-1,4-diamine, Figura 1.11) (Ladenburg y Abel, 1888). No obstante su estructura y síntesis química no fue determinada hasta mucho más tarde (Dudley *et al.*, 1926). De manera similar, a otra poliamina aislada en extracto pancreático bovino se le dio el nombre de espermidina (N-(3-aminopropyl)butane-1,4-diamine) (Dudley *et al.*, 1927), ya que ambas poliaminas están presentes en el semen y son las causantes de su olor. Por otro lado, otras dos poliaminas que se encuentran de forma natural: la putrescina (butane- 1,4-diamine) y la cadaverina (pentane- 1,5-diamine), son productos muy volátiles de descomposición por bacterias que contribuyen en gran medida al olor de la materia orgánica en descomposición, de ahí su nombre (Brieger, 1885). Además recientemente se ha descubierto un isómero de la espermina, denominado termoespermina presente exclusivamente en arqueobacterias y plantas con funciones importantes en estas últimas por su implicación en el desarrollo del sistema vascular (Vera-Sirera *et al.*, 2010)

Desde su descubrimiento, ha habido un gran interés por la comunidad científica por determinar las funciones biológicas de las poliaminas fisiológicas putrescina, espermidina y espermina. Debido a su carga positiva en condiciones fisiológicas, estos compuestos pueden unirse a varias macromoléculas celulares con carga negativa, entre ellas el DNA, el RNA, fosfolípidos, la cromatina y algunas proteínas, modulando su actividad.

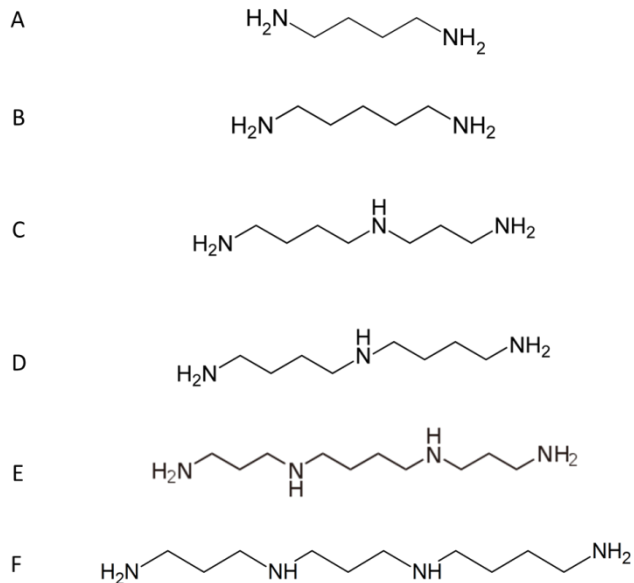


Figura 1.11: Las principales poliaminas naturales junto con la norespermidina. Las diaminas putrescina (A) y cadaverina (B), las triaminas espermidina (C) y norespermidina (D), y las tetraaminas espermina (E) y termoespermina (F).

De este modo, las poliaminas se han relacionado con una miríada de procesos celulares, entre ellos la regulación de la expresión génica, la traducción, la proliferación celular, la modulación de la señalización celular y la estabilidad de membranas (Tabor y Tabor, 1984; Cohen, 1998; Igarashi y Kashiwagi, 2000). Además en el caso de los humanos, las poliaminas están implicadas en algunas enfermedades, como el Alzheimer o enfermedades infecciosas, sin embargo el mayor campo de investigación de las poliaminas en humanos es su relación con el cáncer, ya que se han observado unos niveles anormalmente altos de poliaminas en células cancerígenas (Wallace y Fraser, 2004).

4.1 *Metabolismo y regulación de poliaminas*

Debido a su implicación en distintos procesos críticos de la célula, los niveles de poliaminas están fuertemente regulados mediante una combinación de regulación a nivel de síntesis, catabolismo y transporte.

En cuanto su síntesis, las tres fuentes de poliaminas son la toma externa, la biosíntesis y la síntesis microbiana (en el tracto intestinal en el caso de mamíferos). Las poliaminas se sintetizan a partir de los aminoácidos arginina,

ornitina y metionina. En el caso de las plantas y las bacterias, la putrescina se puede obtener por dos vías. En la primera se obtiene ornitina a partir de la arginina por la enzima mitocondrial arginasa, a continuación la ornitina es descarboxilada por la ornitina descarboxilasa (ODC) para producir putrescina. Curiosamente la planta modelo *Arabidopsis thaliana* carece de la enzima ODC, por lo que es incapaz de producir putrescina a partir de la ornitina (Hanfrey *et al.*, 2001). En la segunda ruta, la arginina es descarboxilada por la enzima arginina descarboxilasa (ADC) para obtener agmatina, a partir de la cual utilizando dos enzimas más (la agmatina iminohidrolasa y la N-carbamoyl-putrescina amidohidrolasa) se obtiene la putrescina. En el caso de los animales, éstos carecen de la segunda ruta por lo que la putrescina puede ser sintetizada únicamente por la ruta de la ornitina. En paralelo a la síntesis de putrescina, la metionina es procesada a S-Adenosilmetionina (AdoMet) y posteriormente es descarboxilada por la enzima S-adenosilmetionina descarboxilasa (SAMDC) para dar lugar AdoMet descarboxilado (DcAdoMet). Este compuesto es usado a continuación como donador del grupo aminopropilo para obtener espermidina con la espermidina sintasa a partir de la putrescina, y espermina con la espermina sintasa a o termoespermina con la termoespermina sintasa a partir de la espermidina (Figura 1.12). La espermina no puede ser sintetizada por las bacterias, ya que carecen en su genoma de un gen que codifique para la espermina sintasa (Wortham *et al.*, 2007). Estudios en ratones han demostrado que tanto la ODC como SAMDC son enzimas limitantes en la síntesis de poliaminas y que su delección es letal, demostrando un papel crucial de estas enzimas y por ende de las poliaminas en general (Nishimura *et al.*, 2002; Pendeville *et al.*, 2001).

En cuanto a su catabolismo, en general las poliaminas superiores pueden ser convertidas a poliaminas más simples. En el caso de los animales, la enzima limitante es la enzima citosólica espermidina/espermina N¹-acetiltransferasa (SSAT), capaz de acetilar tanto a la espermidina como la espermina. Éste es un paso necesario para que las enzimas poliamina oxidasas (PAO) degraden tanto la espermidina como la espermina dando lugar a poliaminas más simples junto con acetaminopropanal y H₂O₂. SSAT es absolutamente necesaria para la conversión de espermidina en putrescina, sin embargo en el citosol la espermina puede ser convertida a espermidina sin acetilación previa por la enzima espermina oxidasa (SMO), en este caso dando como subproducto aminopropanal (Seiler, 2004). En el caso de las plantas, la acetilación previa a su degradación no existe, y las enzimas PAO son capaces de degradar las poliaminas directamente.

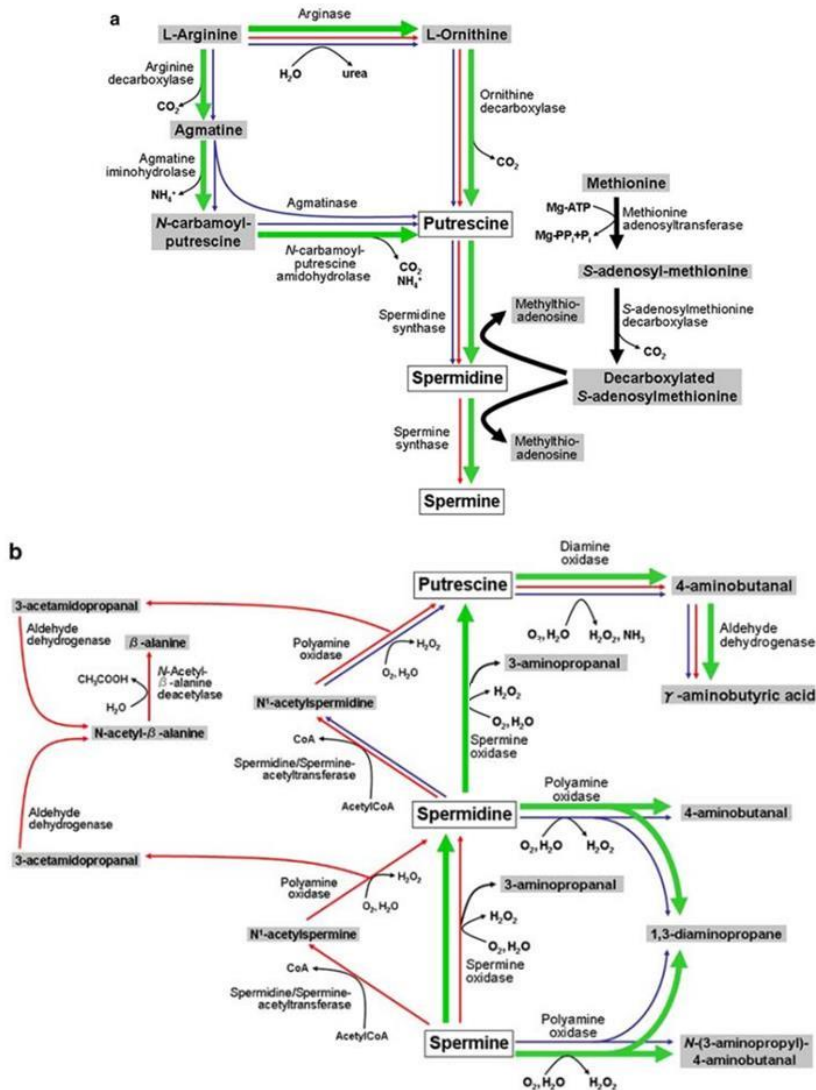


Figura I.12: Rutas de síntesis y degradación de las Poliaminas. Biosíntesis (A) y degradación (B). Las rutas vegetales están indicadas con flechas verdes. Las flechas azules y rojas indican las rutas bacteriales y animales, respectivamente. Adaptado de Kusano *et al.* (2008).

En *Arabidopsis* existen 5 enzimas PAO (PAO1-5). Entre ellas, PAO1 es capaz de convertir la espermina a espermidina (Takahashi *et al.*, 2010). PAO2 y PAO3 tienen un alto grado de homología (>80%) y tienen una afinidad de sustrato similar, ya que ambas son capaces de degradar espermina y espermidina, sin embargo son más eficientes degradando la espermidina y su patrón de expresión

es diferente. En cuanto a PAO4, esta enzima degrada la espermina de manera similar a la enzima SMO de animales. En cuanto a PAO5, de momento se desconoce si tiene capacidad de degradar poliaminas.

El nivel general intracelular de poliaminas en la mayoría de organismos está en un rango micromolar a milimolar y es mantenido constante, ya que niveles elevados de poliaminas son tóxicos para las células y causan muerte celular (Kusano *et al.*, 2008). Para ello los niveles intracelulares de poliaminas están fuertemente regulados en varios pasos, incluyendo síntesis *de novo*, degradación y transporte. A continuación se detallan los dos mecanismos de regulación más estudiados. La enzima SAMDC es un componente importante de la regulación de poliaminas en todos los organismos, esta enzima es sintetizada como una proenzima, que codifica para las dos subunidades que forman la enzima activa. El procesamiento de las subunidades así como la actividad de la SAMDC se incrementa en presencia de putrescina, de este modo, la presencia de putrescina incrementa la cantidad de DcAdoMet que hay disponible para sintetizar espermidina y espermina a partir de la putrescina (Xiong *et al.*, 1997). Además la enzima se puede desactivar de forma irreversible en presencia de cantidades elevadas de DcAdoMet, que es producto de su reacción (Li *et al.*, 2001). Por otro lado existe otro mecanismo de regulación a nivel de la enzima SAMDC. En la secuencia 5' líder del mRNA que codifica esta enzima existe un pequeño ORF aguas arriba del ORF verdadero (llamado uORF). En presencia de altos niveles de poliaminas el ribosoma tiende a traducir el uORF, cuyo producto es capaz de interactuar con algún componente de la maquinaria de traducción y parar la traducción (este proceso de inhibición de síntesis proteica se conoce como *ribosome stalling*). Por el contrario, en ausencia de poliaminas los ribosomas tienden a ignorar el uORF y empiezan la síntesis en el ORF verdadero (Ruan *et al.*, 1996). En el caso de las plantas, éstas tienen un sistema de regulación post-transcripcional de SAMDC mucho más elaborado, compuesto por un uORF principal y pequeños uORFs que modulan la traducción de SAMDC en función de los niveles de poliaminas intracelulares (Hanfrey *et al.*, 2003) Estos dos mecanismos de regulación de la actividad de la SAMDC demuestran que esta enzima tiene un papel crítico en el mantenimiento de los niveles internos de poliaminas. El segundo punto crítico de regulación es una proteína llamada antizima. En respuesta a niveles elevados de poliaminas, la antizima se une a la enzima ODC, enzima crítica de la síntesis de proteínas. Además de la inhibición no competitiva de la actividad ODC por la antizima, esta última es capaz de degradar

la ODC en el proteasoma 26S sin el requerimiento de la poliubiquitilación. La transcripción de la antizima no está regulada por los niveles de poliaminas, no obstante altas concentraciones de éstas causan un desplazamiento de la pauta de lectura +1 del mRNA de la antizima, provocando que ésta proteína se pueda sintetizar correctamente (Matsufuji *et al.*, 1995). Este sistema de regulación está presente en bacterias y animales pero de momento no se ha identificado en plantas.

4.2 *Transporte de poliaminas*

Los mecanismos de entrada de las poliaminas al interior celular han sido identificados a nivel molecular en bacterias y levaduras, no obstante, en el caso de los organismos superiores aún no han sido descritos. En *Escherichia coli* es donde se tiene un mayor conocimiento del transporte de poliaminas. En dicho organismo existen dos sistemas de entrada de poliaminas que funcionan a pH neutro, y que pertenecen a la familia de transportadores ATPasas (*ATP-binding cassette*, ABC). El primero es un sistema de entrada preferencial de espermidina, compuesto por las proteínas PotA, PotB, PotC y PotD, y el segundo es un sistema de entrada específico de putrescina compuesto por las proteínas PotF, PotG, PotH y PotI (Figura I.13; Igarashi y Kashikawagi, 1999). Además existen otros dos sistemas de transporte compuestos por una única proteína cada uno con 12 dominios transmembrana, PotE y CadB, que funcionan como un antiportador putrescina/ornitina y cadaverina/lisina, respectivamente. Recientemente se ha identificado un nuevo transportador de putrescina, PuuP, que está implicado en el metabolismo de esta poliamina (Kurihara *et al.*, 2005). Finalmente, también se ha identificado un sistema de salida de espermidina que se activa en respuesta a concentraciones altas de esta poliamina, formado por las proteínas MdtJ y MdtI (Higashi *et al.*, 2008).

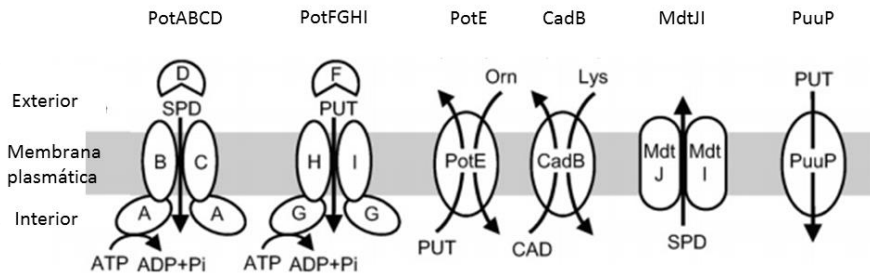


Figura 1.13: Mecanismos de transporte de poliaminas en *E. coli*. PotABCD: sistema de entrada preferencial de espermidina. PotFGHI: sistema de entrada específico de putrescina. PotE: sistema de antiporte putrescina/ornitina. CadB: sistema de antiporte cadaverina/lisina. MdtJI: sistema de excreción de espermidina. PuuP: transportador de putrescina. Adaptado de Igarashi y Kashiwagi, 2010.

En levadura se han identificado nueve proteínas implicadas en el transporte de poliaminas: TPO1-5, UGA4, GAP1, DUR3 y SAM3. TPO1-4 son transportadores de sustancias xenobióticas con capacidad para transportar poliaminas. TPO5, que se encuentra en el complejo post-Golgi, es un transportador específico de poliaminas. UGA4, localizado en la vacuola, es capaz de transportar tanto putrescina como ácido γ -aminobutírico. La proteína de membrana GAP1, puede importar al citosol tanto poliaminas como aminoácidos. Finalmente, DUR3 y SAM3 importan poliaminas al citoplasma (Igarashi y Kashiwagi, 2006). En células de mamífero se han sugerido dos sistemas de transporte de poliaminas. El primer modelo se basa en la endocitosis de poliaminas mediado por un receptor de membrana, en donde las poliaminas se unirían al grupo heparan sulfato de la molécula glican-1 y serían internalizadas mediante endocitosis. A continuación las poliaminas serían acumuladas en cuerpos vesiculares (Belting *et al.*, 2003). El segundo modelo propone que las poliaminas serían internalizadas en la célula por un transportador de membrana dependiente del potencial electroquímico (Soulet *et al.*, 2004). En las plantas por el momento no existe ningún modelo establecido de transporte de poliaminas. No obstante, recientemente se ha identificado un transportador de membrana de la familia de los transportadores de aminoácidos (RMV1), que está implicado en el transporte de poliaminas y metil viologen (un análogo de éstas) (Fujita *et al.*, 2012).

4.3 Distribución intracelular de poliaminas

Para entender las funciones fisiológicas que desempeñan las poliaminas es importante conocer la distribución intracelular de éstas, además cómo ya se ha comentado, la naturaleza policationica de las poliaminas hará que éstas tiendan a estar en contacto con moléculas con carga negativa, tales como ácidos nucleicos, algunas proteínas y fosfolípidos. Tal y como se aprecia en la Tabla I.1, las poliaminas están presentes en células eucariotas y procariotas en concentraciones de rango milimolar: la espermidina y espermina en células animales están en torno a 1 mM (Miyamoto *et al.*, 1993), mientras que la putrescina y la espermidina en células procariotas se encuentran a concentraciones de 32 y 7 mM (Watanabe *et al.*, 1991), respectivamente. No obstante, la mayor parte de estas sustancias se encuentra unida a moléculas con carga negativa, siendo la cantidad de poliaminas libre relativamente baja (entre 200 y 80 μ M en eucariotas). En concreto, se ha observado que la mayor parte de estas sustancias se encuentra unida al RNA (entre el 57 y el 85% del total en células animales) o al DNA (entre el 4 y el 18% del total en células animales). Asimismo, también se observa una cantidad importante de poliaminas unidas a moléculas de ATP (entre el 2 y el 12 % en células animales). Finalmente, la cantidad de poliaminas unidas a fosfolípidos o proteínas es negligible (por debajo del 5%).

Tabla I.1: Distribución intracelular de poliaminas en linfocitos bovinos, hígado de rata y *Escherichia coli*. El contenido de espermidina (SPD), espermina (SPM) y putrescina (PUT) está expresado en milimoles (mM) y entre paréntesis se muestra el porcentaje respecto el total. Adaptado de Watanabe *et al.* (1991) y Miyamoto *et al.* (1993).

	Linfocito bovino		Hígado de rata		<i>Escherichia coli</i>	
	SPD	SPM	SPD	SPM	PUT	SPD
Total	1,33 (100)	1,58 (100)	1,15 (100)	0,88 (100)	32,2 (100)	6,88 (100)
Libre	0,20 (15,0)	0,08 (5,1)	0,08 (7,0)	0,02 (2,3)	12,5 (38,8)	0,26 (3,8)
DNA	0,17 (12,8)	0,29 (18,3)	0,05 (4,3)	0,05 (5,7)	3,0 (9,3)	0,35 (5,1)
RNA	0,76 (57,2)	1,03 (65,2)	0,90 (78,3)	0,75 (85,2)	15,4 (47,9)	6,17 (89,7)
Fosfolípido	0,04 (3,0)	0,04 (2,5)	0,07 (6,1)	0,04 (4,5)	0,46 (1,4)	0,05 (0,7)
ATP	0,16 (12,0)	0,14 (8,9)	0,05 (4,3)	0,02 (2,3)	0,84 (2,6)	0,05 (0,7)

4.4 Funciones de las poliaminas

Las poliaminas poseen una multitud de funciones que afectan tanto el crecimiento como el desarrollo de los organismos, y estos efectos pleiotrópicos complican los intentos de comprender los efectos fisiológicos y patológicos de perturbar el equilibrio de poliaminas intracelular. Estudios recientes han identificado una serie de áreas clave en las que la función de las poliaminas es más clara. Éstas incluyen la regulación de la transcripción, varias etapas en la regulación posttranscripcional, control de la actividad de los canales de iones así como de la regulación de la actividad proteínica quinasa, el ciclo celular, la función y la estructura de la membrana y la estabilidad y estructura de los ácidos nucleicos.

Tal y como se ha observado en el apartado anterior, la mayor parte de las poliaminas se encuentra unida al RNA, de modo que se puede suponer que la mayor parte de las funciones celulares se derivará (salvo notables excepciones) de esta interacción. Efectivamente, los efectos de las poliaminas sobre la síntesis de proteínas se han estudiado en el contexto de sus efectos sobre la estabilidad del RNA. En concreto se ha observado que las poliaminas disminuyen el requerimiento de Mg^{2+} para la síntesis de proteínas *in vitro*, y además provocan un efecto estimulante que no se puede obtener sólo con Mg^{2+} (Atkins *et al.*, 1975). Además las poliaminas también facilitan la formación de la subunidad 30S del ribosoma (Echandi y Algranati, 1975) y aumentan la fidelidad de la síntesis de proteínas (Jelenc y Kurland, 1979). Ambos efectos también debidos a la estabilización de la estructura del RNA por parte de las poliaminas.

A nivel de interacción con el DNA, se ha visto que las poliaminas facilitan la condensación de la cromatina, y que esta acción es inhibida por la acetilación de histonas (Pollard *et al.*, 1999). Estos resultados sugieren que las poliaminas son represoras de la transcripción *in vivo*, y que uno de las funciones de la acetilación de histonas es la neutralizar la condensación de la cromatina por parte de las poliaminas y dejar el DNA más accesible.

Por otro lado, las poliaminas también han sido relacionadas con el ciclo celular y la apoptosis. En concreto se sabe que una carencia de poliaminas limita la síntesis de DNA, lo que a su vez provoca una parada del ciclo celular (Ray *et al.*, 1999). Esta inhibición de la síntesis de DNA podría ser debida a que la deficiencia de poliaminas causa una inhibición de la actividad de enzimas relacionadas con la síntesis de DNA, entre ellas la DNA polimerasa α o la DNA ligasa I (Johansson *et al.*, 2008). En cuanto a la apoptosis, el rol de las poliaminas es aun controvertido ya que, aunque la mayoría de estudios describen los efectos de las poliaminas en

la prevención de la apoptosis, también hay otros que describen un efecto progresivo de las poliaminas promoviendo la apoptosis (Schipper *et al.*, 2000). A modo de ejemplo, se han observado efectos protectores frente a la apoptosis inducida por el factor de crecimiento de la epidermis en células de cáncer de mama (Thomas *et al.*, 1999), pero se ha observado que las poliaminas promueven la apoptosis durante la respuesta antiviral en células Jurkat T (Grandvaux *et al.*, 2005). Por otro lado, niveles altos de H₂O₂ producto de una elevada tasa de oxidación de poliaminas puede desencadenar apoptosis (Parchment and Pierce, 1989).

Debido a su interacción con el ATP, las poliaminas pueden afectar a la fosforilación de proteínas. De hecho, se ha observado que las poliaminas, especialmente la espermina, forman un complejo ternario junto con el ATP y el Mg²⁺ (Meksuriyen *et al.*, 1998). Este complejo estimula la actividad de la proteína kinasa A, aparentemente aumentando la afinidad de la enzima hacia el ATP. Esto podría significar que este complejo ternario modifica la estructura del ATP de forma que el requerimiento de éste para las reacciones de fosforilación sea menor en general.

Tal y como se ha comentado anteriormente, las poliaminas no se unen a proteínas citosólicas de manera significativa. No obstante se ha visto que las poliaminas, y en particular la espermina, interactúa con algunos tipos de canales de iones (Williams, 1997). La espermina intracelular es capaz de modular la actividad de canales rectificadores de entrada de K⁺, interactuando directamente con el poro del canal de iones (Ficker *et al.*, 1994). Otro ejemplo de la modulación de la actividad de canales de iones por las poliaminas es la activación de los de un subtipo de receptores de glutamato (*N-methyl-D-aspartate*, NMDA) por la espermina extracelular (Williams, 1997). Estos receptores modulan la plasticidad de la membrana y se ha observado que la espermina extracelular interactúa con ellos en al menos dos regiones, modulando de este modo su actividad.

Un nuevo concepto que está ayudando a comprender el rol de las poliaminas en la regulación del crecimiento y la viabilidad celular ha sido el descubrimiento del llamado módulo de poliaminas (*polyamine modulon*) en *E. coli*, que consiste en una serie de genes cuya expresión aumenta en respuesta a poliaminas (Yoshida *et al.*, 2004). Como se ha comentado, las poliaminas son capaces de estimular la traducción a varios niveles, por ejemplo mediante la alteración de la estructura del mRNA de forma que se permita la iniciación de la síntesis de proteínas de genes que carecen las secuencias Shine-Dalgarno o que

las tienen situadas en posiciones que no son óptimas. Las proteínas cuya síntesis se ve estimulada por las poliaminas incluyen factores de transcripción y quinasas que pueden a su vez modular la expresión de otros genes, creando una red bastante compleja. Este concepto se ha extendido a levadura (Uemura *et al.*, 2009) y también es probable que se aplique en humanos (Nishimura *et al.*, 2009).

El requerimiento estructural de poliaminas debido a su naturaleza policatiónica no es estricto y diversos contenidos de poliaminas y/o análogos pueden realizar la mayoría de funciones anteriormente descritas. No obstante, en células eucariotas se ha visto que la espermidina posee un rol esencial como la fuente del grupo 4-aminobutilo requerido para sintetizar la hipusina. Ésta es un raro amino ácido presente solamente en una única proteína, el factor de inicio de la traducción eucariota 5A (*eukaryotic translation initiation factor 5A*, eIF5A) que, a pesar de lo que su nombre pueda sugerir, es esencial para promover la elongación traduccional (Saini *et al.*, 2009).

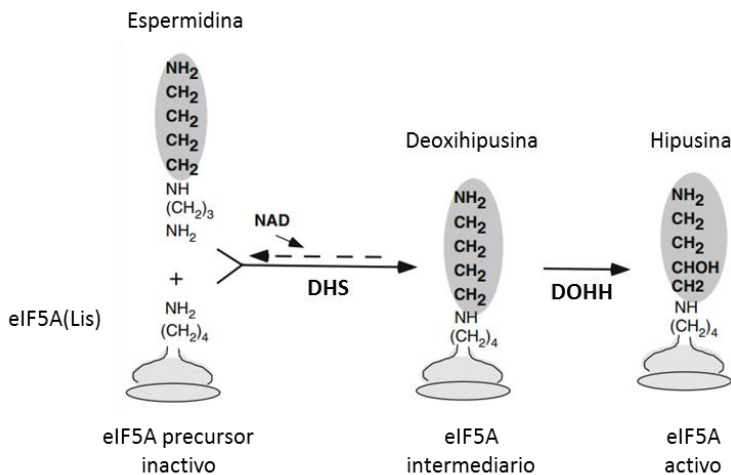


Figura I.14: Biosíntesis de hipusina en el factor eIF5A. La espermidina es la fuente del grupo aminobutilo de la hipusina (marcada en negrita). La síntesis de hipusina se realiza sobre un residuo específico de lisina del factor eIF5A mediante dos etapas enzimáticas, en las que están implicadas la deoxihipusina sintasa (DS) y la deoxihipusina hidrolasa (DOHH). Modificado de Park *et al.*, 2009.

Debido a que el requerimiento de espermidina para la síntesis de hipusina es muy estricto, únicamente ésta o análogos estructurales muy próximos a ella pueden ser sustrato de esta reacción.

La hipusina es sintetizada a través de una modificación posttraduccional única que requiere dos reacciones enzimáticas (Figura I.14). En el primer paso la enzima deoxihipusina sintasa (DHS) cataliza la formación de un intermediario, el residuo deoxihipusina, mediante la transferencia del grupo aminobutilo de la espermidina a un residuo de lisina específico del precursor eIF5A. Este intermediario es a su vez hidroxilado por la enzima deoxihipusina hidrolasa (DOHH) para formar la hipusina, dando pie a eIF5A activo. Recientemente, se ha visto que este factor de la traducción es crítico para sintetizar proteínas que posean varios residuos de prolina consecutivos y se postula que su rol a nivel del ribosoma sea interactuando en el sitio P del ribosoma, permitiendo una geometría favorable para la formación del enlace peptídico entre prolinas (Gutierrez *et al.*, 2013). De este modo, la necesidad de usar espermidina para la hipusinación define un requerimiento absoluto de espermidina en células eucariotas, siendo ésta la única poliamina esencial (Chattopadhyay *et al.*, 2003).

4.5 Poliaminas y enfermedades humanas.

Cada vez hay más indicios que indican que las poliaminas y/o sus metabolitos tienen un rol crítico en las enfermedades humanas. Condiciones que causan un desequilibrio en los niveles de poliaminas están asociadas causativamente a distintas enfermedades. Aunque en muchos casos esta relación no está totalmente clara, estos cambios en los niveles de poliaminas son una potente herramienta de diagnóstico. Por ejemplo, la presencia en la orina de N¹-N¹²-diacetilespermina (producto de la enzima SSAT) es un marcador muy útil para una gran variedad de tipos de cáncer (Kawakita y Hiramatsu, 2006). Esto es debido a que las células cancerígenas tienen una producción anormalmente alta de poliaminas que provocan una alta actividad metabólica (Russel, 1977).

La inducción de la apoptosis por niveles altos de H₂O₂ subproducto del catabolismo de poliaminas tiene un papel importante durante el desarrollo de tejidos (Parchment y Pierce, 1989). Sin embargo, el daño oxidativo derivado de la producción de H₂O₂ y aldehídos causados por una desregulación del catabolismo de las poliaminas puede estar implicado en la iniciación del cáncer y de la etiología de otras patologías (Casero y Pegg, 2010). Además, niveles altos de la enzima SMO

pueden ser especialmente dañinos debido a que esta enzima no está localizada en los peroxisomas como es el caso de la mayoría de enzimas PAO. De hecho recientemente se ha visto que esta enzima tiene un papel importante en la carcinogénesis y proporciona un nexo común entre procesos inflamatorios, infecciosos y cancerígenos (Casero y Pegg, 2010).

Tal y como se ha comentado anteriormente, el aumento de la actividad de la enzima SSAT se ha relacionado con una gran variedad de enfermedades, tales como la pancreatitis, el bloqueo del crecimiento de tejido regenerativo, obesidad, diabetes y cáncer (Pegg y Casero, 2011). Este incremento en la actividad de esta enzima conlleva cambios bioquímicos que pueden dar lugar a patogénesis, entre ellos están la desregulación del equilibrio de poliaminas y la reducción de los niveles de acetil-CoA y ATP (Jell *et al.*, 2007; Merentie *et al.*, 2007).

Finalmente, se ha relacionado una actividad reducida de la enzima SSAT con enfermedades del comportamiento, en concreto con una mayor tendencia al suicidio (Sequeira *et al.*, 2006). Esta relación entre la enzima SSAT y las enfermedades del comportamiento no se comprende a día de hoy, sin embargo se postula que puede ser debida a una desregulación de la actividad de proteínas de membrana tales como canales de K⁺ y los receptores NMDA, cuya actividad puede ser modulada por las poliaminas (Ingi *et al.*, 2001).

En cuanto al cáncer, las poliaminas influyen en muchos procesos relacionados con la carcinogénesis. De hecho en muchos tipos de cáncer se observa que el metabolismo y el requerimiento de poliaminas está alterado. Niveles anormalmente altos de poliaminas se han relacionado con varios tipos de cáncer (mama, colon, pulmón, próstata y piel), además también se observan niveles alterados de enzimas limitantes tanto en la biosíntesis como en el catabolismo de poliaminas. De modo indirecto la actividad del factor traduccional eIF5A también se ha correlacionado con distintos tipos de cáncer y se ha implicado en la respuesta inflamatoria en las células beta del páncreas (Wang *et al.*, 2013). Por este motivo además de por el requerimiento de poliaminas para el crecimiento tumoral, las rutas metabólicas de las poliaminas son muy interesantes como posibles dianas de drogas antitumorales, y se está estudiando el potencial antitumoral tanto de inhibidores de enzimas relacionadas con las poliaminas como análogos de éstas (Gerner y Meyskens, 2004).

4.6 Norespermidina

La norespermidina (NE) es una triamina de estructura similar a la espermidina (Figura I.11), la principal diferencia entre ambas es que la NE tiene dos cadenas de tres carbonos separando los grupos amino, mientras que la espermidina tiene una cadena de tres carbonos y otra de cuatro. A diferencia de la espermidina, la NE solamente se encuentra de forma natural en algunas plantas, como la alfalfa (Rodríguez-Garay *et al.*, 1989), bacterias (Lee *et al.*, 2009) y algas (Hamana y Matsuzaki, 1982).

A día de hoy se sabe muy poco de la función biológica de esta poliamina en aquellos organismos en los que está presente. No obstante, en el caso de las bacterias se sabe que la NE tiene un papel clave en el desensamblaje del biofilm. El biofilm es una comunidad estructurada de bacterias que se mantiene unida gracias a una matriz extracelular compuesta por proteínas y exopolisacáridos, que muchas bacterias son capaces de formar en respuesta a condiciones adversas (Kostakioti *et al.*, 2013). De este modo, el biofilm permite a un organismo unicelular, como las bacterias, entrar en un estado temporal como organismo multicelular, en el que el comportamiento en grupo permite a sus individuos resistir mejor en condiciones adversas. De hecho, dentro del biofilm se puede observar una cierta división de funciones, con subgrupos de bacterias que muestran distintos patrones de expresión génica, incluso hay una población de bacterias “persistentes” en un estado metabólicamente inactivo, que son capaces de tolerar tratamientos antibióticos a pesar de no tener genes de resistencia a ellos (Lewis, 2005). El reciente interés por el biofilm se debe a que muchas bacterias patógenas son capaces de formarlo y de este modo resistir los tratamientos con antibióticos, ya que por un lado la difusión del antibiótico dentro del biofilm es muy limitada, y por otro la presencia de esta subpoblación de bacterias “persistentes” hace muy difícil eliminar por completo la infección (Lewis, 2008). En este caso, la NE actúa de forma muy específica sobre los exopolisacáridos (que tienen carga negativa), perturbando su estructura y rompiendo el biofilm (Kolodkin-Gal *et al.*, 2012). No obstante, su acción sobre el biofilm aún no está clara del todo, ya que también hay estudios en los que se afirma su papel esencial en la formación del biofilm (Lee *et al.*, 2009).

A pesar de que la NE no está presente de manera natural en humanos, esta poliamina está siendo investigada por sus posibles propiedades antitumorales como análogo estructural de la espermidina. La NE parece tener ciertas propiedades antitumorales debido a que reduce los niveles de poliaminas

naturales al inhibir la biosíntesis de éstas (Prakash *et al.*, 1988). Un estudio reciente ha usado la NE junto con cationes de paladio (PdII) o platino (PtII) formando complejos trinucleares y se ha visto que tanto la NE como el complejo que forma con PdII inducen muerte celular y tienen propiedades antineoplásticas frente al cáncer de mama, seguramente vía la inhibición de la enzima ODC (Silva *et al.*, 2013).

5 LONGEVIDAD

El envejecimiento, definido de manera general como el deterioro funcional dependiente del tiempo que afecta a la mayoría de organismos vivos, ha llamado la atención y estimulado la imaginación de la humanidad durante toda su historia. Una de las consecuencias inesperadas de la vida moderna es un envejecimiento general de la población. A partir de 1998, el descenso de la tasa de nacimientos y el aumento de la esperanza de vida han hecho que el número de personas mayores supere al de personas jóvenes en la mayoría de los países más desarrollados por primera vez en la historia, y se estima que esta tendencia será global sobre el año 2050 (United Nations Population Division, 2002). Debido a esto, tanto la comunidad científica como la industria se están interesando por el estudio de los mecanismos celulares del envejecimiento, de modo que recientemente se han hecho importantes hallazgos en este campo. Estos avances se resumen en el artículo publicado por Lopez-Otín *et al.* (2013), en el que se definen los 9 signos característicos del envejecimiento a nivel celular (Figura 1.15). Estos procesos se pueden dividir en tres clases. En primer lugar están aquellos procesos primarios causantes de daño celular, como la inestabilidad genómica, el desgaste de los telómeros, las alteraciones epigenéticas y la pérdida de la proteostasis (homeostasis de proteínas). En segundo lugar están aquellos procesos inducidos en respuesta a este daño, que serían la desregulación de la sensibilidad a nutrientes, la disfunción mitocondrial y la senescencia celular. Estos procesos son interesantes ya que inicialmente disminuyen el daño causado, pero una vez se inducen de forma crónica o exacerbada provocan daño celular por sí mismos. Finalmente estarían los procesos llamados integrativos que son consecuencia de los anteriores y ocasionan daño a nivel del organismo (obviamente en el caso de organismos multicelulares), que serían el agotamiento de células madre y la alteración de la comunicación intercelular.



Figura 1.15: Los signos característicos del envejecimiento. Este esquema describe los 9 signos característicos del envejecimiento a nivel celular: Inestabilidad genómica, desgaste de los telomeros, alteraciones epigenéticas, pérdida de la proteostasis, desregulación de la sensibilidad de nutrientes, disfunción mitocondrial, senescencia celular, agotamiento de células madre y alteraciones de la comunicación intercelular. Adaptado de López-Otín *et al.*, 2013.

El envejecimiento y algunas enfermedades inducidas por este proceso han sido relacionados con la pérdida de la homeostasis de proteínas (Powers *et al.*, 2009). A nivel de las proteínas chaperonas, se ha visto que a medida que un organismo envejece disminuye la síntesis de este tipo de proteínas de manera significativa (Calderwood *et al.*, 2009). Además varios estudios han confirmado que la sobreexpresión de proteínas con actividad chaperona aumenta la longevidad en moscas (Morrow *et al.*, 2004) y nematodos (Walker y Lithgow, 2003). A nivel de la proteólisis, tanto la actividad del sistema UPS como la de la autofagia se ve reducida a medida que un organismo envejece (Rubinsztein *et al.*, 2011; Tomaru *et al.*, 2012) de manera similar a lo que ocurre con las proteínas chaperonas. De este modo, se observa que la eficiencia de todos los componentes del sistema de PQC se ve reducida a medida que un organismo envejece.

5.1 *Longevidad cronológica versus longevidad replicativa*

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* ha sido usada como modelo eucariota para estudiar el proceso de envejecimiento durante más de 50 años (Mortimer y Johnson, 1959). Sin embargo, de manera similar a los metazoos, las células de levadura pueden sufrir dos tipos de envejecimiento, llamados envejecimiento replicativo y envejecimiento cronológico. La longevidad replicativa se define como el número de divisiones que una célula puede realizar antes de entrar en la senescencia. Mientras que la longevidad cronológica (LC) se define como el intervalo de tiempo que una célula en estado de no división permanece viable. En este caso la viabilidad se define como la capacidad de una célula de reanudar su ciclo celular y entrar en mitosis, que es una medida biológicamente representativa de lo bien que una célula puede sobrevivir en estado de no división (Longo *et al.*, 2012). La LC generalmente se mide creciendo un cultivo de levadura hasta que éste llega a la fase postdiauxica, a partir de la cual la mayoría de las células salen del ciclo celular y permanecen en un estado de no división. La fase postdiauxica es el periodo de tiempo que empieza 24 horas después de la inoculación del cultivo, y es cuando el cultivo ha agotado toda la glucosa del medio, causando una bajada dramática de la tasa de crecimiento y el paso del metabolismo fermentativo al metabolismo aeróbico (Werner-Washburne *et al.*, 1996). En levadura, la LC puede durar de días a meses, en función de la cepa y las condiciones de cultivo. En general se postula que la longevidad replicativa puede ser relacionada con el envejecimiento de células en continuo estado de división como las células madre o epiteliales en organismos multicelulares, mientras que la LC se parecería más al envejecimiento de células de un organismo que están en estado de no división, tales como las neuronas. No obstante ambos métodos son válidos para estudiar la longevidad en levadura y en general tratamientos que aumentan la longevidad replicativa también aumentan la cronológica y viceversa (Longo *et al.*, 2012).

5.2 *Autofagia, homeostasis de aminoácidos y longevidad*

Además de su función en la adaptación de los organismos a condiciones ambientales cambiantes, la autofagia tiene un rol prominente en la longevidad en varios organismos modelo. Por un lado, la reducción de la autofagia ha sido asociada con envejecimiento acelerado, mientras que la inducción de este mecanismo puede tener potentes efectos anti-envejecimiento (Rubinsztein *et al.*,

2011). Dado que la autofagia se induce en condiciones de ayuno, la restricción calórica (RC), que es una dieta pobre en energía sin causar malnutrición, es uno de los tratamientos que más éxito ha tenido para prevenir el envejecimiento y aumentar la longevidad en levadura (Jiang *et al.*, 2000), nematodos (Schulz *et al.*, 2007), moscas (Mair *et al.*, 2003) y ratas (McCay *et al.*, 1939). Además el tratamiento con rapamicina también induce longevidad a través de la inhibición de TORC1, promoviendo de este modo la autofagia (Harrison *et al.*, 2009). De manera similar, la inhibición de TORC1 en levadura por otros métodos, ya sea por medios genéticos (Powers *et al.*, 2006) o farmacológicos (Wanke *et al.*, 2008) se ha visto que aumenta la longevidad induciendo autofagia. No obstante, la aplicación de una RC sobre organismos que ya tienen la actividad TORC1 inhibida mediante otros métodos no causa un aumento significativo de la longevidad (Grandison *et al.*, 2009), lo cual sugiere que la ruta que media entre el ayuno de nutrientes y la inducción de la autofagia podría ser efectivamente TORC1. Sin embargo en este artículo se sugiere que el aumento de la longevidad por una RC no sería debido a la falta de energía sino más bien a un desequilibrio en el contenido de aminoácidos.

Profundizando en la misma idea que el artículo anterior, recientemente han aparecido otros estudios en los que se plantea que además de la restricción de glucosa en el medio de cultivo, la distinta concentración de aminoácidos en el medio también tiene efectos en la longevidad de la levadura. En el estudio de Alvers *et al.* (2009) se ha visto que la autofagia es importante para la longevidad cronológica de la levadura, y que la composición del medio determina en gran medida la vida media de la levadura. Sin embargo, en este estudio también se ha visto que la adición de los aminoácidos no esenciales isoleucina y valina, además del aminoácido esencial leucina extienden la vida media de la levadura de manera independiente de la autofagia pero dependiente del factor de transcripción GCN4, ya que por un lado su expresión constitutiva anula el efecto de los aminoácidos, mientras que la adición de valina e isoleucina reducen los niveles de proteína de GCN4. Estos resultados sugieren que la represión de la ruta GAAC aumenta la longevidad en levadura, mientras que su activación la reduce, y que este efecto es independiente de la autofagia.

Por otro lado, un estudio del año pasado (Wu *et al.*, 2013), también ha demostrado el rol que tienen los aminoácidos en la longevidad cronológica de la levadura. En este caso, tras hacer un estudio preliminar con distintas concentraciones de 14 aminoácidos, se vio que una reducción de la concentración

de metionina en el medio y/o un aumento de la concentración del ácido glutámico aumentan la longevidad de la levadura de manera independiente y aditiva, y que estos efectos también son aditivos con la RC. Además en este estudio también observan que para el aumento de longevidad observado con la reducción de metionina, el aumento de ácido glutámico y la RC, TOR1 no es requerido, pero que SCH9 (una proteína quinasa situada aguas debajo de TORC1) sí que lo es en el caso de la reducción de la metionina y la RC, pero no en el caso del aumento de ácido glutámico. Por el contrario GCN2 se ha visto que es requerido para el aumento de longevidad por la adición de ácido glutámico y por la reducción de metionina.

En conjunto, todos estos datos apuntan a que además de la RC, la concentración de aminoácidos en el medio es crítica para la longevidad de la levadura, no ya a nivel nutricional sino a nivel de la alteración de rutas de señalización de nutrientes como la ruta GAAC o la ruta TORC1, y que la inhibición de estas rutas provoca un aumento de la longevidad cronológica de la levadura que puede ser debida (en el caso de TORC1) o no (en el caso de la ruta GAAC) a la inducción de la autofagia. Sin embargo a día de hoy se desconocen por qué tratamientos aparentemente similares tienen un efecto sobre una ruta u otra.

5.3 Efecto de la espermidina en la longevidad

Además de los efectos de la espermidina que se han comentado anteriormente, estudios recientes han demostrado que la adición externa de esta poliamina en distintos organismos (levadura, moscas, nematodos y líneas celulares humanas) aumenta la longevidad a través de la inducción de la autofagia (Eisenberg *et al.*, 2009). Además, la depleción de los niveles de poliaminas en levadura disminuye su longevidad y aumenta la necrosis. Estas evidencias sugieren que las poliaminas, en concreto la espermidina, tienen un efecto importante en la longevidad de distintos organismos. En cuanto a la inducción de la autofagia por la espermidina, si bien es cierto que la autofagia es necesaria para el efecto de esta poliamina, no están claros los mecanismos moleculares por los cuales esta sustancia induce autofagia. En su estudio, Eisenberg *et al.* proponen que la espermidina inhibe la actividad de distintas enzimas HAT (*Histone Acetyltransferase*) causando una hipoacetilación de las histonas H3 que a su vez modifican a la cromatina de forma que se inducen específicamente genes relacionados con la autofagia. No obstante a día de hoy se desconoce si el efecto

de esta hipoacetilación es capaz de explicar por completo el efecto antienvjecimiento de la espermidina y la inducción, por lo tanto no se descarta que haya otras rutas implicadas en este proceso.

5.4 Efecto del ácido acético en la longevidad cronológica

La viabilidad del ensayo de longevidad cronológica se ha puesto en cuestión a raíz de un estudio publicado por Burtner *et al.* (2009). En este estudio se vio que la depleción de glucosa provoca un aumento del etanol en el medio que posteriormente es degradado a ácido acético, y que dicho ácido provoca una acidificación del medio que reduce la longevidad de la levadura. En este estudio se demostró que tamponando el medio con glucosa normal se conseguía un aumento de la longevidad similar al logrado con la RC (Burtner *et al.*, 2009) y que el ácido acético sólo es tóxico para la levadura cuando está protonado a pHs bajos (con pHs próximos al neutro, el acético está en forma de acetato y no resulta tóxico para la levadura). Posteriores experimentos en el mismo estudio demostraron que el ácido acético es uno de los factores determinantes de la longevidad cronológica de la levadura y pusieron en cuestión la validez de dicho método (Longo *et al.*, 2012). No obstante, si bien es cierto que el ácido acético a pHs bajos provoca una reducción de la longevidad cronológica de la levadura, estudios más recientes en los que se ha empleado la aproximación de la longevidad cronológica para estudiar los mecanismos moleculares del envejecimiento en levadura utilizan medios con el pH tamponado para evitar el efecto tóxico del acético a pHs bajos. Tal es el caso del estudio del efecto de la espermidina en la longevidad de la levadura (Eisenberg *et al.*, 2009) o el estudio de los efectos aditivos del ácido glutámico y la metionina en la longevidad (Wu *et al.*, 2013). De hecho en este último estudio se ha hecho especial hincapié en demostrar que el efecto de los aminoácidos y de la RC en la longevidad es independiente de la cantidad de ácido acético y/o del pH del medio.

6 ORGANISMOS MODELO

La denominación de sistema u organismo modelo hace referencia organismos experimentales en los cuales el estudio de problemas biológicos es particularmente asequible por existir un conocimiento detallado de su morfología general y celular, fisiología, metabolismo, enzimas y otras proteínas (proteoma),

genética (directa y reversa), genoma y transcriptoma. Estos organismos fueron seleccionados en su momento por ofrecer facilidades experimentales y la concentración de esfuerzos de muchos equipos de investigación de alto nivel hizo posible que se convirtieran en sistemas modelo, generándose además de información muchas herramientas para la comunidad científica, tales como técnicas experimentales (incluyendo transformación genética) y colecciones de mutantes. Trabajando con estos sistemas modelo se pueden obtener conclusiones que puedan ser generalizadas a otras especies y que sería muy difícil de obtener en especies que carecen de las facilidades que los sistemas modelo ofrecen.

6.1 *Saccharomyces cerevisiae*

Saccharomyces cerevisiae es una especie de levadura que ha sido utilizada por la humanidad a lo largo de la historia para obtener pan, vino y cerveza. Además, tiene una serie de características que hacen de ella uno de los organismos modelo eucariotas más utilizados en la biología molecular: al ser un organismo unicelular, *S. cerevisiae* tiene un tiempo de replicación relativamente corto (tasa de replicación de 1,5 a 2 horas a 30°C; Boekhout y Robert, 2003) y puede crecerse fácilmente; además se pueden realizar transformaciones genéticas mediante recombinación homóloga con relativa facilidad y la posibilidad de crecer *S. cerevisiae* como organismo haploide simplifica la creación de cepas de pérdida de función; finalmente, al ser un organismo eucariota unicelular, *S. cerevisiae* conserva la compleja estructura intracelular de otros organismos eucariotas superiores, de modo que los hallazgos realizados en este organismo pueden ser exportados a otros organismos superiores con relativa facilidad. Además, tal y como se ha comentado anteriormente este organismo es comúnmente utilizado para estudiar los mecanismos celulares del envejecimiento y tratamientos efectivos contra él (Longo *et al.*, 2012) y tiene un genome relativamente pequeño (12 Mb).

6.2 *Arabidopsis thaliana*

En el siglo pasado, la mayoría de los estudios en plantas se realizaron con especies de interés económico para poder mejorar sus cultivos. Estas especies por lo general presentan dificultades para su estudio, ya que en la mayoría de los casos sus genomas son de gran tamaño y tienen un elevado grado de ploidía, lo

que dificulta su manipulación y análisis (Meyerowitz, 2001). En el campo de la biología molecular vegetal se ha generalizado la utilización de una crucífera sin valor económico llamada *Arabidopsis thaliana* que se ha convertido rápidamente en la planta modelo por excelencia. *Arabidopsis* presenta unas características óptimas como organismo modelo en Biología vegetal, entre las que destacan su capacidad de crecimiento bajo condiciones controladas, su pequeño tamaño (unos 30-50 cm de altura, que posibilita cultivar hasta 10000 plantas/m²), su ciclo de vida corto (aproximadamente unas 6 semanas) y la producción de varios miles de semillas, lo que unido a su genoma pequeño (120 Mb, aproximadamente 26000 genes) y su facilidad para obtener mutantes o transgénicas, permite hacer estudios genéticos.

6.3 Líneas celulares HeLa

El estudio de fenómenos a nivel celular en sistemas animales se facilita enormemente utilizando cultivo *in vitro* de líneas celulares. Uno de los mayores problemas de trabajar con líneas celulares es su incapacidad de crecer indefinidamente, lo que se conoce como el límite de Hayflick (Hayflick y Moorhead, 1961). Este problema se solucionó con la introducción de las llamadas líneas celulares inmortales. Éstas son una población de células de un organismo multicelular que no deberían ser capaces de proliferar de forma indefinida pero que, debido a una serie de mutaciones, son capaces de evitar entrar en senescencia y pueden continuar dividiéndose de manera indefinida. De este modo estas células pueden ser mantenidas de forma indefinida en condiciones *in vitro* y han demostrado ser una herramienta muy potente para estudiar los procesos bioquímicos y de biología celular de organismos multicelulares.

La primera línea inmortal aislada y la más utilizada actualmente son las células *HeLa* (Rahbari *et al.*, 2009). Esta línea celular se obtuvo a partir de células de cáncer cervical de una paciente llamada Henrietta Lacks por el Dr. Gey en 1951 y se usaron inicialmente para desarrollar la primera vacuna contra la polio (Scherer *et al.*, 1953). Desde entonces esta línea celular ha sido usada rutinariamente en investigaciones relacionadas con el cáncer, infecciones víricas, los efectos de la radiación y otras sustancias tóxicas, cartografía genética, entre otras (Skloot, 2010).

OBJETIVOS

El objetivo fundamental de este trabajo es la identificación del mecanismo(s) de toxicidad de la noespermidina y comprobar si la espermidina tiene un efecto similar. Para ello se definen los siguientes objetivos específicos.

1. Estudiar la respuesta transcripcional de *Arabidopsis* a la noespermidina.
2. En base a los resultados del punto anterior, identificar los mecanismos de toxicidad de la noespermidina a nivel molecular.
3. Confirmar el principal efecto tóxico de la noespermidina en otros organismos modelo y utilizando distintos abordajes.
4. Comprobar si la espermidina, una triamina natural, tiene el mismo efecto que la noespermidina.
5. Proponer un modelo para la toxicidad de la noespermidina.

MATERIALES Y MÉTODOS

1 MATERIALES

1.1 Cepas y condiciones de cultivo de bacterias

La cepa DH5 α (F' ϕ 80dlacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF) U169 *recA1 endA1 hsdR17*(r_k⁻, m_k⁺) *phoA supE44* λ *thi-1 gyrA96 relA1*) de *Escherichia coli* fue empleada como vehículo para la propagación y el aislamiento de plásmidos. La cepa Rosetta (*gal hsdS_B lacY1 ompT* (pRARE *araW argU glyT ileX leuW proL metT thrT tyrU Cam^r*) (Novagen) fue empleada para la expresión y purificación de proteínas recombinantes. Para el cultivo y manipulación de estas cepas se siguieron métodos estándar (Sambrook and Russell, 2001). Los medios de cultivo utilizados fueron:

Medio Luria Bertani (LB)

Medio empleado para el crecimiento de *E. coli*. Está compuesto por 1% triptona, 0.5% extracto de levadura y 1% NaCl. El pH se ajusta a 7 con NaOH.

Medio SOC:

Medio utilizado para el crecimiento de *E. coli* previo a la preparación de células competentes por choque térmico. La composición del medio es la siguiente: 2% triptona, 0,5% extracto de levadura, 10 mM NaCl, 3 mM KCl, 10 mM MgCl₂ y 10 mM MgSO₄.

En el caso de medios sólidos, se añadió un 2% de agar bacteriológico, y cuando se requirió, se agregaron antibióticos al medio con las siguientes concentraciones finales: ampicilina (50 mg/l), cloramfenicol (30 mg/l).

En condiciones normales de crecimiento, las bacterias se incubaron toda la noche a 37°C en agitación (180-200 rpm).

1.2 Cepas y condiciones de cultivo de levadura

Las cepas de *Saccharomyces cerevisiae* utilizadas en el presente trabajo se muestran en la Tabla M.1.

Tabla M.1: Cepas mutantes de levadura empleadas.

Cepa	Descripción	procedencia
BY4741	MAT α <i>his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0</i>	Euroscarf
HSP104-CFP	BY4741 HSP104-yEmCFP-spHIS5	Specht <i>et al.</i> , 2011
CLN1-TAP	BY4741 CLN1-TAP-HIS3MX	Ghaemmaghami <i>et al.</i> , 2003
CLN2-TAP	BY4741 CLN2-TAP-HIS3MX	Ghaemmaghami <i>et al.</i> , 2003
Δ gcn2	BY4741 <i>gcn2::KanMX4</i>	Winzeler <i>et al.</i> , 1999
Δ gcn4	BY4741 <i>gcn4::KanMX4</i>	Winzeler <i>et al.</i> , 1999
GCN2 ^c	BY4741 GCN2 ^c -M719V-E1537G	Menacho-Marquez <i>et al.</i> , 2007
Δ gln3	BY4741 <i>gln3::KanMX4</i>	Winzeler <i>et al.</i> , 1999
Δ tor1	BY4741 <i>tor1::KanMX4</i>	Winzeler <i>et al.</i> , 1999
YCR25	BY4741 MSN2::NAT MSN4::KAN	Ruiz-Roig <i>et al.</i> , 2010

Las células de levadura se cultivaron y manipularon según métodos estándar (Guthrie y Fink, 1991) a 28°C en agitación (180-200 rpm) en los siguientes medios:

Medio YPD

2% glucosa, 2% triptona y 1% extracto de levadura.

Medio mínimo (SD)

2% glucosa, 0,7% *yeast nitrogen base*, 50 mM ácido succínico ajustado a pH 5.5 con Tris.

Medio mínimo completo (SCD)

2% glucosa, 0,7% *yeast nitrogen base*, 50 mM ácido succínico ajustado a pH 5.5 con Tris, 20 mg/L arginina, 20 mg/L lisina, 20 mg/L metionina, 30 mg/L isoleucina, 30 mg/L serina, 30 mg/L treonina, 30 mg/L tirosina, 30 mg/L valina, 50 mg/L fenilalanina 85 mg/L inositol y 90 mg/L ácido p-aminobenzóico.

Medio mínimo completo modificado (SCDmod)

Usado en los experimentos de longevidad. Igual que el medio SCD exceptuando que se suplementa con 80 mg/L histidina, 200 mg/L leucina, 30 mg/L adenina, 320 mg/L uracilo, 30 mg/L lisina, 30 mg/L metionina (Fabrizio y Longo, 2003).

En el caso del medio SD, SCD y SCDmod se añadieron aminoácidos y bases púricas y pirimidínicas de acuerdo con las necesidades de cada cepa (30 µg/ml adenina, 100 µg/ml triptófano, 30 µg/ml histidina, 100 µg/ml leucina, 30 µg/ml metionina, 30 µg/ml uracilo). Para la preparación de medios sólidos se añadió un 2% de agar. En el caso de que se deseara suplementar el medio con aminoácidos, se añadían 40 g/l de peptona de caseína ácida.

1.3 Ecotipos, mutantes y medios de cultivo de plantas

Como líneas silvestres se emplearon los ecotipos *Columbia* y *Landsberg erecta* de *A. thaliana* y los mutantes utilizados se describen en la Tabla M.2.

Tabla M.2: Plantas transgénicas empleadas

Plantas transgénicas	Descripción	Procedencia
oePAO3 <i>col</i>	pGWB6 35S:PAO3	Laboratorio Roubelakis-Angelakis (Heraklion, Grecia)
oePAO1 <i>col</i>	pGWB6 35S:PAO1	Laboratorio Roubelakis Angelakis (Heraklion, Grecia)
ΔPAO3 <i>col</i>	GK-038F09	NASC
ΔPAO1 <i>col</i>	SAIL_114_G05	NASC
GFP-RGA <i>Ler</i>	RGAprom::GFP-RGA	Silverstone <i>et al.</i> , 2001

Las plantas de *A. thaliana* fueron manipuladas y crecidas en el siguiente medio (Weigel y Glazebrook, 2002):

Medio Murashige-Skoog (MS)

Medio empleado de forma rutinaria para el cultivo *in vitro* de *A. thaliana*. Está compuesto por sales MS (Sigma-Aldrich) al 0,4%, 1% sacarosa (p/v) y 10mM de MES (ácido 2-N-morfolino etanosulfónico), ajustándose el pH a 5,7. Para la obtención de medio sólido se añade 0,8% (p/v) de agar.

1.5 Cepas y condiciones de cultivo de líneas celulares

Las células *HeLa* fueron crecidas en medio Eagle modificado por Dulbecco (*Dulbecco's modified Eagle's medium*, DMEM) (Life Technologies, USA) con un 10% de suero fetal de ternero.

Para su sincronización G₁/S, 6x10⁵ células *HeLa* se cultivan en placas de Petri de 10 cm de diámetro en medio DMEM. Tras 24h de incubación, se añaden 2,5 mM de timidina y se incuba durante otras 16h. A continuación las células se transfieren a medio fresco DMEM sin timidina y se incuban durante 12h, a continuación se añaden 5 µg/ml de afidicolina y se incuban otras 12h. Tras lo cual las células son lavadas para eliminar la afidicolina y la sincronización está completada. A continuación las células se pueden cultivar en medio DMEM suplementándose con 0,04 µg/ml nocodazol cuando sea necesario.

1.6 Vectores de clonación, expresión y transformación

Los plásmidos empleados en el presente trabajo se resumen en la Tabla M.3.

Tabla M.3: Plásmidos utilizados en el presente trabajo.

Plásmido	Descripción	Procedencia
pESC-mGFP-VHL	GAL1 promoter::mGFP-VHL; NLS-tdTomato AmpR; URA3; 2µ	Kaganovich <i>et al.</i> , 2008
GCN4utr-βGal	p180 GCN4-LacZ CEN4 ARS1 URA3	Hinnebusch <i>et al.</i> , 1985
MSN2-GFP	pAdh1-Msn2-GFP LEU2	Görner <i>et al.</i> , 1998
UBC8-6xHis	pDEST17 atUBC8-6xHis	Stone <i>et al.</i> , 2005
MBP-XBAT32	pMAL-c2X MBP-XBAT32	Nozdon <i>et al.</i> , 2004

1.7 Anticuerpos empleados para la inmunodetección de proteínas

Los anticuerpos utilizados y el organismo del cual proceden se resumen en la Tabla M.4

Tabla M.4: Anticuerpos primarios y secundarios utilizados para la inmunodetección de proteínas.

Anticuerpo primario	Dilución	Anticuerpo secundario	Dilución	Procedencia del anticuerpo primario
α -Ub	1:1000	α -HRP-rabbit	1:20000	Calbiochem
α -GFP	1:2000	α -HRP-mouse	1:20000	Roche
α -PeIF2 α	1:2000	α -HRP-rabbit	1:20000	Tom Dever Lab
α -eIF5A	1:5000	α -HRP-rabbit	1:20000	A. Ferrando Lab
α -PAP	1:10000	α -HRP-mouse	1:20000	M. Proft Lab
Streptavidina	1:100000	NP	NP	Millipore
α -P53	1:5000	α -HRP-mouse	1:20000	Santa Cruz Biotech
α -CCNA2	1:10000	α -HRP-rabbit	1:20000	Pierce Antibodies
α -CCNB1	1:10000	α -HRP-rabbit	1:20000	Santa Cruz Biotech
α -HRP-rabbit	1:20000	NP	NP	GE Healthcare
α -HRP-mouse	1:20000	NP	NP	GE Healthcare

1.8 Noespermidina

La noespermidina (noespermidina) se adquirió a Sigma (USA) y se guardó en la nevera. Debido a su naturaleza policationica, esta sustancia tiende a liberar protones en medios con pH neutro o ácido, subiendo de esta forma el pH. Para evitar esto en todos los ensayos en los que se usó la NE y/o la SPD, se preparó una alícuota 1 M fresca en la que el pH fue ajustado con HCl al pH del medio en

cuestión y suplementado con 0,1 M del tampón adecuado para mantener el pH estable.

2 ENSAYOS DE CRECIMIENTO Y SENSIBILIDAD EN *S. CEREVISIAE*

2.1 Ensayo de crecimiento en medio sólido (goteos).

Se obtuvieron diluciones seriadas de cultivos líquidos de las distintas cepas de levadura y fueron transferidas (3 μ l de cada dilución) con la ayuda de un replicador (Sigma) a placas de medio sólido con las diferentes condiciones a estudiar. Las placas fueron incubadas de 1 a 3 días a 28°C o en el caso de los tratamientos con condiciones restrictivas, hasta que las colonias de levadura fueron visibles. En el análisis del crecimiento se tuvo en cuenta tanto la mayor dilución a la cual aún se observaba crecimiento como el tamaño de la colonia.

2.2 Ensayo de crecimiento en medio líquido (bioscreen).

La capacidad de crecimiento de cultivos de levadura en medio líquido se cuantificó a lo largo del tiempo registrando el crecimiento de los cultivos en placas multipocillo mediante un analizador Bioscreen C (Thermo LabSystems). Se calculó la densidad óptica con un filtro de banda ancha (420-580 nm) para reducir la contribución del medio a la lectura de la absorbancia. La temperatura de crecimiento fue de 28,5°C y los cultivos fueron sometidos a agitación durante los 40 segundos previos a la lectura. Esta lectura se llevó a cabo en intervalos de 15 minutos durante las 48 ó 72 horas que duraba cada experimento en función de las dificultades que presentaban las cepas para crecer. En todos los casos se utilizaron cultivos en fase exponencial de crecimiento (OD₆₆₀ entre 0,5 y 1) diluidos 200 veces desde el cultivo inicial al cultivo en cada pocillo de la placa de crecimiento y análisis, y cada cultivo se analizó por triplicado para reducir en lo posible los errores de carga. Los datos fueron corregidos para hacer comparables las lecturas del analizador con absorbancias reales a 660 nm de cultivos crecidos en condiciones óptimas corrigiendo la pérdida de linealidad de las absorbancias a partir de ciertos valores (Warringer and Blomberg, 2003).

2.3 *Ensayo de viabilidad*

Para estudiar la capacidad de provocar muerte celular de la NE, se hizo un ensayo de viabilidad basado en el conteo de unidades formadoras de colonias (CFUs). Las cepas ensayadas son crecidas hasta fase logarítmica ($OD_{600} < 0,5$), posteriormente se les somete al tratamiento adecuado junto con su control negativo. A continuación se hace una dilución 10^{-5} de cada tratamiento y se inoculan 100 μ l en una placa de medio YPDA (por triplicado). A los dos días se cuenta el número de CFUs presentes en cada tratamiento y se obtiene el porcentaje de muerte celular de cada tratamiento en relación al número de CFUs presente en el tratamiento control.

2.4 *Ensayo de longevidad cronológica*

La longevidad cronológica (LC) en levadura se define como el intervalo de tiempo en el cual una célula en fase estacionaria es capaz de sobrevivir. En este trabajo se usó el protocolo definido por Fabrizio y Longo (2003). Para ello se hace una dilución 1:100 de un cultivo saturado y se diluye en medio fresco SCDmod. A los tres días (día 0 del experimento de longevidad), se suplementa dicho cultivo con la sustancia que se desee evaluar (junto con un cultivo control) y se toma una alícuota. De dicha alícuota se hace una dilución 10^{-5} y se inoculan 100 μ l en una placa de medio YPDA (por triplicado). A los dos días se cuenta el número de CFUs, que en este caso corresponderán al número inicial de CFUs presentes en el cultivo y se considera 100% de viabilidad. Cada dos o tres días se toma una nueva alícuota y se obtiene la viabilidad del cultivo relativa al día 0 hasta que el número de CFUs es menor que el 10% del número de CFUs en el día 0 (supervivencia máxima). Las diluciones se van ajustando de forma que en las placas de YPDA se obtengan entre 20 y 200 CFUs.

2 MANIPULACIÓN Y CRECIMIENTO DE *A. THALIANA*

2.1 *Esterilización de semillas*

Las semillas se esterilizan en su superficie tratándolas en primer lugar con una solución de etanol al 70% (v/v) y Tritón X-100 0,1% (v/v) durante 15 minutos. A continuación se elimina el etanol y se añade una segunda solución compuesta de lejía al 2,5% (v/v) y Tritón X-100 0,05% (v/v). Finalmente, las semillas se lavan 3

veces con agua destilada. La estratificación de las semillas se lleva a cabo dejándolas en agua estéril a 4 °C durante 3 días.

2.2 *Cultivo in vitro en medio sólido*

Para el cultivo *in vitro* en horizontal se utilizan placas petri de 9 cm de diámetro con 25 ml de medio cada una. Para el cultivo en vertical se emplean placas cuadradas de 12 cm de lado con unos 50 ml de medio cada una. En ambos casos, las placas se sellan con cinta porosa (Micropore) y se incuban en una cámara con condiciones controladas de 23°C de temperatura, fotoperiodo de día largo y una intensidad de luz de $100 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$.

2.3 *Cultivo en invernadero*

Las plantas de *A. thaliana* se crecen en una mezcla 2:1 de turba (Biolan): vermiculita exfoliada (Asfaltex). Las macetas se colocan en bandejas que se irrigan 2 veces por semana. Las condiciones de crecimiento en el invernadero son de día largo, 23 °C de temperatura, 70 % de humedad relativa y una intensidad de luz aproximada de $130 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{sec}^{-1}$.

2.4 *Ensayo de aparición de cotiledones*

Este ensayo permite determinar la respuesta de la planta frente a distintos estreses en los primeros estadios de desarrollo. Para ello, se utilizan los medios descritos en el apartado 1.3 suplementados o no con NE y/o otros compuestos y se observa el porcentaje de plántulas con cotiledones expandidos y verdes entre los 4 y 7 días (el tiempo es variable según el tratamiento). Se realizan tres repeticiones en cada condición, y se calcula la media y error estándar de esas tres réplicas biológicas.

3 **CITOMETRÍA DE FLUJO CON LINEAS CELULARES**

Para realizar lecturas de citometría de flujo, en primer lugar las células se lavan en tampón PBS (*phospate buffered saline*: 8 g/l NaCl, 0,2 g/l KCl, 1,44 g/l Na_2HPO_4 , 0,24 g/l KH_2PO_4 , con pH ajustado a 7,4 con HCl) frío. A continuación se fijan incubándose con 70% etanol durante toda la noche a -20°C, tras lo cual son centrifugadas y resuspendidas en tampón PBS suplementado con 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ RNAsa A y 50 μM de yoduro de propidio. Tras una hora de incubación el yoduro de

propidio y el número de células son cuantificadas usando el citómetro de flujo FACSCalibur (Becton Dickinson). La distribución de células en distintos estadios del ciclo celular se determinó con el programa Cellquest (Becton Dickinson).

4 PURIFICACIÓN Y MANIPULACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

4.1 Aislamiento de DNA plasmídico en E. coli

Para el aislamiento de DNA plasmídico de *E. coli* se emplea el método descrito por Holmes y Quigley (1981). Las células de 2 ml de cultivo crecidas en medio LB con el antibiótico selectivo se recogen por centrifugación y se resuspenden en 0,5 ml de STET (10% p/v sacarosa, 50 mM Tris-HCl pH 8, 50 mM EDTA y 1% v/v Triton X-100), se añaden 5 µl de lisozima 5% (p/v) y se calienta a 95°C durante 2 minutos para lisar las células. A continuación, se centrifuga a 12.000 rpm durante 10 minutos y se elimina el sedimento (restos celulares y DNA cromosómico). Al sobrenadante se le agregan 400 µl de isopropanol y se deja precipitar a -20°C durante 15 minutos. Transcurrido ese tiempo, se centrifuga a 12.000 rpm durante 10 minutos y se resuspende el precipitado en 200 µl de agua estéril, se añaden 700 µl de etanol absoluto:acetato de amonio 7,5 M (6:1) y se deja a -20°C durante 20 minutos. A continuación, se centrifuga a 12.000 rpm durante 10 minutos y se lava el precipitado con etanol 70% (v/v). Finalmente el precipitado se resuspende en 15 µl de agua estéril.

En caso de que sea necesario secuenciar el plásmido aislado, se realiza previamente un tratamiento con RNAasa y fenol cloroformo isoamílico (PCI), del siguiente modo: Se añade agua estéril hasta un volumen final de 100 µl, y se agrega 1,5 µl RNAasa 1% (p/v). La mezcla se incuba a 37°C durante 40 minutos. Transcurrido ese tiempo, se añaden 100 µl de PCI, se mezcla y se centrifuga a 12.000 rpm durante 10 minutos. Después se toma la fase acuosa superior, se coloca en un tubo nuevo, se añade el doble de volumen (unos 200 µl) de etanol acetato sódico (1ml acetato sódico 3M en 10 ml de etanol absoluto: EtAcNa) y se incuba a -20°C un mínimo de 2 h. Finalmente, se centrifuga a 12.000 rpm durante 10 minutos, se lava el precipitado con etanol 70%, se deja secar el precipitado para eliminar el etanol y se resuspende en 15 µl de agua estéril.

4.2 *Aislamiento de DNA genómico de A. thaliana*

Se ha empleado una adaptación del método del CTAB descrito en McKinney (1995). Aproximadamente un gramo de tejido vegetal se homogeneiza con mortero usando nitrógeno líquido. Este homogeneizado se coloca en un tubo falcon de 10 ml, se le añaden 2 ml de tampón de extracción CTAB 2% (2% p/v CTAB, 100 mM Tris-HCl pH 8, 20 mM EDTA, 1,4 M NaCl y 1% p/v PVP Mr 40.000) y se incuba a 60 °C durante 15 minutos. A continuación se agregan 2 ml de cloroformo:alcohol isoamilico (24:1), se mezcla usando vórtex y se centrifuga a 2.000 rpm durante 10 minutos. Se toma la fase acuosa superior y se añaden 0,1 volúmenes de la solución CTAB 10% (10% p/v CTAB y 0,7 M NaCl) y se calienta a 60 °C durante 2 minutos. A continuación, se añaden dos volúmenes de agua estéril fría para inducir la precipitación del complejo CTAB/DNA-RNA. Los tubos se incuban en hielo durante 3 horas y se recoge el precipitado mediante centrifugación a 12.000 rpm durante 10 minutos. El precipitado se resuspende en 0,4 ml de NaCl 1M, se añaden 0,8 ml de etanol absoluto frío para inducir la precipitación del DNA y se centrifuga a 12.000 rpm durante 10 minutos. Finalmente, el DNA precipitado se lava dos veces con etanol 70% y el precipitado final se resuspende en 20 µl de agua estéril.

4.3 *Electroforesis de DNA*

Para comprobar la integridad y concentración del DNA plasmídico y genómico extraído se emplean geles de agarosa 0,7% (p/v) fundida en tampón de electroforesis TBE 0,5X (45 mM TrisBase, 45mM ácido bórico y 1 mM EDTA). Tanto el tampón de electroforesis como el gel contienen 0,05% (p/v) de bromuro de etidio. La visualización del DNA se realiza iluminando el gel con luz ultravioleta (UV) a 254 nm de longitud de onda.

Como tampones de carga se utilizan: Tampón 6X naranja (50% v/v glicerol, 60 mM Tris-HCl pH 8, 6 mM EDTA y 0,35% p/v Orange G) y tampón 6X azul (40% p/v sacarosa, 0,1 M EDTA y 0,25% p/v azul de bromofenol). Como marcadores de tamaño y peso molecular se utilizan los patrones comerciales 1Kb y λ /HindIII de Invitrogen.

Para la purificación de fragmentos de DNA a partir de geles de agarosa, se emplea el kit "NucleoSpin RNA" (Macherey-Nagel).

4.4 Aislamiento de RNA de *A. thaliana*

Se homogeneiza con mortero 0,5-1 gramo de tejido vegetal congelado, se coloca en un tubo falcon y se agregan 1 ml de PCI y 1 ml de TCES (0,2 M Tris, 0,2 M NaCl, 50 mM EDTA, 2% p/v SDS, ajustado a pH 8 con HCl). El homogeneizado se incuba a 50 °C durante 15 minutos. A continuación, se centrifuga a 12.000 rpm durante 10 minutos, se toma la fase superior acuosa y se coloca en un nuevo tubo donde se añade un volumen de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1), se mezcla en vórtex y se vuelve a centrifugar a 12.000 rpm durante 10 minutos. Tras la centrifugación, se pasa la fase superior a un tubo nuevo y el RNA se precipita agregando un volumen de LiCl 6 M y colocándolo a -20 °C durante 4-5 horas. Finalmente, se centrifuga a máxima velocidad durante 10 minutos, el precipitado se lava con etanol 70% y se resuspende en 20 µl de agua estéril. Para comprobar la integridad del RNA se emplean geles no desnaturalizantes y para conocer la concentración se utiliza un espectrofotómetro ND-1000 (NanoDrop).

4.5 Electroforesis de RNA

Se emplean estas condiciones para observar la integridad del RNA aislado. Se preparan geles de agarosa 1% TAE 1X y las muestras se preparan con el tampón de carga 1,25X (55% v/v formamida, 20% v/v formaldehído, 12,5% v/v MAE 10X, 8% v/v glicerol, 0,05% p/v azul de bromofenol y 0,001% p/v de bromuro de etidio) y se calientan a 56 °C durante 10 minutos, antes de cargarlas en el gel. El gel se deja correr 1-2 horas a 50 voltios.

4.6 Síntesis de cDNA

Se parte de 4,4 µg de RNA total previamente extraído y cuya integridad se ha verificado mediante electroforesis de la muestra. En primer lugar se elimina el DNA que esté presente en la muestra, para ello se mezcla el RNA con 4 µl de tampón DNAsa 10X y 4 µl de DNAsa I (1 U/µl, Fermentas) en un volumen total de 40 µl y se deja incubando durante 30 min. A continuación se añaden 4 µl de EDTA 50 m, que protege el RNA en el calentamiento posterior, y se inactiva la DNAsa incubando las muestras a 75°C durante 10 min.

Posteriormente se parte de 10 µl de la reacción anterior (aproximadamente 1 µl de RNA) y se añaden 9 µl de *5X Reaction Mix* y 2 µl de *Maxima Enzyme Mix* (Thermo Scientific) en un volumen total de 45 µl (en el *mix* está incluido el oligodT). La incubación tiene dos etapas: una primera de 10 min a

25°C y otra de 30 min a 50°C. Finalmente la reacción se inactiva calentando a 85°C durante 5 min.

4.7 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Todos los cebadores utilizados en este trabajo han sido sintetizados por la empresa Isogen Life Science. En la Tabla M.5 se muestran las secuencias de los oligonucleótidos empleados como cebadores en las reacciones de PCR y RT-PCR semicuantitativa.

Las reacciones de PCR se llevan a cabo de forma rutinaria en tubos estériles, donde se añaden los siguientes reactivos:

- 10 ng DNA molde
- 2 µl Tampón PCR 10X
- 2 µl dNTPs 10 mM
- 1 µl Cebador sentido (0,1 µg/µl)
- 1 µl Cebador antisentido (0,1 µg/µl)
- 1 µl Polimerasa (*Taq*) 1U /µl
- Volumen final de 20 µl de agua MilliQ estéril

En las reacciones rutinarias se utiliza la enzima *Taq* polimerasa (Biotools), y en aquellas reacciones que requieren una amplificación del DNA de alta fidelidad se emplea la enzima *Pwo DNA polimerase* (Roche). Todas las reacciones de PCR se llevan a cabo en un termociclador Mastercycler personal (Eppendorf) con el siguiente programa de PCR:

- 1 ciclo de desnaturalización a 95 °C durante 3 min.
- 30-35 ciclos de:
 - desnaturalización: 30s a 95°C
 - hibridación de los cebadores: 30s a una temperatura de anillamiento 2°C inferior a la T_m de los oligonucleótidos
 - extensión a 72 °C de 1 min por kb a amplificar, en el caso de la enzima *Taq* polimerasa, y de 2 min por kb a amplificar en el caso de la polimerasa *Pwo*.
- 1 ciclo de extensión final a 72°C durante 5 min.

4.8 PCR cuantitativa

A partir del cDNA extraído previamente, se llevan a cabo en placas multipocillo (Applied Biosystems) donde se añaden los siguientes componentes:

- 1 μ l de cDNA
- 1 μ l de Cebador sentido 10 μ M
- 1 μ l de Cebados antisentido 10 μ M
- 4 μ l de Polimerasa 5X *PyroTaq Evagreen qPCR Mix Plus (ROX)* (Cultek Molecular Bioline)
- Volumen final de 20 μ l con agua MilliQ estéril

Las reacciones se realizan en un termociclador 7500 *Fast Real-Time* (Applied Biosystems) con el siguiente programa:

- 1 ciclo de desnaturalización inicial a 95°C durante 3 min
- 40 ciclos:
 - 30 seg de desnaturalización a 95°C
 - 30 seg de hibridación de los cebadores a 55°C
 - Una extensión de 72°C durante 30 seg
- 1 ciclo de extensión final a 72°C durante 5 min
- Ciclo final de desnaturalización-renaturalización

La especificidad de la amplificación por PCR se comprobó mediante una curva de disociación (de 60°C a 95°C), además de que se calculó la eficiencia de la PCR y se seleccionó el estándar interno en función dicha eficiencia (Czechowski *et al.*, 2005). La abundancia relativa de mRNA fue calculada usando el método *comparative threshold cycle* (Pfaffl, 2001).

Tabla M.5: Cebadores empleados en las reacciones de PCR:

HsfA2-I	TCGTCAGCTCAATACTTATGGATTC
HsfA2-II	TTATTCGTCAGCTCAATACTTATATGGGTTTC
HsfA2-rev	CACATGACATCCCAGATCCTTGC
ACT8for	AGTGGTCGTACAACCGGTATTGT
ACT8rev	GAGGATAGATGTGGAAGTGAGAA

5 TÉCNICAS DE TRANSFERENCIA GÉNICA

5.1 Transformación de *E. coli*

5.1.1 Obtención de células competentes para transformación por choque térmico

Se añaden 400 μ l de un cultivo saturado de *E. coli* (cepa DH5 α) a 200 ml de medio SOB y se incuba a temperatura ambiente hasta alcanzar una absorbancia ($A_{\lambda=660}$) de 0,5-0,7. Se recogen las células por centrifugación en frío a 5000 rpm durante 5 minutos, y se resuspenden en 10 ml de TB (*Transformation Buffer*) frío (0,48% p/v Pipes, 16 mM CaCl₂, 170 mM KCl, 40 mM MnCl₂, ajustar a pH 6,7). Tras una incubación de 10 minutos en hielo, se realiza otra centrifugación en frío de 5 min a 5000 rpm. Finalmente, las células se resuspenden en 10 ml de TB frío y se agregan 750 μ l de dimetilsulfóxido (DMSO). Tras incubarlo de nuevo 10 minutos en hielo, se distribuyen las células en alícuotas de 100 μ l que se guardan a -80 °C.

5.1.2 Transformación por choque térmico

Se añade el plásmido, o mezcla de ligamiento, a una alícuota de células competentes y se coloca 30 minutos en hielo. Transcurrido ese tiempo se realiza un choque térmico de 1 minuto a 42°C, e inmediatamente se coloca en hielo durante 2 minutos. A continuación, se agregan 900 μ l de medio LB y se incuba 1 hora a 37°C en agitación. Finalmente, se extienden 150 μ l en una placa de LB con el antibiótico adecuado, según el plásmido empleado.

5.2 Transformación de *S. cerevisiae*

Para las transformaciones de levadura se utilizó un protocolo estándar de transformación con acetato de litio (Gietz *et al.*, 1995). Se obtuvo un cultivo de 100 ml de levadura crecido durante toda la noche a 28°C en agitación en medio YPD hasta una OD₆₆₀ óptima de entre 0,8-1. Se centrifugó a 3000 rpm durante 3 minutos y se lavó con agua estéril. El precipitado obtenido se resuspendió con 1 ml de acetato de litio 100 mM y se incubó durante 15 minutos a 30°C. Después se mezclaron 50 µl de estas células con entre 0,1 y 10 µg de plásmido y 5 µl de una solución de DNA sonicada de esperma de salmón (0,1%) en 500 µl de solución PLATE (40% PEG-4000, 100 mM Acetato de Litio, 10 mM Tris pH 7,5, EDTA 0,4 mM). La mezcla se incubó 30 minutos a 30°C y posteriormente se incubó a 42°C durante 10 minutos. Se recogieron las células por centrifugación (1 minuto, 13000 rpm). Finalmente las células se resuspendieron en agua estéril y se sembraron sobre placas de medio selectivo incubando éstas a 30°C hasta que se observaron colonias (aproximadamente a los dos días de incubación).

6 EXTRACCIÓN, ELECTROFORESIS Y TÉCNICAS DE DETECCIÓN DE PROTEÍNAS

6.1 Obtención de extractos proteicos

6.1.1 Método del hervido en tampón Laemmli

En el caso de levadura, para la obtención de extractos proteicos las células fueron cultivadas hasta fase logarítmica, y se recogieron 10 ml de cultivo por centrifugación (3000 rpm, 5 min). Se quita el sobrenadante y las células se resuspenden en 100 µl de tampón Laemmli 5X (3,8 % SDS, 20% β-Mercaptoetanol (se añade justo antes de la extracción), 0,15mM Tris-HCl pH 6,8, 15% Glicerol, 0,125 mg/ml Azul de bromofenol). A continuación las muestras se hierven durante 10 min (100°C), se centrifugan a máxima velocidad durante un minuto y se guardan a -20°C hasta el momento de su utilización.

En el caso de *A. thaliana*, las plántulas crecidas previamente en medio MS líquido se pesan y se congelan con nitrógeno líquido, se homogenizan en mortero y se pasan a un eppendorf. A continuación se añade por cada 100 mg de tejido vegetal 100 µl de tampón Laemmli 2X y se procede como en levadura. En el caso

de líneas celulares *HeLa*, las células son tratadas previamente con Las células fueron lavadas con medio PBS frío y liberadas de la placa con medio PBS. A continuación las proteínas se extraen con el siguiente tampón de lisis (50 mM Tris-HCl pH 7,4, 150 mM NaCl, 0,1% SDS, 1% NP40, 0,25% deoxicolato de sodio y una pastilla del cocktail de inhibidores de proteínas cOmplete Mini (Roche)). A continuación se cuantificaron por el método Bradford, se les añadió tampón Laemmli 5X y se procedió de manera similar a la levadura.

6.1.2 Método del NaOH

Cuando se precisa obtener una mayor eficiencia en la extracción de proteínas de levadura, se utiliza el siguiente protocolo (von der Haar, 2007). Se recogen 10 ml de cultivo de levadura en fase exponencial por centrifugación (3000 rpm, 5 min). Se quita el sobrenadante y las células se resuspenden en 100 μ l de tampón de lisis (0,1 M NaOH, 0,05 M EDTA, 2% SDS, 2% β -Mercaptoetanol) y se incuban durante 10 min a 90°C. A continuación se añaden 2,5 μ l de ácido acético 4 M, se mezcla bien y se vuelven a incubar 10 min a 90°C. Finalmente se añaden 25 μ l de tampón de carga (0,25 M Tris-HCl pH 6,8, 50% Glicerol, 0,05% Azul de bromofenol), se centrifugan a máxima velocidad durante un minuto y se guardan a -20°C hasta el momento de su utilización.

6.1.3 Extracción de proteínas para el análisis por electroforesis bidimensional (2D)

En el caso de *A. thaliana*, las plántulas crecidas previamente en medio MS líquido se pesan y se congelan con nitrógeno líquido, se homogenizan en mortero y se pasan a un eppendorf. A continuación se añaden 200 μ l de tampón de extracción (100 mM TRIS pH 8,8, 5 mM EDTA, 20 mM DTT, 30% Sacarosa y una pastilla del cocktail de inhibidores de proteínas cOmplete Mini (Roche)), por cada 100 mg de material vegetal, se mezcla vigorosamente y se deja reposar a 4°C durante 10 min. A continuación las muestras se centrifugan (15000 rpm, 15 min, 4°C) y se recupera el sobrenadante y las proteínas se precipitaron con la adición de 1 ml de TCA/Acetona al 10% y una incubación a -20°C durante toda la noche. A continuación las muestras se centrifugan de nuevo (15000 rpm, 15 min, 4°C) y se recuper el precipitado. Finalmente el precipitado se somete a 5 lavados con acetona, tras lo cual se secaron brevemente con el *SpeedVac* y se guardaron a -20°C.

6.2 *Electroforesis y técnicas de detección de proteínas*

6.2.1 *Electroforesis de proteínas*

La separación de proteínas mediante electroforesis se llevó a cabo en condiciones desnaturalizantes en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) utilizando el sistema MiniProtean 3 (BioRad). Estos geles constan de una zona superior de empaquetamiento (3% acrilamida:bisacrilamida 30:0,8, 0,1% SDS, 125 mM Tris-HCl pH 6,8, 1% APS, 0,1% TEMED) y una zona inferior de separación (6% acrilamida:bisacrilamida 30:0,8, 8% SDS, 325 mM Tris-HCl pH 6,8, 1% APS, 0,1% TEMED), la concentración de acrilamida en la zona de separación se ajusta (entre el 6 y el 12%) en función del tamaño de las proteínas de interés. Una vez cargadas las proteínas en el gel, éste se sumerge en tampón de electroforesis (0,19 M Glicina, 0,1% SDS, pH 8,3 ajustado con Tris Base). Mientras la muestra recorre la primera fase de los geles (empaquetamiento) se somete a una corriente eléctrica de 75 V mientras que una vez el frente alcanza la fase de separación se incrementa la corriente a 120 V.

6.2.2 *Electroforesis de proteínas en dos dimensiones*

El precipitado obtenido en la extracción con TCA/Acetona se resuspendió en tampón de rehidratación (7 M Urea, 4% (p/v) CHAPS, 1% (v/v) tampón de inmovilización gradiente de pH 3-11 (GE Healthcare), 40 mM DTT y 0,002% (p/v) azul de bromofenol y una pastilla del cocktail de inhibidores de proteínas cOmplete Mini (Roche) por cada 10 ml de tampón). 150 µg de proteína solubilizada en el anterior tampón fueron cargados para la rehidratación pasiva de las tiras de electroenfoco de 7 cm con pH 3-11 (durante al menos 12h). Tras la hidratación se procedió al isoelectroenfoco a 12k Vh. Una vez las proteínas fueron separadas por su punto isoeléctrico, las tiras fueron equilibradas con tampón de equilibrio (6 M urea, 75 mM Tris-HCl pH 8,8, 30% Glicerol, 2% SDS, 0,002% de azul de bromofenol y DTT 64 mM) durante 15 min. A continuación se incubó con el mismo tampón suplementado con iodoacetamida 18,4 mM durante otros 15 min. Finalmente las tiras fueron procesadas mediante un gel de electroforesis normal (apartado anterior).

6.2.3 Tinción de proteínas con Azul de Coomassie

Las membranas de proteínas se incuban durante al menos media hora en la solución de tinción (2,5 g Azul Brillante Coomassie R-250, 450 ml metanol, 100 ml ácido acético glacial en un volumen de 1 L con agua destilada). Cuando las bandas aparecen sobre el gel, se puede eliminar el fondo azul usando realizando lavados con la solución de desteñido (200 ml metanol, 150 ml ácido acético glacial, 650 ml agua destilada).

6.2.4 Transferencia a membrana

Una vez separadas por electroforesis, las proteínas se transfieren a una membrana de PVDF previamente activada con metanol. La transferencia se realiza utilizando el sistema MiniProtean 3 (BioRad) usando tampón de transferencia (5 g/l Tris base, 3,1 g/l Ácido Bórico) con un voltaje de 15 V durante toda la noche. De esta forma se optimiza la transferencia de proteínas de alto peso molecular

6.2.5 Inmunodetección de proteínas transferidas a membrana

Una vez las proteínas han sido transferidas a la membrana, ésta se sumerge durante una hora en agitación constante en solución de bloqueo (5% leche desnatada, 0,1% Tween 20, 150 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 7,6). A continuación se sustituye la solución de bloqueo usada con 10 ml de solución de bloqueo fresca a la que se le ha añadido el anticuerpo primario en la concentración adecuada (Tabla M.4) y se deja incubar en agitación durante 1 h a temperatura ambiente o durante toda la noche a 4°C, en función de la especificidad del anticuerpo empleado. Posteriormente se realizan tres lavados consecutivos de 10 min cada uno con solución de lavado (0,1% Tween 20, 150 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 7,6), tras los cuales se sustituye la solución de lavado usada por 10 ml de solución de lavado nueva a la que se le ha añadido la concentración correspondiente de anticuerpo secundario (Tabla M.4), dejándose incubar durante 1 h a temperatura ambiente y agitación constante. Finalmente, se realizan otros tres lavados consecutivos con solución de lavado.

La detección de la proteína de interés se realizó usando un sistema de quimioluminiscencia (*ECL prime Western Blotting Detection System*, Amersham Biosciences) según las especificaciones del fabricante. La señal quimioluminiscente se detectó mediante un sistema de adquisición de imágenes LAS-3000 (FUJI). Las imágenes así obtenidas fueron tratadas usando el *software*

Photoshop para la optimización de la intensidad y el contraste. En el caso de que se deseara la cuantificación relativa de las bandas obtenidas en la imagen se utilizó el *software* ImageJ.

6.3 *Cuantificación de proteína total*

6.3.1 *Método Bradford*

Éste es un método rápido y de sensibilidad media para cuantificar la cantidad de proteína presente en una muestra por colorimetría a $\lambda=595$ nm. La determinación de la concentración de proteína total en cada muestra se hizo por comparación de intensidad colorimétrica con una muestra conocida de seroalbúmina bovina (BSA) con la que se realizó una recta de calibrado. El reactivo utilizado capaz de cambiar de color en función de la concentración de proteína fue 5X BioRad Assay kit (BioRad) diluido 5 veces en agua. Se utilizaron 200 μ l de BioRad diluido y en cada pocillo de la placa multipocillo se cargaron cantidades crecientes y conocidas de BSA para obtener la recta de calibrado; igualmente se cargaron tres réplicas de diluciones de la muestra extraída y se llevaron a cabo los cálculos de regresión para determinar la concentración de nuestra muestra.

6.3.2 *Método ImageJ*

En aquellas muestras cuyo proceso de extracción no es compatible con el método Bradford de cuantificación de proteínas, para la cuantificación relativa de proteína total se cargan las muestras en un gel SDS-PAGE. Una vez resuelto el gel se tiñe con coomasie, se escanea y se analiza la intensidad de la señal de las proteínas con el *software* ImageJ. Dicho *software* permite una cuantificación relativa de la cantidad de proteína presente y permite equilibrar las cantidades de proteína en cada carril.

7 ENSAYO DE UBICUITILACIÓN *IN VITRO*

7.1 *Expresión de proteínas recombinantes en E. coli*

7.1.1 *Expresión y purificación de proteínas con cola de histidinas*

A partir de un cultivo saturado, se inoculan 20 ml de medio LB suplementado con el antibiótico de selección adecuado (dilución 1/50) y se incuba a 37°C durante 3h (OD = 0,6 – 0,8). A continuación se induce la expresión de la proteína deseada con la adición de IPTG a un volumen final de 1 mM, y tras 3h de incubación adicional a 37°C se detiene la inducción con frío. Las bacterias se centrifugan (10-15 min, 4000 rpm) y son lavadas con 2 ml de tampón de sonicación/equilibrado (S/E) (10% glicerol, 50 mM Tris-HCl pH 7,6, 250 mM KCl, 0,1% Tween 20). Tras una nueva centrifugación (10-15 min, 4000 rpm) se quita el sobrenadante y los pellets se pueden guardar a -80°C.

Antes de la purificación, en primer lugar se cargan 0,5 ml de resina de Ni-NTA (Novagen) en una columna de gravedad (BioRad), se deja que el exceso de etanol salga y se lava la resina con agua MilliQ estéril. A continuación se equilibra la columna con 10 ml de tampón S/E y ya está lista para ser utilizada.

Para extraer la proteína, los pellets congelados se resuspenden en 2 ml de tampón S/E suplementado con 10 mM de β -mercaptoetanol y las células se rompen mediante cuatro pulsos de sonicación (amplitud = 100, ciclo = 0,8) de 45 seg, con pausas de 4 min en hielo entre ellos. Una vez sonicadas, la muestras se pasan a tubos eppendorf de 2 ml y se centrifugan a 4°C (15 min, 13000 rpm), a continuación se diluyen el sobrenadante con 4 ml de tampón S/E con β -mercaptoetanol y se carga en la columna. Una vez todo el líquido se ha eluido la columna se lava con 10 ml de tampón de lavado (20% glicerol, 250 mM KCl, 50 mM Tris-HCl pH 7,6, 30 mM imidazol, 0,1% Tween 20 y 10 mM β -mercaptoetanol). Finalmente la proteína se eluye utilizando 5 alícuotas de 200 μ l de tampón de elución (20% glicerol, 250 mM KCl, 50 mM Tris-HCl pH 7,6, 250 mM imidazol, 0,1% Tween 20 y 10 mM β -mercaptoetanol), normalmente la mayor cantidad de proteína se obtiene con las 3 últimas eluciones, éstas se cuantifican y se reparten en dosis de 50 μ l y se guardan a -80°C.

7.1.2 *Expresión y purificación de proteínas fusionadas a la Maltose Binding Protein (MBP)*

A partir de un cultivo saturado, se inoculan 20 ml de medio LB suplementado con el antibiótico de selección adecuado (dilución 1/50) y se incuba

a 37°C durante 3h (OD = 0,6 – 0,8). A continuación se induce la expresión de la proteína deseada con la adición de IPTG a un volumen final de 1 mM, y tras 3h de incubación adicional a 37°C se detiene la inducción con frío. Las bacterias se centrifugan (10-15 min, 4000 rpm) y son lavadas con 2 ml de tampón MBP (20 mM Tris-HCl pH 7,4, 200 mM NaCl, 1 mM EDTA). Tras una nueva centrifugación (10-15 min, 4000 rpm) se quita el sobrenadante y los pellets se pueden guardar a -80°C.

Antes de la purificación, en primer lugar se carga 1 ml de resina de amilosa (Novagen) en una columna de gravedad (BioRad), se deja que el exceso de etanol salga. A continuación se equilibra la columna con 10 ml de tampón MBP y ya está lista para ser utilizada.

Para extraer la proteína, los pellets congelados se resuspenden en 2 ml de tampón MBP Lisis (tampón MBP con 10 mM β -mercaptoetanol y 0,25% Tween 20) y las células se rompen mediante cuatro pulsos de sonicación (amplitud = 100, ciclo = 0,8) de 45 seg, con pausas de 4 min en hielo entre ellos. Una vez sonicadas, la muestras se pasan a tubos eppendorf de 2 ml y se centrifugan a 4°C (15 min, 13000 rpm), a continuación se diluyen el sobrenadante con 8 ml de tampón MBP con 10 mM β -mercaptoetanol y se carga en la columna. Una vez todo el líquido se ha eluido la columna se lava con 10 ml de tampón MBP con 10 mM β -mercaptoetanol. Finalmente la proteína se eluye utilizando 5 alícuotas de 200 μ l de tampón de elución (tampón MBP con 10 mM β -mercaptoetanol y 10 mM maltosa), normalmente la mayor cantidad de proteína se obtiene con las 3 últimas eluciones, éstas se cuantifican y se reparten en dosis de 50 μ l y se guardan a -80°C.

7.2 Ensayo de ubicuitilación

El ensayo de ubicuitilación *in vitro* se realizó tal y como se describe en Stone *et al.* (2006) y Guerra *et al.* (2012). La reacciones se realizan en 30 μ l de tampón de ubicuitilación (50 mM Tris-HCl pH 7,5, 10mM MgCl₂, 0,05 mM ZnCl₂, 1mM ATP, 0.5 μ l Energy Regenerating Solution (Enzo Life Sciences), 0.2mM dithiothreitol) al cual se le añaden 50 ng de E1 humana comercial (BostonBiochem), 250 ng de 6xHis-AtUBC8 (E2) purificada, 500 ng de GST-XBAT32 (E3) purificada y 0,5 μ g de ubicuitina biotinilada (Enzo Life Sciences). Las reacciones se incuban durante 1 h a 30°C, tras lo cual se añaden 6 μ l de tampón Laemmli 5X para detener la reacción. A continuación se incuban durante 10 min a 100°C y se cargan en un gel SDS-PAGE al 6% acrilamida. Una vez transferidas a

membrana, las proteínas poliubicultiladas se detectan usando estreptavidina unida a enzima peroxidasa (Milipore).

8 ENSAYO DE TOMA DE LEUCINA

Cultivos de la cepa BY4741 crecidos durante toda la noche ($OD_{600} \approx 4-5$) en medio YPD se recogieron, fueron lavados con agua y resuspendidos (20-25 mg/ml) en medio de toma (2% Glucosa, 10 mM KCl y 50 mM Ácido succínico tamponado a pH 4 con Tris base) suplementado con o sin NE. Las células se incubaron durante 6 min a 30°C tras lo cual se añadió 20 μ M (25 Ci/mol) de L-[α - 14 C]leucina (GE Healthcare). Se tomaron muestras de 0,1 ml a los 15, 30, 45, 60, 120 y 180 segundos de incubación a 30°C. Dichas muestras se diluyeron rápidamente en 10 ml de agua fría. Para recuperar las células, las muestras se filtraron con filtros de fibra de vidrio (Whatman GF/C) y fueron posteriormente lavados con 10 ml de agua fría. Una vez secos, los filtros se sumergieron en líquido de centelleo (Ready Safe, Beckman) y la radioactividad se midió con un contador de centelleo (Beckman LS 9000). Se utilizaron controles para medir la radioactividad presente sin células, y se observó que ésta era menor del 10% de los valores de transporte.

9 ENSAYO DE INHIBICIÓN DE SÍNTESIS DE PROTEÍNAS *IN VITRO*

Para el ensayo de inhibición de síntesis de proteínas *in vitro* se usó el *kit wheat germ extract* (Promega) y se procedió según las indicaciones del fabricante. Brevemente, para cada reacción se utilizaron: 25 μ l de extracto de germen de trigo, 4 μ l de mix de aminoácidos menos leucina, 10 μ l de RNA control (mRNA de la luciferasa), 1 μ l de inhibidor de la RNAsa (40 u/ μ l), 5 μ l L-[α - 14 C]leucina (300 mCi/mol) más la cantidad deseada de NE en un volumen final de 50 μ l. La reacción se incubó durante 2h a 25°C. Una vez completada, se cogieron 2 μ l de reacción, se diluyeron en 98 μ l de NaOH 1 M y se incubaron a 37°C durante 1h. A continuación se añadieron 900 μ l de agua fría (que tenía 25% TCA y 2% aminoácidos) y se incubó 30 minutos en hielo para precipitar el producto de la traducción. Posteriormente se recuperaron las proteínas traducidas con un filtro de fibra de vidrio GF/C (Whatman), dicho filtro se lavó con 3 ml de agua fría (5% TCA) y con acetona. Una vez secos, los filtros se sumergieron en líquido de centelleo (Ready

Safe, Beckman) y la radioactividad se midió con un contador de centelleo (Beckman LS 9000).

10 CUANTIFICACIÓN DE LA ACTIVIDAD β -GALACTOSIDASA

Se partió de 5 ml de cultivo en fase exponencial de la cepa BY4741 transformada con el plásmido GCN4utr- β Gal crecido en YPD. Tras los tratamientos adecuados, 3 mg de peso fresco de las muestras se centrifugaron y resuspendieron en 100 μ l de GTED20 (20% glicerol, 100 mM Tris pH 7,5, 1 mM DTT, 1 mM EDTA). A continuación se añadió 6 μ l de TET (1 Tolueno: 4 Etanol absoluto (volumen:volumen), 10% Triton X-100) y se agitó con vórtex durante 3 min para la permeabilización de las células. Seguidamente se valoró la actividad β -galactosidasa. Para ello se añadió en un ependorf 10 μ l de células permeabilizadas, 190 μ l de tampón Z (0,1 M fosfato sódico pH 7, 10 mM ClK, 1mM SO₄Mg y 50 mM β -mercaptoetanol) y 40 μ l ONPG (4 mg/ml O-nitrofenil- β -galactosido en tampón fosfato sódico 0,1 M pH 7). La reacción se dejó incubar durante 40 min y se detuvo con la adición de 100 μ l de Na₂CO₃ 1 M. Finalmente la absorbancia se midió a 405 nm con un lector Multiscan FC (Thermo Scientific). Las muestras se midieron por duplicado.

11 TÉCNICAS DE MICROSCOPIA

11.1 *Técnicas de microscopía confocal*

El tejido vegetal y las células de levadura se observaron utilizando un microscopio confocal Leica TCS SL (Leica) usando un objetivo sumergible HCX PL APO x40/1,25-0,75. La detección de la señal GFP se realizó mediante su excitación por un láser de Argón (488 nm) y la emisión se visualizó mediante un paso de luz de 30 nm de ancho centrado en 515 nm. Cuando se usó la proteína Tdtomato la excitación se realizó con un láser de neón verde (543 nm) y la emisión de fluorescencia se recogió en 620 nm. Las imágenes fueron procesadas con el *software* Leica Confocal o con el *software* ZEN (Zeiss).

11.2 Técnicas de microscopía de fluorescencia

Para la observación de la señal fluorescente en levadura se utilizó un microscopio óptico (Nikon Eclipse E600) con cámara digital refrigerada DS-Ri 1 equipado con un sistema de epi-fluorescencia y un sistema de contraste diferencial (DIC) y campo oscuro. Brevemente, los cultivos se crecieron hasta fase logarítmica en el medio adecuado, se les realizó el tratamiento adecuado y finalmente se observaron al microscopio. Para la visualización de la señal CFP se usó el filtro B-2A (Nikon) y para visualizar la señal GFP se usó el filtro G-2A (Nikon). Las imágenes se procesaron usando el *software* NIS elements F (Nikon).

12 ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA EN *A. THALIANA* TRATADA CON NORESPERMIDINA MEDIANTE MICROMATRICES DE OLIGOS

12.1 Características de los microarrays empleados

En este trabajo se han empleado *microarrays* provenientes de la Universidad de Arizona: “*Arabidopsis Genome Oligo Set version 3.0*” (www.ag.arizona.edu/microarray). Cada *microarray* contiene 29.110 oligonucleótidos de 70 pares de bases, que representan 26.173 genes que codifican proteínas, 28.964 transcritos codificantes de proteínas y 87 microRNAs. El diseño de los *microarrays* se ha realizado en base a la información de la base de datos *TIGR Arabidopsis genome* (<http://www.tigr.org/tdb/e2k1/ath1/>) y al registro de microRNAs del *Sanger Institute* (<http://www.sanger.ac.uk/Software/Rfan/mirna/index.shtml>).

12.2 Preparación de las muestras

Plantas crecidas durante 5 días en medio MS sólido se transfieren a medio MS líquido y se dejan crecer durante 13 días más. Transcurrido ese tiempo se toman 4 muestras (en torno a 10 plantas cada una) y se les somete a un tratamiento de 24 horas con 3 mM de NE, mientras que otras 4 muestras se transfieren a medio MS sin NE y se mantienen durante 24 horas (muestras control). A continuación, se extrae RNA de estas muestras, y se realizan 4 réplicas biológicas enfrentando en cada *microarray* una muestra tratada con NE frente a una muestra control.

12.3 Preparación de la sonda de RNA para la hibridación

Tras la extracción y purificación del RNA (mediante el kit *RNeasy Minikit* de Quiagen), se lleva a cabo el marcaje del mismo con fluoróforos. Se emplea un método de marcaje indirecto, de modo que en primer lugar se obtiene el *aminoallyl-RNA* (aa-RNA), y a continuación se acoplan los fluoróforos. Para ello se emplea el kit *Amminoallyl MessageAmpTMII RNAA kit* de Ambion. Finalmente se fragmentará el RNA para favorecer su hibridación al *microarray*.

A) Amplificación del RNA y síntesis del aa-RNA:

En primer lugar se sintetiza cDNA de doble cadena a partir del RNA. Tras la purificación del cDNA (kit *DNA clear* de Ambion), se realiza una transcripción *in vitro* incorporando el nucleótido modificado *5-(3-aminoallyl)-UTP* (Ambion), obteniendo así el aa-RNA. Finalmente, se efectúa otra purificación empleando el kit *Megaclear* (Ambion).

B) Acoplamiento con los fluoróforos:

Una vez purificado el aa-RNA, se lleva a cabo la reacción de acoplamiento con los fluoróforos Cy3 y Cy5 (*N-hydroxyl succinimidyl dyes*) de GE Healthcare. En dos de las réplicas, se empleó el fluoróforo Cy3 para las muestras control y el Cy5 para las muestras tratadas. En las otras 2 réplicas se marcaron de forma contraria, para eliminar la variabilidad debida a la mayor o menor hibridación de los fluoróforos.

Para el marcaje, 7,5 µg de aa-RNA se disuelven en 10 µl de *coupling buffer*, y se mezcla con 18 µl del fluoróforo apropiado disuelto en DMSO. El acoplamiento se lleva a cabo durante 1 hora a temperatura ambiente y en oscuridad. A continuación, el aa-RNA acoplado al fluoróforo se purifica usando el kit *MegaClear* (Ambion). Finalmente, se mezclan 250 pmoles de cada aa-RNA (muestra tratada y control), marcados con diferentes fluoróforos, se secan en *speedvac* y se realiza la fragmentación.

C) Fragmentación del aRNA:

Para llevar a cabo la fragmentación, se emplea el kit *RNA fragmentation reagent* (Ambion). Concretamente, se añaden al aa-RNA, 20 µg de tRNA y 20 µg de poly(A), usando un tampón de fragmentación de RNA (Ambion) en un volumen

final de 5 μ l. La mezcla se incuba 15 minutos a 70°C, y transcurrido ese tiempo se detiene la reacción (*stop solution*) y la sonda está preparada para la hibridación.

12.4 Preparación de los microarrays para la hibridación

Previamente a su uso, los cristales deben ser rehidratados, empleando vapor de agua a 60°C durante 10 segundos, y secándose en un termobloque a 65°C durante 5 segundos. La hidratación de los cristales se realiza 3 veces consecutivas. Tras la hidratación, se fija el DNA exponiendo los cristales a 65mJ empleando un *UV cross-linker* (Stratagene).

A continuación, los cristales se lavan dos veces con una solución de 0,1 % SDS y 4 veces en agua. Cada lavado se realiza durante 2 minutos. Finalmente, se introduce el cristal en etanol absoluto durante 30 segundos, y se seca por centrifugación a 2.000 rpm durante 1 minuto a temperatura ambiente.

12.5 Prehibridación e hibridación de los microarrays

Los cristales se prehibridan 30-45 minutos a 42°C con 50 ml de solución de prehibridación (3X SSC (Sigma), 0,01% BSA (Sigma) y 0,1% SDS (Sigma)) en un tubo de 50 ml. Transcurrido ese tiempo, los cristales se lavan a temperatura ambiente, 2 veces en agua (lavados de 2 min cada uno) y una vez en propanol (30 segundos), y se secan por centrifugación a 2.000 rpm durante 1 minuto. Inmediatamente después se realiza la hibridación.

La hibridación se lleva a cabo en una cámara de hibridación de *microarrays* (*ArrayIt Hybridization Cassete*, TeleChem) y se tapa con una cubierta 60x22 mm *LifterSlip* (Erie Scientific).

Al aa-RNA ya fragmentado (sonda) se le añade la mezcla de hibridación, que contiene 50 μ l de formamida desionizada, 30 μ l de SSC20x, 5 μ l de solución *Denhardt's* y 5 μ l de SDS 10%. La mezcla de hibridación se desnaturaliza a 95 °C durante 5 minutos y se aplica al cristal. Los cristales se incuban a 37 °C durante 16 horas en la cámara de hibridación.

12.6 Lavado y escaneado de los microarrays

Finalizada la hibridación, los cristales se lavan del siguiente modo: el primer lavado se realiza con SSC 1x y SDS 0,1% a 30 °C (5 minutos), el segundo con SSC 0,2x y SDS 0,1% a 30 °C (5 minutos), el tercero y el cuarto con SSC 0,1x a 28 °C (2 minutos) y finalmente con SSC 0,01x durante 2 minutos a temperatura

ambiente. Los cristales se secan por centrifugación a 2.000 rpm durante 1 minuto a temperatura ambiente.

Los *microarrays* hibridados se escanean a 532 nm para el fluoróforo Cy3 y a 635 nm para el fluoróforo Cy5, usando el escáner Genepix 4000B (Axon Molecular Devices, Sunnyvale CA) a una resolución de 10 μm . Se ajusta manualmente la intensidad de señal para cada canal, con el propósito de incrementar la diferencia entre el fondo y la señal de cada punto, así como para reducir el número de puntos saturados

12.7 Preprocesamiento de los datos con el software Genepix

Mediante el programa GenePix 4.1 *microarray-analysis* (Axon Molecular Devices, Sunnyvale CA) se cuantifica la intensidad de cada punto, se realiza una primera normalización de los datos (basada en que el cociente rojo/verde sea igual a 1), y se analizan las imágenes. Tras este análisis, los puntos con manchas, saturados en ambos canales, o una intensidad en alguno de los dos canales menor al doble de la intensidad del fondo en ese canal, se eliminan.

12.8 Procesamiento de los datos con el software Accuity y análisis estadístico

Mediante el programa *Accuity*, se realiza una nueva normalización de los datos (método Lowess: *Locally Weighted Scatter plot Smoother*). Asimismo, se eliminan aquellos puntos (*spots*) que no estén representados al menos en 3 de las 4 réplicas, se invierte el cociente en las 2 réplicas cuyo marcaje se realizó con los fluoróforos invertidos, y se seleccionan los genes diferencialmente expresados. Como genes diferencialmente expresados se consideraron aquellos que al menos en 3 de los 4 *arrays* están más de 3 veces inducidos o más de 4 veces reprimidos.

El análisis estadístico se realiza con el test estadístico SAM ("*Significant Analysis of Microarrays*"), que permite determinar aquellos genes cuyo nivel de inducción o represión es estadísticamente significativo (considerando un error del 5%). Además, con el *software* Genesis, se realizó un análisis *k-means clustering* con un *p-value* < 0.05 para encontrar grupos de genes cuyo comportamiento en función del tiempo fuese similar. Finalmente, utilizando la página web <http://mips.helmholtz-muenchen.de/proj/funcatDB/> se realizaron los análisis funcionales de los listados de genes obtenidos de los *microarrays* agrupándolos según su categoría funcional del MIPS el *Munich Information Center for Protein Sequences* (Mewes et al., 2000).

RESULTADOS

1 ANÁLISIS DE LA RESPUESTA TRANSCRIPCIONAL EN PLANTAS TRATADAS CON NORESPERMIDINA

Este trabajo partió de un análisis de la respuesta transcripcional de plantas tratadas con 2,8 mM NE durante 3h, tal y como se ha comentado en la introducción. Sin embargo, se consideró de interés realizar un nuevo análisis transcriptómico usando la misma dosis pero aumentando el tratamiento a 24h. Aunque el experimento de hibridación de micromatrices con muestras de 3h de tratamiento fue realizado por el Dr. Santiago Alejandro, los resultados se muestran aquí junto al *microarray* con 24h de tratamiento (realizado durante la presente tesis) para mayor claridad. En el *microarray* de 3h se indujeron de manera significativa (por encima de 2 en logaritmo de base 2) 1866 genes, mientras que en el de 24h fueron 1196, de los cuales 465 están presentes en ambos *microarrays*. De igual modo durante el tratamiento de 3h se reprimieron de manera significativa (por encima de 2 en logaritmo en base 2) 2230 genes, mientras que en el de 24h 446 genes se encontraron reprimidos, de los cuales sólo 74 se encontraban reprimidos tanto a las 3h como a las 24h. En este primer resultado ya se puede comprobar que el efecto de la NE a corto (3h) y a largo plazo (24h) tiene un efecto muy distinto en la planta ya que hay muy pocos genes que estén inducidos o reprimidos en ambos tiempos. La validación de los *microarrays* se encuentra en el Anejo 3.

Con las listas de genes inducidos y reprimidos obtenidas con los *microarrays*, se realizó un análisis de categorías funcionales enriquecidas para estudiar de manera general la función de dichos genes. En este trabajo se usaron las categorías funcionales definidas por el *Munich Information Center for Protein Sequences* (MIPS) (Mewes *et al.*, 2000), ya que se consideró que estas proporcionaban más información que las del *Gene Ontology* (datos no mostrados). En la Tabla R.1 se pueden observar algunas de las categorías funcionales estadísticamente significativas en el *microarray* de 3h (el listado de todas las categorías funcionales significativas de ambos *microarrays* se encuentra en el Anejo 1). En ellas se puede observar una gran cantidad de genes inducidos que regulan e inducen la transcripción y la síntesis de RNA, así como de genes que interactúan y regulan el DNA (mayoritariamente factores de transcripción). Igualmente se puede observar que el tratamiento con NE induce la expresión de genes implicados en varias respuestas a estrés: choque térmico, estrés oxidativo, estrés osmótico y salino. Por lo tanto, en general el tratamiento con NE dispara una gran cantidad de factores de transcripción y además provoca una respuesta a

estrés en la planta muy fuerte. En cuanto a las categorías funcionales reprimidas tras 3h de tratamiento con NE, entre aquellas más interesantes se puede observar en general una represión de tanto el metabolismo de aminoácidos como del nitrógeno en general, lo cual sugiere una falta de nitrógeno en la planta. De igual modo se encuentran reprimidos procesos relacionados tanto con la respiración como la fotosíntesis.

Con el tratamiento de 24h, la respuesta transcripcional de inducción es bastante similar a nivel de categoría funcional al tratamiento con 3h. En la Tabla R.2, en la que se muestran las categorías más interesantes, se puede observar una respuesta a estrés osmótico, salino, choque térmico y oxidativo; también se pueden observar una gran cantidad de genes que regulan y modifican el DNA, así como el transporte de cationes. No obstante, hay muchos más genes inducidos referidos a la traducción y síntesis de mRNA a las 24h que a las 3h. Respecto a genes reprimidos, debido a la relativa poca cantidad de genes significativos encontrados (446), solamente se encontró una categoría funcional significativa: genes relacionados con la fotosíntesis, categoría que también se reprimía tras 3h de tratamiento. A continuación se quiso analizar aquellos genes que se encontraban inducidos o reprimidos en ambos tratamientos. Tal y como se aprecia en la Tabla R.3, entre los 465 genes inducidos en ambos tratamientos se pueden observar genes relacionados con el estrés oxidativo y choque térmico, genes relacionados con la transcripción, con el metabolismo de toxinas o drogas, así como de envejecimiento celular, entre otros (el listado completo de categorías inducidas se encuentra en el Anejo 1). De este modo se puede observar que el tratamiento con NE tanto a largo como a corto plazo dispara una respuesta muy fuerte a varios estreses, además induce la síntesis de gran cantidad de genes relacionados con la traducción y la modificación del DNA. En cuanto a los genes comunes reprimidos (74), debido a su poca cantidad no se observó ninguna categoría funcional significativa.

Tabla R.1: Categorías funcionales destacadas estadísticamente significativas en el tratamiento de 3h.

Categorías inducidas		
Código	Categoría MIPS	<i>p-value</i>
01.20.38	metabolismo de toxinas/drogas	1.48E-05
10.01.09	restricción o modificación del DNA	4.76E-06
10.01.09.05	modificación conformacional del DNA	1.41E-06
11	TRANSCRIPCIÓN	0.00828
11.02.03	mRNA síntesis	0.000283
11.02.03.04	control transcripcional	0.000197
32.01.01	respuesta al estrés oxidativo	0.000326
32.01.03	respuesta al estrés osmótico y salino	1.38E-09
32.01.05	respuesta a choque térmico	7.14E-11
32.07.07	desintoxicación de ROS	0.00118
36.20.18	regulación hormonal	1.17E-07
36.25.16	respuesta inmune	0.000197
40.2	envejecimiento celular	0.0037
Categorías reprimidas		
Código	Categoría MIPS	<i>p-value</i>
1	METABOLISMO	4.77E-25
1.01	metabolismo de aminoácidos	1.45E-14
01.02.02	metabolismo del nitrógeno	5.87E-05
2	ENERGIA	9.67E-07
2.01	glicolisis y gluconeogenesis	0.00968

		<u>Resultados</u>
2.19	metabolismo de reservas energéticas	0.00108
10.01.05	recombinación y reparación del DNA	0.0011
11.04	procesamiento del RNA	0.00798
11.04.01	procesamiento del rRNA	0.00584
20.01.01	transporte de iones	0.00966
20.01.01.07	transporte de aniones	0.00584
70.16	mitocondria	0.00122
70.26.03	cloroplasto	8.19E-19

Tabla R.2: Categorías funcionales destacadas estadísticamente significativas en el tratamiento de 24h.

Categorías inducidas		
Código	Categoría MIPS	<i>p-value</i>
1	METABOLISMO	0.000104
1.04	metabolismo del fosfato	7.95E-07
01.20.38	metabolismo de toxinas/drogas	7.47E-05
10.01	procesamiento del DNA	4.48E-06
10.01.09	restricción o modificación del DNA	1.33E-09
10.01.09.05	modificación conformacional del DNA	3.67E-10
11	TRANSCRIPCIÓN	9.03E-11
11.02	síntesis de RNA	6.74E-13
11.02.03	síntesis de mRNA	8.03E-14
11.02.03.04	control transcripcional	2.78E-14
14.07.03	modificación por fosforilación	1.40E-06

Resultados

16.03.01	unión al DNA	2.00E-05
20.01.01.01	transporte de cationes	0.00179
32.01.01	respuesta al estrés oxidativo	0.00281
32.01.03	respuesta al estrés osmótico y salino	0.000776
32.01.05	respuesta a choque térmico	0.00197
32.01.11	respuesta a ayuno de nutrientes	0.000532
36.20.18	regulación hormonal	2.45E-09
42.10.03	organización de la estructura cromosomal	1.33E-09

Categorías reprimidas

Código	Categoría MIPS	<i>p-value</i>
2.3	fotosíntesis	8.39E-05

Tabla R.3: Categorías funcionales inducidas en ambos tratamientos (3 y 24h).

Categorías inducidas en ambos tiempos		
Código	Categoría MIPS	<i>p-value</i>
01.20.38	metabolismo de toxinas/drogas	0.000263
10.01	procesamiento del DNA	5.56E-06
11	TRANSCRIPCIÓN	1.28E-08
11.02	síntesis de RNA	6.07E-11
11.02.03	síntesis de mRNA	2.09E-12
11.02.03.04	control transcripcional	1.35E-12
32.01.01	respuesta al estrés oxidativo	0.00536
32.01.05	respuesta a choque térmico	0.000254
32.07	desintoxicación	0.00536
36.20.18	regulación hormonal	2.00E-05
36.25.16	respuesta inmune	2.94E-05
40.2	envejecimiento celular	0.00774
42.10.03	organización de la estructura cromosomal	1.86E-08

Debido a que se poseía información sobre la respuesta de la planta a la NE en dos tiempos distintos, otra forma de analizar los datos es agrupar los genes que tengan un comportamiento parecido a lo largo del tiempo en clústeres (grupos). Por ejemplo, aquellos genes que no están inducidos a las 3h pero que se encuentran inducidos con un nivel similar a las 24h formarían parte de un clúster. Para realizar este análisis se agrupó la información de ambos *microarrays* en un único archivo que se analizó mediante el *software* Genesis. Dicho *software* es capaz de identificar grupos de genes cuyo comportamiento sea similar de manera significativa mediante un análisis *k-means clustering*. De este modo se pudieron identificar 25 clústeres compuestos por un número de genes, que osciló entre 62 y 1267. A continuación se hizo un análisis de categorías funcionales de cada

clúster, de este modo se identificaron grupos de genes que tienen una función relacionada y cuya evolución a lo largo del tiempo es similar. En la Figura R.1 se muestran aquellos clústeres que contienen información relevante, el análisis completo de todos los clústeres se encuentra en el Anejo 2. En primer lugar se encontraron dos clústeres de 105 y 168 genes respectivamente relacionados con la biosíntesis de ribosomas y la traducción (clúster 4 y 10). Dichos genes tienen unos niveles de inducción bastante altos tras 3h de tratamiento y a las 24h la inducción de dichos genes se modera (clúster 4) o bien se reprime (clúster 10). Esto sugiere que en general la síntesis de proteínas es mayor a las 3h que a las 24h de tratamiento. Además, dentro del clúster 10 también se observan una serie de genes relacionados con la ubicuilitación y degradación de proteínas. Esto es interesante ya que el clúster 20 está formado casi exclusivamente por este tipo de genes y también se observa que estos genes pasan de estar estables a las 3h a estar reprimidos tras 24h, por lo tanto parece que el sistema de degradación de proteínas vía ubicuilitación se está reprimiendo tras 24h de tratamiento. Por otro lado, otro clúster interesante es el 21, compuesto por 206 genes relacionados con el metabolismo de aminoácidos, que pasan de estar ligeramente inducidos a las 3h a aumentar su inducción a las 24h. Lo cual sugiere que a las 24h horas de tratamiento la planta presenta carencia de nitrógeno y/o aminoácidos. Además hay una serie de clústeres relacionados con la fotosíntesis (clúster 16 en la Figura, clústeres 7, 9, 13, 15 y 16 en los anejos), cuya inducción se reduce de las 3h a las 24h, lo cual sugiere una parada de la fotosíntesis en general. Finalmente hay varios clústeres relacionados con la respuesta a estrés: el 17 (mostrado en la Figura) y el 18 (en el Anejo), en los que se encuentran genes relacionados con la respuesta a estrés, principalmente frente a choque térmico, y en los que se aprecia que éstos se van induciendo conforme aumenta el tiempo de tratamiento con NE, lo cual sugiere que conforme pasa el tiempo la NE provoca una reacción frente al estrés más acusada.

A modo de resumen, se puede observar que el tratamiento a corto plazo con NE induce una gran cantidad de genes relacionados con la síntesis de proteínas y de factores de transcripción, a la vez que induce una respuesta frente a varios tipos de estreses y reprime de manera moderada los procesos relacionados con respiración y fotosíntesis. Con un tratamiento a largo plazo, la NE reduce o reprime la inducción de genes relacionados con la síntesis de proteínas y de factores de transcripción inducidos a corto plazo, a la vez que

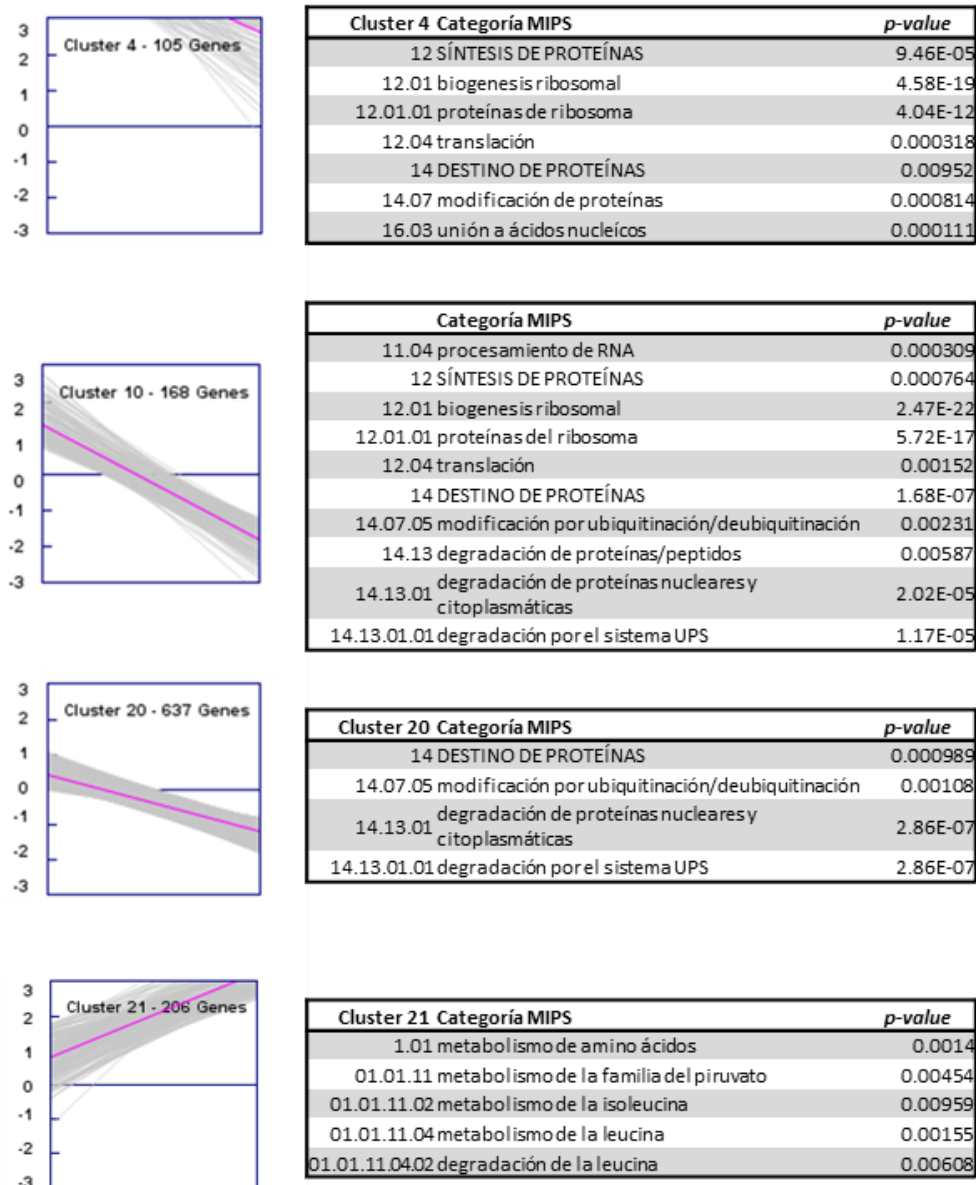
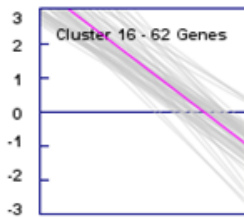
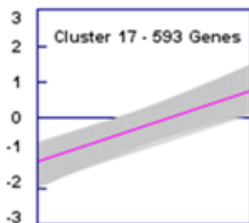


Figura R.1: Clusters seleccionados del análisis de la respuesta transcripcional a la NE en función del tiempo. Los datos de ambos *microarrays* fueron tratados con el *software* Genesis, el cual identificó 25 grupos de genes que se comportaban de manera similar en función del tiempo. A continuación el listado de genes de los clústeres se sometió a un análisis de categorías funcionales.



Cluster 16 Categoría MIPS	<i>p-value</i>
70.26.03 cloroplastos	5.62E-12



Cluster 17 Categoría MIPS	<i>p-value</i>
01.20.38 metabolismo de drogas/toxinas	0.00372
10.01.09 restricción o modificación del DNA	0.000166
11 TRANSCRIPCIÓN	0.000166
11.02 síntesis de RNA	6.74E-05
11.02.03 síntesis de mRNA	2.41E-05
11.02.03.04 control transcripcional	2.07E-05
16.03.01 union al DNA	2.13E-06
32.01.01 respuesta a estrés oxidativo	0.000099
32.01.03 respuesta a estrés osmótico y salino	0.000611
32.01.05 respuesta a choque térmico	7.23E-12
34.11.03 percepción y respuesta de químicos	0.000194

Figura R.1 (continuación): Clusters seleccionados del análisis de la respuesta transcripcional a la NE en función del tiempo.

reprime también genes relacionados con la degradación de proteínas y aumenta la represión de los genes relacionados con la fotosíntesis. Además el tratamiento a largo plazo induce genes relacionados con ayuno de nitrógeno y/o aminoácidos a la vez que induce aún más las respuestas a estrés observadas en el tratamiento a corto plazo.

2 IDENTIFICACIÓN DE LAS DIANAS DE TOXICIDAD DE LA NORESPERMIDINA EN *A. THALIANA*

2.1 Efecto de la NE en los mutantes PAO

Basándose en los datos de los *microrrays* del apartado anterior, se decidió intentar obtener más información sobre la toxicidad de la NE en plantas, ya que se pensó que ello permitiría identificar nuevos mecanismos para la tolerancia a estreses abióticos, tales como el estrés iónico o el estrés oxidativo. En primer lugar, se observó que un gran número de genes relacionados con la respuesta al estrés oxidativo eran inducidos en respuesta a la NE, lo cual sugería que la NE

podría estar causando especies reactivas de oxígeno (ROS, *Reactive Oxygen Species*). Tal y como se ha comentado en la Introducción, en el catabolismo de PAs en plantas intervienen una serie de enzimas llamadas Poliamina oxidasas (PAOs) que catabolizan las PAs en otras PAs más pequeñas dando como subproducto H_2O_2 . Debido a esto, se decidió estudiar la respuesta a la NE de mutantes de sobreexpresión y de pérdida de función de dos PAOs capaces de catabolizar la espermidina (SPD) en plantas: PAO1 (Tavladoraki *et al.*, 2006) y PAO3 (Moschou *et al.*, 2008), ya que se pensó que el catabolismo de la NE podría ser la fuente de las ROS, y por ende de la toxicidad de la NE.

Tal y como se muestra en la Figura R.2, ambos mutantes de sobreexpresión son tolerantes a la NE, siendo la sobreexpresión de PAO3 la que mayor tolerancia da. Sin embargo, en los mutantes de pérdida de función no se observan diferencias significativas comparados con el control silvestre, si bien debido a la redundancia de estas enzimas es posible que para observar un fenotipo de sensibilidad se requiera un mutante de pérdida de función doble. Estos resultados demuestran que la NE, pese a ser una poliamina que no es sintetizada por *A. thaliana*, sí que debería ser degradada por el catabolismo de PAs, de hecho esto fue confirmado más tarde por Moschou y Roubelakis-Angelakis (comunicación personal). Además, también demuestran que la degradación de la NE por las enzimas PAO y la consiguiente generación de H_2O_2 no es la principal causa de toxicidad de la NE ya que de ser así las plantas sobreexpresoras no serían tolerantes.

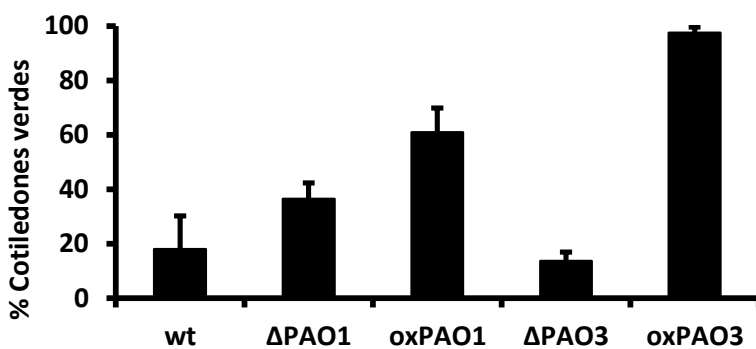


Figura R.2: Los mutantes de sobreexpresión de enzimas PAO son tolerantes a la NE. Porcentaje de cotiledones verdes tras 6 días de crecimiento en medio MS suplementado con 2,6 mM de NE. Cada columna representa la media y la desviación estándar de 3 repeticiones biológicas.

2.2 Estudio de la expresión de las isoformas de *hsfa2* en respuesta a la NE

Puesto que la generación de H₂O₂ debida a la degradación de la NE por las enzimas PAO no es la principal fuente de toxicidad de esta sustancia, se observó que en la respuesta de la planta a la NE había una inducción de genes relacionados con la síntesis de proteínas y con la respuesta a choque térmico, a la vez que se reprimían genes relacionados con la degradación de proteínas. Todo esto sugería que el tratamiento con NE podría tener algún efecto a nivel de la homeostasis de proteínas. Por otro lado, tal y como se ha comentado en la Introducción, las PAs, debido a su naturaleza policitiónica en condiciones fisiológicas, pueden interactuar con sustancias con carga negativa en el interior celular, tales como DNA, RNA o proteínas cuya carga neta sea negativa. Debido a ello, se pensó que la NE podría estar interactuando o bien con proteínas cuya carga neta sea negativa, dando lugar a una desnaturalización de ellas; o bien interactuando con el RNA ribosomal, provocando errores en la traducción que darían como resultado proteínas mal plegadas. Ambas hipótesis explicarían esta respuesta de la planta a la NE.

Entre aquellos genes de respuesta a choque térmico inducidos, se encuentra el *heat shock factor A2* (HSFA2). Este factor transcripcional se induce en respuesta a procesos de desnaturalización de proteínas (Schramm *et al.*, 2006) regulando la transcripción de distintas *Heat shock proteins* (HSP). Además, hace algunos años se describieron dos isoformas posibles de este factor transcripcional: la isoforma I (HSFA2-I), que es una forma activa de la proteína que se induce por choque térmico; y la isoforma II (HSFA2-II), que es una isoforma no activa inducida por una categoría específica de respuesta a choque térmico conocida como *cytosolic protein response* (CPR) (Sugio *et al.*, 2009). Este tipo de respuesta es comúnmente inducida por sustancias que afectan a la integridad de las proteínas que son sintetizadas *de novo*, tales como el AZC (L-azetidine-2-carboxylic acid) que es un análogo de la prolina, es decir que la CPR se induce como respuesta especializada a errores en la correcta síntesis de las proteínas por la maquinaria ribosomal.

Debido a esto, para averiguar el efecto que podía tener la NE a nivel de desnaturalización de proteínas, se quiso estudiar cuál de las dos isoformas de HSFA2 era inducida por el tratamiento con NE. En la Figura R.3 se observan los resultados de una RT-PCR en la que se analiza la expresión de las dos isoformas de HSFA2 provenientes de muestras sometidas a distintos tratamientos. Tal y como se había descrito, un tratamiento por choque térmico que provoca una desnaturalización general del proteoma induce la isoforma I, mientras que un

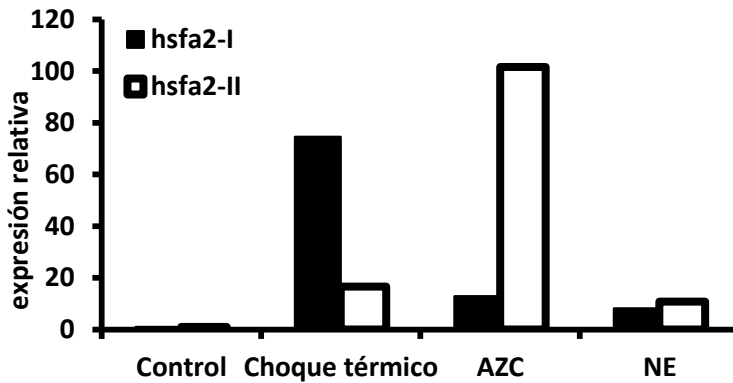


Figura R.3: La NE induce ambas isoformas de HSFA2. RT-PCR en la que se analiza la expresión relativa de las dos isoformas de HSFA2 bajo tratamiento por choque térmico (37°C, 3h), AZC (10 mM, 3h) y NE (3 mM, 3h) respecto a condiciones control.

tratamiento con el análogo de la prolina AZC, que provoca proteínas mal plegadas *de novo*, induce la isoforma II. Sin embargo, se puede observar que el tratamiento con NE induce ambas isoformas a la vez, si bien los niveles de inducción son mucho más modestos que con los otros dos tratamientos: el tratamiento por choque térmico induce la isoforma I unas 75 veces comparado con el tratamiento control, el tratamiento con AZC induce la isoforma II unas 100 veces respecto al tratamiento control, mientras que el tratamiento con NE induce ambas isoformas unas 10 veces comparado con el tratamiento control.

Estos resultados demuestran que la respuesta de la planta a la NE es distinta que una respuesta *Heat Shock* o una respuesta CPR, al menos desde el punto de vista de hsf2. Además, la inducción de hsf2 por la NE es más moderada comparada con las otras dos. Todo esto parece indicar que si bien la NE parece estar afectando de algún modo al proteoma, no parece estar actuando provocando errores en la síntesis de proteínas ni desestabilizando de forma masiva el proteoma.

2.3 Interacción de la NE con la droga geldanamicina

Puesto que en el análisis transcripcional de plantas tratadas con NE se observaba una fuerte inducción de genes de respuesta a choque térmico, se quiso probar si una inducción química de la respuesta a choque térmico conferiría tolerancia a esta poliamina. Para ello se utilizó la droga geldanamicina (GDM), que inhibe la acción de HSP90, disparando de este modo la respuesta a choque térmico (Yamada *et al.*, 2007). En primer lugar se buscó una concentración de GDM que prácticamente no tuviera efecto en la inhibición del crecimiento (50 nM GDM, datos no mostrados), y se hizo un experimento de germinación en el que se trataron plántulas con GDM, NE y ambas a la vez. Tal y como se puede observar en la Figura R.4, 50 nM GDM provoca una ligera inhibición del crecimiento (92% crecimiento frente al 98% del control) y el tratamiento con 2,8 mM NE inhibe la germinación como ya se había observado (52% germinación. Sin embargo con el tratamiento de NE con GDM el crecimiento se ve fuertemente inhibido (14%). Con estos datos se puede concluir que la GDM no solo no confiere tolerancia a la NE, sino que aumenta la toxicidad de ésta sugiriendo que ambas sustancias podrían estar actuando al mismo nivel. Esto implica también que la inhibición de HSP90 puede ser perjudicial para tolerar la NE. Las implicaciones que tiene esta interacción se discutirán más adelante.

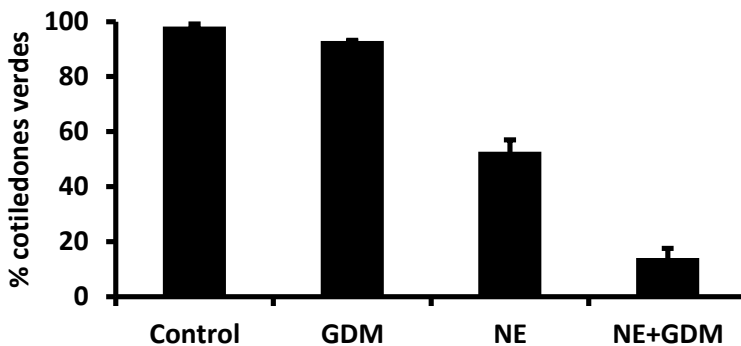


Figura R.4: La geldanamicina aumenta la toxicidad de la NE. Porcentaje de cotiledones verdes presentes tras 6 días de crecimiento en medio MS suplementado con 50 nM geldanamicina (GDM), 2,8 mM NE o con ambos tratamientos (NE+GDM) frente al tratamiento control. Cada columna representa la media y la desviación estándar de 3 repeticiones biológicas.

2.4 Estudio de la expresión de eIF5A en respuesta a la NE

Tal y como se ha comentado en la introducción, una de las funciones esenciales de la SPD es la hipusinación de eIF5A, factor de inicio de la traducción que tiene un papel crítico en la síntesis de proteínas en condiciones de estrés. Debido a la homología estructural que tiene la NE con la SPD, se pensó que la primera podría estar compitiendo con la segunda en el proceso de hipusinación de eIF5A, y esto podría provocar una alteración en los niveles de síntesis de proteínas que explicarían lo visto en los *microarrays*. Para estudiar esta hipótesis se estudiaron las distintas isoformas de eIF5A en presencia y ausencia de 3mM NE. Tal y como se puede observar en la Figura R.5, el perfil de las isoformas de eIF5A es muy distinto en plántulas tratadas con NE respecto a las plántulas control: en la muestra control se aprecian dos puntos mayoritarios, mientras que en la muestra tratada con NE, estos dos puntos tienen menor intensidad y aparece un tercer punto cuyo punto isoeléctrico es más neutro. Resultados previos en el laboratorio del Dr. Ferrando han demostrado que el punto mayoritario de las muestras no tratadas más básico se corresponde con la isoforma hipusinada de eIF5A (comunicación personal), por lo que efectivamente el tratamiento con NE parece estar inhibiendo la hipusinación de este factor de elongación traduccional. Respecto al resto de puntos mostrados, no hemos sido capaces de asignar a qué tipo de modificación postraduccional corresponden.

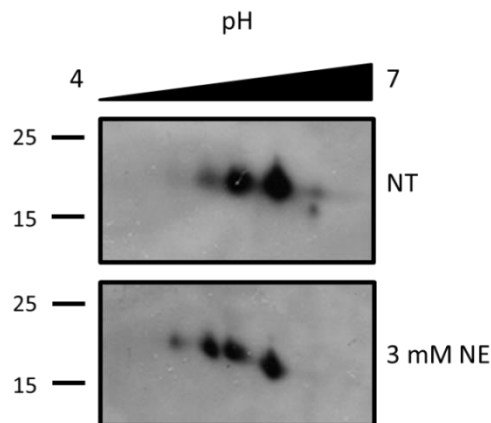


Figura R.5: Efecto de la NE sobre las isoformas de eIF5A. Inmunoblot 2D en el que se observan las isoformas de eIF5A procedentes de plántulas tratadas 24h con 3 mM NE comparadas con muestras no tratadas. A la izquierda se muestran los tamaños en kDa.

3 EFECTO DE LA NORESPERMIDINA EN EL CRECIMIENTO EN PLANTAS, LEVADURA Y CÉLULAS *HeLa*.

Tras el estudio de la respuesta transcripcional en plantas y la búsqueda de dianas de toxicidad en *Arabidopsis* basada en dicha respuesta, se procedió a evaluar la toxicidad de las poliaminas NE y SPD en *A. thaliana*, levadura y células *HeLa*.

En el caso de *A. thaliana*, se evaluó la capacidad de estas poliaminas de inhibir la germinación. Tal y como se puede observar en la Figura R.6, un tratamiento con 2,4 mM NE reduce la germinación por debajo del 50% a los 5 y 7 días, y conforme se va aumentando la dosis la inhibición en la germinación aumenta hasta que en 3 mM no se observan prácticamente plántulas a los 5 días, aunque a los 7 días germinan en torno al 20% de las semillas. En el caso de la SPD únicamente se evaluó un tratamiento de 6 mM, y a pesar de ser el doble de la dosis máxima utilizada de NE, se observa más de un 50% de germinación en ambos días. A la vista de estos resultados se confirma que la NE es más tóxica que la SPD, posiblemente debido a que la primera carece de función biológica en *Arabidopsis*, por lo que el catabolismo de la planta tendrá más problemas para eliminarla que con la SPD.

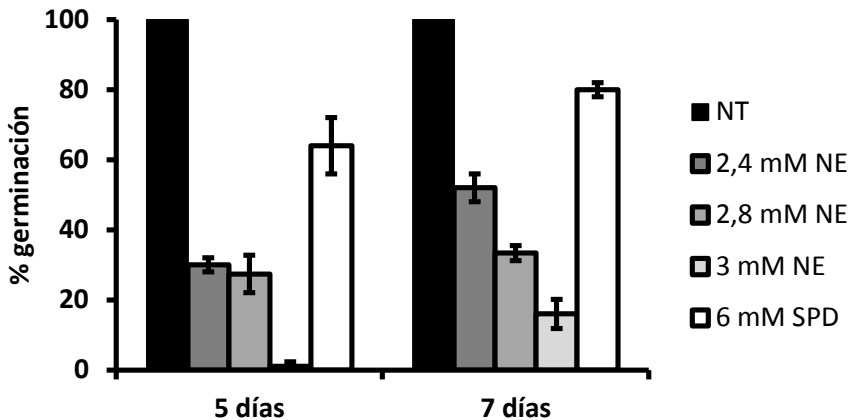


Figura R.6: La NE y la SPD inhiben la germinación de *A. thaliana*. Porcentaje de cotiledones verdes tras 5 o 7 días de crecimiento en presencia de distintas concentraciones de NE y SPD. Cada columna representa la media y el error estándar de tres repeticiones biológicas.

En el caso de levadura, en primer lugar se estudiaron curvas de crecimiento de cultivos crecidos en YPD o SCD sometidos a distintas concentraciones de NE o SPD. Tal y como se puede observar en la Figura R.7 A y B, el efecto de la NE y la SPD en levadura en medio YPD, a diferencia de en plantas, es muy similar: con un tratamiento de 1 mM el crecimiento no se ve afectado, sin embargo con 3 mM NE o 4 mM SPD se observa una inhibición prácticamente total del crecimiento. Por otro lado, cultivos de levadura crecidos en SCD son capaces de soportar dosis mucho más altas de NE o SPD sin que se observen efectos en el crecimiento (hasta 6 mM), y es necesario subir la dosis hasta 12 mM para obtener una inhibición del crecimiento total (similar a lo obtenido con 3 mM NE o 4 mM SPD en YPD). Esta diferencia en el efecto de las poliaminas entre el medio YPD y el SCD podría ser debida a la alta concentración de sulfato amónico (38 mM) presente en el medio SCD ya que dicha sustancia, debida a su similitud con las poliaminas, podría interferir de manera competitiva con la toma de NE o SPD.

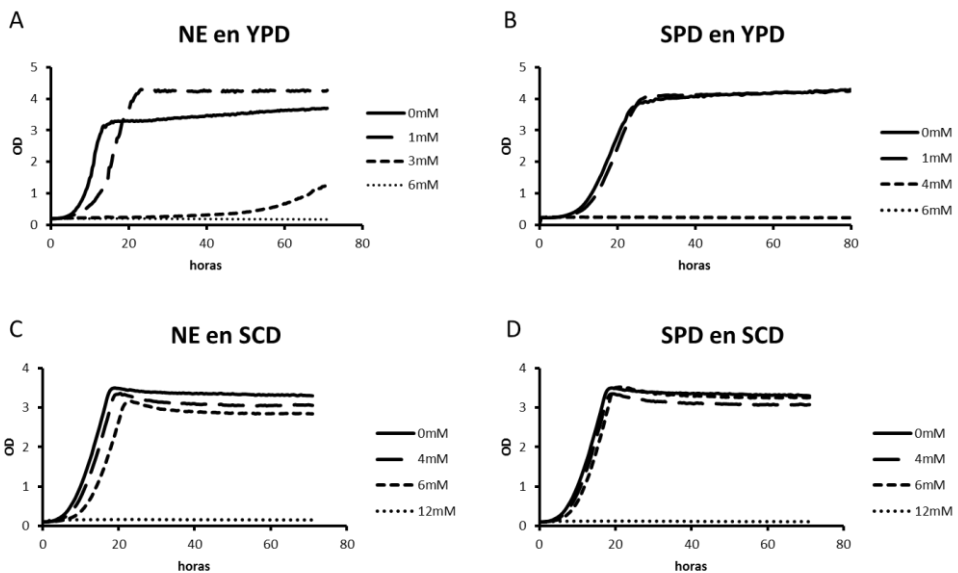


Figura R.7: NE y SPD inhiben el crecimiento de la levadura en función del medio de crecimiento. Curvas de crecimiento de levadura en medio YPD suplementado con NE (A) o SPD (B). Curvas de crecimiento de levadura en medio SCD suplementado con NE (C) o SPD (D). La OD significa Densidad Óptica a 600 nm y las curvas se obtuvieron a partir de tres réplicas técnicas (desviación estándar no mostrada para facilitar la interpretación de la Figura).

Tras el estudio de la inhibición del crecimiento, se quiso averiguar si la NE era capaz de reducir la viabilidad en cultivos de levadura. Para ello se midió el número de CFUs de cultivos de levadura tratados a distintos tiempos (3h y 24h) con distintas dosis de NE (1, 3 y 6 mM). Tal y como se aprecia en la Figura R.8, el tratamiento con 1 mM reduce ligeramente el número de colonias viables tras 3 o 24h, sin embargo con 3 y 6 mM NE el número de colonias viables cae por debajo del 40% a las tres horas, y prácticamente reduce las CFUs a 0 tras 24h. Con este experimento se confirma que a partir de 3 mM, la NE tiene un potente efecto que es letal para la levadura, especialmente a tiempos largos.

A continuación, basándose en los resultados previos del análisis transcripcional en *A. thaliana*, en los que se observó una gran cantidad de genes relacionados con respuesta a choque térmico inducidos, y de manera similar a lo realizado en el apartado anterior en *Arabidopsis*, se quiso investigar la posible interacción de la NE con dos estreses que provocan desnaturalización de proteínas: un choque térmico suave (37°C) y la inducción de la *unfolded protein response*, que es una respuesta especializada causada por desnaturalización de proteínas en el retículo endoplasmático (Korennykh y Walter, 2012) con la adición de tunicamicina (Tun).

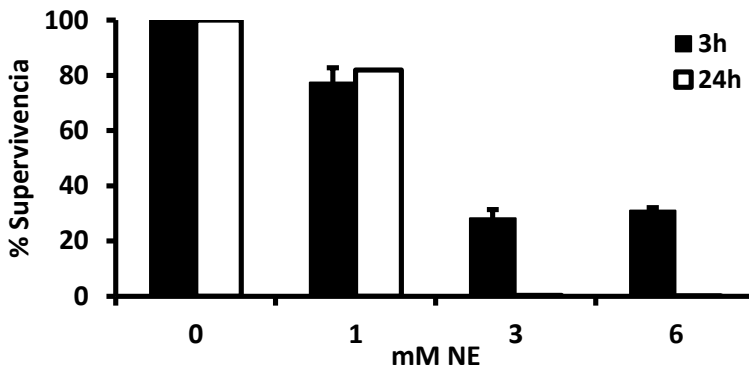


Figura R.8: La NE provoca muerte celular en levadura. Porcentaje de supervivencia relativa de cultivos tratados durante 3 o 24 horas con concentraciones crecientes de NE. El promedio y la desviación estándar se corresponden a tres réplicas biológicas.

En la Figura R.9 se pueden observar los resultados de un ensayo de crecimiento en los que se ha utilizado NE (6 mM y 12 mM), choque térmico (crecimiento a 37°C), 0,2 µg/ml Tun, 6 mM NE con choque térmico y 6mM NE con Tun.

Como era de esperar, el crecimiento de la levadura con 6 mM y 12 mM NE se reduce drásticamente comparado con el control. Por otro lado, incubar la levadura a 37°C no modifica de manera significativa el crecimiento. Sin embargo, si los cultivos de levadura tratados con 6 mM NE son incubados a 37°C, se aprecia una inhibición del crecimiento mucho mayor que en el caso de 6 mM NE a 28°C. Por otro lado, la levadura suplementada con Tun tampoco tiene afectado el crecimiento de manera significativa, sin embargo en el tratamiento de Tun con 6 mM NE, se observa un crecimiento similar al de 6 mM NE, lo cual sugiere que la adición de la Tun no aumenta la toxicidad de la NE. A la vista de estos resultados, se observa una interacción muy fuerte entre la adición de NE al medio y un tratamiento de choque térmico, esta interacción sustancia la idea de que la NE podría estar afectando a la homeostasis de proteínas.

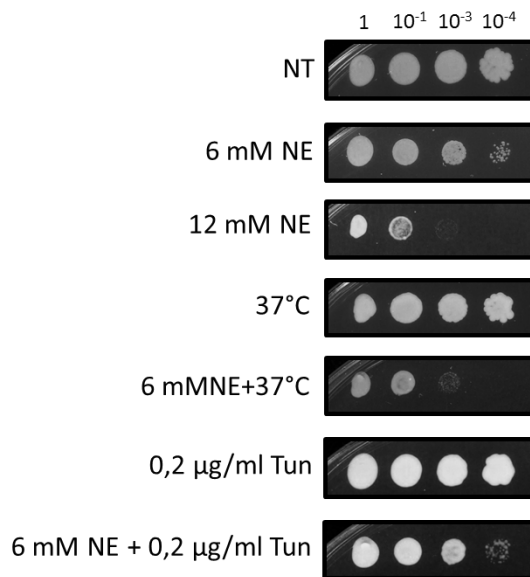


Figura R.9: La NE aumenta la sensibilidad a choque térmico pero no a la *Unfolded Stress Response*.

Ensayo de crecimiento de la cepa BY4741 sometida a distintos estreses: 6 y 12 mM NE, choque térmico (37°C) y estrés de retículo con 0,2 µg/ml Tunicamicina (Tun). Las fotos se tomaron a los seis días de incubación.

Finalmente se quiso estudiar el efecto de la NE en el crecimiento de células *HeLa*, para ello células tratadas con distintas dosis de NE y distintos tiempos fueron analizadas con el citómetro de flujo para estudiar el estadio del ciclo celular en el que se encontraban. Como se puede observar en la Figura R.10, los tratamientos a tiempos cortos (6 y 12 mM 6h) no tienen efectos significativos comparados con el tratamiento control. No obstante con tiempos largos (6 y 12 mM, 24h) se puede observar un efecto en el ciclo celular de las células tratadas: a medida que se aumenta la dosis el número de células que están en fase G0 & G1 (crecimiento sin replicación del DNA) va descendiendo (65% en el control, 40% con 12 mM), mientras que el número de células que están en fase G2 y M va aumentando (del 14% en el control al 25% con 12 mM). Sin embargo lo más destacable es que con 12 mM NE durante 24h hay un aumento importante de células que están en la llamada fase subG1 que indica aquellas células que han muerto (2% en condiciones control a 7,5% con 12 mM NE). Este resultado confirma que el tratamiento con NE provoca muerte celular en células *HeLa* así como perturbaciones en el correcto ciclo celular, si bien es cierto que ambos fenómenos son más tenues que los observados en plantas y levadura. Esto a su vez podría significar que las células animales son más tolerantes a la NE que en levadura o *Arabidopsis*.

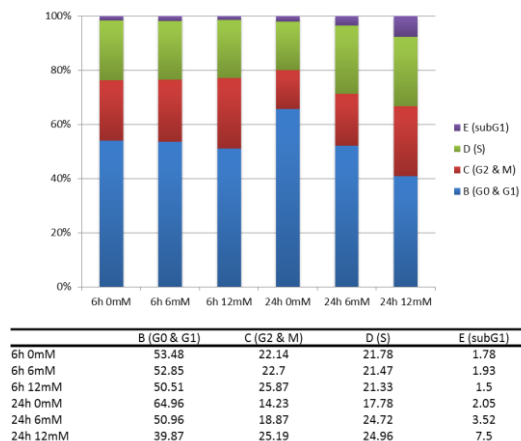


Figura R.10: El tratamiento con NE induce muerte celular en células *HeLa*. Ensayo de citometría de flujo de células *HeLa* tratadas con distintas dosis NE (6 y 12 mM) con distintos tiempos (6 y 24h). El gráfico muestra el porcentaje de células que están en los distintos estadios del ciclo celular y en la tabla adjunta se muestran el porcentaje concreto.

4 LA NORESPERMIDINA REDUCE LOS NIVELES DE PROTEÍNAS POLIUBICUITILADAS EN PLANTAS, LEVADURA Y LINEAS CELULARES HUMANAS

En los resultados obtenidos en el apartado anterior se observa que la NE tiene un efecto en el proteoma, si bien este efecto no se llega a definir con claridad. Tal y como se ha descrito en la Introducción, las células eucariotas tienen dos sistemas de degradación de proteínas desnaturalizadas o de aquellas proteínas que ya no son necesarias: el sistema UPS y la autofagia. En este caso, puesto que en el análisis de ambos *microarrays* se vieron varios clústeres relacionados con poliubiquitilación y degradación por el proteasoma, se decidió estudiar el perfil de proteínas poliubiquitiladas de muestras de *A. thaliana* tratadas con NE para ver si se apreciaba un aumento de ellas, lo que significaría una acción desnaturalizante de la NE a nivel del proteoma. Sorprendentemente, tal y como se aprecia en la Figura R.11.A, lo que se observa no es un aumento de los niveles de proteínas poliubiquitiladas, sino una disminución general de estas proteínas. Dicha disminución se observa a partir de las 12 horas de tratamiento y sugiere que la NE podría estar afectando el sistema UPS. Para confirmar esto, en la Figura R.11.B se utilizó el inhibidor del proteasoma MG132 en un tratamiento conjunto con NE. En esta Figura se puede observar que ambas muestras, las tratadas con NE y las que no están tratadas, aumentan los niveles de proteínas poliubiquitiladas cuando se inhibe la actividad del proteasoma con MG132. Estos resultados muestran que el proteasoma está funcionando en las muestras tratadas con NE, y que la reducción de las proteínas poliubiquitiladas por parte de la NE no es dependiente del proteasoma, sino que la NE podría estar interfiriendo en la cadena de transferencia del grupo ubiquitilo a las proteínas diana por las enzimas E1, E2 y E3.

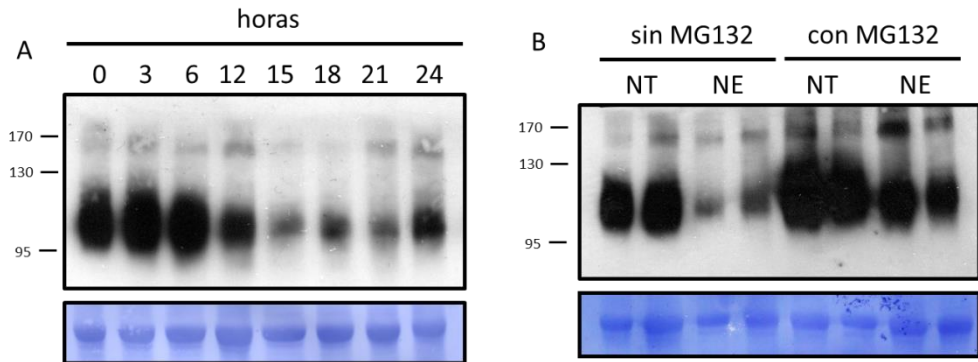


Figura R.11: NE reduce los niveles de proteínas poliubiquitiladas en *A. thaliana*. A) Inmunoblot mostrando los niveles de proteínas poliubiquitiladas provenientes de muestras tratadas con tiempos crecientes con 3 mM NE. B) Perfiles por duplicado de proteínas poliubiquitiladas provenientes de muestras tratadas con 3 mM NE durante 24 horas (NE) frente a muestras sin tratamiento (NT), tratadas a su vez con y sin 100 μ M MG132. El control de carga es un gel teñido con coomase con la misma cantidad de muestra que en el gel usado para el inmunoblot y los tamaños están expresados en kDa.

En vista de que este efecto de la NE en las proteínas poliubiquitiladas es muy poco usual, se quiso averiguar si la NE era capaz de reducir los niveles de proteínas poliubiquitiladas en la mayoría de organismos eucariotas o bien este efecto estaba restringido a las plantas. Para ello se estudió el perfil de proteínas poliubiquitiladas tras un tratamiento con NE con otras dos organismos eucariotas: levadura y células *HeLa* (células humanas). Tal y como se observa en la Figura R.12, el tratamiento con NE es capaz de reducir los niveles de proteínas poliubiquitiladas tanto en levadura como en células humanas, si bien las concentraciones de NE necesarias son un poco más altas que las usadas en *A. thaliana*. En el caso de la levadura, se observa una reducción en los niveles de proteínas poliubiquitiladas a partir de las 2 horas de tratamiento en las tres concentraciones estudiadas (6, 12 y 20 mM), y esta disminución se hace más aparente tras 3 horas de tratamiento. En el caso de las células *HeLa*, tras 3 horas de tratamiento se observa una ligera disminución en los niveles de proteínas poliubiquitiladas en la muestra tratada con 12 mM de NE

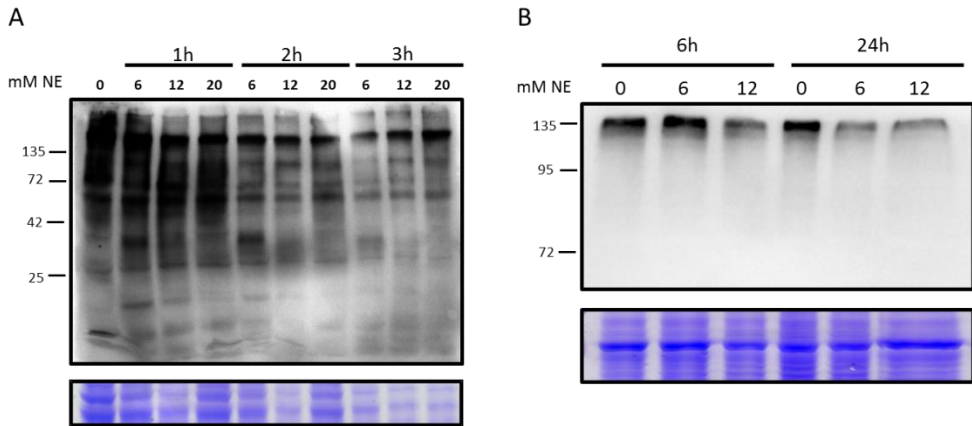


Figura R.12: NE reduce los niveles de proteínas poliubiquitiladas en levadura y líneas celulares *HeLa*. A) Perfiles de proteínas poliubiquitiladas de muestras de levadura tratadas con tres concentraciones distintas de NE (6, 12 y 20 mM) a distintos tiempos (1, 2 y 3 horas). B) Perfiles de proteínas poliubiquitiladas de muestras provenientes de células *HeLa* tratadas con dos concentraciones de NE (6 y 12 mM) a distintos tiempos (6 y 24 horas). El control de carga es un gel teñido con coomasie con la misma cantidad de muestra que en el gel usado para el inmunoblot y los tamaños estén expresados en kDa.

No obstante, tras 24 horas de tratamiento la reducción en los niveles de proteínas poliubiquitiladas se hace aparente tanto en la muestra tratada con 6 mM como con la tratada con 12 mM.

A la vista de estos resultados, puesto que se ha observado el mismo efecto con la NE con organismos tan dispares como las plantas, levadura y células humanas, se puede concluir que la NE es capaz de reducir los niveles de proteínas poliubiquitiladas en la mayoría de organismos eucariotas, y que éste no es un efecto específico de una sola especie.

5 LA NORESPERMIDINA INHIBE LA POLIUBICUITILACIÓN *IN VITRO*

En vista del efecto general de reducción de proteínas poliubiquitiladas que tiene la NE, se decidió estudiar con más detalle la reacción de poliubiquitilación por la cual una proteína diana es poliubiquitilada por la acción conjunta de tres enzimas llamados E1, E2 y E3, para ver si la NE influía en esta reacción. Para ello se estudió el efecto de la NE en una reacción de poliubiquitilación *in vitro*, la cual

consiste en la adición de los enzimas E1, E2 y E3 purificados independientemente, junto con ubiquitina, en presencia de ATP y un tampón adecuado (tal y como se describe en Materiales y Métodos). Después de la reacción, las muestras son hervidas en presencia de un agente reductor (en este caso β -mercaptoetanol), para eliminar los enlaces tioester y dejar únicamente los enlaces covalentes al grupo ubiquitilo. En estas condiciones, unas concentraciones de enzimas muy altas y en ausencia de una proteína diana, la enzima E2 (que es la que transfiere el grupo ubiquitilo de forma covalente a la proteína diana suministrada por la enzima E3) es capaz de ubiquitinar a la enzima E1, a sí misma, y a otras proteínas presentes en la reacción que se hayan co-purificado, si bien la mayoría de grupos ubiquitilo serán transferidos a la enzima E3, puesto que hay una fuerte interacción entre las enzimas E2 y E3 que facilitan esta ubiquitilación. Por lo tanto, la eficiencia de una reacción de poliubiquitilación *in vitro* es estimada por los niveles de proteína E3 poliubiquitilada.

En la Figura R.13.A se puede observar una reacción típica de poliubiquitilación *in vitro*, en los primeros tres carriles se utilizó únicamente enzima E1 y E2 en condiciones control (NT), suplementada con SPD o suplementada con NE. En este caso se puede observar que la adición de SPD o NE tiene un ligero efecto positivo sobre los niveles de enzima E2 ubiquitinada. Sin embargo, en los últimos tres carriles de esta Figura se observan los perfiles de proteínas poliubiquitiladas de reacciones en las que se añadieron los tres enzimas implicados en condiciones control, con SPD o NE, y en este caso se puede observar claramente una disminución en los niveles de poliubiquitilación de la enzima E3 en la reacción con NE comparada con la reacción control. Además también se puede observar una reducción en los niveles de poliubiquitilación de la E3 en la reacción con SPD comparada con la reacción control, si bien el efecto no es tan fuerte como en el caso de la NE. Este último resultado es sorprendente, puesto que la SPD en este experimento se usó como “control negativo”, ya que se esperaba que el efecto inhibitor de la NE fuese específico de ella misma y que la SPD no tuviese este efecto. El hecho de que la SPD posea un efecto similar a la NE, inhibiendo la reacción de poliubiquitilación *in vitro*, puede ser muy relevante desde el punto de vista biológico ya que, a diferencia de la NE, esta poliamina está presente en cantidades relativamente altas en la mayoría de organismos eucariotas y sus posibles implicaciones se discutirán más adelante.

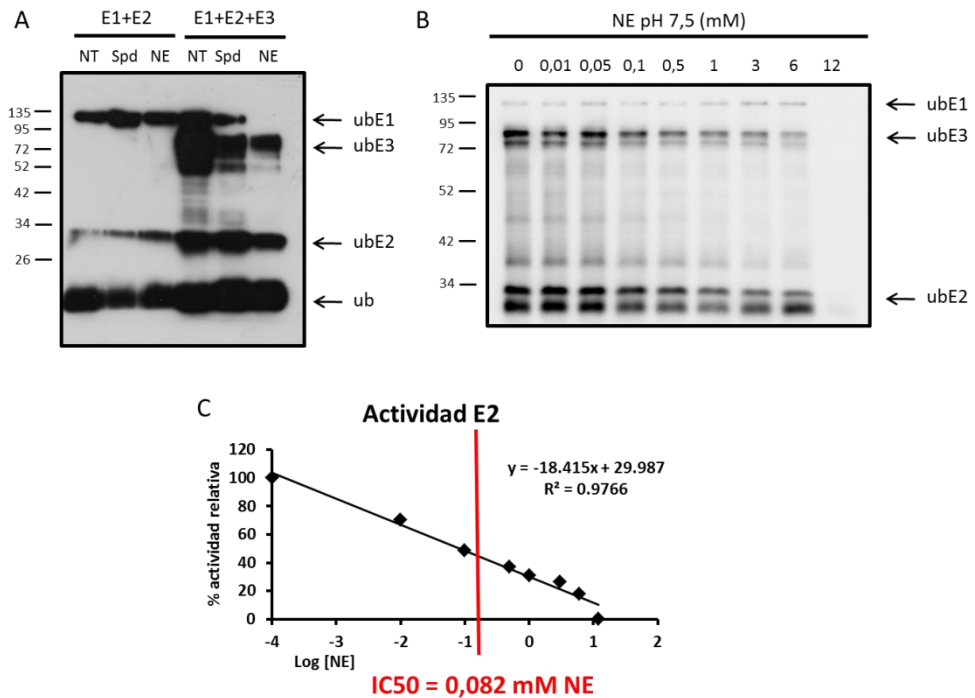


Figura R.13: La NE inhibe la poliubiquitilación *in vitro*. A) Inmunoblot mostrando los perfiles de proteínas poliubiquitiladas tras una reacción de poliubiquitilación *in vitro*. Los tres primeros carriles corresponden a una reacción de poliubiquitilación en presencia de las enzimas E1 y E2 en condiciones control (NT), con 1,5 mM de SPD o NE. Los tres últimos carriles corresponden a una reacción de poliubiquitilación en presencia de las enzimas E1, E2 y E3 en las mismas condiciones anteriores. B) Inmunoblot mostrando los perfiles de proteínas poliubiquitiladas tras una reacción de poliubiquitilación *in vitro* con concentraciones crecientes de NE, la señal de la E3 ubiquitinada se cuantificó (C) y se obtuvo una curva dosis-respuesta a partir de la cual se estimó la eficiencia de la transferencia del grupo ubiquitilo de la enzima E2 a la enzima E3 y de la que se obtuvo una IC50 de 0,082 mM de NE. Las señales correspondientes a ubiquitina (ub) y enzimas E1, E2 y E3 ubiquitinadas (ubE1, ubE2 y ubE3 respectivamente) están marcadas con flechas y los tamaños están expresados en kDa.

En la Figura R.13.B se muestra otro experimento de poliubiquitilación *in vitro* en el que se usó un rango de concentraciones de NE muy amplio (de 0,01 a 10 mM) a fin de poder evaluar la capacidad de esta sustancia de inhibir este tipo de reacciones. Tal y como se puede observar, con 10 μ M de NE ya se aprecia una

ligera disminución en los niveles de proteína E3 ubiquitinada y al aumentar la dosis a 0,1 mM la inhibición de la reacción es evidente. Esta inhibición de la reacción se incrementa hasta alcanzar los 12 mM de NE, dosis en la cual la reacción está casi totalmente detenida. Utilizando el *software* ImageJ, se pueden cuantificar los niveles de enzima E3 poliubiquitilada, de tal modo que se puede construir una curva dosis-respuesta como la que se muestra en la Figura R.12.C. En esta Figura se estudia la capacidad relativa de la enzima E2 (se considera que en ausencia de NE esta enzima posee un 100% de actividad) de transferir grupos ubiquitilo a la enzima E3 en presencia de concentraciones crecientes de NE. Como se observa en la Figura, existe una correlación lineal muy fuerte ($R^2 = 0,97$) entre la disminución de la actividad relativa de la enzima E2 con la concentración de NE, lo cual sugiere una inhibición competitiva de la reacción de poliubiquitilación por parte de la NE.

Además, a partir de esta Figura se puede obtener que la concentración necesaria para obtener la mitad de la inhibición máxima (IC₅₀, parámetro usado comúnmente para cuantificar la eficiencia de una droga para inhibir una reacción) es de 0,082 mM de NE. Estos resultados confirman que efectivamente la NE reduce los niveles de proteínas poliubiquitiladas debido a su capacidad para inhibir la reacción de poliubiquitilación, posiblemente a nivel de la enzima E2, capacidad que comparte con la triamina SPD.

6 ACCIÓN DE LA NORESPERMIDINA EN LA ESTABILIDAD DE PROTEINAS EN PLANTAS, LEVADURA Y LÍNEAS CELULARES HUMANAS

Con los resultados anteriores se ha confirmado que la reducción de los niveles de proteínas poliubiquitiladas por parte de la NE se debe a la acción de interferencia con la reacción de poliubiquitilación a nivel de la enzima E2. Debido a esto, proteínas que deberían ser degradadas por el sistema UPS se estarán acumulando en células tratadas con NE, ya que éstas no se pueden poliubiquitinar de manera correcta en presencia de esta sustancia. En los siguientes experimentos se pretende averiguar si efectivamente se produce una amulación de proteínas que debieran ser degradadas por la vía UPS y, en su caso, cuál es el destino de estas proteínas diana del sistema UPS cuando éste está inhibido por la NE.

Tal y como se ha comentado en la Introducción, gran parte de la respuesta hormonal en *A. thaliana* está mediada por el sistema UPS, un ejemplo de ello son

las proteínas DELLA en el caso de la respuesta a giberelinas. Las proteínas DELLA son expresadas de manera constitutiva y actúan inhibiendo la respuesta a giberelinas en la planta. Sin embargo, en presencia de niveles altos de giberelinas, el receptor de éstas se modifica y activa una serie de enzimas E3 de tipo culina que poliubiquitinan las proteínas DELLA, que son degradadas por el proteosoma. Esta degradación de de las proteínas DELLA desreprimien la respuesta a giberelinas (Dill *et al.*, 2004). En este caso se quiso comprobar si plántulas tratadas con NE serían capaces de degradar a las proteínas DELLA cuando se añaden giberelinas de forma exógena, como pasaría en condiciones normales. Para estudiar esto se usó un mutante de *A. thaliana* que tenía una proteína DELLA fusionada a la GFP (RGA-GFP). En la Figura R.14 se observan células de la punta de la raíz al microscopio confocal. Dichas células en condiciones normales (A) presentan gran parte de la señal de la GFP localizada en el núcleo celular, ya que se sabe que la proteína RGA es nuclear.

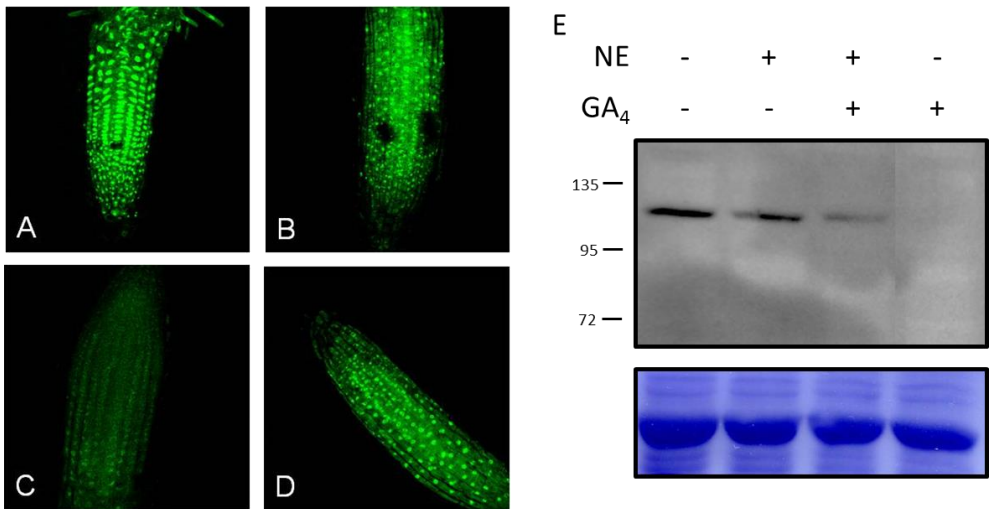


Figura R.14: La NE estabiliza la proteína RGA-GFP en presencia de giberelinas en *A. thaliana*.

Imágenes obtenidas al microscopio confocal de la punta de raíces de un mutante RGA-GFP sin tratar (A), tratadas con 3 mM NE durante 24h (B), tratadas con 1 μM GA₄ durante 3h (C) y tratadas con 3 mM NE (24h) y 1 μM GA₄ (3h) (D). E) Inmunoblot frente a GFP de muestras extraídas de plántulas del mutante RGA-GFP. Las condiciones de los tratamientos son los mismos que en el experimento anterior. El control de carga es un gel teñido con coomasie con la misma cantidad de muestra que en el gel usado para el inmunoblot y los tamaños estén expresados en kDa.

Sin embargo tras tres horas de tratamiento con giberelinas (C) se aprecia una caída de la señal de la GFP, confirmando la degradación de esta proteína en presencia de giberelinas. Por otro lado, plántulas tratadas durante 24h con 3mM (B) se observan de manera muy similar a las plántulas sin tratar, concentrándose la señal GFP en el núcleo. No obstante, en plántulas tratadas durante 24h con 3mM a las que posteriormente se le añade giberelinas (D) no se observa la caída de la señal de la GFP que se observaba en plántulas tratadas únicamente con giberelinas (comparar C con D). Este resultado fue comprobado posteriormente por inmunoblot frente a GFP (Figura R.14.E) con resultados parecidos. En este experimento se confirma por primera vez *in vivo* el efecto de la NE en la estabilidad de proteínas que deberían ser objeto de degradación por parte del sistema UPS y confirma los resultados obtenidos *in vitro* del apartado anterior.

En el siguiente experimento se estudió la estabilidad de la proteína *von Hippel-Lindau* fusionada a la GFP (VHL-GFP) en levadura. La proteína VHL es una proteína humana que forma un complejo con otras dos proteínas (llamado complejo VBC), dicho complejo forma parte de una enzima E3 de tipo culina que está involucrada en respuesta al cáncer (Ivan *et al.*, 2001). Al expresar dicha proteína en levadura, dado que en levadura no existen las dos proteínas necesarias para formar el complejo VBC, la proteína VHL carece de función y al presentar en su superficie zonas hidrofílicas expuestas (los puntos de anclaje para las otras dos proteínas) es altamente inestable y rápidamente degradada por el sistema UPS (Kaganovich *et al.*, 2008) La proteína VHL-GFP se puso bajo control de un promotor inducible por galactosa, de este modo se podía detener su síntesis al añadir glucosa al medio, y en el mismo plásmido había otra construcción para señalar los núcleos (TFP-NLS, referirse a Materiales y Métodos). Tras un crecimiento durante toda la noche en medio con galactosa (YPGal), se añadió glucosa al medio para parar la síntesis de esta proteína, de este modo se pueden estudiar los mecanismos de degradación de esta proteína de manera independiente de su síntesis. En la Figura R.15.A se puede observar al microscopio confocal que tras el crecimiento durante toda la noche en galactosa hay una gran cantidad de proteína sintetizada presente de manera homogénea en toda la célula (tiempo 0).

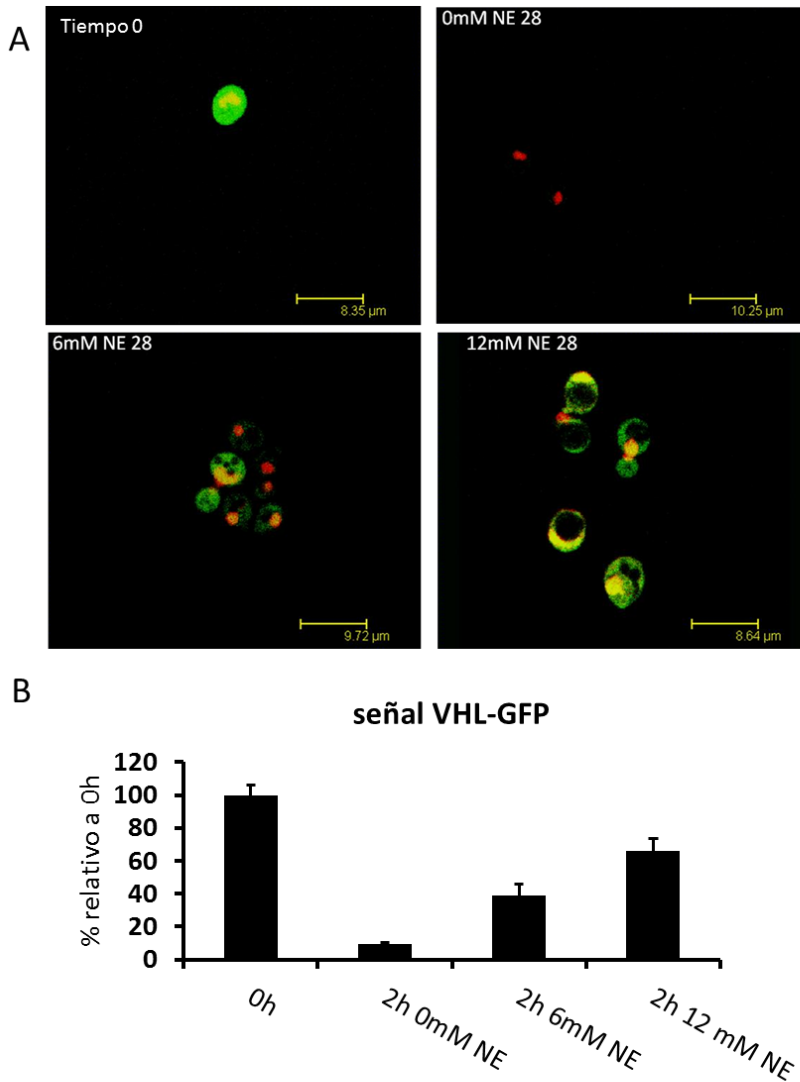


Figura R.15: NE estabiliza la proteína VHL-GFP en levadura. A) Imágenes obtenidas al microscopio confocal de levadura transformada con el plásmido pGAL::VHL-GFP. Las levaduras crecieron toda la noche en medio GliPD para la inducir la proteína VHL-GFP (tiempo 0h), a continuación se añadió un 2% de glucosa al medio para parar la síntesis de esta proteína, junto con dos concentraciones distintas de NE, tras dos horas de tratamiento con NE se tomaron las fotos (0 mM, 6 mM y 12 mM NE). La señal roja corresponde al núcleo celular. B) Cuantificación de la señal GFP presente en las células relativa al tiempo 0h. Media y error estándar de la señal presente en al menos 12 células.

Por otro lado, tras dos horas de crecimiento tras la adición de glucosa en ausencia de NE (0 mM) se puede observar que la señal de la GFP ha desaparecido totalmente, esto quiere decir que, al haber detenido la síntesis de dicha proteína por la adición de la glucosa y al ser ésta una proteína altamente inestable, toda la proteína presente a tiempo 0 ha sido degradada por el sistema UPS. Sin embargo, tras dos horas de crecimiento tras la adición de glucosa en presencia de 6 mM NE, se puede observar que aún hay gran cantidad de señal de la GFP presente en las células. Además, si se sube la dosis de NE a 12 mM, la cantidad de señal presente a las dos horas es prácticamente la que había a tiempo 0. La cantidad de señal de la GFP presente en las células de levadura para cada tratamiento se cuantificó con el *software* ZEN 2011 (Carl Zeiss) y los resultados se muestran en la Figura R.7.B. La señal presente a tiempo 0 se consideró la máxima posible (100%) y la señal del resto de los tratamientos se analizó en relación a la inicial. De este modo, se observa que tras dos horas de crecimiento tras la adición de glucosa y en ausencia de NE la cantidad de proteína VHL-GFP es menos del 10% la presente a tiempo 0. Sin embargo tras dos horas de crecimiento con glucosa y 6 mM de NE aún queda el 40% de la cantidad de proteína a tiempo 0 y ésta aumenta a más del 60% en presencia de 12 mM de NE. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en *A. thaliana* y confirman el efecto de la NE para inhibir la acción del sistema UPS.

Como se ha comentado en la Introducción, el sistema UPS juega un papel clave en la homeostasis del proteoma. Aquellas proteínas que se desnaturalizan de forma irreversible o que son incapaces de plegarse en su estructura nativa en el momento de su síntesis son degradadas rápidamente por este sistema, ya que su acumulación puede tener efectos perjudiciales en la célula, si bien tanto el mecanismo como la magnitud de su toxicidad aún se desconocen. No obstante, lo que sí se sabe es que cuando hay un estrés que provoca una desnaturalización masiva del proteoma que rebasa la capacidad de degradación del sistema UPS, las proteínas desnaturalizadas que no pueden ser degradadas tienden a agruparse formando agregados de proteínas insolubles. Además, hay una serie de HSP dedicadas a deshacerse de estos agregados insolubles de proteínas, éste es el caso de HSP104. Esta proteína forma un hexámero cuya función es solubilizar los agregados de proteínas desnaturalizadas, para que de este modo puedan ser diana del sistema UPS y puedan ser destruidas (ver Introducción, Specht *et al.*, 2011). En el siguiente experimento se usó un mutante de levadura cuyo gen *hsp104* había sido sustituido por una construcción *hsp104-Cyan Fluorescent Protein* (HSP104-CFP) bajo control de su mismo promotor.

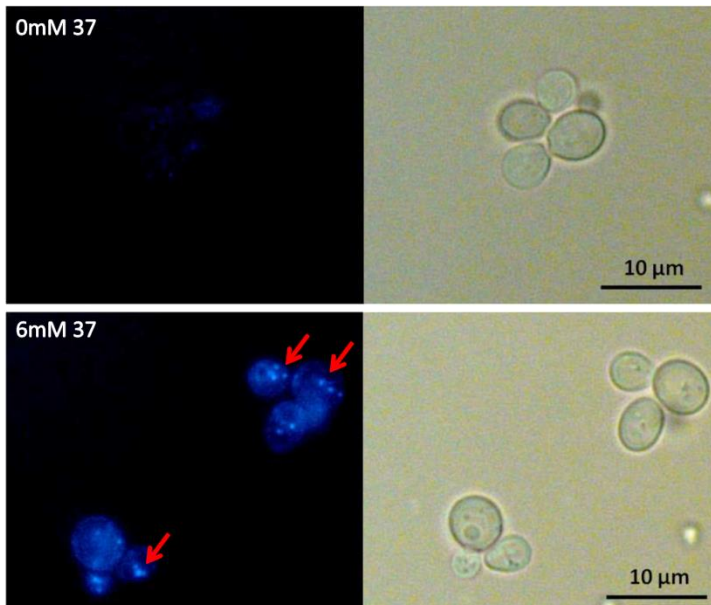


Figura R.16: NE induce HSP104 y provoca su acumulación en puntos específicos del interior celular. Imágenes obtenidas al microscopio de fluorescencia de un mutante de levadura HSP104-CFP, tras dos horas de tratamiento con (6 mM) o sin (0 mM) NE a 37°C. Las imágenes de la izquierda se obtuvieron con el filtro B-2A, y las de la derecha con luz visible en campo claro. Las flechas rojas indican sitios de acumulación de proteínas desnaturalizadas.

Tras crecer este mutante hasta obtener un cultivo exponencial, los cultivos se suplementaron con o sin NE (0mM o 6mM) y se incubaron durante 2 horas a 37°C para provocar una mayor inducción de HSP104. En la Figura R.16 se observan imágenes obtenidas al microscopio de fluorescencia de células de este mutante tratadas con o sin NE. En primer lugar se puede observar que las células no tratadas tienen una ligera inducción de esta proteína (0 mM 37), no obstante las células tratadas con NE (6 mM 37) presentan una fuerte inducción de HSP104, además se puede observar una concentración de la señal en puntos específicos del interior celular (Figura R.16, flechas rojas) que se corresponderían con sitios de agregación de proteínas desnaturalizadas.

Tras estos resultados se confirma que, como era de esperar, la inhibición de la poliubiquitilación causada por la NE tiene efectos graves en el mantenimiento del proteoma, estabilizando proteínas que deberían ser degradadas por el sistema UPS y provocando una acumulación de proteínas desnaturalizadas que podrían tener efectos tóxicos en la célula. A continuación se quiso observar si la NE era capaz de estabilizar proteínas con una baja tasa de recambio en levadura y células *HeLa*, de modo que se estudio la estabilidad de proteínas implicadas en el control del ciclo celular, como las ciclinas (Yen *et al.*, 2008), y la proteína p53 que también se degrada por el sistema UPS (Devine y Dai, 2013). En la Figura R.17 se puede apreciar que el efecto de la NE sobre la estabilidad de dos ciclinas tanto en levadura (A) como en células *HeLa* (B) es el opuesto al esperado. Es decir, en vez de estabilizar esas proteínas, el tratamiento con NE promueve su degradación. En el caso de p53, una proteína antitumoral que también está involucrada en el control del ciclo celular y la apoptosis (Green y Kroemer, 2009) también es degradada en presencia de la NE. Estos últimos resultados en principio están en desacuerdo con los experimentos anteriores.

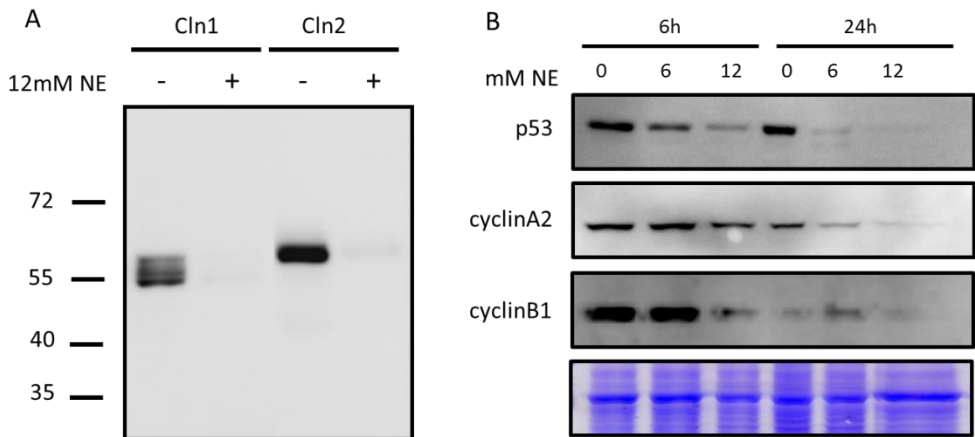


Figura R.17: La NE no estabiliza proteínas con alta tasa de recambio ni en levadura ni en células *HeLa*. A) Inmublot mostrando los niveles de ciclina 1 (cln1) y ciclina 2 (cln2) de cultivos de levadura tratados (+) y sin tratar (-) 3h con 12 mM NE. B) Inmublot mostrando los niveles de distintas proteínas de alta tasa de recambio (p53, ciclina A2 y ciclina B1) de muestras de células *HeLa* tratadas con distintas dosis de NE (6 y 12 mM) con dos tiempos distintos (6 y 24 horas). El control de carga es un gel teñido con coomasie con la misma cantidad de muestra que en el gel usado para el inmunoblot y los tamaños están expresados en kDa.

Sin embargo, dado que se ha visto que el tratamiento con NE provoca muerte celular tanto en levadura como en células *HeLa*, y que tanto las ciclinas como p53 están envueltas en la regulación de la apoptosis, podría existir una relación entre la bajada en los niveles de estas proteínas y la apoptosis que se discutirá más adelante.

7 EFECTO DE LA NORESPERMIDINA EN LA SÍNTESIS DE PROTEÍNAS

Debido a la diferencia del efecto de la NE en proteínas con alta o baja tasa de recambio, se quiso estudiar el efecto que la NE podría tener en la síntesis de proteínas. Para ello se usó un *kit* de síntesis de proteínas *in vitro* basado en extractos de germen de trigo. Para evaluar la capacidad de síntesis del sistema, se usó un aminoácido marcado con carbono 14 de forma que, tras terminar con la síntesis, el producto se filtraba para separar los aminoácidos de las proteínas y luego se medía la cantidad de carbono 14 presente en la fracción proteica. Utilizando este sistema se hicieron varios ensayos de síntesis de proteínas con distintas concentraciones de NE (de 0,5 a 3 mM) y se obtuvieron los resultados que se resumen en la Figura R.18. Tal y como se puede observar, la concentración de NE más baja empleada (0,5 mM) es suficiente para inhibir por completo la síntesis de proteínas. Sin embargo el *kit* usado está suplementado con 0,5 mM SPD, ya que ésta estimula la eficiencia de la elongación. Por lo tanto, el valor más bajo utilizado tendría una concentración total de poliaminas de 1 mM (0,5 mM SPD y 0,5 mM NE).

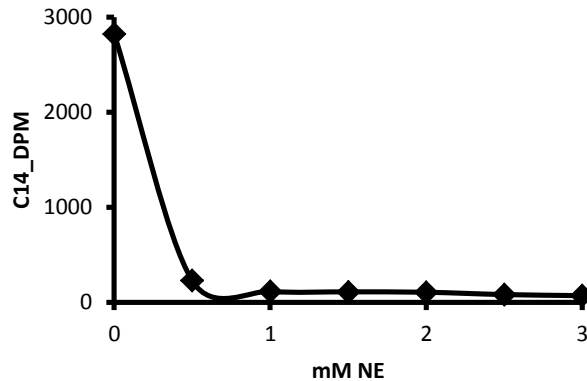


Figura R.18. La NE inhibe la síntesis de proteínas *in vitro*. Ensayo de síntesis de proteínas *in vitro* con concentraciones crecientes de NE (de 0,5 a 3 mM).

8 EFECTO DE LA NORESPERMIDINA EN LA HOMEOSTASIS DE AMINOÁCIDOS

En los apartados anteriores se ha demostrado que el tratamiento con NE reduce la degradación de proteínas por el sistema UPS, inhibiendo la poliubiquitilación. Por otro lado, tal y como se ha comentado en la introducción, recientemente se ha descubierto que la inhibición de la actividad del proteasoma provoca una disminución en la cantidad de aminoácidos disponibles que eventualmente conduce a muerte celular (Suraweera *et al.*, 2012). Además la adición de aminoácidos (AAs) al medio reduce la toxicidad de esta inhibición del proteasoma. Ahora bien, la inhibición del proteasoma y la inhibición de la poliubiquitilación tienen efectos opuestos en los perfiles de proteínas poliubiquitiladas, sin embargo ambos efectos provocan una reducción de la actividad del sistema UPS. Por ese motivo se quiso estudiar si la NE tenía algún efecto a nivel de la homeostasis de AAs

En primer lugar se quiso averiguar si la adición de un suplemento de AAs al medio daría tolerancia a la NE como en el caso del inhibidor del proteasoma MG132. En la Figura R.19 se pueden observar las curvas de crecimiento de cultivos de levadura tratados con NE o SPD suplementadas o no con AAs. En el caso de la NE, se puede ver que 3 mM es suficiente para inhibir por completo el

crecimiento (A), no obstante al suplementar dichos cultivos con AA, éstos son capaces de crecer con normalidad con 3 mM NE y en menor medida con 6 mM (B). Este mismo efecto se puede observar en ensayos de crecimiento en placa (E). De manera similar, 4 mM SPD inhibe por completo el crecimiento de la levadura (C), pero si se suplementa el cultivo con AAs, éste crece perfectamente con 4 mM y con más dificultad con 6 mM (D). Puesto que la adición de AAs confiere tolerancia a la NE y la SPD, a continuación se quiso averiguar si este suplemento de AAs podría tener algún efecto en los niveles de proteínas poliubiquitiladas. Por otro lado, si el tratamiento con esas dos poliaminas redujera los niveles de AAs disponibles, esto desencadenaría una serie de respuestas a nivel molecular, entre ellas la fosforilación del factor de inicio de la traducción eIF2 α .

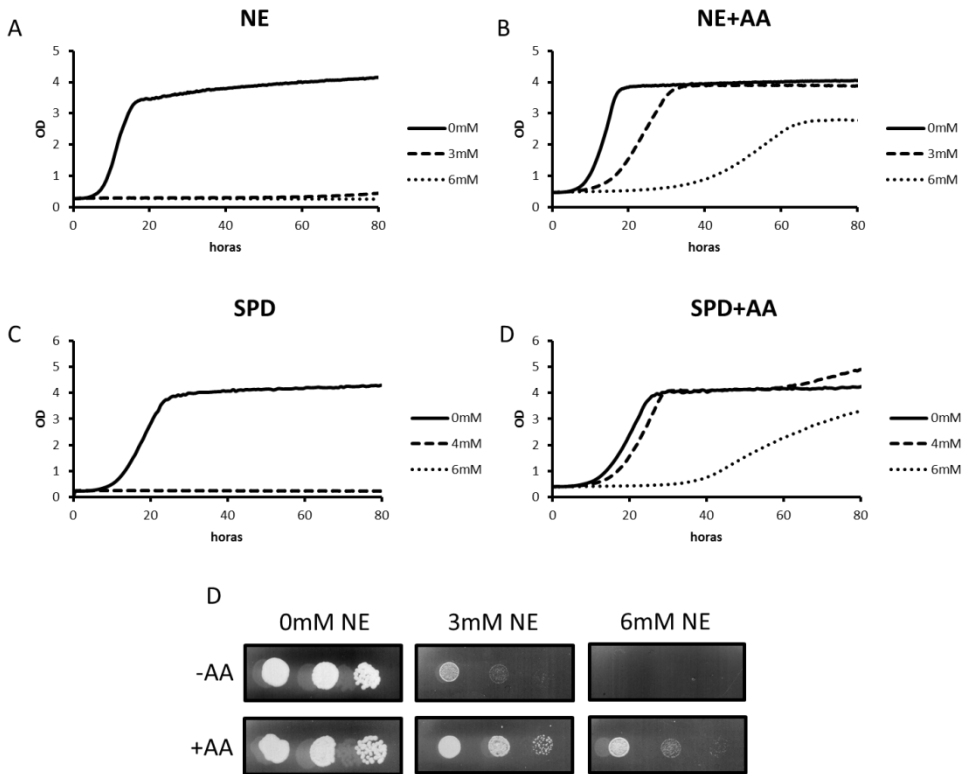


Figura R.19: La adición de AAs confiere tolerancia a la NE y la SPD. Curvas de crecimiento de levadura en medio YPD en presencia de NE con o sin AAs, (B y A, respectivamente) o SPD con o sin AAs (D y C, respectivamente). La OD significa Densidad Óptica a 600 nm y las curvas se obtuvieron a partir de tres réplicas técnicas (desviación estándar no mostrada para facilitar la interpretación de la Figura). D) Ensayo de crecimiento de levadura con dos concentraciones distintas de NE suplementada con (+) o sin (-) AAs. Las fotos se tomaron a los 6 días de incubación.

Esta fosforilación provocaría una represión general de la síntesis de proteínas a la vez que permitiría la traducción de una serie de mRNAs relacionados con la biosíntesis y la toma de AAs, entre ellos GCN4 (referirse a la Introducción). Debido a esto se hizo una extracción de proteínas de cultivos suplementados o no con AAs y en presencia o ausencia de NE o SPD, a fin de estudiar los perfiles de proteínas poliubiquitiladas y el estado de fosforilación de eIF2 α .

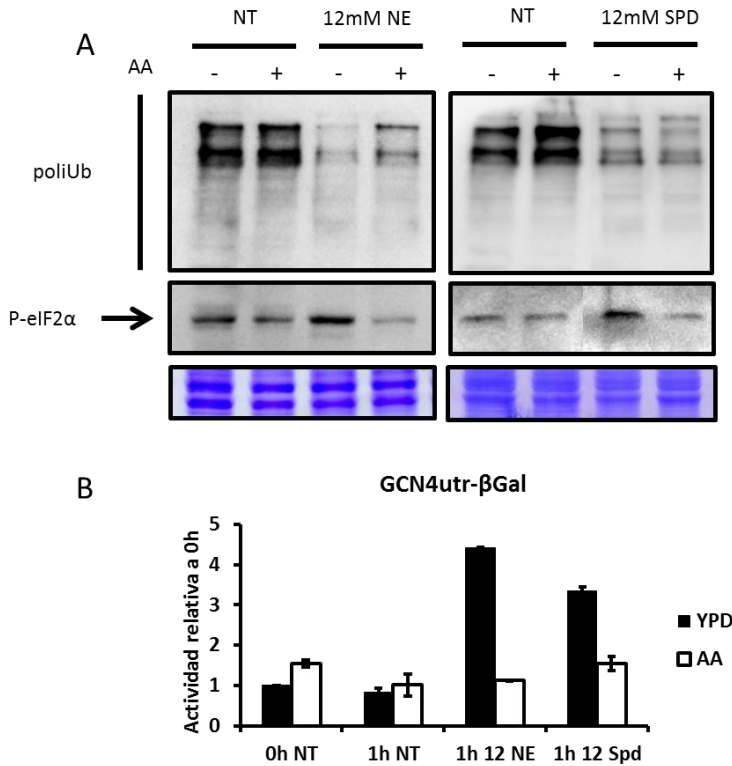


Figura R.20: La adición de AAs a muestras tratadas con NE o SPD no afecta a los niveles de proteínas poliubiquitiladas pero sí a los niveles de fosforilación de eIF2 α . A) Inmunoblot mostrando proteínas poliubiquitiladas y eIF2 α fosforilado de muestras de levadura tratadas con 12 mM NE o SPD, frente a muestras sin tratar (NT) con (+) o sin (-) la adición de AAs. El control de carga es un gel teñido con coomasie con la misma cantidad de muestra que en el gel usado para el inmunoblot. B) Medida de la actividad β -galactosidasa de una cepa de levadura que contiene el plásmido GCN4utr- β Gal, sometida a tratamientos con NE o SPD con o sin la adición de AAs. La medida de la actividad es en relación a la actividad β -galactosidasa a tiempo 0h sin AAs. La media y la desviación estándar se corresponden a dos experimentos independientes.

Tal y como se observa en la Figura R.20.A, el tratamiento con NE o SPD reduce los niveles de proteínas poliubiquitiladas de manera similar con o sin suplemento de AAs. Por otro lado, respecto a los niveles de fosforilación de eIF2 α , se puede observar que el tratamiento con NE o SPD aumenta los niveles de fosforilación, si bien esto no ocurre cuando el medio ha sido suplementado con AAs. Este resultado se confirmó utilizando una cepa transformada con el plásmido GCN4utr- β Gal. Dicho plásmido dirige el gen de la β -Galactosidasa (β -Gal) bajo el mismo tipo de control postraduccional que GCN4, de tal modo que cuando eIF2 α está fosforilado, aumenta la traducción de este gen, de tal modo que midiendo la actividad β -Galactosidasa de esta cepa se puede tener una estimación muy precisa del grado de fosforilación de eIF2 α . De este modo se puede observar que el tratamiento con 12 mM NE o SPD aumenta la actividad β -Gal casi 5 veces y 4 veces, respectivamente, comparado con la muestra no tratada (Figura R.20.B), sin embargo el tratamiento con NE o SPD en cultivos suplementados con AAs no aumentan de manera significativa la actividad β -Gal. De este modo se confirma que la adición de un exceso de AAs al medio no impide la entrada de estas poliaminas al interior celular y que un exceso en los AAs disponibles por la célula tampoco tiene un efecto en los perfiles de proteínas poliubiquitiladas que siguen viéndose disminuidos por la adición de NE o SPD. Sin embargo un suplemento de AAs a cultivos tratados con estas poliaminas sí que previenen la fosforilación de eIF2 α que ocurre en ausencia de dicho suplemento, seguramente debido a que el exceso de AA en el medio previene la falta de AAs en el interior celular producida por la reducción de la actividad del sistema UPS.

En el experimento anterior se ha confirmado que un exceso de AAs en el medio no interfiere ni en la toma ni en la acción de la NE y la SPD a nivel de la poliubiquitilación de proteínas. Sin embargo es necesario investigar lo contrario, es decir que la adición de estas poliaminas puedan dificultar la toma de AAs por las células. De este modo, para averiguar si la NE podría estar inhibiendo la entrada de AAs al interior celular se hizo un experimento en el que se midió la toma de leucina marcada con carbono 14 en presencia o ausencia de dicha sustancia. Tal y como se observa en la Figura R.21.A, la cantidad de leucina tomada por cultivos de levadura en presencia o ausencia de 12 mM NE es prácticamente la misma, por lo tanto la NE al menos no interfiere en la toma de este AA. El siguiente experimento que se realizó para confirmar que la NE no interfiere en la toma de AAs fue estudiar la fosforilación de eIF2 α de cultivos de levadura tratados con NE a los que se le han suministrado un exceso de los AAs

que dicha levadura es incapaz de sintetizar (en el caso de la cepa utilizada metionina, leucina e histidina) o únicamente metionina. En este caso, la adición de estos tres AAs o únicamente metionina no reduce la fosforilación de eIF2 α en presencia de NE (Figura R.21.B) a diferencia de lo que se ha visto cuando se suplementa con un exceso de todos los AAs. Estos dos experimentos confirman que la NE y la SPD no interfieren de manera significativa en la toma de AAs y que su efecto en la reducción de los AAs disponibles por la célula debe ser general, además dicho efecto debe ser causado por una reducción en la actividad del sistema UPS debido a la interferencia de estas poliaminas en la poliubiquitilación de proteínas.

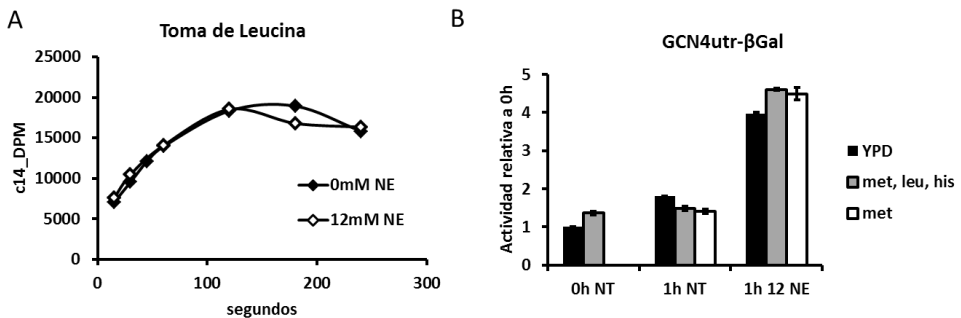


Figura R.21: La NE no interfiere en la toma de AA. A) Ensayo de toma de leucina marcada con carbono 14 en cultivos de levadura tratados con o sin 12 mM NE. Las unidades se corresponden a desintegraciones por minuto de átomos de carbono 14 (c14_DPM). B) Medida de la actividad β -galactosidasa de una cepa de levadura que contiene el plásmido GCN4utr- β Gal, sometida a tratamientos con o sin NE en condiciones normales (YPD), con un suplemento de los AAs no sintetizables por la cepa empleada (metionina, leucina e histidina), o suplementado únicamente con metionina (met). La medida de la actividad es en relación a la actividad β -galactosidasa a tiempo 0h en condiciones normales. La media y la desviación estándar se corresponden a dos experimentos independientes.

Tras demostrar el efecto de estas poliaminas en los niveles de AAs disponibles, se quiso estudiar la respuesta de mutantes en la ruta de control de aminoácidos GAAC a la NE. Para ello se usó un mutante de pérdida de función de GCN2 (Δ gcn2), un mutante que expresa de forma constitutiva una forma activa de GCN2 (GCN2^c) y un mutante de pérdida de función de GCN4 (Δ gcn4), junto a su control silvestre (CS). En la Figura R.22.A se observa un ensayo de crecimiento en medio sólido de los mutantes GCN2^c y Δ gcn2 junto al CS en ausencia y en

presencia de 3 mM NE. En dicha Figura se puede observar que el mutante GCN2^c tiene el crecimiento menos inhibido en presencia de NE que el CS, además el mutante Δ gcn2 parece tener una cierta sensibilidad a esta poliamina. Para confirmar esto, se obtuvieron las curvas de crecimiento de ambos mutantes junto a su CS en presencia y ausencia de 3 mM NE, en este caso se vio que el mutante Δ gcn2 se comporta de manera muy similar al CS en presencia de NE (Figura R.22.C), mientras que GCN2^c es capaz de tolerar mucho mejor la NE ya que su crecimiento se ve menos inhibido en presencia de ésta. Por otro lado es interesante señalar que el mutante GCN2^c en condiciones normales presenta una disminución notable de su OD a partir de las 40 horas de incubación. Esto, como se verá más adelante, es debido a que este mutante presenta una longevidad cronológica muy reducida, y a partir de los 2 días aproximadamente este cultivo empieza a morir, bajando la OD. Finalmente, se estudió la capacidad de la NE de provocar muerte celular en los dos mutantes gcn2 más el mutante Δ gcn4. Tal y como se observa en la Figura R.22.B, el CS presenta unos valores del 20 y 14% de los CFUs respecto a condiciones control, para 2 y 4 mM NE, respectivamente. No obstante el mutante GCN2^c tiene ambos valores por encima del 50%, confirmándose la tolerancia de este mutante a la NE. Finalmente, los mutantes Δ gcn2 y Δ gcn4 presentan valores ligeramente más bajos respecto al CS (11 y 13% respectivamente para 2 mM, comparado con el 20% en el CS y ambos en torno al 9% con 4 mM NE, comparado con el 14% del CS). Estos resultados demuestran que la activación de la ruta GCN2 es beneficiosa para tolerar la NE, mientras que la incapacidad para disparar esta ruta aumenta ligeramente la toxicidad de esta sustancia.

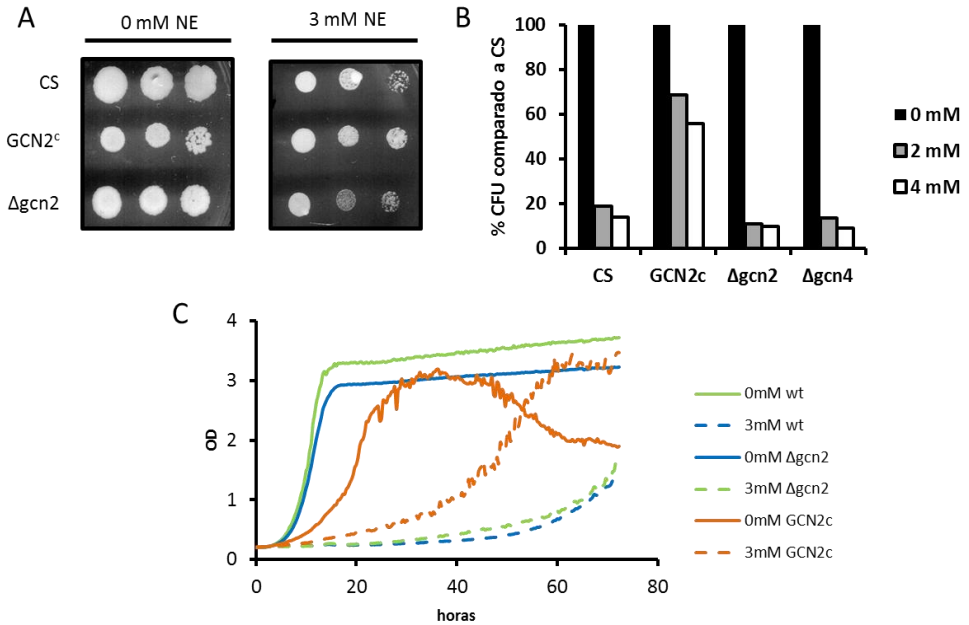


Figura R.22: Efecto de la NE en los mutantes de la ruta GCN. A) Ensayo de crecimiento de los mutantes de pérdida de función ($\Delta gcn2$) y de expresión constitutiva ($GCN2^c$) junto a su control silvestre (CS) tratados con y sin 3 mM de NE. La foto se hizo a los 6 días de crecimiento. B) Número de unidades formadoras de colonia (CFUs) relativos al control de mutantes de la ruta GCN tratados con NE (2 mM y 4 mM) durante 3 horas. C) Curvas de crecimiento en YPD de los mutantes $\Delta gcn2$, $GCN2^c$ y el CS con y sin 3 mM NE. La OD significa densidad óptica a 600 nm y las curvas se obtuvieron a partir de tres réplicas técnicas (desviación estándar no mostrada para facilitar la interpretación de la Figura).

Los experimentos anteriores habían demostrado que si se suplementa con AAs un cultivo tratado con NE éste es capaz de crecer con relativa normalidad y la ruta GAAC no se activa. Debido a eso, se quiso comprobar si una inhibición de la síntesis de proteínas durante el tratamiento con NE también aliviaría el efecto de esta última. La idea detrás de esto es que si tanto el proceso de síntesis como el de destrucción de proteínas se reduce de forma similar, en principio los niveles de AAs intracelulares permanecerían más o menos constantes y tampoco se activaría la ruta GAAC. Para demostrar esto se hizo un experimento de recuento de viables en el que dos cultivos en fase exponencial fueron tratados con 6 mM NE (NE) o con 6 mM NE y 1 $\mu\text{g/ml}$ de cicloheximida (NE+CHX)) (que es un potente inhibidor de la síntesis de proteínas) durante 24h, posteriormente fueron lavados

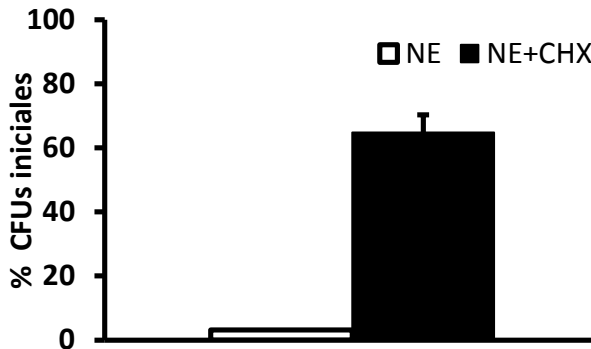


Figura R.23: La cicloheximida reduce el efecto tóxico de la NE. Cultivos tratados 24h con 6 mM NE con (NE+CHX) o sin (NE) la adición de 1 $\mu\text{g/ml}$ de cicloheximida. La media y la desviación estándar se corresponden a tres experimentos independientes en los que se midió el número de CFUs tras el tratamiento.

y se estimó la viabilidad del cultivo con un recuento de CFUs. Tal y como se observa en la Figura R.23, tras 24h con NE, solamente el 3% del cultivo inicial sobrevivió, mientras que los cultivos tratados con NE+CHX sobrevivió más del 60% del cultivo inicial. Así que a la vista de estos resultados una inhibición de la síntesis de proteínas que no sea letal de por sí reduce la toxicidad de la NE de manera similar a la suplementación de AAs.

Aunque esos experimentos se han centrado en investigar el efecto de esta sustancia sobre la ruta GAAC, hay otra ruta igualmente importante que responde al ayuno de aminoácidos (o a alguno de ellos) y esta es la ruta TORC1. Para estudiar la implicación de la ruta TORC1 se usó el mutante Δtor1 ya que, como se ha comentado en la introducción la levadura posee dos genes *tor*, de modo que la delección de *tor1*, que solo es capaz de formar el complejo TORC1 no es letal pero presenta una actividad TORC1 reducida. También se utilizó el mutante Δgln3 , que codifica para un factor de traducción regulado por TORC1 que responde al ayuno de fuentes de nitrógeno. En condiciones normales *gln3* está fosforilado por TORC1 y se localiza en el citosol, mientras que en condiciones de ayuno de nitrógeno

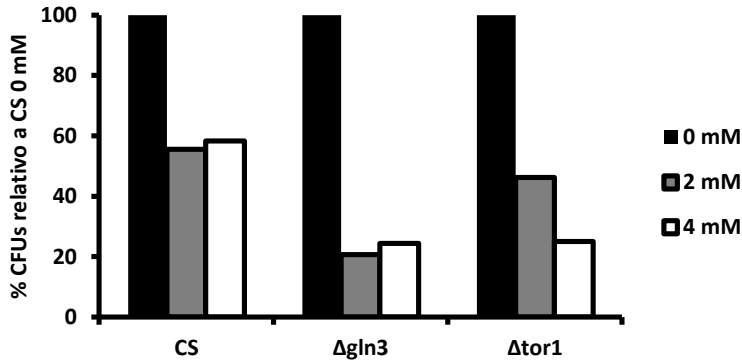


Figura R.24: Mutantes de la ruta TORC1 son sensibles a la NE. Número de unidades formadoras de colonia (CFUs) relativos al control de mutantes de la ruta TORC1 tratados con NE (2 mM y 4 mM) durante 3 horas.

TORC1 se inhibe, de modo que *gln3* deja de estar fosforilado y migra al núcleo, donde induce los genes de respuesta al ayuno de nitrógeno (Liao *et al.*, 2008). En primer lugar se investigó si los mutantes de pérdida de función eran sensibles o tolerantes a la NE, para ellos se realizó un ensayo de supervivencia en el que los mutantes y el control silvestre fueron sometidos a 2 y 4 mM NE durante 24h. Tal y como se aprecia en la Figura R.24, ambos mutantes mostraron ser sensibles a la NE. Dado que ambos mutantes presentan de manera constitutiva una actividad TORC1 reducida, estos resultados sugieren en primer lugar que la NE tiene un efecto sobre la ruta TORC1, y que la inhibición de esa ruta aumenta la toxicidad de la NE.

En vista de que mutantes de la ruta TORC1 mostraban sensibilidad a la NE, se quiso averiguar si la NE era capaz de inhibir la ruta TORC1. Para ello se utilizó un mutante que tenía la proteína *Msn2* fusionada a la proteína fluorescencia verde (*Msn2*-GFP). Esta proteína codifica para un factor de transcripción de respuesta a estrés, dicho factor en condiciones normales está fosforilado por TORC1 y permanece en el núcleo, sin embargo en condiciones adversas en las que TORC1 se inhibe, *Msn2* deja de estar fosforilado y se transloca al núcleo donde induce genes de respuesta a estrés (Beck y Hall, 1999). Para ello, cultivos tratados con y sin 6 mM de NE del mutante *Msn2*-GFP fueron incubados durante 3 horas y observados al microscopio de fluorescencia para observar la localización intracelular de *msn2*-GFP.

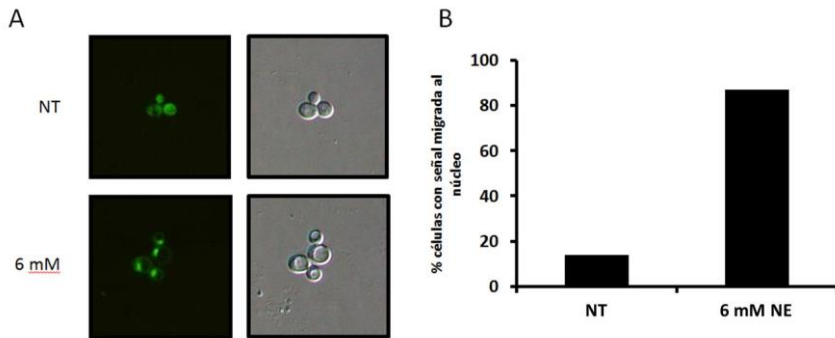


Figura R.25: La NE transloca la proteína msn2 al núcleo mediante la inhibición de TORC1. Cultivos del mutante msn2-GFP en fase exponencial fueron tratados con (6 mM) o sin (NT) 6 mM NE durante tres horas y observados al microscopio de fluorescencia (A). (B) Porcentaje del número de células que presentan la señal GFP migrada al núcleo en presencia o ausencia de 6 mM NE.

Tal y como se observa en la Figura R.25.A, en el cultivo sin tratar la mayor parte de la proteína Msn2 está difusa en el citosol, sin embargo en los cultivos tratados con NE esta proteína tiende a acumularse en el núcleo. Por otro lado se decidió observar al menos 100 células en cada cultivo y marcar aquellas que tuvieran la señal migrada al núcleo para tener un resultado más robusto. De este modo, se estimó que el 14% de las células no tratadas tenían la señal migrada al núcleo, mientras que el 87% de las células tratadas con NE tenían la señal migrada al núcleo (Figura R.25.B). A la vista de estos resultados parece evidente que el tratamiento con NE transloca al activador transcripcional al núcleo, seguramente a través de una inhibición de la actividad TORC1.

9 EFECTO DE LA NORESPERMIDINA EN LA LONGEVIDAD CRONOLÓGICA EN LEVADURA

A pesar de que en los experimentos anteriores ha quedado patente el efecto tóxico de altas dosis de las poliaminas NE y SPD en animales, plantas y levadura, como se ha comentado en la introducción, en 2009 se descubrió que la adición de SPD promueve la longevidad en levadura, *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans* y células humanas (Eisenberg *et al.*, 2009). Debido a que se ha demostrado que tanto la NE como la SPD tienen un efecto bastante similar a nivel de la inhibición de la actividad UPS y de la depleción de los niveles de aminoácidos, se quiso averiguar si la NE podría tener un efecto similar al de la SPD

aumentando la longevidad cronológica de cultivos de levadura. Por ese motivo, se diseñó un experimento para medir la longevidad cronológica de levadura tratada con 4 mM NE o SPD en medio SCD modificado (en el cual se añaden unas dosis más altas de las auxotrofías requeridas por la cepa usada, para así impedir que dichos compuestos esenciales se agoten). Como era de esperar, el tratamiento con SPD mejoró la longevidad cronológica de la levadura comparada con el cultivo no tratado (Figura R.26). Sin embargo, el tratamiento con NE no solo mejoró la longevidad cronológica comparada con el cultivo no tratado, sino que resultó ser más efectiva que la SPD. Este resultado confirma que la NE es capaz de promover la longevidad cronológica de la levadura de manera similar, o incluso más eficientemente que la SPD.

En el apartado anterior se ha estudiado cómo la ruta GAAC influye en la toxicidad de la NE y la SPD. Por ese motivo, se quiso estudiar si el mutante de pérdida de función $\Delta gcn2$ o el mutante que expresa una forma constitutivamente activa $GCN2^c$ reaccionarían de manera distinta en un experimento de longevidad cronológica en presencia de NE. En primer lugar es importante destacar que, sorprendentemente, ambos mutantes tienen una longevidad cronológica muy reducida en condiciones normales comparados con el CS, aunque $GCN2^c$ es el que menor longevidad presenta (Figura R.27).

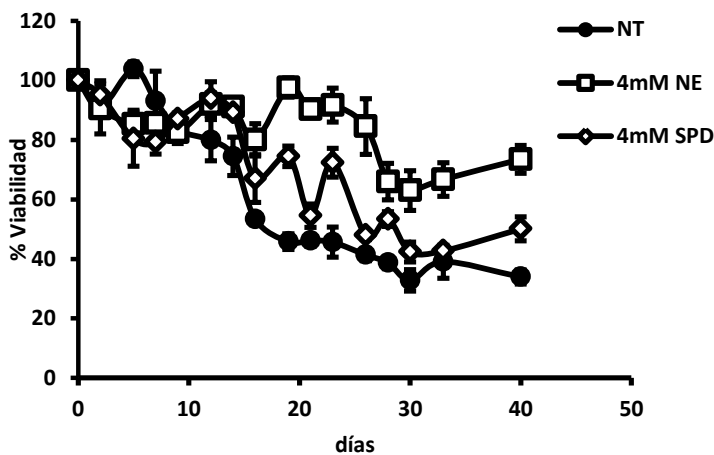


Figura R.26: La NE y la SPD aumentan la longevidad cronológica de la levadura. Estudio de la longevidad cronológica de cultivos de la levadura BY4741 en medio suplementado con 4 mM NE, 4 mM SPD o en condiciones control. La media y la desviación estándar se corresponden a tres experimentos independientes.

Sin embargo los dos mutantes estudiados reaccionan a la NE de manera muy similar al CS, aumentando su longevidad cronológica. Estos resultados confirman que la ruta GAAC es importante para la LC de la levadura y que el efecto de la NE parece ser independiente de estos, ya que si fuese independiente de la ruta GAAC no se apreciaría un aumento de la LC en el mutante suplementado con NE.

Como se ha comentado en la introducción, la inhibición de la ruta TORC1, ya sea por restricción calórica o por medios farmacológicos (como la cafeína o la rapamicina) es capaz de aumentar la LC de la levadura. Por otro lado, puesto que se tenían indicios de que la NE podría estar inhibiendo TORC1, se quiso comprobar el efecto de la NE sobre mutantes en la ruta TORC1 en un experimento de longevidad cronológica. Tal y como se observa en la Figura R.28, los mutantes de la ruta TORC1 $\Delta gln3$ y $\Delta tor1$ tienen una mayor LC que el control silvestre, confirmando datos previos (Powers *et al.*, 2006). No obstante, tanto el control silvestre como ambos mutantes son capaces de aumentar su LC en presencia de la NE.

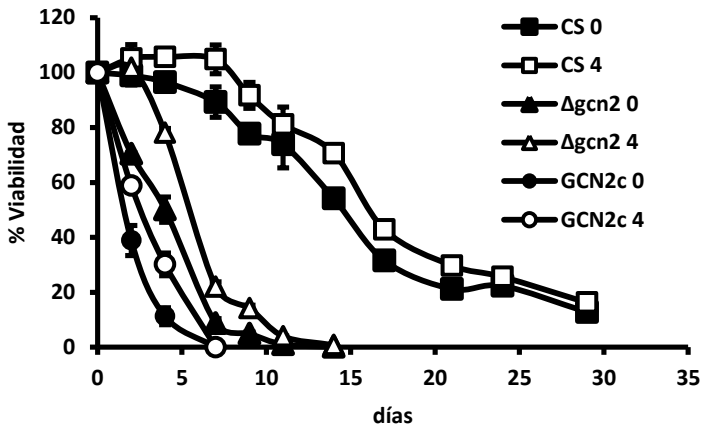


Figura R.27: Efecto de la NE en la longevidad cronológica de mutantes de la ruta GAAC. Estudio de la longevidad cronológica de los mutantes $\Delta gcn2$ y $GCN2^c$ con su CS en presencia (4) y ausencia (0) de 4 mM NE. La media y la desviación estándar se corresponden a tres experimentos independientes.

Sin embargo un dato interesante es que la adición de la NE parece ser más efectiva en el mutante Δtor1 que en el control silvestre, ya que la variación de supervivencia acumulada (la suma de las diferencias entre el cultivo tratado y sin tratar para cada observación) es de 131,21 puntos para el cultivo silvestre y de 196,99 puntos para Δtor1 , esto supone un aumento de la efectividad del tratamiento en el mutante frente al control de más del 50%. Esto sugiere que el efecto de la NE sea aditivo al de la inhibición de TORC1 o bien que la NE es capaz de causar una mayor inhibición de TORC1 sobre el mutante.

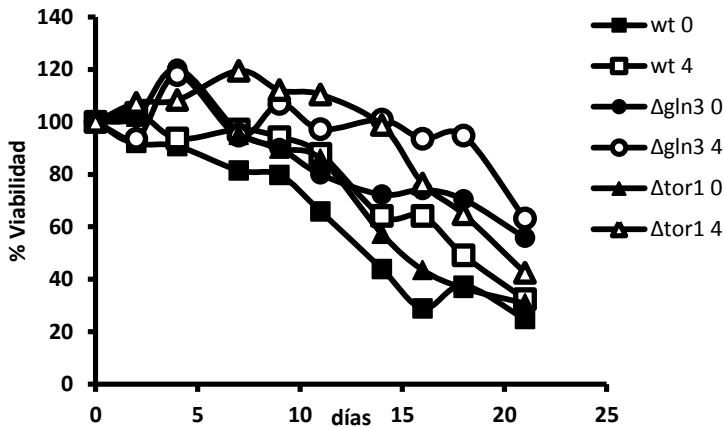


Figura R.28: Efecto de la NE en la longevidad cronológica de mutantes de la ruta TORC1. Estudio de la longevidad cronológica de los mutantes Δtor1 y Δgln3 con su CS en presencia (4) y ausencia (0) de 4 mM NE. La media y la desviación estándar se corresponden a tres experimentos independientes.

DISCUSIÓN

1 ANÁLISIS DE LA RESPUESTA TRANSCRIPCIONAL EN PLANTAS TRATADAS CON NORESPERMIDINA

A partir del análisis transcripcional en dos tiempos distintos de plantas tratadas con NE se ha podido obtener mucha información del efecto de la NE a nivel molecular y, en retrospectiva, esto ha sido vital para entender el efecto que tiene esta sustancia en la célula. Entre los resultados de este experimento, se ha visto que la NE induce la respuesta a distintos estreses, tales como el estrés por choque térmico, el estrés oxidativo y el estrés osmótico y salino (Tabla R.3). Este último era bastante predecible puesto que había estudios previos que demostraban que mutantes tolerantes a NE también lo eran frente a sequía (Alejandro *et al.*, 2007). Por otra parte el estrés oxidativo podía ser una respuesta secundaria del estrés osmótico (Cruz, 2008), pero no así la respuesta a choque térmico. Que la NE estaba causando algún efecto a este nivel se hizo patente tras un análisis más exhaustivo de grupos de genes de comportamiento similar. En este análisis aparecían inducidos varios grupos de genes relacionados con la síntesis y/o el destino de las proteínas (degradación, modificación, etc...), así como de genes relacionados con la síntesis de aminoácidos (Figura R.1). Es interesante destacar aquí la existencia de diversos grupos de genes relacionados con la síntesis y degradación de proteínas que se ven reprimidos en función del tiempo de tratamiento, mientras que hay un grupo de genes relacionados con la síntesis de aminoácidos que se induce a lo largo del tiempo. Este efecto es interesante ya que sugiere una parada general de la síntesis de proteínas y una inducción de la síntesis de aminoácidos, y este efecto sería justamente el esperado si la ruta GAAC estuviera activada. De modo que aparte del efecto ya descrito a nivel de estrés osmótico que se esperaba obtener con un tratamiento con NE aparecía un efecto a nivel de homeostasis de proteínas que ha sido elucidado en este trabajo por primera vez. En el análisis transcripcional también se aprecia curiosamente que la NE induce genes relacionados con la modificación y el remodelado del DNA y de otros procesos relacionados con la transcripción de mRNA. La inducción de estos genes por la NE, a la vista de los resultados de Eisenberg *et al.* (2009), podrían ser explicados si la NE tuviera una actividad inhibitoria de las enzimas HAT similar a la de la SPD, ya que una modificación de la cromatina podría explicar estos procesos, y podría resultar una línea de investigación interesante. Siguiendo con los resultados de Eisenberg *et al.*, resulta sorprendente que en el análisis transcriptómico de plantas tratadas con NE no aparezcan genes relacionados con la autofagia, ya que en este estudio se describe

que la SPD es un potente inductor de la autofagia. Como se discutirá más adelante, ésta parece ser la diferencia más importante entre el tratamiento con NE respecto al tratamiento con SPD. Centrándose en aquellos genes reprimidos, en general se observa una inhibición de la fotosíntesis y de procesos relacionados con la obtención de energía, si bien esto suele ser lo habitual cuando se somete a la planta a un estrés y no presenta especial relevancia aparentemente.

2 IDENTIFICACIÓN DE LAS DIANAS DE TOXICIDAD DE LA NORESPERMIDINA EN *A. THALIANA*

Centrándonos en los tres tipos de estrés inducidos por el tratamiento con NE (osmótico, oxidativo y choque térmico), el siguiente objetivo fue tratar de averiguar cuál de ellos era el predominante. Para ello, la primera hipótesis que se contempló fue que la NE pudiese ser degradada por las enzimas PAO, dando como resultado H_2O_2 , y que esta degradación podría ser la causante de la respuesta al estrés oxidativo puesto de manifiesto en los análisis transcriptómicos. En este caso hay varios ejemplos de procesos similares descritos en la bibliografía, como la inducción de H_2O_2 por la degradación de PAs necesaria para el correcto desarrollo de tejidos (Parchment y Pierce, 1989). Además, como se ha comentado en la introducción, el estrés oxidativo puede causar desnaturalización de proteínas, por lo que de este modo también quedaría explicada la inducción de una respuesta a choque térmico (que al fin y al cabo es causada por una desnaturalización de proteínas). Efectivamente la NE podía ser degradada por las enzimas PAO, cosa que no se sabía hasta la fecha, sin embargo la hipótesis de la toxicidad de la NE debido a su degradación por las enzimas PAO se demostró incorrecta ya que los mutantes de sobreexpresión de las enzimas PAO eran tolerantes y no sensibles a la NE (Figura R.2). Del mismo modo, que los mutantes de sobreexpresión de las enzimas PAO fueran tolerantes implicaba que el estrés oxidativo causado por la degradación de la NE no era tan tóxico como la NE *per se*.

Este resultado nos llevó a plantearnos la posibilidad de que la NE pudiera estar causando un efecto en el proteoma directamente, y de hecho había ciertos datos previos que apuntaban en esa dirección. En primer lugar se sabe que las PAs son capaces de interactuar con el ribosoma, estabilizando sus cargas negativas en dosis bajas y mejorando la eficiencia de sistemas *in vitro* de síntesis de proteínas, sin embargo una dosis muy elevada de PAs disminuye de manera dramática la

tasa de síntesis de proteínas (Atkins *et al.*, 1975). Además las PAs también afectan a la tasa de fidelidad de la síntesis de proteínas (Jelenc y Kurland, 1979). En segundo lugar la NE podría estar compitiendo con la SPD inhibiendo la actividad de las enzimas encargadas de la reacción de hipusinación del factor eIF5A, factor esencial en la síntesis de proteínas (Saini *et al.*, 2009). Finalmente la NE podría estar interactuando directamente con proteínas con carga negativa, desnaturalizándolas. Para identificar el tipo de efecto que la NE podría tener sobre el proteoma, se decidió investigar el efecto de esta sustancia sobre la inducción de HsfA2, un regulador transcripcional que induce la respuesta a choque térmico y que estaba inducido en ambos *microarrays*. El estudio de este factor traduccional era especialmente interesante puesto que presenta dos isoformas que se inducen preferencialmente bajo estreses distintos (Sugio *et al.*, 2009). La isoforma I se induce tras un estrés por choque térmico normal, mientras que la isoforma II se induce preferencialmente por sustancias que interfieren con la síntesis normal de proteínas y disminuyen la fidelidad de éstas. De este modo, el estudio de las dos isoformas permitiría saber si la NE causaba una desnaturalización general de las proteínas similar a un choque térmico o bien si tenía un efecto más específico a nivel ribosomal, como la bibliografía previa sugería. En este caso los resultados mostraron una leve inducción de las dos isoformas de HsfA2, cosa que no se correspondía ni con un choque térmico ni con un efecto específico a nivel del proteoma y que por lo tanto sugería que el efecto de la NE debía ser distinto a estos dos (Figura R.3). En el siguiente experimento se quiso comprobar si una inducción del sistema de chaperonas podría conferir tolerancia a la NE, ya que aunque el efecto de la NE aún no estaba claro, lo que sí se sabía era que dicho efecto inducía una respuesta a choque térmico. Para ello se utilizó la droga GDM, un compuesto capaz de inhibir la chaperona HSP90 y de este modo inducir una respuesta por choque térmico (Yamada *et al.*, 2007). En este experimento se observó justo lo contrario de lo que se suponía que pasaría, es decir que una concentración de GDM que por sí sola no inhibía el crecimiento de las plántulas agravaba el efecto de la NE, aumentando su toxicidad (Figura R.4). Una revisión más exhaustiva de la bibliografía reveló que la inhibición de HSP90 por la GDM también provoca un aumento del nivel de proteínas polibutiquitinadas (Nishizawa-Yokoi *et al.*, 2010), seguramente ya que HSP90 también está implicada en el ensamblaje y el mantenimiento del proteasoma 26S en levadura (Imai *et al.*, 2003) y células animales (Yamano *et al.*, 2008), de modo que la inhibición de HSP90 reduce la actividad del sistema UPS, y esto provoca a

su vez que la célula no pueda degradar con normalidad las proteínas desnaturalizadas, por lo que las proteínas poliubiquitiladas tienden a acumularse.

En cuanto a la posible interferencia de la NE en la hipusinación de eIF5A, el estudio de las isoformas de eIF5A de plántulas tratadas o no con NE reveló que estas últimas tenían un perfil muy distinto de las plantas control (Figura R.5). En concreto con las plantas tratadas con NE hay una forma proteica de eIF5A de punto isoeléctrico más ácido con niveles incrementados. Estudios recientes en el laboratorio del Dr. A. Ferrando han demostrado que dicha señal corresponde a las formas no hipusinadas de eIF5A. Estos datos sugieren que, o bien la hipusinación del factor eIF5A se encuentra comprometida en presencia de NE por un posible efecto de competición con la SPD por el sustrato, o bien que la NE conduce a una estabilización proteica de formas no hipusinadas del factor que en condiciones normales no son detectables, o ambos efectos simultáneos.

Con los resultados obtenidos en este apartado es posible afirmar que la NE afecta de alguna manera a la homeostasis de proteínas, si bien el posible efecto de la NE sobre la síntesis de proteínas queda descartado con el estudio de la expresión de HsfA2, la interacción con la GDM sugiere que la NE podría tener algún efecto a nivel del sistema UPS o de la autofagia.

3 EFECTO DE LA NORESPERMIDINA Y LA ESPERMIDINA EN EL CRECIMIENTO EN PLANTAS, LEVADURA Y CÉLULAS *HeLa*

Antes de continuar analizando el efecto de la NE sobre los sistemas de control de la homeostasis de proteínas, se quiso averiguar si la NE tenía un efecto similar sobre distintos organismos superiores. Para ello se realizaron distintos experimentos de viabilidad y muerte celular en *A. thaliana*, *S. cerevisiae* y líneas celulares humanas *HeLa*.

En primer lugar se observó que en *Arabidopsis* niveles altos de SPD no son tan tóxicos como la NE (Figura R.6). Esto podría ser debido simplemente a que como la SPD está presente en condiciones normales y la NE no, el catabolismo de poliaminas está más adaptado a ella que a la NE, que no suele darse de forma natural en ésta, además como se ha comentado en la introducción, la enzima SAMDC (implicada en la síntesis de SPD y SPM) se inhibe en presencia de niveles altos de poliaminas superiores, por lo que en presencia de SPD externa se reduciría la síntesis de SPD para compensar. De manera similar, puede que la NE sea también capaz de inhibir a la enzima SAMDC, pero en este caso la NE no

puede sustituir a las PAs superiores naturales por lo que esta inhibición también aumentaría la toxicidad de la NE.

En el caso de la levadura altas dosis de NE y SPD tienen un efecto similar en la inhibición del crecimiento, además de que se requieren dosis más altas de ambas para lograr un efecto similar a *Arabidopsis*, salvando las distancias (Figura R.7). De manera similar a lo que ocurre en levadura, la NE parece ser menos efectiva en las células *HeLa* que en *Arabidopsis* (Figura R.10). Esto podría ser debido al distinto sistema de degradación de PAs, ya que en levadura (y en animales) antes de la degradación de las PAs por las enzimas PAO hay un paso de acetilación previa llevado a cabo por la enzima SSAT, la cual no existe en las plantas. Los valores de Km de la enzima SSAT para la SPD, la SPM y la NE son de 130, 34 y 9 μM , respectivamente (Della Ragione y Pegg, 1983), mientras que la Km de la enzima PAO3 de *Arabidopsis* para la SPD, la SPM y la NE son de 204, 588 y 184 μM , respectivamente (Moschou y Roubelakis-Angelakis, comunicación personal). Esto significa que efectivamente la enzima SSAT es más efectiva acetilando la NE (y el resto de PAs) que la enzima PAO3 degradando NE (o el resto de PAs) y en principio podría explicar la mayor tolerancia a las PAs de la levadura y las células *HeLa*. Continuando con el efecto de la NE en levadura, la NE tiene efectos muy distintos en función del medio de crecimiento de la levadura. Mientras que en YPD con 6 mM NE se inhibe el crecimiento por completo, en medio mínimo SCD se requiere 12 mM NE para lograr un efecto similar (Figura R.7). Tal y como se ha explicado en los resultados, puede que la alta concentración de sulfato amónico (38 mM) del medio mínimo esté interfiriendo en la toma de NE por la levadura, de modo que en medio mínimo la toma de esta sustancia sea menor ya que está compitiendo con el sulfato amónico por los canales de entrada. Por otro lado, como se verá más adelante esta diferencia en la tolerancia de la levadura a la NE en función del medio no es trivial, ya que en los experimentos de longevidad cronológica se usa el medio SCD y una concentración de PAs de 4 mM, que en este medio no inhibe el crecimiento en absoluto, mientras que si se realizase un experimento similar en YPD la concentración de NE debería ser mucho más baja ya que 4 mM en YPD inhibe el crecimiento por completo.

Debido a que los resultados anteriores mostraban indicios de que la NE podría estar perturbando la homeostasis de proteínas, induciendo una respuesta a choque térmico, se investigó la posible interacción de esta sustancia con otros tratamientos que provocan desnaturalización de proteínas. En este caso por un

lado se vio que un tratamiento de choque térmico suave aumentaba la toxicidad de esta sustancia, mientras que por otro lado no se apreció ninguna interacción de la NE con la *unfolded protein response* (Figura R.9). Este resultado apunta en la misma dirección que el experimento con GDM realizado en *Arabidopsis* en el sentido de que, si como el experimento con la GDM sugiere, la NE estuviera inhibiendo el sistema UPS, la célula sería mucho más sensible a un tratamiento suave por choque térmico que provoca una desnaturalización general del proteoma, como de hecho ocurre en levadura.

Finalmente, también se observó que la NE es capaz de provocar muerte celular tanto en levadura como en células *HeLa* (Figuras R.8 y R.10). Este hecho está bastante bien documentado en la bibliografía ya que como se ha comentado en la introducción altos niveles de poliaminas causan muerte celular (Kusano *et al.*, 2008). De hecho, y pese a que hay una miríada de tratamientos que causan muerte celular, es interesante destacar que sustancias que inhiben el sistema UPS provocan muerte celular tanto en animales como levadura (Frezza *et al.*, 2011).

4 LA NORESPERMIDINA INHIBE LA REACCIÓN DE POLIUBICUITILACIÓN

A la vista de los resultados anteriores, tanto la inducción de ambas isoformas de HsfA2, como la interacción de la NE con la GDM en plantas y la sensibilidad a choque térmico que confiere la NE en levadura sugerían de forma clara un efecto de la NE en la homeostasis de proteínas, seguramente a nivel de los sistemas de degradación de proteínas. Debido a esto se decidió analizar los niveles de proteínas poliubicitiladas en plantas, levadura y líneas *HeLa* tratadas con NE. En este caso se esperaba obtener un aumento de los niveles de proteínas poliubicitiladas porque se asumía que la NE actuaría inhibiendo el proteasoma. Sin embargo, el resultado de estos estudios fue justamente el contrario al esperado, ya que se observaba una clara reducción de los niveles de proteínas poliubicitiladas en todos los organismos estudiados (Figuras R.11 y R.12). Esto daba pie a tres hipótesis de trabajo: la primera es que la NE estuviera inhibiendo directamente la síntesis de proteínas, la segunda que la NE estuviera activando la actividad del proteasoma y la tercera que la NE estuviera inhibiendo las reacciones de poliubicitilación. Para estudiar la primera hipótesis se realizó un experimento de síntesis de proteínas *in vitro* basado en un sistema de germen de trigo, en el cual efectivamente la adición de NE inhibía de forma clara la síntesis de proteínas (Figura R.18). Sin embargo en este sistema se observó que el tampón de reacción tenía 0,5 M de SPD, ya que como se ha comentado anteriormente la

adición de PAs a los sistemas de síntesis de proteínas *in vitro* es práctica usual, puesto que las PAs aumentan la eficiencia y la fidelidad del transcrito, sin embargo a partir de ciertos niveles las PAs inhiben por completo la síntesis (Atkins *et al.*, 1975). En el caso de nuestro experimento *in vitro*, el tampón de reacción venía preparado con 0,5 mM SPD, que es el considerado óptimo para una máxima síntesis de proteínas. Esto provocaba que el dato sin NE ya tuviese 0,5 mM SPD, mientras que la adición de NE fue de 0,5, 1, 1,5 etc... esto significa que el primer punto con NE tenía una concentración total de PAs de 1 mM (0,5 SPD + 0,5 NE) y Atkins *et al.* (1975) estimaron que a partir de 0,8 mM la concentración de PAs es excesiva y el sistema pierde eficiencia rápidamente. Debido a esto, con este experimento no se puede deducir el posible efecto que la adición de NE pueda tener *in vivo*. Por otro lado, hay varios experimentos realizados hasta ahora que sugieren que la NE no debería estar interfiriendo en la síntesis de proteínas, ya que se comporta de forma distinta al AZC, además las interacciones con la droga GDM y el aumento de sensibilidad a choque térmico sugieren justamente lo contrario. Finalmente, los datos de los *microarrays* no se corresponden con los de una sustancia que inhiba la síntesis de proteínas. La segunda hipótesis que explicaría la reducción de los niveles de proteínas poliubiquitiladas sería que la NE estuviera aumentando la actividad del proteasoma. Para comprobar si esto era así se utilizó un tratamiento conjunto de la NE con un inhibidor del proteasoma (MG132). Este experimento demostró que tras la inhibición del proteasoma las proteínas poliubiquitiladas tendían acumularse tanto en plántulas tratadas o no con NE, si bien en el caso de la NE esta acumulación era menor, esto sugiere que en principio la NE no debería estar actuando a nivel del proteasoma sino en un paso previo de la ruta UPS (Figura R.11.B). Finalmente, para comprobar la tercera hipótesis, que la NE estuviese inhibiendo la poliubiquitilación de proteínas, se realizaron varios ensayos de poliubiquitilación *in vitro* en presencia o ausencia de NE y SPD. En estos ensayos de *in vitro* que la cantidad de enzima E3 autoubiquitilada (que es lo que se suele medir en estos casos), disminuía drásticamente en presencia de NE, y en menor medida de SPD, mientras que los niveles de enzima E1 y E2 ubiquitilados permanecían relativamente invariables (Figura R.13). En el mismo experimento se utilizaron solamente las enzimas E1 y E2 (sin E3) sin que se apreciara ningún efecto significativo. Esto sugiere que la NE (y la SPD) no interfiere en la activación de la ubiquitina por la E1, ni en el paso del grupo ubiquitilo a la E2, pero sí que interfiere en la transferencia del grupo ubiquitilo a la E3 (en este experimento la proteína diana). Como se ha comentado en la

introducción, la conjugación del grupo ubiquitilo a la E1 y E2 se realiza a través de un enlace tioéster, mientras que el enlace del grupo ubiquitilo a la proteína diana mediante la E2 es un enlace peptídico en una lisina libre. Puesto que la NE (y la SPD) tienen una estructura similar a la lisina (Figura D.1) se podría suponer que estas sustancias podrían competir con las proteínas diana por el sitio activo de la enzima E2, al que debe acceder la lisina libre, de modo que o bien la interacción E2-NE sería irreversible, o bien la E2 transferiría el grupo ubiquitilo a la NE. En cualquier caso, esta interacción disminuiría la eficiencia de la transferencia de grupos ubiquitilos a las proteínas diana y explicaría la reducción en los niveles de proteínas poliubiquitiladas visto anteriormente. En este caso la mayor eficiencia de la NE sería debido a que sus dos extremos parecen residuos de lisina, mientras que con la SPD sólo uno de ellos está formado por cuatro carbonos (el otro extremo tiene sólo tres). Por otro lado, en un experimento en el que se utilizó un rango más grande de concentraciones de NE se pudo determinar que el IC₅₀ de la NE para la inhibición de transferencia del grupo ubiquitilo de la enzima E2 a la E3 es de 82 µM NE. Esta concentración es relativamente baja comparada con la de los tratamientos empleados (3-12 mM). Sin embargo, como se ha comentado en la introducción, la cantidad de triaminas libres en el interior celular (que son las que podrían interactuar con la reacción de poliubiquitilación) representa entre el 15% y el 7% del total (Watanabe *et al.*, 1991). De modo que, asumiendo que el 100% de la NE externa penetra al interior celular, 3 mM NE en el interior celular equivaldrían a entre 450-210 µM de NE libre, por lo que la actividad se reduciría de forma estimada al 35-42% de la inicial. De modo que en teoría podríamos estar reduciendo la actividad de la enzima E2 más de un 75% bajo nuestras condiciones. Este efecto no es trivial, ya que aunque se conocen varias sustancias (como el Bortezomib) que son capaces de inhibir al proteasoma 26S, aún no se ha descrito ninguna sustancia capaz de inhibir la reacción de poliubiquitilación. Además, como se ha visto, este efecto está conservado en plantas, levadura y células humanas por lo que aparte su efecto se puede exportar a todos los organismos eucariotas. Este resultado puede tener bastante interés, ya que la actividad UPS está adquiriendo una gran importancia tanto en el campo del cáncer (Micel *et al.*, 2013), como en el de las enfermedades neurodegenerativas (Ying *et al.*, 2013) y la longevidad (López-Otín *et al.*, 2013), por lo que una nueva herramienta en este campo puede ser especialmente útil.

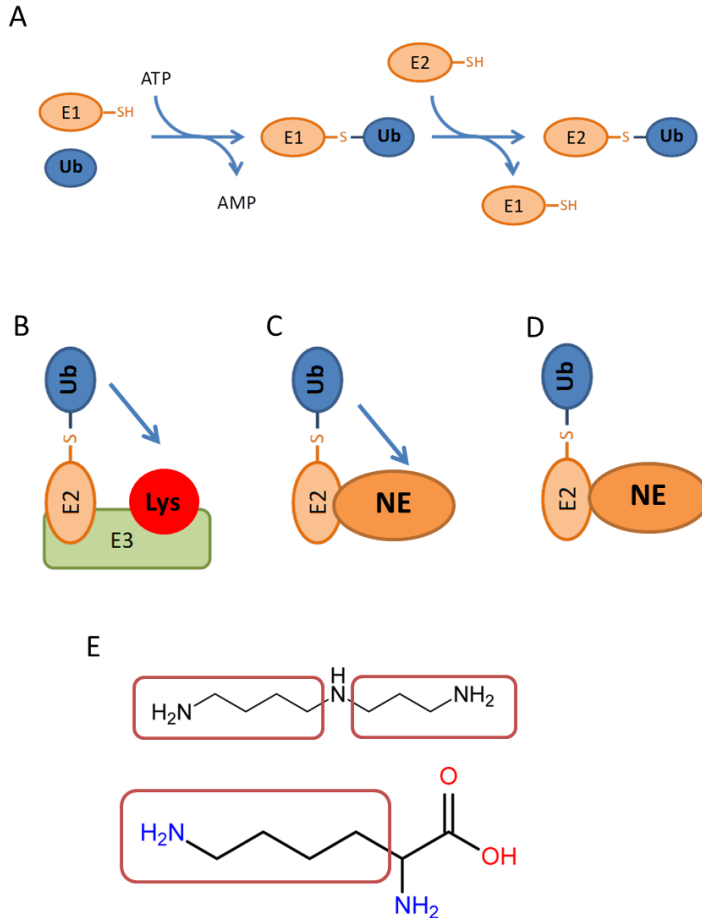


Figura D.1: Modelo hipotético de inhibición de la ubiquitilación por la NE. Los resultados experimentales han demostrado que la NE no inhibe ni la activación de la ubiquitina por la E1, ni la transferencia del grupo ubiquitilo a la E2, seguramente por el tipo de enlace tioéster que se forma (A). En condiciones *in vitro* y en ausencia de proteína diana la E2 cargada tiende a transferir el grupo ubiquitilo principalmente a la E3 (B), formando un enlace peptídico con un residuo de lisina libre. En este caso la NE podría (C) interactuar con la E2 de modo que el grupo ubiquitilo es transferido a un grupo amino de la NE formando un enlace peptídico, o (D) interactuar de forma irreversible con la E2 de forma que ésta no puede transferir el grupo ubiquitilo a nadie. Esto sería posible debido a la homología estructural de la NE con la lisina (E), ya que ambas tienen un grupo amino unido a una cadena de 4 carbonos (enmarcado en rojo), que podría entrar al sitio activo de la E2.

5 ACCIÓN DE LA NORESPERIMIDINA EN LA ESTABILIDAD DE PROTEÍNAS

Si efectivamente la NE era capaz de inhibir los procesos de poliubiquitilación de proteínas, esto explicaría la inducción de la respuesta por choque térmico visto en el análisis de la respuesta transcripcional a la NE, además de los otros experimentos: en el caso de la GDM, puesto que esta droga está inhibiendo el proteasoma, la inhibición de la poliubiquitilación por la NE agravaría aún más la reducción de la actividad UPS y explicaría el aumento de toxicidad. En cuanto a la sensibilidad a choque térmico que confiere la NE, a la vista de los resultados resulta obvio que al inhibir la poliubiquitilación las proteínas desnaturalizadas por el choque térmico no pueden ser degradadas y se acumulan aumentando de este modo la toxicidad. Finalmente también se explicaría de este modo la inducción distinta de las isoformas de HsfA2 comparadas con un choque térmico y con el tratamiento con AZC.

Otro efecto que se esperaba de una inhibición en la poliubiquitilación sería que las proteínas que deben ser degradadas por el UPS, ya sea porque se han desnaturalizado o porque ya no son requeridas (como en el caso de algunos reguladores hormonales o reguladores del ciclo celular) tenderían a acumularse. De modo que para comprobar *in vivo* la acción de la NE sobre la poliubiquitilación nos propusimos estudiar la estabilidad de proteínas diana del sistema UPS. En el primer experimento se utilizó *Arabidopsis* como organismo modelo y se estudió la estabilidad de una proteína DELLA en presencia de GAs. Como se ha comentado en la introducción, las proteínas DELLA son represoras de la respuesta a GAs y son degradadas por el UPS en presencia de estas hormonas vegetales. Como era de esperar, la NE estabilizó la proteína DELLA en presencia de GAs, de modo que se confirma *in vivo* la inhibición de la poliubiquitilación de la NE en *Arabidopsis* (Figura R.14). Este experimento tiene implicaciones importantes ya que muchas respuestas hormonales en plantas tienen algún receptor que necesita ser degradado para inducir la respuesta hormonal (Vierstra, 2009), de modo que la NE podría estar interfiriendo en la respuesta hormonal a nivel general en las planas. De hecho en el *microarray* descrito anteriormente se ven muy inducidos genes relacionados con la respuesta hormonal, efecto que podría ser explicado por efectos similares con otros procesos de señalización hormonal en los que interviene activamente el sistema UPS.

A continuación se quiso observar si las proteínas mal plegadas se acumulaban en presencia de NE debido a su efecto sobre la poliubiquitilación. Para ello se realizaron dos experimentos bastante comunes en el campo de la

estabilidad de proteínas en levadura. El primero de ellos se basó en la expresión controlada de una proteína foránea incapaz de plegarse correctamente tras su traducción (VHL-GFP), por lo que resulta una diana perfecta para el UPS. En este experimento se vio que efectivamente la NE era capaz de estabilizar la proteína una vez su síntesis había sido detenida, confirmando la inhibición del UPS por parte de la NE (Figura R.15). Por otro lado, para el segundo experimento se midió la presencia e inducción de una proteína *Heat Shock* de tipo 100 (HSP104). Este tipo de proteínas, como se ha visto en la introducción interaccionan con agregados de proteínas que se van formando cuando el sistema UPS se ve desbordado. En este caso se vio que con NE esta proteína se veía altamente inducida y tendía a acumularse en puntos específicos del citosol donde en teoría se estarían formando los agregados de proteínas desnaturalizadas que no podían ser degradadas (Figura R.16). Estos resultados nos permiten confirmar *in vivo* la acción de la NE en la inhibición del UPS en levadura, ya que tras su tratamiento se observa una estabilización de proteínas diana del sistema UPS y una acumulación de proteínas mal plegadas en forma de agregados, que es el síntoma típico de un UPS desbordado (Tyedmers *et al.*, 2010).

Finalmente se quiso comprobar si la NE era capaz de estabilizar proteínas en células humanas, puesto que se había visto previamente que esta sustancia era capaz de reducir los niveles de proteínas poliubiquitinadas al igual que en plantas y animales. Para ello se intentó estabilizar distintas proteínas de tipo ciclina y la proteína antitumoral p53. No obstante en este caso no se logró estabilizar ninguna proteína, sino más bien lo contrario (Figura R.17.B). En levadura tampoco se pudieron estabilizar proteínas con función ciclina (Figura R.17.A). En ambos casos, se cree que la falta de estabilización se debió que estas proteínas están implicadas en la regulación del ciclo celular y la entrada en apoptosis, procesos en los que las poliaminas tienen efectos importantes (Kusano *et al.*, 2008; Ray *et al.*, 1999) de modo que es difícil predecir la estabilidad de proteínas que pueden reaccionar a tantos procesos distintos todos ellos desencadenados por la adición PAs. En retrospectiva, en el caso de células animales hubiera sido buena idea hacer un experimento para comprobar los niveles de agregación de proteínas mal plegadas o comprobar la estabilidad de una proteína foránea, de manera similar a lo visto en levadura.

Pese a todo, los resultados obtenidos en este trabajo permiten afirmar que efectivamente la NE (y en menor medida la SPD) son capaces de inhibir la

poliubiquitilación de proteínas, y que este efecto provoca alteraciones a distintos niveles, básicamente debido a la pérdida de la homeostasis de proteínas.

6 EFECTO DE LA NORESPERMIDINA EN LA HOMEOSTASIS DE AMINOÁCIDOS

Como se ha comentado en la introducción, hasta hace poco se pensaba que el principal efecto tóxico derivado de la inhibición del sistema UPS era una acumulación masiva de proteínas mal plegadas, no obstante un estudio ha demostrado recientemente que la inhibición del proteasoma provoca una carencia de aminoácidos en la célula que puede ser letal (Suraweera *et al.*, 2012), demostrando así que reducir la actividad del proteasoma inhibe la síntesis de proteínas debido a la falta de aminoácidos disponibles.

Puesto que la NE aparentemente actuaba a nivel de las enzimas E2, reduciendo la degradación de proteínas, se quiso averiguar si esta inhibición de la actividad UPS provocaba una bajada en los niveles de aminoácidos como ocurría en el caso de inhibir la actividad del proteasoma por otros métodos. Efectivamente, la adición de aminoácidos a un medio ya rico en aminoácidos (YPD), confería una gran tolerancia a la NE en levadura (Figura R.19). Esto en un principio nos llevó a pensar que la NE podía estrar inhibiendo de forma competitiva la entrada de aminoácidos al interior celular (ya que ambos compuestos tienen grupos amino y pueden utilizar los mismos canales de entrada). No obstante el experimento de toma de leucina radioactiva en medios suplementados o no con NE demostró que la NE no interfería en la toma, descartando así esta hipótesis. En el siguiente experimento se quiso comprobar si la adición de AAs tenía algún efecto sobre los niveles de proteínas poliubiquitiladas y/o sobre el estado de fosforilación de eIF2 α (dicho factor se fosforila en condiciones de ayuno de AAs) en presencia o ausencia de NE/SPD. Sorprendentemente, los AAs no alteraban de manera significativa la reducción de las proteínas poliubiquitiladas causada por la NE/SPD. Pero lo más interesante era que el tratamiento con NE/SPD causaba una fosforilación de eIF2 α en ausencia de un suplemento de AAs, pero que dicha fosforilación no se observaba con un suplemento de AAs (Figura R.20). Además también se comprobó que el tratamiento con NE/SPD induce la expresión postranscripcional de GCN4 dependiente de eIF2 α , que es una lectura molecular del grado de fosforilación de este factor de inicio de la traducción. Estos resultados unidos al hecho de que los AAs confieren tolerancia a la NE/SPD apuntan a que de manera similar a los

inhibidores del proteasoma, la reducción de la actividad UPS causada por estas poliaminas ocasiona una bajada de los niveles de aminoácidos disponibles, y apunta a que dicha bajada activará el sistema GAAG a través de GCN2, ya que se descartó que la NE estuviera inhibiendo la toma de AAs (Figura R.21).

Por ello, para estudiar el efecto de la NE/SPD sobre la ruta GAAC se estudiaron varios mutantes en esa ruta. Los resultados obtenidos mostraron que los mutantes de pérdida de función $\Delta gcn2$ (la quinasa que activa a eIF2 α) y $\Delta gcn4$ (el factor de transcripción cuya expresión se induce cuando eIF2 α está fosforilado) resultaron ser sensibles a la NE, mientras que el mutante GCN2^C que expresa de forma constitutiva una forma activa de GCN2 resultó ser tolerante a ella (Figura R.22). Esto tiene sentido puesto que la ruta GAAC se activa en respuesta al ayuno de AAs, parando la síntesis de proteínas de forma general y promoviendo la biosíntesis y la toma de aminoácidos. Si inactivamos la ruta GAAC (mutantes $\Delta gcn2$ y $\Delta gcn4$), la célula es incapaz de responder al ayuno de aminoácidos, de manera que sus niveles de AAs caen rápidamente, ocasionando una parada letal de la síntesis de proteínas. Por el contrario, si activamos la ruta GAAC (mutante GCN2^C), la célula está mejor preparada para afrontar una bajada en los niveles de AAs, ya que está de forma permanente reprimiendo la síntesis de proteínas e induciendo las rutas de toma y biosíntesis de AAs.

A raíz de estos resultados, podemos ofrecer un modelo de la toxicidad de la NE/SPD. La NE, a través de la inhibición de la actividad de la enzima E2, reduce la actividad del sistema UPS, con la consiguiente acumulación de proteínas desnaturalizadas. No obstante dicha acumulación no es la mayor causa de toxicidad, sino que al inhibir el sistema UPS se reduce el reciclaje de AAs ya que las proteínas desnaturalizadas no son degradadas a AAs libres. Esto provoca una bajada de los niveles de AAs disponibles que eventualmente activa la ruta GAAC, inhibiendo la síntesis de proteínas y si esta situación se mantiene se induce autofagia y muerte celular. No obstante si a células tratadas con NE/SPD se las suplementa con AAs, se observa la misma acumulación de proteínas desnaturalizadas pero no se observa la bajada de AA puesto que la ruta GAAC no se activa, de modo que la célula puede sobrevivir a pesar de que tiene una alta cantidad de proteínas desnaturalizadas que no se han podido degradar (Figura D.2). Una de las cosas que se pueden deducir de este modelo es que si de alguna manera se puede reducir la síntesis de proteínas a la vez que la NE inhibe la

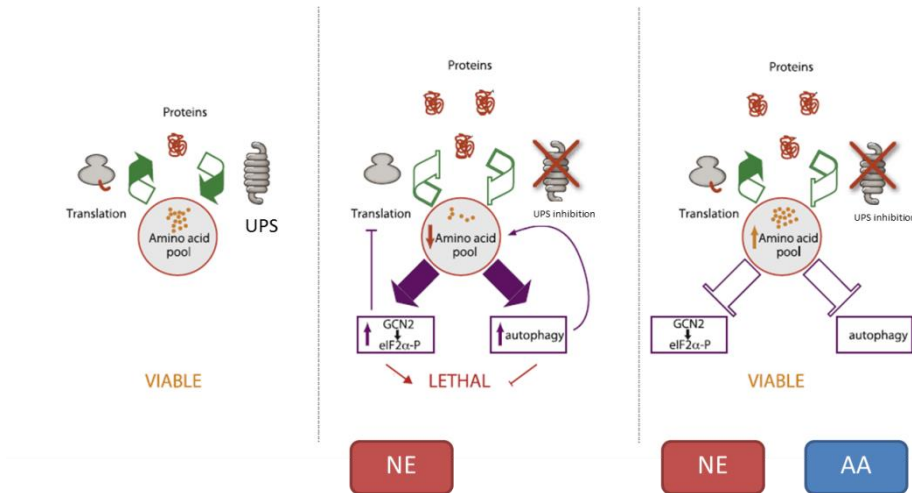


Figura D.2: Modelo de la toxicidad de la NE/SPD. En condiciones normales la cantidad de AAs disponible permanece relativamente constante y los sistemas de traducción y degradación funcionan con normalidad. En presencia de NE, la actividad UPS se reduce, dando como resultado un aumento de las proteínas mal plegadas y reduciendo los AAs disponibles para sintetizar nuevas proteínas. Esta bajada general de los niveles de AAs activa la ruta GAAC a través de GCN2, de modo que se produce una parada general de la síntesis de proteínas y se inducen procesos de autofagia que eventualmente acabarán en muerte celular. Si se trata con NE y se suplementa con AAs, se observa la misma inhibición de la actividad UPS con la consiguiente acumulación de proteínas desnaturalizadas, pero debido a la adición externa de AAs, los niveles intracelulares de AAs permanecen constantes y la ruta GAAC no es activada, por lo que la síntesis de proteínas no está alterada y la célula continúa siendo viable. Adaptado de Suraweera *et al.* (2012).

actividad del UPS, los niveles intracelulares de AAs deberían permanecer constantes y no se activaría la ruta GAAC, por lo que la célula continuaría siendo viable. De modo que para comprobar esta teoría se trataron cultivos de levadura con NE y con CHX (un inhibidor de la síntesis de proteínas). De acuerdo con el modelo de toxicidad propuesto de la NE, tras un tratamiento de 24h las células tratadas con NE y CHX tenían más viabilidad que aquellas tratadas únicamente con NE (Figura R.23).

Tal y como se ha comentado en la introducción, hay dos rutas mayoritarias capaces de percibir el ayuno de AAs: la ruta GAAC y la ruta TORC1. En este estudio nos hemos centrado en la ruta GAAC ya que esta responde a la carencia de la mayoría de AAs, a diferencia de la ruta TORC1 en la que este complejo solamente responde a algunos AAs específicos, además de que esta ruta es sensible a otros muchos procesos, por lo que es difícil intentar encontrar

respuestas específicas. Dicho esto, se han realizado una serie de experimentos para comprobar si el tratamiento con NE inhibe TORC1. En el primer experimento se observa que tanto el mutante de pérdida de función Δtor1 como Δgln3 (que actúa aguas debajo de TORC1 regulando la respuesta al ayuno de nitrógeno) son sensibles a la NE, lo cual sugiere que la inhibición de la ruta TORC1 aumenta la toxicidad de la NE (Figura R.24). Esto es inesperado ya que TORC1 se inhibe en condiciones de ayuno (al igual que la ruta GAAC se activa), de modo que uno esperaría que una pre-inhibición de la ruta TORC1 conferiría tolerancia a la NE, de manera análoga a lo visto con la ruta GAAC. En cualquier caso, el experimento de la localización subcelular del factor de transcripción Msn2 sugiere que la NE, seguramente debido a la caída en los niveles de AAs libres, inhibe la actividad TORC1 (Figura R.25), no obstante este factor transcripcional no está regulado únicamente por la ruta TORC1, sino que también está regulado por la ruta de la proteína quinasa A (PKA) que responde a los niveles de ATP intracelulares y a otros estreses (Görner *et al.*, 1998), de hecho la comunidad científica no se pone de acuerdo en cuál es la ruta mayoritaria que regula la migración al núcleo de Msn2, ya que hay artículos que apuntan a ambas rutas (Görner *et al.*, 1998; Beck y Hall 1999; Powers *et al.*, 2006). De este modo, y tal y como se ha comentado en la introducción, la mejor forma de averiguar si la NE inhibe la actividad de TORC1 consistiría a medir el estado de fosforilación de SCH9.

En cualquier caso, queda claro que la NE se comporta de manera similar a otros inhibidores del UPS, en el sentido de que una inhibición del UPS provoca una bajada en los niveles de AAs intracelulares. Además, se ha demostrado que el tratamiento con NE actúa en ambas rutas que responden al ayuno de nutrientes, induciendo la ruta GAAC e inhibiendo la ruta TORC1.

7 EFECTO DE LA NORESPERMIDINA EN LA LONGEVIDAD CRONOLÓGICA EN LEVADURA

Como se ha comentado anteriormente, recientemente se ha sabido que la SPD es capaz de aumentar la LC de la levadura a través de la inducción de la autofagia (Eisenberg *et al.*, 2009). Ya que en este trabajo se ha observado que tanto la NE como la SPD son capaces de provocar un ayuno de nutrientes a través de la inhibición de la actividad UPS, nos planteamos si a través de dicho mecanismo la NE sería capaz de aumentar la LC de manera similar a la SPD. Efectivamente, en los resultados mostrados en este trabajo queda claro que ambas sustancias aumentan la LC de manera similar (Figura R.26), de hecho parece que la NE sea más efectiva en este sentido que la SPD. Esto se podría explicar aduciendo las mismas razones que se han aportado para explicar la mayor toxicidad de la NE frente a la SPD y no se van a volver a nombrar aquí. Una cosa que sí que merece la pena señalar es que las concentraciones de NE y SPD usadas en los experimentos de longevidad (que se realizan en medio SCD modificado) son tóxicas si se usan en medio rico (YPD). Como se ha discutido anteriormente, esta diferencia en la toxicidad seguramente sea debida a la distinta concentración de sulfato amónico en estos medios, no obstante es interesante señalar la distinta toxicidad de estas sustancias en función del medio sobre el que se añaden. También es importante señalar que en los experimentos de longevidad realizados en este trabajo, tanto el control silvestre como el resto de cepas presentan una LC bastante más alta que en otros trabajos del mismo campo: el control silvestre puede sobrevivir en nuestros experimentos más de 20 días mientras que en otros trabajos suele morir sobre los 15 (Eisenerg *et al.*, 2009). Esto es debido a que en nuestros experimentos el medio SCD ha sido tamponado a pH 5,5 con ácido succínico mientras que en el resto de trabajos el medio no suele tamponarse. La razón que nos llevó a tamponar el medio es doble: por un lado, en los experimentos de LC el medio tiende a acidificarse por la acumulación de ácido acético derivado del metabolismo de la glucosa y este tiende a ser tóxico en el medio, reduciendo la LC (Burtner *et al.*, 2009). Por otro lado la NE, al tener naturaleza policatiónica, tiende a subir el pH, y esto reduce la toxicidad del ácido acético, de forma que si no se hubieran realizado los experimentos con medios tamponados el aumento de la LC por la NE sería en parte debido a que ésta tiende a subir el pH del medio y en parte a la acción de esta sustancia en el interior celular.

Tal y como se ha comentado en la introducción, tanto la ruta GAAC como la ruta TORC1 pueden influir en la LC. Puesto que se ha visto que la NE activa la ruta GAAC e inhibe la ruta TORC1, nos planteamos si el efecto sobre la longevidad de la NE podría estar mediado por una de estas rutas (o ambas).

En cuanto a la ruta GAAC, en primer lugar se estudió la LC de mutantes que activaban y reprimían la ruta GAAC en presencia y ausencia de NE (GCN4^C y Δ gcn2, respectivamente). En este caso se vio que ambos mutantes tenían una menor LC comparada con el control silvestre y que ámbos eran capaces de responder a un tratamiento con NE, aumentando de este modo su longevidad (Figura R.27). Alvers *et al.* (2009) observaron que tanto el mutante Δ gcn4 como GCN4^C (la expresión constitutiva de GCN4) tenían un LC similar al control silvestre, pero que al ser suplementados con los AAs isoleucina, treonina y valina el mutante constitutivo GCN4 no aumentaba la LC, pero que el mutante de pérdida de función respondía mucho mejor que el control silvestre. De manera similar Wu *et al.*, (2013) observaron que GCN2 era necesario para el aumento de la LC obtenido por una adición de ácido glutámico y/o una reducción de la metionina del medio. Los resultados de estos dos estudios están de acuerdo en el sentido de que la ruta GAAC es necesaria para la LC mediada por un suplemento de AAs no esenciales. Por el contrario, parecen contradecirse en el sentido de que si se reduce la cantidad de metionina en presencia de GCN2, éste percibirá la presencia de tRNA-Met no cargados y activará la ruta GAAC, situación que según Alvers *et al.*, parece reducir la LC. Si comparamos nuestros experimentos con estos dos estudios, la LC reducida del mutante GCN2^C parece estar de acuerdo con los resultados de Alvers *et al.*, ya que este mutante tendrá activa la ruta GAAC. Por el contrario nuestro mutante Δ gcn2 tiene una LC reducida y en los experimentos de Wu *et al.*, esto no se observa. En resumen podemos concluir que la ruta GAAC es necesaria para la LC, pero que una actividad GAAC muy alta (GCN2^C) o muy baja (Δ gcn2) reduce de forma importante la LC. Además con los resultados obtenidos parece que esta ruta no esté mediando el efecto de la NE ya que ambos mutantes responden de manera similar que el control silvestre a la NE.

En cuanto a la ruta TORC1, en primer lugar se ha visto que la inhibición de ésta aumenta la toxicidad de altas concentraciones de NE en los ensayos de viabilidad celular y que la NE seguramente sea capaz de inhibir TORC1 probablemente debido a la bajada en los niveles de AAs disponibles. Por otro lado en el experimento de longevidad con mutantes de la ruta TORC1 se vio que tanto Δ tor1 como Δ gln3 (que poseen de forma innata una mayor LC que el control silvestre;

Powers *et al.*, 2006) responden también al tratamiento con NE aumentando aun más su LC (Figura R.29). La observación más interesante es que el mutante Δtor1 parece ser hipersensible a la acción de la NE (de manera similar a lo visto en cuanto a muerte celular), ya que ésta aumenta proporcionalmente su LC comparado al control silvestre un 50% más. En el estudio de Wu *et al.*, se observó que el mutante Δtor1 respondía igual que el control silvestre a un aumento del ácido glutámico/reducción de la metionina. No obstante el mutante Δsch9 (una proteína quinasa situada aguas abajo de TORC1) demostró ser insensible a la reducción de la metionina pero no a la adición de ácido glutámico. Así que al parecer el aumento de la LC por la reducción de metionina está mediado por TORC1 y SCH9, y en el mutante Δtor1 esto no se observa debido a que, aunque tiene la actividad TORC1 reducida, al reducir los niveles de metionina ésta aun se puede reducir más. De este modo, los datos de la NE con el mutante Δtor1 podrían ser explicados del mismo modo: en condiciones normales este mutante tiene una actividad TORC1 reducida que le proporciona una mayor LC, pero al ser tratado con NE el efecto de ésta se potencia logrando una mayor LC (o una mayor toxicidad a dosis altas) debido a una mayor inhibición de TORC1. Tomando estos datos en conjunto, nosotros proponemos que el efecto de la NE sobre la LC debería de ser similar al de la reducción de la metionina observado por Wu *et al.* y debería de estar mediado por TORC1 y seguramente por SCH9 (pero no GLN3). Esta inhibición de la actividad TORC1 aumentaría la vida media a través de la autofagia, como ya se ha descrito ampliamente en la literatura (Rubinsztein *et al.*, 2008). No obstante en el *microarray* no se ha visto inducida ninguna categoría funcional relacionada con la autofagia, sin embargo no hay que olvidar que este *microarray* se realizó en plantas y no en levadura. En cuanto a la autofagia en levadura, los experimentos de muerte celular realizados en mutantes defectivos en autofagia no han dado diferencias significativas comparados con el control silvestre (datos no mostrados) y deberían hacerse nuevos experimentos encaminados en esta dirección. No obstante, en algunas de las Figuras que muestran fotos del microscopio confocal o fluorescente las células tratadas con NE presentan una vacuola sensiblemente más grande que las no tratadas lo cual parece sugerir que efectivamente la NE podría estar induciendo autofagia (Figuras R.15.A y R.25.A).

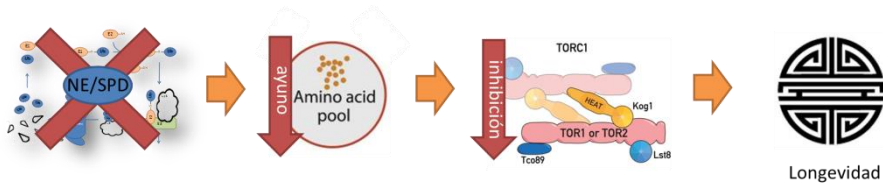


Figura D.3: Modelo propuesto del aumento de la longevidad mediada por NE/SPD. La NE/SPD reduce la actividad del UPS debido a su posible interacción con las enzimas E2, esto provoca una bajada de los niveles de AAs intracelulares que inhibe a TORC1, esta inhibición es transducida posiblemente a través de SCH9 induciendo autofagia y aumentando la longevidad.

Finalmente, en el estudio en el que se describieron por primera vez las propiedades antienvjecimiento de la SPD se observa que el aumento de la longevidad de la SPD está mediado por la autofagia y sugieren que esta inducción estaría inducida por una modificación de la cromatina causada por la capacidad de inhibir la actividad de distintas enzimas HAT de la SPD (Eisenberg *et al.*, 2009). Sin embargo en su estudio los autores dejan abierta la posibilidad de que haya otros mecanismos implicados capaces de inducir autofagia tras la adición de SPD. Con los resultados obtenidos en este trabajo nosotros proponemos un modelo alternativo al de Eisenberg *et al.* sobre el efecto antienvjecimiento de la NE/SPD (Figura D.3), aunque como bien discutieron Eisenberg *et al.*, puede que el efecto real de estas sustancias sea debido a estos dos mecanismos o incluso a un tercero. En nuestro modelo, la NE/SPD reduciría la actividad del sistema UPS a través de la reducción de los niveles de proteínas poliubiquitiladas de forma que eventualmente se reduciría la cantidad de AAs disponibles ocasionando la activación de la ruta GAAC y la inhibición de la ruta TORC1. Esta inhibición, seguramente transducida a través de SCH9, inducirá autofagia y aumentará la longevidad. Para finalmente validar esta hipótesis faltarían por realizar varios experimentos que, por razones de tiempo, no se han podido acometer: En primer lugar se debería estudiar si realmente la NE inhibe TORC1 a través del estudio de los niveles de fosforilación de SCH9. En segundo lugar se debería estudiar si realmente el tratamiento con NE está induciendo autofagia o no. Y finalmente se podría estudiar el efecto de la NE sobre la LC del mutante SCH9.

A modo de resumen, en este trabajo se ha observado que la NE y la SPD son capaces de inhibir la poliubiquitilación de proteínas, con consecuencias en el reciclado de AAs y en procesos de letalidad celular, efecto que no se ha descrito en ninguna otra sustancia hasta la fecha. Este efecto puede ser muy útil para

estudiar los mecanismos de homeostasis de proteínas en general y específicamente las enfermedades neurodegenerativas, además puede tener una aplicación potencial en la lucha contra el cáncer. Finalmente también hemos podido demostrar que la NE es capaz de aumentar la LC de la levadura de manera similar a la SPD, y se ha propuesto un nuevo modelo de inducción de la longevidad cronológica de estas sustancias mediado por TORC1.

CONCLUSIONES

1. El tratamiento con concentraciones milimolares de noespermidina induce genes de respuesta a estrés osmótico, térmico y oxidativo en *Arabidopsis*. Además esta sustancia tiene también efectos a nivel de la transcripción, la remodelación de la cromatina y el sistema UPS.
2. Las alteraciones de expresión génica se han podido explicar al demostrar que la noespermidina reduce los procesos de poliubiquitilación de proteínas en todos los organismos estudiados, lo cual causa un desequilibrio importante de la homeostasis de proteínas.
3. Se ha demostrado que tanto la noespermidina como la espermidina son capaces de inhibir la poliubiquitilación *in vitro* de proteínas, lo que explica su capacidad para reducir los niveles de proteínas poliubiquitiladas.
4. La reducción en los niveles de poliubiquitilación de proteínas por acción de la noespermidina produce la estabilización de proteínas que deberían ser degradadas por el sistema UPS y provoca una acumulación de proteínas mal plegadas.
5. La inhibición de la actividad UPS por la noespermidina y la espermidina provoca la activación de la ruta GAAC, efecto que puede ser paliado mediante la adición de aminoácidos al medio de cultivo que no alteran los niveles reducidos de proteínas poliubiquitiladas, de donde se infiere que el principal efecto tóxico de la NE se debe a la reducción de los niveles internos de aminoácidos y no a la acumulación de proteínas mal plegadas.
6. La noespermidina aumenta la longevidad cronológica de la levadura de manera similar a la espermidina y se propone que dicho aumento de la longevidad pueda ser debido a la inhibición de la ruta TORC1 por la reducción de los niveles de aminoácidos disponibles.

BIBLIOGRAFÍA

- Albanese V, Yam AY, Baughman J, Parnot C, Frydman J. 2006. System analyses reveal two chaperone networks with distinct functions in eukaryotic cells. *Cell* **124**: 75-88.
- Alberti S. 2012. Molecular mechanisms of spatial protein quality control. *Prion* **6**: 437-442.
- Alejandro S, Rodríguez PL, Bellés JM, Yenush L, García-Sánchez MJ, Fernández JA, Serrano R. 2007. An *Arabidopsis* quiescin-sulfhydryl oxidase regulates cation homeostasis at the root symplast-xylem interface. *EMBO J* **26**: 3203-3215.
- Alvers AL, Fishwick LK, Wood MS, Hu D, Chung HS, Dunn WA Jr, Aris JP. 2009. Autophagy and amino acid homeostasis are required for chronological longevity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Aging Cell* **8**: 353-369.
- Arrigo AP, Tanaka K, Goldberg AL, Welch WJ. 1988. Identity of the 19S "prosome" particle with the large multifunctional protease complex of mammalian cells (the proteasome). *Nature* **331**: 192-194.
- Atkins JF, Lewis JB, Anderson CW, Gesteland RF. Enhanced differential synthesis of proteins in a mammalian cell-free system by addition of polyamines.
- Beck T, Hall MN. 1999. The TOR signaling pathway controls nuclear localization of nutrient regulated transcription factors. *Nature* **402**: 689-692.
- Belting M, Mani K, Jonsson M, Cheng F, Sandgren S, Jonsson S, Ding K, Delcros JG, Fransson L. 2003. Glicipan-1 is a vehicle for polyamine uptake in mammalian cells: a pivotal role for nitrosothiol-derived nitric oxide. *J. Biol. Chem.* **278**: 47181-47189.
- Ben-Zvi AP, Goloubinoff P. 2002. Proteinaceous infectious behavior in non-pathogenic proteins is controlled by molecular chaperones. *J. Biol. Chem.* **277**: 49422-49427.
- Bengtson MH, Joazeiro CA. 2010. Role of a ribosome-associated E3 ubiquitin ligase in protein quality control. *Nature* **467**: 470-473.

- Binda M, Peli-Gulli MP, Bonfils G, Panchaud N, Urban J, Sturgill TW, Loewith R, De Virgilio C. 2009. The Vam6 GEF controls TORC1 by activating the EGO complex. *Mol Cell* **35**: 563-573.
- Boekhout V. Robert V. 2003. Yeasts in Food: Beneficial and detrimental aspects. Behr's Verlag. ISBN 978-3-86022-961-3.
- Brieger L. 1885. Ueber spaltungsprodukte der bacterien, zweite mittheilung. *Zeitschr Physiol Chem* **9**: 1-7.
- Bukau B, Weissman J, Horwich A. 2006. Molecular chaperones and protein quality control. *Cell* **125**: 443-451.
- Burtner CR, Murakami CJ, Kennedy BK, Kaeberlein M. 2009. A molecular mechanism of chronological aging in yeast. *Cell Cycle* **8**: 1256-1270.
- Calderwood SK, Murshid A, Prince T. 2009. The shock of aging: molecular chaperones and the heat shock response in longevity and aging-a mini-review. *Gerontology* **55**: 550-558.
- Casero RA, Pegg AE. 2010. Polyamine catabolism and disease. *Biochem J* **421**: 323-338.
- Chai Y, Shao J, Miller VM, Williams A, Paulson HL. 2002. Live-cell imaging reveals divergent intracellular dynamics of polyglutamine disease proteins and supports a sequestration model for pathogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**: 9310-9315.
- Chang YY, Liu HS, Liu HY, Chi WT, Want CN, Chang SH, Wang TT. 2007. A Heat-inducible transcription factor, HsfA2, is required for extension of acquired thermotolerance in Arabidopsis. *Plant Phys* **143**: 251-262.
- Chattopadhyay MK, Tabor CW, Tabor H. 2003. Spermidine but not spermine is essential for hypusine biosynthesis and growth in *Saccharomyces cerevisiae*: spermine is converted to spermidine in vivo by the fms1-amine oxidase. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**: 13869-13874.

- Cherkasova VA, Hinnebusch AG. 2003. Translational control by TOR and TAP42 through dephosphorylation of eIF2alpha kinase. *Genes Dev* **17**: 859-872.
- Childs AC, Metha DJ, Gerner WE. 2003. Polyamine-dependent gene expression. *Cell Mol Life Sci* **60**: 1394-1406.
- Ciechanover A, Heller H, Elias S, Haas AL, Hershko A. 1980. ATP-dependent conjugation of reticulocyte proteins with the polypeptide required for protein degradation. *Proc Natl Acad Sci USA* **77**: 1365-1368.
- Ciechanover A. 1998. The ubiquitin-proteasome pathway: On protein death and cell life. *EMBO J* **17**: 7151-7160.
- Ciechanover A, DiGiuseppe JA, Bercovich B, Orian A, Richter JD, Schwartz AL, Brodeur GM. Degradation of nuclear oncoproteins by the ubiquitin system in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**: 139-143.
- Cohen SS. 1998. A guide to the polyamines. *Oxford University Press*, New York.
- Crespo JL, Hall MN. 2002. Elucidating TOR signaling and rapamycin action: lessons from *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev* **66**: 579-591.
- Cruz MH. 2008. Drought stress and reactive oxygen species. *Plant Signal Behav* **3**: 156-165.
- Czechowski T, Stitt M, Altmann T, Udvardi MK, Scheible WR. 2005. Genome-wide identification and testing of superior reference genes for transcript normalization in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **139**: 5-17.
- Della Ragione F, Pegg AE. 1983. Studies of the specificity and kinetics of rat liver spermidine/spermine N1-acetyltransferase. *Biochem J* **213**: 701-706.
- Devine T, Dai MS. 2013. Targeting the ubiquitin-mediated proteasome degradation of p53 for cancer therapy. *Curr Pharm Des* **19**: 3248-3262.
- Di Como CJ, Arnd KT. 1996. Nutrients, via the Tor proteins, stimulate the association of Tap42 with tyrosine 2A phosphatases. *Genes Dev* **10**: 1904-1916.

- Dill A, Thomas SG, Hu J, Steber CM, Sun TP. 2004. The *Arabidopsis* F-box protein SLEEPY1 targets gibberellin signaling repressors for gibberellin-induced degradation. *Plant Cell* **16**: 1392-1405.
- Dobson CM. 2003. Protein folding and misfolding. *Nature* **426**: 884-890.
- Drummond DA, Wilke CO. 2008. Mistranslation-induced protein misfolding as a dominant constraint on coding-sequence evolution. *Cell* **134**: 341-352.
- Dudley HW, Rosenheim O, Starling WW. 1926. The chemical constitution of spermine. III. Structure and synthesis. *Biochem J* **20**: 1082-1094.
- Dudley HW, Rosenheim O, Starling WW. 1927. The constitution and synthesis of spermidine, a newly discovered base isolated from animal tissues. *Biochem J* **21**: 97-103.
- Echandi G, Algranati ID. 1975. Defective 30S ribosomal particles in a polyamine auxotroph of *Escherichia coli*. *Biochem Biophys Res Commun* **67**: 1185-1191.
- Eisele F, Wolf DH. 2008. Degradation of misfolded protein in the cytoplasm is mediated by the ubiquitin ligase Ubr1. *FEBS Lett* **582**: 4143-4146.
- Eisenberg T, Knauer H, Schauer A *et al.* 2009. Induction of autophagy by spermidine promotes longevity. *Nature Cell Biology* **11**: 1305-1314.
- Escusa-Toret S, Vonk WIM, Frydman J. 2013. Spatial sequestration of misfolded proteins by a dynamic chaperone pathway enhances cellular fitness during stress. *Nature Cell Biology* **15**: 1231-1243.
- Fang NA, Measday NV, Mayer T. 2011. Hul5 HECT ubiquitin ligase plays a major role in the ubiquitylation and turnover of cytosolic misfolded proteins. *Nat Cell Biol* **13**: 1344-1352.
- Fredrickson EK, Rosenbaun JC, Locke MN, Milac TI, Gardner RG. 2011. Exposed hydrophobicity is a key determinant of nuclear quality control degradation. *Mol Biol Cell* **22**: 2384-2395.

- Frezza M, Schmitt S, Dou QP. 2011. Targeting the ubiquitin-proteasome pathway: an emerging concept in cancer therapy. *Curr Top Med Chem* **11**: 2888-2905.
- Frydman J. 2001. Folding of newly translated proteins in vivo: the role of molecular chaperones. *Annu Rev Biochem* **70**: 603-647.
- Fujita M, Fujita Y, Iuchi S, Yamada K, Kobayashi Y, Urano K, Kobayashi M, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K. 2012. Natural variation in a polyamine transporter determines paraquat tolerance in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA* **109**: 6343-6347.
- Gaemmaghami S, Huh WK, Bower K, Howson RW, Belle A, Dephoure N, O'Shea EK, Weissman JS. 2003. Global analysis of protein expression in yeast. *Nature* **425**: 737-741.
- Gardner RG, Nelson ZW, Gottschling DE. 2005. Degradation-mediated protein quality control in the nucleus. *Cell* **120**: 803-815.
- Geng F, Wenzel S, Tansey WP. 2012. Ubiquitin and proteasomes in transcription. *Annu Rev Biochem* **81**: 177-201.
- Gerner EW, Meyskens FL. 2004. Polyamines and cancer: old molecules, new understanding. *Nat Rev Cancer* **4**: 781-792.
- Giaever G, Chu AM, Ni L *et al.* 2002. Functional profiling of the *Saccharomyces cerevisiae* genome. *Nature* **418**: 387-391.
- Gietz RD, Schiestl RH, Willems AR, Woods RA. 1995. Studies on the transformation of intact yeast cells by the LiAc/SS-DNA/PEG procedure. *Yeast* **11**: 355-360.
- Gidalevitz T, Ben-Zvi A, Ho KH, Brignull HR, Morimoto RI. 2006. Progressive disruption of cellular protein folding in models of polyglutamine diseases. *Science* **311**: 1471-1474.
- Goldberg AL. 2003. Protein degradation and protection against misfolded or damaged proteins. *Nature* **426**: 895-899.

- Gong R, Li L, Liu Y, Wang P, Yang H, Wang L, Cheng J, Guan KL, Xu Y. 2011. Crystal structure of the Gtr1p-Gtr2p complex reveals new insights into the amino acid-induced TORC1 activation. *Genes Devel* **25**: 1668-1673.
- Goossens A, De la Fuente N, Forment J, Serrano R and Portillo F. 2000. Regulation of yeast H⁺-ATPase by protein kinases belonging to a family dedicated to activation of plasma membrane transporters. *Mol Cell Biol* **20**: 7654-7661
- Görner W, Durchschlag E, Martinez-Pastor MT, Estruch F, Ammerer G, Hamilton B, Ruis H, Schüller C. 1998. *Genes & development* **12**: 586-597.
- Grandvaux N, Gaboriau F, Harris J, Tenoever BR, Lin R, Hiscott J. 2005. Regulation of arginase II by interferon regulatory factor 3 and the involvement of polyamines in the antiviral response. *FEBS J* **272**: 3120-3131.
- Green DR, Kroemer G. 2009. Cytoplasmic functions of the tumour suppressor p53. *Nature* **458**: 1127-1130.
- Guthrie C, Fink GR. 1991. Guide to yeast genetics and molecular biology. *Academic Press*.
- Gutierrez E, Byung-Sik S, Woolstenhulme CJ, Joo-Ran Kim, Saini P, Buskirk AR. 2013. eIF5A promotes translation of polyproline motifs. *Molecular Cell* **51**: 1-11.
- von der Haar T. 2007. Optimized protein extraction for quantitative proteomics of yeast. *PLoS ONE* **10**: e1078.
- Haglund K, Dikic I. 2005. Ubiquitylation and cell signaling. *EMBO J* **24**: 3353-3359.
- Hahn JS, Hu Z, Thiele DJ, Iyer VR. Genome-wide analysis of the biology of stress responses through heat shock transcription factor. *Mol Cell Biol* **24**: 5249-5256.
- Hamana K, Matsuzaki S. 1982. Widespread occurrence of norspermidine and norspermidine in eukaryotic algae. *J Biochem* **91**: 1321-1328.

- Hamana K, Matsuzaki S, Hosaka K, Yamashita S. 1989. Interconversion of polyamines in wild-type strains and mutants of yeast and the effects of polyamines on their growth. *FEMS Microbiol Lett* **61**: 231-236.
- Hanfrey C, Sommer S, Mayer MJ, Burtin D, Michael AJ. 2001. Arabidopsis polyamine biosynthesis: absence of ornithine decarboxylase and the mechanism of arginine decarboxylase activity. *Plant J* **27**: 551-560.
- Hanfrey C, Franceschetti M, Mayer MJ, Illingworth C, Elliot K, Michael AJ. 2003. Translational regulation of the plant S-adenosylmethionine decarboxylase. *Biochem Soc Trans* **31**: 424-427.
- Harrison DE, Strong R, Sharp ZD, Nelson JF, Astle CM, Flurkey K, Nadon NL, Wilkinson JE, Frenkel K, Carter CS *et al.* 2009. Rapamycin fed late in life extends lifespan in genetically heterogeneous mice. *Nature* **260**: 392-395.
- Haslbeck M, Franzmann T, Weinfurter D, Buchner J. 2005. Some like it hot: the structure and function of small heat-shock proteins. *Nat Struct Mol Biol* **15**: 641-650.
- Hayflick L, Moorhead PS. 1961. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res* **25**: 585-621.
- Heitman J, Mowa NR, Hall MN. 1991. Targets for cell cycle arrest by the immunosuppressant rapamycin in yeast. *Science* **253**: 905-909.
- Hershko A, Ciechanover A. 1998. The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem* **67**: 425-479.
- Hicke L. 2001. A new ticket for entry into budding vesicles-ubiquitin. *Cell* **106**: 527-530.
- Hicke L. 2001. Protein regulation by monoubiquitin. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**: 195-201.
- Higashi K, Ishigure H, Demizu R, Uemura T, Nishino K, Yamaguchi A *et al.* 2008. Identification of a spermidine excretion protein complex (MdtII). *J Bacteriol* **190**: 872-878.

- Hinnebusch AG. 1985. A hierarchy of *trans*-acting factors modulates translation of an activator of amino acid biosynthetic genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology* **5**: 2349-2360.
- Hinnebusch AG. 2005. Translational regulation of GCN4 and the general amino acid control of yeast. *Annu Rev Microbiol* **59**: 407-450.
- Hinnebusch AG, Fink GR. 1983. Positive regulation in the general amino acid control of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci USA* **80**: 5374-5378.
- Holmes DS, Quigley M. 1981. A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Anal. Biochem.* **114**: 193-197.
- Hough R, Pratt G, Rechsteiner M. 1987. Purification of two high molecular weight proteases from rabbit reticulocyte lysate. *J Biol Chem* **262**: 8303-8313.
- Fabrizio P, Longo VD. 2003. The chronological life span of *Saccharomyces cerevisiae*. *Aging Cell* **2**:73-81.
- Ficker E, Taglialatela M, Wible BA, Henley CM, Brown AM. 1994. Spermine and spermidine as gating molecules for inward rectifier K⁺ channels. *Science* **266**: 1068-1072.
- Finley D, Ulrich HD, Sommer T, Kaiser P. 2012. The ubiquitin-proteasome system of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **192**: 319-360.
- Fortun J, Dunn WA, Joy S, Li J, Notterpek L. 2003. Emerging role of autophagy in the removal of aggregates in Schwann cells. *J Neurosci* **23**: 10672-10680.
- Garcia-Barrio M, Dong J, Ufano S, Hinnebusch AG. 2000. Association of GCN1-GCN20 regulatory complex with the N-terminus of eIF2 α kinase GCN2 is required for GCN2 activation. *EMBO J* **19**: 1887-1899.
- Grandison RC, Piper MD, Partridge L. 2009. Amino-acid imbalance explains extension of lifespan by dietary restriction in drosophila. *Nature* **462**: 1061-1064.

- Guerra D, Mastrangelo AM, Lopez-Torrejon G, Marzin S, Schweizer P, Stanca AM, del Pozo JC, Cattivelli L, Mazzucotelli E. 2012. Identification of a protein network interacting with TdRF1, a wheat RING ubiquitin ligase with a protective role against cellular dehydration. *Plant Physiol* **158**: 777-789.
- Igarashi K, Kashiwagi K. 1999. Polyamine transport in bacteria and yeast. *Biochem J*. **344**: 633-642.
- Igarashi K, Kashiwagi K. 2000. Polyamines: mysterious modulators of cellular functions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **271**: 559-564.
- Igarashi K, Kashiwagi K. 2010. Modulation of cellular function by polyamines. 2010. *Int J Biochem Cell Biol* **42**: 39-51.
- Imai J, Maruya M, Yashiroda H, Yahara I, Tanaka K. 2003. The molecular chaperone Hsp90 plays a role in the assembly and maintenance of the 26S proteasome. *EMBO J* **22**: 3557-3567.
- Ingi T, Worley PF, Lanahan AA. 2001. Regulation of SSAT expression by synaptic activity. *Eur J Neurosci* **13**: 1459-1463.
- Ivan M, Kaelin WG Jr. 2001. The von Hippel-Lindau tumor suppressor protein. *Curr Opin Genet Dev* **11**: 27-37.
- Jelenc PC, Kurland CG. 1979. Nucleoside triphosphate regeneration decreases the frequency of translational errors. *Proc Natl Acad Sci USA* **76**: 3174-3178.
- Jell J, Merali S, Hensen ML, Mazurchuk R, Spornyak JA, Diegelman P, Kisiel ND, Barrero C, Deeb KK, Alhonen L, Patel MS, Porter CW. 2007. Genetically altered expression of spermidine/spermine N¹-acetyltransferase affects fat metabolism in mice via acetyl-CoA. *J Biol Chem* **282**: 8404-8413.
- Jiang JC, Jaruga E, Repneskaya MV, Jazwinski SM. 2000. An intervention resembling caloric restriction prolongs life span and retards aging in yeast. *FASEB J* **14**: 2135-2137.
- Johansson VM, Miniatis MF, Hegardt C, Jönsson G, Staaf J, Berntsson PS *et al.* 2008. Effect of polyamine deficiency on proteins involved in Okazaki fragment maturation. *Cell Bio Int* **32**: 1467-1477.

- Kaganovich D, Kopito R, Frydman J. 2008. Misfolded proteins partition between two distinct quality control compartments. *Nature* **454**: 1088-1095.
- Kawakita M, Hiramatsu K. 2006. Diacetylated derivatives of spermine and spermidine as novel promising tumor markers. *J Biochem* **139**: 315-322.
- Kim E, Goraksha-Hicks P, Li L, Neufeld TP, Guan KL. 2008. Regulation of TORC1 by Rag GTPases in nutrient response. *Nat Cell Biol* **10**: 935-945.
- Kim E, Guan KL. 2011. Amino Acid signaling in TOR activation. *Annu Rev Biochem* **80**: 1001-1032.
- Kisselev AF, Goldberg AL. 2001. Proteasome inhibitors: from research tools to drug candidates. *Chem Biol* **8**: 739-758.
- Kitada T, Asakawa S, Hattori N, Matsumine H, Yamamura Y, Minoshima S, Yokochi M, Mizuno Y, Shimizu N. 1998. Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Nature* **392**: 605-608.
- Koegl M, Hoppe T, Schlenker S, Ulrich HD, Mayer TU *et al.* 1999. A novel ubiquitination factor, E4, is involved in multiubiquitin chain assembly. *Cell* **96**: 635-644.
- Kolodkin-Gal I, Cao S, Chai L, Böttcher T, Kolter R, Clardy J, Losick R. 2012. A self-produced trigger for biofilm disassembly that targets exopolysaccharide. *Cell* **149**: 684-692.
- Kölling R, Hollenberg CP. 1994. The ABC-transporter Ste6 accumulates in the plasma membrane in a ubiquitinated form in endocytosis mutants. *EMBO J* **13**: 3261-3271.
- Komander D, Rape M. 2012. The ubiquitin code. *Annu Rev Biochem* **81**: 203-229.
- Korennykh A, Walter P. 2012. Structural basis of the unfolded protein response. *Annu Rev Cell Dev Biol* **28**: 251-277.

- Korolchuk VI, Mansilla A, Menzies FM, Rubinsztein DC. 2009. Autophagy inhibition compromises degradation of ubiquitin-proteasome pathway substrates. *Mol Cell* **33**: 517-527.
- Kostakioti M, Hadjifrangiskou M, Hultgren SJ. 2013. Bacterial biofilms: Development, dispersal and therapeutic strategies in the dawn of the postantibiotic era. *Cold Spring Harb Perspect Med* 3:a010306
- Kurihara S, Oda S, Kato K, Kim HG, Koyanagi T, Kumagai H, *et al.* 2005. A novel putrescine utilization pathway involves γ -glutamylated intermediates of *Escherichia coli* K-12. *J Biol Chem* **280**: 4602-4608.
- Kusano T, Berberich T, Tateda C, Takahashi Y. 2008. Polyamines: essential factors for growth and survival. *Planta* **228**: 367-381.
- Ladenburg A. 1886. Über die Identität des Cadaverin mit dem Pentamethyldiamin. *Ber Dtsch Chem Ges* **19**: 2585-2586.
- Ladenburg A, Abel J. 1888. Über das Aethylenimin (Spermin?). *Ber Dtsch Chem Ges* **21**: 758-766.
- Landry JJ, Pyl PT, Rausch T, Zichner T, Tekkedil MM, Stütz AM, Jauch A, Aiyar
- Lee J, Sperandio V, Frantz DE, Longgood J, Camilli A, Phillips MA, Michael AJ. 2009. An alternative polyamine biosynthetic pathway is widespread in bacteria and essential for biofilm formation in *Vibrio cholera*. *J Biol Chem* **284**: 9899-9907.
- Lewis K. 2005. Persister cells and the riddle of biofilms survival. *Biochemistry* **70**: 267-274.
- Lewis K. 2008. Multidrug tolerance of biofilms and persister cells. *Curr Top Microbiol Immunol* **322**: 107-131.
- Li YF, Hess S, Pannell LK, Tabor CW, Tabor H. 2001. In vivo mechanism-based inactivation of S-adenosylmethionine decarboxylases from *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, and *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**: 10578-10583.

- Liao XH, Majithia A, Huang X, Kimmel AR. 2008. Growth control via TOR kinase signaling, an intracellular sensor of amino acid and energy availability, with crosstalk potential to proline metabolism. *Amino Acids* **35**: 761-770.
- Liberek K, Lewandowska A, Zietkiewicz S. 2008. Chaperones in control of protein disaggregation. *EMBO Journal* **27**: 328-335.
- Loewith R, Hall MN. 2011. Target of rapamycin (TOR) in nutrient signaling and growth control. *Genetics* **189**: 1177-1201.
- Longo VD, Shadel GS, Kaeberlein M, Kennedy B. 2010. Replicative and chronological aging in *saccharomyces cerevisiae*. *Cell metabolism* **16**: 18-31.
- López-Otín C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M, Kroemer G. 2013. The hallmarks of aging. *Cell* **153**: 1194-1217.
- Lutz N, Bharti K, Döring P, Kumar S, Ganguli A, Scharf KD. 2001. Arabidopsis and the heat stress transcription factor world: how many heat stress transcription factors do we need. *Cell Stress Chaperones* **6**: 177-789.
- Maiale SJ, Marina M, Sánchez DH, Pieckenstein FL, Ruiz OA. 2008. In vitro and in vivo inhibition of plant polyamine oxidase activity by polyamine analogues. *Phytochem* **69**: 2522-2558.
- Mair W, Goymer P, Pletcher SD, Partridge L. 2003. Demography of dietary restriction and death in *drosophila*. *Science* **301**: 1731-1733.
- Matsufuji S, Matsufuji T, Miyazaki Y, Murakami Y, Atkins JF, Gesteland RF, Hayashi S. 1995. Autoregulatory frameshifting in decoding mammalian ornithine decarboxylase antizyme. *Cell* **80**: 51-60.
- Mayer MP. 2010. Gymnastics of molecular chaperones. *Molecular Cell* **39**: 321-331.
- Mayer MP, Bukau B. 2005. Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism. *Cell Mol Life Sci* **62**: 670-684.

- McCay CM, Maynard LA, Sperling G, Barnes LL. 1939. Retarded growth, life span, ultimate body size and age changes in the albino rat after feeding diets restricted in calories. *The Journal of Nutrition* **18**: 1-13.
- McKinney EC, Ali N, Traut A, Feldmann KA, Belostotsky DA, McDowell JM, Meegher RB. 1995. Sequence-based identification of T-DNA insertion mutations in *Arabidopsis*: actin mutants act2-1 and act4-1. *The Plant Journal* **8**: 613-622.
- Meksuriyen D, Fukuchi-Shigomori T, Tomitori H, Kashiwagi K, Toida T, Imanari T *et al.* 1998. Formation of a complex containing ATP, Mg²⁺ and spermine. Structural evidence and biological significance. *J Biol Chem* **273**: 30939-30944.
- Menacho-Marquez M, Perez-Valle J, Ariño J, Gadea J, Murguia. 2007. Gcn2p regulates a G1/S cell cycle checkpoint in response to DNA damage. *Cell Cycle* **6**: 2302-2305.
- Merentie M, Uimari A, Pietila M, Sinervirta R, Keinanen TA, Vepsalainen J, Khomutov A, Grigorenko N, Herzig KH, Janne J, Alhonen L. 2007. Oxidative stress and inflammation in the pathogenesis of activated polyamine catabolism-induced acute pancreatitis. *Amino Acids* **33**: 323-330.
- Mewes HW, Frishman D, Gruber C, Geier G, Haase D, Kaps A, Lemcke K, Mannhaupt G, Pfeiffer F, Schüller C, Stocker S, Weil B. 2000. MIPS: a database for genomes and protein sequences. *Nucleic Acids Research* **28**: 37-40.
- Meyerowitz EM. 2001. Prehistory and history of *Arabidopsis* research. *Plant Physiology* **125**: 15-19
- Micel LN, Tentler JJ, Smith PG, Eckhardt GS. 2013. Role of ubiquitin ligases and the proteasome in oncogenesis: novel targets for anticancer therapies. *J Clin Oncol* **20**: 1231-1238.
- Miyamoto S, Kashiwagi K, Ito K, Watanabe S, Igarashi K. 1993. Estimation of polyamine distribution and polyamine stimulation of protein synthesis in *Escherichia coli*. *Arch Biochem Biophys* **300**: 63-68.

- Morrow G, Battistini S, Zhang P, Tanguay RM. 2004. Decreased lifespan in the absence of expression of the mitochondrial small heat shock protein Hsp22 in *Drosophila*. *J Biol Chem* **2004**: 43382-43385.
- Mortimer RK, Johnson JR. 1959. Life span of individual yeast cells. *Nature* **183**: 1751-1752.
- Moschou PN, Sanmartin M, Andriopoulou AH, Rojo E, Sanchez-Serrano JJ, Roubelakis-Angelakis KA. 2008. Bridging the gap between plant and mammalian polyamine catabolism: a novel peroxisomal polyamine oxidase responsible for a full back-conversion pathway in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **147**: 1845-1857.
- Murase K, Hirano Y, Sun TP, Hakoshima T. 2008. Giberellin-induced DELLA recognition by the giberellin receptor GID1. *Nature* **456**: 459-463.
- Murguía JR, Serrano S. 2012. New functions of protein kinase Gcn2 in yeast and mammals. *IUBMB Life* **64**: 971-974.
- Nakatogawa H, Suzuki K, Kamada Y, Ohsumi U. 2009. Dynamics and diversity in autophagy mechanisms: lessons from yeast. *Nat Rev Mol Cell Biol* **10**: 458-467.
- Natarajan K, Meyer MR, Jackson BM, Slade D, Roberts C, Hinnebusch AG, Marton MJ. 2001. Transcriptional profiling shows that Gcn4p is a master regulator of gene expression during amino acid starvation in yeast. *Mol Cell Biol* **21**: 4347-4368.
- Nigg EA. 1995. Cyclin-dependent protein kinases: key regulators of the eukaryotic cell cycle. *Bioessays* **17**: 471-480.
- Nillegoda NB, Theodoraki MA, Mandal AK, Mayo KJ, Ren HY *et al.* 2010. Ubr1 and Ubr2 function in a quality control pathway for degradation of unfolded cytosolic proteins. *Mol Biol Cell* **21**: 2102-2116.
- Nishimura K, Nakatsu F, Kashiwagi K, Ohno H, Saito T, Igarashi K. 2002. Essential role of S-adenosylmethionine decarboxylase in mouse embryonic development. *Genes Cells* **7**: 41-47.

- Nishimura K, Okudaira H, Ochiai E, Higashi K, Kaneko M, Ishii I, Nishimura T, Dohmae N, Kashiwagi K, Igarashi K. 2009. Identification of proteins whose synthesis is preferentially enhanced by polyamines at the level of translation in mammalian cells. *Int J Biochem Cell Biol* **40**: 2251-2261.
- Nishizawa-Yokoi A, Tainaka H, Yoshida E, Tamoi M, Yabuta Y, Shigeoka S. 2010. The 26S proteasome function and Hsp90 activity involved in the regulation of HsfA2 expression in response to oxidative stress. *Plant Cell Physiol* **51**: 486-496.
- Nobel PS. 1991. Physicochemical an environmental plant physiology. Academic Press, Sand Diego, California, USA. p. 123.
- Nozdon LA, Xu WH, Wang Y, Pi LY, Chakrabarty PK, Song WY. 2004. The ubiquitin ligase XBAT32 regulates lateral root development in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* **40**: 996-1006.
- Pandey UB, Nie Z, Batlevi Y, McCray BA, Ritson GP, Nedelsky NB, Schwartz SL, DiProspero NA, Knight MA, Shuldiner O, Padmanabhan R, Hild M *et al*. 2007. HDAC6 rescues neurodegeneration and provides an essential link between autophagy and the UPS. *Nature* **447**: 859-863.
- Parchment RE, Pierce GB. 1989 Polyamine oxidation programmed cell death, and regulation of melanoma in the murine embryonic limb. *Cancer Res* **49**: 6680-6686.
- Park MH, Nishimura K, Zanelli CF, Valentini SR. 2009. Functional significance of eIF5A and its hypusine modification in eukaryotes. *Amino Acids* **38**: 491-500.
- Pegg AE, Casero RA. 2011. Current status of the polyamine research field. *Methods Mol Biol* **720**: 3-35.
- Pendeville H, Carpino N, Marine JC, Takahashi Y, Muller M, Martial JA *et al*. 2001. The ornithine decarboxylase gene is essential for cell survival during early murine development. *Mol Cell Biol* **21**: 6549-6558.

- Pfaffl MW. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* **1**: 29(9):e45
- Pollard KJ, Samuels ML, Crowley KA, Hansen JC, Peterson CL. 1999. Functional interaction between GCN5 and polyamines: a new role for core histone acetylation. *EMBO J* **18**: 5622-5633.
- Powers ET, Morimoto RI, Dillin A, Kelly JW, Balch WE. 2009. Biological and chemical approaches to diseases of proteostasis deficiency. *Annu Rev Biochem* **78**: 959-991.
- Powers RW, Kaeberlain M, Caldwell SD, Kennedy BK, Fields S. 2006. Extension of chronological life span in yeast by decreased TOR pathway signaling. *Genes & Development* **20**: 174-184.
- Prakash NJ, Bowlin TL, Dabis GF, Sunkara PS, Sjoerdsma A. 1988. Antitumor activity of norspermidine, a structural homologue of the natural polyamine spermidine. *Anticancer Res* **8**: 563-568.
- Rahbari R, Sheahan T, Modes V, Collier P, Macfarlane C, Badge RM. 2009. A novel L1 retrotransposon marker for HeLa cell line identification. *BioTechniques* **46**: 277-284.
- Raught B, Gingras AC. 2007. Signaling to translation initiation. In *Translational control in biology and medicine*. Mathews, M, Sonenber N y Hershey JWB, eds. (Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press), pp 369-400.
- Ravikumar B, Vacher C, Berger Z, Davies JE, Luo S, Oroz LG, Scaravilli F, Easton DF, Duden R, O'Kane CJ, Rubinsztein DC. 2004. Inhibition of mTOR induces autophagy and reduces toxicity of polyglutamine expansions in fly and mouse models of Huntington disease. *Nat Genet* **36**: 585-595.
- Ray RM, Zimmerman BJ, McCormack SA, Patel TB, Johnson LR. Polyamine depletion arrests cell cycle and induces inhibitors p21^{Waf1/Cip1}, p27^{Kip1} and p53 in IEC-6 cells. *Am J Physiol* **276**: C684-691.

-
- Read AP, Strachan T. 1999. Human molecular genetics 2. New York: Wiley ISBN: 0-471-33061-2.
- Richter K, Buchner J. 2006. Hsp90: twist and fold. *Cell* **127**: 251-253.
- Rodriguez-Garay B, Phillips GC, Kuehn GD. 1989. Detection of Norspermidine and Norspermine in *Medicago sativa* L. (Alfalfa). *Can J Bot* **76**: 130-133.
- Ruan H, Shantz LM, Pegg AE, Morris DR. 1996. The upstream open reading frame of the mRNA encoding S-adenosylmethionine decarboxylase is a polyamine-responsive translational control element. *J Biol Chem* **271**: 29576-29582.
- Rubinsztein DC, Mariño G, Kroemer G. 2011. Autophagy and aging. *Cell* **146**: 682-695.
- Ruiz-Roig C, Viétez C, Posas F, de Nadal E. 2010. The Rpd3L HDAC complex is essential for the heat stress response in yeast. *Molecular Microbiology* **76**: 1049-1062.
- Russel DH. 1977. Clinical relevance of polyamines as biochemical markers of tumor kinetics. *Clin Chem* **23**: 22-27.
- Saini P, Eyler DE, Green R, Dever TE. 2009. Hypusine-containing protein eIF5A promotes translation elongation. *Nature* **459**: 118-121.
- Sambrook J, Russel DW. 2001. *Molecular Cloning*. 3rd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York.
- Santner A, Estelle M. 2010. The ubiquitin-protease system regulates plant hormone signaling. *Plant J* **61**: 1029-1040.
- Scherer WF, Syverton JT, Gey GO. 1953. Studies on the propagation in vitro of poliomyelitis viruses. IV. Viral multiplication in a stable strain of human malignant epithelial cells (strain HeLa) derived from a epidermoid carcinoma of the cervix. *J Exp Med* **97**: 696-710.

- Schipper RG, Penning LC, Verhofstad AA. 2000. Involvement of polyamines in apoptosis. Facts and controversies: effectors or protectors? *Semin Cancer Biol* **10**: 55-68.
- Schramm F, Ganguli A, Kiehlmann E, Englich G, Walch D, von Koskull-Döring P. 2006. The heat stress transcription factor HsfA2 serves as a regulatory amplifier of a subset of genes in the heat stress response in *Arabidopsis*. *Plant Mol Biol*. **60**: 759-772.
- Schulz TJ, Karse K, Voigt A, Urban N, Birringer M, Ristow M. 2007. Glucose restriction extends caenorhabditis elegans life span by inducing mitochondrial respiration and increasing oxidative stress. *Cell metabolism* **6**: 280-293.
- Seiler N. 2004. Catabolism of polyamines. *Amino Acids* **26**: 217-233.
- Sequeira A, Gwadry FG, Ffrench-Mullen JM, Canetti L, Gingras Y, Casero RA, Rouleau G, Benkelfat C, Turecki G. 2006. Implication of SSAT by gene expression and genetic variation in suicide and major depression. *Arch Gen Psychiatry* **63**: 35-48.
- Shimada A, Ueguchi-Tanaka M, Nakatsu T, Nakajima M, Naoe Y, Ohmiya H, Kato H, Matsuoka M. 2008. Structural basis for gibberellin recognition by its receptor GID1. *Nature* **456**: 520-523.
- Silva TM, Andersson S, Sukumaran SK, Marques MP, Persson L, Oredsson S. 2013. Norspermidine and novel Pd(II) and Pt(II) polynuclear complexes of norspermidine as potential antineoplastic agents against breast cancer. *PLOS one* **8**: e55651.
- Silverstone AL, Jung HS, Dill A, Kawaide H, Kamiya Y, Sun T. 2001. Repressing a repressor: Gibberellin-induced rapid reduction of the RGA protein in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **13**: 1555-1566.
- Singh KB, Foley RC, Oñate-Sanchez L. 2002. Transcription factors in plant defense and stress responses. *Curr Opin Plant Biol* **5**: 430-436.

- Skloot R. 2010. The immortal life of Henrietta Lacks. New York: Crown/Random House. 978-1-4000-5217-2.
- Snyder RD, Edwards ML. 1991. Effects of polyamine analogs on the extent and fidelity of *in vitro* polypeptide synthesis. *Biochemical & Biophysical Research Communications* **176**: 1383-1392.
- Sorger PK, Pelham RH. 1987. Purification and characterization of a heat-shock element binding protein from yeast. *EMBO J* **6**: 3035-3041.
- Soulet D, Gagnon B, Rivest S, Audette M, Poulin R. 2004. A fluorescent probe of polyamine transport accumulates into intracellular acidic vesicles via a two-step mechanism. *J Biol Chem* **279**: 49355-49366.
- Specht S, Miler SB, Mogk A, Bukau B. 2011. Hsp42 is required for sequestration of protein aggregates into deposition sites in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol.* **195**: 617-629.
- Stadtman ER, Levine RL. 2000. Protein oxidation. *Ann NY Acad Sci* **899**: 191-208.
- Stone SL, Hauksdóttir H, Troy A, Herschleb J, Kraft E, Callis J. 2005. Functional analysis of the RING-Type ubiquitin ligase family of *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **137**: 13-30
- Stone SL, Williams LA, Farmer LM, Vierstra RD, Callis J. 2006. KEEP ON GOING, a RING E3 ligase essential for *Arabidopsis* growth and development, is involved in abscisic acid signaling. *Plant Cell* **18**: 3415-3428.
- Sugio A, Dreos R, Aparicio F, Maule AJ. 2009. The cytosolic protein response as a subcomponent of the wider heat shock response in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **21**: 642-654.
- Suraweera A, Münch C, Hanssum A, Bertolotti A. 2012. Failure of amino acid homeostasis causes cell death following proteasome inhibition. *Molecular Cell* **48**: 242-253.
- Tabor CW, Tabor H. 1984. Polyamines. *Annu Rev Biochem* **53**: 749-790.

- Tabor CW, Tabor H. 1985. Polyamines in microorganisms. *Microbiol Rev* **49**: 81-99.
- Takahashi Y, Cong R, Sagor GHM, Niitsu M, Berberich T, Kusano T. 2002. Characterization of five polyamine oxidase isoforms in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Rep* **29**: 955-965.
- Tavladoraki P, Rossi MN, Saccuti G, Perez-Amador MA, Polticelli F, Angelini R, Federico R. 2006. Heterologous expression and biochemical characterization of a polyamine oxidase from *Arabidopsis* involved in polyamine back conversion. *Plant Physiol*. **141**: 1519-1532.
- Thomas T, Balabhadrapathruni S, Gardner CR, Hong J, Faaland CA, Thomas TJ. 1999. Effects of epidermal growth factor on MDA-MB-468 breast cancer cells: alterations in polyamine biosynthesis and the expression of p21/CIP1/WAF1. *J Cell Physiol* **179**: 257-266.
- Thomas T, Thomas TJ. 2003. Polyamine metabolism and cancer. *J Cell Mol Med* **7**: 113-126.
- Tomaru U, Takahashi S, Ishizu A, Miyatake Y, Gohda A, Suzuki S, Ono A, Ohara J, Baba T, Murata S, *et al.* 2012. Decreased proteasomal activity causes age-related phenotypes and promotes the development of metabolic abnormalities. *Am J Pathol* **180**: 963-972.
- Tyedmers J, Mogk A, Bukau B. 2010. Cellular strategies for controlling protein aggregation. *Molecular Cell Biology* **11**: 777-778.
- Uemura T, Higashi K, Takigawa M, Toida T, Kashiwagi K, Igarashi K. 2009. Polyamine modulon in yeast-stimulation of COX4 synthesis by spermidine at the level of translation. *Int J Biochem Cell Biol* **41**: 2538-2545.
- Umekage S, Ueda T. 2006. Spermidine inhibits transient and stable ribosome subunit dissociation. *FEBS Lett* **580**: 1222-1226.
- United Nations Population Division. 2002. World Population Ageing: 1950-2050. <http://www.un.org/esa/population/publications/worldageing19502050>

- Urban J, Soulard A, Huber A, Lippman S, Mukhopadhyay D, Deloche O, Wanke V, Anrather D, Ammerer G, Riezman H, Broach JR, De Virgilio C, Hall MN, Loewith R. 2007. Sch9 is a major target of TORC1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell* **26**: 663-674.
- Vera-Sirera F, Minguet EG, Singh SK, Ljung K, Tuominen H, Blázquez MA, Carbonell J. 2010. Role of polyamines in plant vascular development. *Plant Phys and Biochem* **48**: 534-539.
- Vierstra RD. 2009. The ubiquitin-26S proteasome system at the nexus of plant biology. *Nat Rev Mol Cell Biol* **10**: 385-397.
- Voges D, Zwickl P, Baumeister W. 1999. The 26S proteasome: a molecular machine designed for controlled proteolysis. *Annu Rev Biochem* **68**: 1015-1068.
- Wagner I, Musso H. 1983. New naturally occurring amino acids. *Angew Chem Int Ed Engl* **22**: 816-828.
- Walker GA, Lithgow GJ. 2003. Lifespan extension in *C. elegans* by a molecular chaperone dependent upon insulin-like signals. *Aging Cell* **2**: 131-139.
- Wallace HM, Fraser AV. 2004. Inhibitors of polyamine metabolism: review article. *Amino Acids* **26**: 353-365.
- Wang FW, Guan XY, Xie D. 2013. Roles of Eukaryotic Initiation Factor 5A2 in Human Cancer. *Int J Biol Sci* **9**: 1013-1020.
- Wanke V, Cameroni E, Uotila A, Piccolis M, Urban J, Loewith R, De Virgilio C. 2008. Caffeine extends yeast lifespan by targeting TORC1. *Mol Microbiol* **69**: 277-285.
- Warringer J, Blomberg A. 2003. Automated screening in environmental arrays allows analysis of quantitative phenotypic profiles in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **20**: 53-57.

- Watanabe S, Kusama-Eguchi K, Kobayashi H, Igarashi K. 1991. Estimation of polyamine binding to macromolecules and ATP in bovine lymphocytes and rat liver. *J Biol Chem* **266**: 20803-20809.
- Waxman L, Fagan JM, Goldberg AL. 1987. Demonstration of two distinct high molecular weight proteases in rabbit reticulocytes, one of which degrades ubiquitin conjugates. *J Biol Chem* **262**: 2451-2457.
- Weigel D, Glazebrook J. 2002. *Arabidopsis*, a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Werner-Washburne M, Braun EL, Crawford ME, Peck VM. 1996. Stationary phase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol* **19**: 1159-1166.
- Wilkinson KD, Urban MK, Haas AL. 1980. Ubiquitin is the ATP-dependent proteolysis factor I of rabbit reticulocytes. *J Biol Chem* **255**: 7529-7532.
- Williams K. 1997. Interactions of polyamines with ion channels. *Biochem J* **44**: 289-297.
- Winzeler EA, Shoemaker DD, Astromoff A *et al.* 1999. Functional characterization of the *S. cerevisiae* genome by gene deletion and parallel analysis. *Science* **285**: 901-906.
- Wu Z, Song L, Liu SQ, Huang D. 2013. Independent and additive effects of glutamic acid and methionine on yeast longevity. *PLoS one* **8**: e79319.
- Wullschleger S, Loewith R, Hall MN. 2006. TOR signaling in growth and metabolism. *Cell* **124**: 471-484.
- Xiong H, Stanly BA, Tekwani BL, Pegg AE. 1997. Processing of mammalian and plant S-adenosylmethionine decarboxylase proenzymes. *J Biol Chem* **272**: 28342-28348.

- Yamada K, Fukao Y, Hayashi M, Fukazawa M, Suzuki I, Nishimura M. 2007. Cytosolic HSP90 regulates the heat shock response that is responsible for heat acclimation in *Arabidopsis*. *J. Biol. Chem.* **282**: 37794-37804.
- Yamano T, Mizukami S, Murata S, Chiba T, Tanaka K, Udono H. 2008. Hsp90-mediated assembly of the 26S proteasome is involved in major histocompatibility complex class I antigen processing. *J Biol Chem* **283**: 28060-28065.
- Yan G, Shen X, Jiang Y. 2006. Rapamycin activates Tap42-associated phosphatases by abrogating their association with Tor complex 1. *EMBO J* **25**: 3546-3555.
- Yang Z, Huang J, Geng J, Nair U, Klionsky DJ. 2006. Atg22 recycles amino acids to link the degradative and recycling functions of autophagy. *Mol Biol Cell* **17**: 5094-5104.
- Yen HS, Xu Q, Chou DM, Zhao Z, Elledge SJ. 2008. Global protein stability profiling in mammalian cells. *Science* **322**: 918-923.
- Ying Z, Wang H, Wang G. 2013. The ubiquitin proteasome system as a potential target for the treatment of neurodegenerative diseases. *Curr Pharm Des* **13**: 3305-3314.
- Yoshida M, Kashiwagi K, Shigemasa A, Taniguchi S, Yamamoto K, Malkinoshima H, Ishishama A, Igarashi K. 2004. A unifying model for the role of polyamines in bacterial cell growth, the polyamine modulon. *J Biol Chem* **279**: 46008-46013.

ANEJOS

Anejo 1: Categorías MIPS inducidas y reprimidas en la respuesta transcripcional de *A. thaliana* a la NE tras 3 y 24h de tratamiento

Categorías MIPS inducidas tras 3 horas de tratamiento		
	Term	p-value
01.01.11.04	metabolism of leucine	0.0037
01.01.11.04.02	degradation of leucine	0.00165
01.20.38	metabolism of toxins/drugs	1.48E-05
10.01.09	DNA restriction or modification	4.76E-06
10.01.09.05	DNA conformation modification (e.g. chromatin)	1.41E-06
11	TRANSCRIPTION	0.00828
11.02	RNA synthesis	0.00143
11.02.03	mRNA synthesis	0.000283
11.02.03.04	transcriptional control	0.000197
11.02.03.04.01	transcription activation	0.00161
16.02	peptide binding	0.0037
16.17	metal binding	9.51E-07
16.17.01	calcium binding	0.000471
16.17.09	heavy metal binding (Cu, Fe, Zn)	0.00113
18.02.01.02.03	protease inhibitor	0.00304
20.01.10	protein transport	0.000263
32	CELL RESCUE, DEFENSE AND VIRULENCE	5.36E-23

32.01	stress response	1.88E-18
32.01.01	oxidative stress response	0.000326
32.01.03	osmotic and salt stress response	1.38E-09
32.01.05	heat shock response	7.14E-11
32.01.06	cold shock response	0.000246
32.05	disease, virulence and defense	0.0037
32.07	detoxification	0.00088
32.07.07	oxygen and radical detoxification	0.00118
32.07.07.03	glutathione conjugation reaction	5.52E-06
34	INTERACTION WITH THE ENVIRONMENT	1.27E-11
34.11	cellular sensing and response to external stimulus	9.47E-15
34.11.01	photoperception and response	0.00618
34.11.03	chemoperception and response	2.52E-13
34.11.03.12	water response	9.82E-09
34.11.03.13	osmosensing and response	1.44E-09
34.11.09	temperature perception and response	2.57E-13
36	SYSTEMIC INTERACTION WITH THE ENVIRONMENT	5.12E-11
36.2	plant / fungal specific systemic sensing and response	1.15E-08
36.20.18	plant hormonal regulation	1.17E-07
36.20.18.02	ethylen response	1.23E-05

36.20.18.05	abscisic acid response	1.93E-11
36.20.18.99	other plant signalling molecules response	0.00101
36.25	animal specific systemic sensing and response	0.000339
36.25.16	immune response	0.000197
36.25.16.08	response to wounding	0.000835
40.2	cell aging	0.0037
42	BIOGENESIS OF CELLULAR COMPONENTS	0.0037
42.1	nucleus	4.10E-06
42.10.03	organization of chromosome structure	4.10E-06
70.22	endosome	0.0037

Categorías MIPS reprimidas tras 3 horas de tratamiento

	Term	p-value
1	METABOLISM	4.77E-25
1.01	amino acid metabolism	1.45E-14
01.01.03	assimilation of ammonia, metabolism of the glutamate group	0.00213
01.01.03.05	metabolism of arginine	0.00373
01.01.03.05.01	biosynthesis of arginine	0.00414
01.01.06	metabolism of the aspartate family	1.97E-08
01.01.06.04	metabolism of threonine	0.000102

01.01.06.04.01	biosynthesis of threonine	0.00213
01.01.06.05	metabolism of methionine	0.000691
01.01.06.06	metabolism of lysine	0.00414
01.01.06.06.01	biosynthesis of lysine	0.00301
01.01.09	metabolism of the cysteine - aromatic group	5.87E-05
01.01.09.02	metabolism of serine	0.00867
1.02	nitrogen, sulfur and selenium metabolism	9.67E-07
01.02.02	nitrogen metabolism	5.87E-05
1.03	nucleotide/nucleoside/nucleobase metabolism	0.000166
01.03.01	purin nucleotide/nucleoside/nucleobase metabolism	0.00597
1.05	C-compound and carbohydrate metabolism	8.04E-14
01.05.02	sugar, glucoside, polyol and carboxylate metabolism	2.75E-07
01.05.02.01	nucleotide-sugar metabolism	0.00968
01.05.02.07	sugar, glucoside, polyol and carboxylate catabolism	0.000225
01.05.03	polysaccharide metabolism	0.00584
01.05.03.04	starch metabolism	0.000115
01.05.03.04.07	starch catabolism	0.00106
01.05.07	C-3 compound metabolism	0.00291
01.05.13	transfer of activated C-1 groups	0.00395

01.05.13.03	tetrahydrofolate-dependent C-1-transfer	0.00725
1.06	lipid, fatty acid and isoprenoid metabolism	0.00354
1.07	metabolism of vitamins, cofactors, and prosthetic groups	1.53E-08
01.07.01	biosynthesis of vitamins, cofactors, and prosthetic groups	0.00159
1.2	secondary metabolism	0.00114
01.20.17	metabolism of secondary products derived from primary amino acids	0.00387
01.20.17.07	metabolism of glucosinolates and derivatives	0.00371
01.20.19	metabolism of secondary products derived from glycine, L-serine and L-alanine	0.000472
01.20.19.01	metabolism of porphyrins	0.000244
2	ENERGY	9.67E-07
2.01	glycolysis and gluconeogenesis	0.00968
2.07	pentose-phosphate pathway	0.000492
2.08	pyruvate dehydrogenase complex	0.00157
2.19	metabolism of energy reserves (e.g. glycogen, trehalose)	0.00108
10.01.02	DNA topology	0.00213
10.01.05	DNA recombination and DNA repair	0.0011
10.01.05.01	DNA repair	0.000561
10.01.05.03	DNA recombination	0.00211

11.04	RNA processing	0.00798
11.04.01	rRNA processing	0.00584
11.04.03	mRNA processing (splicing, 5'-, 3'-end processing)	0.00339
11.04.03.01	splicing	0.00409
12.1	aminoacyl-tRNA-synthetases	0.00121
14.01	protein folding and stabilization	0.00816
14.1	assembly of protein complexes	0.00981
16.03.03	RNA binding	0.00375
16.19	nucleotide/nucleoside/nucleobase binding	0.000266
16.19.03	ATP binding	0.000979
16.21	complex cofactor/cosubstrate/vitamine binding	0.004
20	CELLULAR TRANSPORT, TRANSPORT FACILITATION AND TRANSPORT ROUTES	0.00414
20.01	transported compounds (substrates)	0.00486
20.01.01	ion transport	0.00966
20.01.01.07	anion transport	0.00584
20.01.01.07.08	organic anion transport	0.00593
20.01.03	C-compound and carbohydrate transport	0.00844
20.03	transport facilities	0.00156
30.07	regulation of signal transduction	0.00394
32.01.01	oxidative stress response	0.00274

		Anejos
34.11.01	photoperception and response	0.00661
34.11.07	gravity perception and response	0.00533
40	CELL FATE	0.00429
40.01	cell growth / morphogenesis	0.00274
41	DEVELOPMENT (Systemic)	0.00584
41.03	plant development	0.00449
41.03.03	embryonal development	0.00225
42.01	cell wall	0.00409
47.02.01.02	leaf	0.00387
70	SUBCELLULAR LOCALIZATION	1.90E-18
70.01	cell wall	0.0011
70.16	mitochondrion	0.00122
70.26	plastid	3.08E-19
70.26.03	chloroplast	8.19E-19

Categorías MIPS inducidas tras 24h de tratamiento

	Term	p-value
1	METABOLISM	0.000104
1.04	phosphate metabolism	7.95E-07
1.2	secondary metabolism	0.000781

01.05.02.01	nucleotide-sugar metabolism	0.00337
01.06.02.02	glycolipid metabolism	0.00638
01.20.23	metabolism of secondary products derived from L-methionine	0.00281
01.20.38	metabolism of toxins/drugs	7.47E-05
10	CELL CYCLE AND DNA PROCESSING	0.000134
10.01	DNA processing	4.48E-06
10.01.09	DNA restriction or modification	1.33E-09
10.01.09.05	DNA conformation modification (e.g. chromatin)	3.67E-10
11	TRANSCRIPTION	9.03E-11
11.02	RNA synthesis	6.74E-13
11.02.03	mRNA synthesis	8.03E-14
11.02.03.04	transcriptional control	2.78E-14
11.02.03.04.01	transcription activation	0.00241
11.02.03.04.03	transcription repression	0.00928
14.07	protein modification	0.000776
14.07.03	modification by phosphorylation, dephosphorylation, autophosphorylation	1.40E-06
16	PROTEIN WITH BINDING FUNCTION OR COFACTOR REQUIREMENT (structural or catalytic)	4.21E-06
16.03.01	DNA binding	2.00E-05
16.17.01	calcium binding	0.00355

16.03	nucleic acid binding	0.00806
20.01.01	ion transport	0.000619
20.01.01.01	cation transport (H+, Na+, K+, Ca2+ , NH4+, etc.)	0.00179
20.03.22	transport ATPases	0.00139
30.05	transmembrane signal transduction	0.000271
30.05.01	receptor enzyme mediated signalling	0.000272
32	CELL RESCUE, DEFENSE AND VIRULENCE	2.50E-19
32.01.01	oxidative stress response	0.00281
32.01.03	osmotic and salt stress response	0.000776
32.01.05	heat shock response	0.00197
32.01.06	cold shock response	0.000199
32.01.11	nutrient starvation response	0.000532
32.01	stress response	2.14E-08
32.05	disease, virulence and defense	3.82E-11
32.07.07.03	glutathione conjugation reaction	6.59E-05
34	INTERACTION WITH THE ENVIRONMENT	4.08E-13
34.11.03	chemoperception and response	9.15E-13
34.11.03.13	osmosensing and response	0.000359
34.11.09	temperature perception and response	2.32E-06
34.11.10	response to biotic stimulus	1.82E-09
34.11	cellular sensing and response to external	3.24E-15

	stimulus	
36	SYSTEMIC INTERACTION WITH THE ENVIRONMENT	1.91E-11
36.2	plant / fungal specific systemic sensing and response	1.21E-10
36.20.18	plant hormonal regulation	2.45E-09
36.20.18.01	auxin response	0.000241
36.20.18.05	abscisic acid response	9.87E-05
36.20.18.99	other plant signalling molecules response (jasmonic acid, salicylic acid etc.)	0.000702
36.25	animal specific systemic sensing and response	0.00355
36.25.16	immune response	0.00234
36.25.16.08	response to wounding	0.00111
42	BIOGENESIS OF CELLULAR COMPONENTS	0.00011
42.1	nucleus	1.33E-09
42.10.03	organization of chromosome structure	1.33E-09
70.1	nucleus	4.49E-05

Categorías MIPS reprimidas tras 24 de tratamiento

	Term	p-value
2.3	photosynthesis	8.39E-05
10.03.01	mitotic cell cycle and cell cycle control	0.00267
18.02.01.02	enzyme inhibitor	0.0012
18.02.01.02.03	protease inhibitor	0.00101
20.01.13	lipid/fatty acid transport	0.00267
34	INTERACTION WITH THE ENVIRONMENT	0.00101
34.11	cellular sensing and response to external stimulus	0.00267
34.11.03	chemoperception and response	0.0012
36.20.18.01	auxin response	0.000622

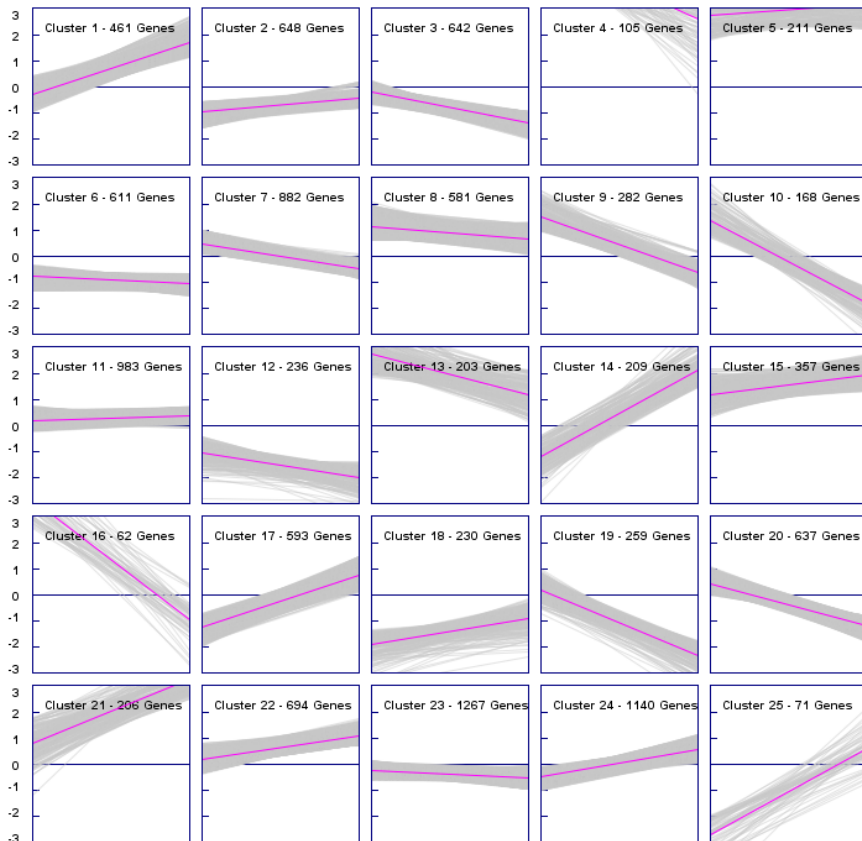
Categorías MIPS inducidas en ambos tratamientos

	Term	p-value
1.2	secondary metabolism	0.00643
01.20.23	metabolism of secondary products derived from L-methionine	0.00841
01.20.38	metabolism of toxins/drugs	0.000263
10	CELL CYCLE AND DNA PROCESSING	8.71E-05
10.01	DNA processing	5.56E-06
10.01.09	DNA restriction or modification	1.06E-08

10.01.09.05	DNA conformation modification (e.g. chromatin)	4.81E-09
11	TRANSCRIPTION	1.28E-08
11.02	RNA synthesis	6.07E-11
11.02.03	mRNA synthesis	2.09E-12
11.02.03.04	transcriptional control	1.35E-12
11.02.03.04.01	transcription activation	0.000337
16.03	nucleic acid binding	0.00196
16.03.01	DNA binding	4.48E-06
16.17	metal binding	0.00643
16.17.01	calcium binding	0.000148
32	CELL RESCUE, DEFENSE AND VIRULENCE	1.85E-14
32.01	stress response	3.49E-08
32.01.01	oxidative stress response	0.00536
32.01.05	heat shock response	0.000254
32.01.06	cold shock response	0.000907
32.05	disease, virulence and defense	8.71E-05
32.07	detoxification	0.00536
32.07.07	oxygen and radical detoxification	0.00478
32.07.07.03	glutathione conjugation reaction	9.77E-05
34	INTERACTION WITH THE ENVIRONMENT	1.42E-06
34.11.03	chemoperception and response	2.65E-06

34.11.09	temperature perception and response	2.80E-06
34.11.10	response to biotic stimulus	0.00129
34.11	cellular sensing and response to external stimulus	1.09E-07
36	SYSTEMIC INTERACTION WITH THE ENVIRONMENT	2.88E-07
36.2	plant / fungal specific systemic sensing and response	1.66E-05
36.20.18	plant hormonal regulation	2.00E-05
36.20.18.02	ethylene response	0.00933
36.20.18.05	abscisic acid response	0.00103
36.20.18.99	other plant signalling molecules response (jasmonic acid, salicylic acid etc.)	0.00644
36.25	animal specific systemic sensing and response	4.73E-05
36.25.16	immune response	2.94E-05
36.25.16.08	response to wounding	2.94E-05
40.2	cell aging	0.00774
42	BIOGENESIS OF CELLULAR COMPONENTS	0.000118
42.1	nucleus	1.86E-08
42.10.03	organization of chromosome structure	1.86E-08
70.1	nucleus	9.30E-06

Anejo 2: Clusters de genes cuya evolución es similar en función del tiempo de tratamiento con NE.



Cluster 1	Term	p-value
70	SUBCELLULAR LOCALIZATION	4.04E-08

70.03	cytoplasm	5.32E-05
01.06.06.11	tetracyclic and pentacyclic triterpenes (cholesterin, steroids and hopanoids) metabolism	0.00278
Cluster 2	Term	p-value
32	CELL RESCUE, DEFENSE AND VIRULENCE	1.57E-09
32.05	disease, virulence and defense	8.52E-08
36	SYSTEMIC INTERACTION WITH THE ENVIRONMENT	1.08E-07
34.11	cellular sensing and response to external stimulus	1.55E-07
34	INTERACTION WITH THE ENVIRONMENT	1.68E-06
34.11.03	chemoperception and response	3.44E-06
36.2	plant / fungal specific systemic sensing and response	4.98E-06
36.20.18	plant hormonal regulation	2.16E-05
34.11.10	response to biotic stimulus	2.76E-05
11.02.03.04	transcriptional control	9.23E-05
11.02.03	mRNA synthesis	0.000117
11.02	RNA synthesis	0.000444
32.01.11	nutrient starvation response	0.000847
36.20.18.99	other plant signalling molecules response (jasmonic acid, salicylic acid etc.)	0.000847

1	METABOLISM	0.00104
11	TRANSCRIPTION	0.00133
32.01	stress response	0.00133
30.01.09	second messenger mediated signal transduction	0.00233
36.20.18.05	abscisic acid response	0.00233
1.04	phosphate metabolism	0.00269
40.2	cell aging	0.00412
30.01.09.08	hormone mediated signal transduction	0.00589
32.07.07.03	glutathione conjugation reaction	0.00827
36.25.16	immune response	0.00878
10.01.09.05	DNA conformation modification (e.g. chromatin)	0.00967

Cluster 3	Term	p-value
1	METABOLISM	0.000789
01.02.02.02	nitrate assimilation	0.00581
70	SUBCELLULAR LOCALIZATION	0.00647
16.19	nucleotide/nucleoside/nucleobase binding	0.00722

Cluster 4	Term	p-value
12.01	ribosome biogenesis	4.58E-19

70.03	cytoplasm	1.26E-16
12.01.01	ribosomal proteins	4.04E-12
16	PROTEIN WITH BINDING FUNCTION OR COFACTOR REQUIREMENT (structural or catalytic)	3.04E-07
16.01	protein binding	5.10E-05
12	PROTEIN SYNTHESIS	9.46E-05
14.07.03	modification by phosphorylation, dephosphorylation, autophosphorylation	0.000111
16.03	nucleic acid binding	0.000111
16.03.03	RNA binding	0.000111
12.04	translation	0.000318
14.07	protein modification	0.000814
34.11.10	response to biotic stimulus	0.00129
1.04	phosphate metabolism	0.00146
16.19	nucleotide/nucleoside/nucleobase binding	0.00883
14	PROTEIN FATE (folding, modification, destination)	0.00952
<hr/>		
Cluster 5	<i>No terms found</i>	p-value
<hr/>		
Cluster 6	Term	p-value
70	SUBCELLULAR LOCALIZATION	6.91E-14

16.19	nucleotide/nucleoside/nucleobase binding	5.82E-08
16	PROTEIN WITH BINDING FUNCTION OR COFACTOR REQUIREMENT (structural or catalytic)	9.03E-08
12.1	aminoacyl-tRNA-synthetases	1.80E-07
11.04.03	mRNA processing (splicing, 5'-, 3'-end processing)	3.39E-07
70.16	mitochondrion	4.35E-07
16.19.03	ATP binding	5.39E-07
10.01.02	DNA topology	5.41E-07
11.04.03.01	splicing	5.63E-07
12.04.01	translation initiation	7.33E-07
16.03.03	RNA binding	3.38E-06
11.04.01	rRNA processing	3.65E-06
10.01.05.03	DNA recombination	1.73E-05
70.03	cytoplasm	1.73E-05
1.03	nucleotide/nucleoside/nucleobase metabolism	8.54E-05
70.16.05	mitochondrial inner membrane	0.000193
1.01	amino acid metabolism	0.00021
10.01.05.01	DNA repair	0.000354
01.03.01.03	purine nucleotide/nucleoside/nucleobase anabolism	0.000405
70.10.05	nuclear membrane	0.000405

11.04	RNA processing	0.000496
10.01.05	DNA recombination and DNA repair	0.000555
1	METABOLISM	0.00075
2.1	tricarboxylic-acid pathway (citrate cycle, Krebs cycle, TCA cycle)	0.000832
12.07	translational control	0.000832
01.01.03.05	metabolism of arginine	0.00143
20.09.04	mitochondrial transport	0.00152
20.03	transport facilities	0.00161
16.03	nucleic acid binding	0.00234
14	PROTEIN FATE (folding, modification, destination)	0.00238
01.05.13.03	tetrahydrofolate-dependent C-1-transfer	0.003
01.01.03.05.01	biosynthesis of arginine	0.00342
01.01.06.04	metabolism of threonine	0.00342
1.04	phosphate metabolism	0.00378
01.03.01	purin nucleotide/nucleoside/nucleobase metabolism	0.00641
70.26.03	chloroplast	0.00923

Cluster 7	Term	p-value
70.26	plastid	1.95E-26
70.26.03	chloroplast	1.51E-25

1	METABOLISM	5.01E-10
1.05	C-compound and carbohydrate metabolism	1.93E-08
70	SUBCELLULAR LOCALIZATION	1.93E-08
1.07	metabolism of vitamins, cofactors, and prosthetic groups	2.62E-05
01.06.06	isoprenoid metabolism	0.000914
1.06	lipid, fatty acid and isoprenoid metabolism	0.00098
01.05.02	sugar, glucoside, polyol and carboxylate metabolism	0.00112
01.06.06.13	tetraterpenes (carotinoids) metabolism	0.00243
10.03.03	cytokinesis (cell division) /septum formation and hydrolysis	0.00353
70.04	cytoskeleton	0.00403
70.04.05	microtubule cytoskeleton	0.00683

Cluster 8	Term	p-value
14.07	protein modification	0.000132
14.07.03	modification by phosphorylation, dephosphorylation, autophosphorylation	0.00113
32	CELL RESCUE, DEFENSE AND VIRULENCE	0.00213
14	PROTEIN FATE (folding, modification, destination)	0.00391
34.11.10	response to biotic stimulus	0.00391
1.04	phosphate metabolism	0.00465

34.11	cellular sensing and response to external stimulus	0.00465
-------	--	---------

Cluster 9	Term	p-value
20.01.15	electron transport	2.04E-05
70.26	plastid	0.000111
2	ENERGY	0.000124
32.07	detoxification	0.000124
70.26.03	chloroplast	0.000124
2.11	electron transport and membrane-associated energy conservation	0.00021
32.07.07	oxygen and radical detoxification	0.000214
20.01	transported compounds (substrates)	0.000682
20	CELLULAR TRANSPORT, TRANSPORT FACILITATION AND TRANSPORT ROUTES	0.000708
2.45	energy conversion and regeneration	0.0013
02.45.15	energy generation (e.g. ATP synthase)	0.008

Cluster 10	Term	p-value
70.03	cytoplasm	5.06E-25
12.01	ribosome biogenesis	2.47E-22
12.01.01	ribosomal proteins	5.72E-17
16.01	protein binding	1.53E-16

16	PROTEIN WITH BINDING FUNCTION OR COFACTOR REQUIREMENT (structural or catalytic)	3.00E-11
70	SUBCELLULAR LOCALIZATION	3.08E-08
14	PROTEIN FATE (folding, modification, destination)	1.68E-07
70.1	nucleus	3.33E-07
14.13.01.01	proteasomal degradation (ubiquitin/proteasomal pathway)	1.17E-05
14.13.01	cytoplasmic and nuclear protein degradation	2.02E-05
14.07	protein modification	3.21E-05
11.04	RNA processing	0.000309
11.04.03	mRNA processing (splicing, 5'-, 3'-end processing)	0.000348
16.03	nucleic acid binding	0.00042
1.04	phosphate metabolism	0.000456
12	PROTEIN SYNTHESIS	0.000764
16.03.03	RNA binding	0.00107
12.04	translation	0.00152
30.01.05.01.05	tyrosine kinase	0.00215
70.10.09	nuclear speckles	0.0022
14.07.05	modification by ubiquitination, deubiquitination	0.00231
11.04.03.01	splicing	0.00306

70.07	endoplasmic reticulum	0.00313
14.13	protein/peptide degradation	0.00587

Cluster 11	Term	p-value
32.05	disease, virulence and defense	1.19E-05
34.11.10	response to biotic stimulus	1.29E-05
20.03.22	transport ATPases	2.60E-05
1.04	phosphate metabolism	0.00015
14.07.03	modification by phosphorylation, dephosphorylation, autophosphorylation	0.00015
34.11	cellular sensing and response to external stimulus	0.00015
34	INTERACTION WITH THE ENVIRONMENT	0.000308
20.01	transported compounds (substrates)	0.000424
32	CELL RESCUE, DEFENSE AND VIRULENCE	0.000456
16	PROTEIN WITH BINDING FUNCTION OR COFACTOR REQUIREMENT (structural or catalytic)	0.000527
30	CELLULAR COMMUNICATION/SIGNAL TRANSDUCTION MECHANISM	0.000602
20.03	transport facilities	0.00146
20	CELLULAR TRANSPORT, TRANSPORT FACILITATION AND TRANSPORT ROUTES	0.00162
14	PROTEIN FATE (folding, modification, destination)	0.00269

14.07	protein modification	0.00296
30.05.01	receptor enzyme mediated signalling	0.00299
01.01.03.02	metabolism of glutamate	0.00402
36.20.18.06	brassinosteroid response	0.00402
30.01	cellular signalling	0.0048
20.03.25	ABC transporters	0.00494
1	METABOLISM	0.00549
2.01	glycolysis and gluconeogenesis	0.00549
30.01.05	enzyme mediated signal transduction	0.00549
30.05	transmembrane signal transduction	0.0059

Cluster 12	Term	p-value
32.01	stress response	0.000109
32	CELL RESCUE, DEFENSE AND VIRULENCE	0.000145
34.11.03	chemoperception and response	0.000374
32.01.03	osmotic and salt stress response	0.000496
34.11.03.13	osmosensing and response	0.000496
34.11	cellular sensing and response to external stimulus	0.00221
34.11.03.12	water response	0.00477
20.03.01	channel / pore class transport	0.00542
34	INTERACTION WITH THE ENVIRONMENT	0.00711

Cluster 13	Term	p-value
70.26	plastid	8.47E-12
70.26.03	chloroplast	8.47E-12
70	SUBCELLULAR LOCALIZATION	1.91E-10
1	METABOLISM	1.40E-05
1.05	C-compound and carbohydrate metabolism	0.00254
2	ENERGY	0.00267

Cluster 14	<i>No terms found</i>	p-value
------------	-----------------------	---------

Cluster 15	Term	p-value
2.3	photosynthesis	0.000159
01.20.17.09	metabolism of alkaloids	0.00648
10.03.01	mitotic cell cycle and cell cycle control	0.00994

Cluster 16	Term	p-value
1	METABOLISM	4.90E-13
70.26.03	chloroplast	5.62E-12
70.26	plastid	6.52E-12
1.05	C-compound and carbohydrate metabolism	9.46E-08
01.05.02	sugar, glucoside, polyol and carboxylate metabolism	1.14E-06

70	SUBCELLULAR LOCALIZATION	1.70E-06
2	ENERGY	0.000157
1.01	amino acid metabolism	0.000292
1.07	metabolism of vitamins, cofactors, and prosthetic groups	0.000341
20	CELLULAR TRANSPORT, TRANSPORT FACILITATION AND TRANSPORT ROUTES	0.000341
01.01.06.05	metabolism of methionine	0.00218
2.08	pyruvate dehydrogenase complex	0.00446
20.01	transported compounds (substrates)	0.00446
20.01.03	C-compound and carbohydrate transport	0.00446
01.01.06.05.01	biosynthesis of methionine	0.00526
01.05.02.07	sugar, glucoside, polyol and carboxylate catabolism	0.00642

Cluster 17	Term	p-value
32.01.05	heat shock response	7.23E-12
32	CELL RESCUE, DEFENSE AND VIRULENCE	3.86E-08
34.11.09	temperature perception and response	1.19E-07
32.01	stress response	1.82E-07
34.11	cellular sensing and response to external stimulus	1.24E-06
16.03.01	DNA binding	2.13E-06

34	INTERACTION WITH THE ENVIRONMENT	5.33E-06
16.03	nucleic acid binding	9.87E-06
11.02.03.04	transcriptional control	2.07E-05
11.02.03	mRNA synthesis	2.41E-05
11.02	RNA synthesis	6.74E-05
32.01.01	oxidative stress response	9.90E-05
70.1	nucleus	0.000122
10.01.09.05	DNA conformation modification (e.g. chromatin)	0.000137
10.01.09	DNA restriction or modification	0.000166
11	TRANSCRIPTION	0.000166
34.11.03	chemoperception and response	0.000194
42.1	nucleus	0.000194
42.10.03	organization of chromosome structure	0.000194
34.11.01	photoperception and response	0.000226
10.01	DNA processing	0.000445
32.01.03	osmotic and salt stress response	0.000611
34.11.03.13	osmosensing and response	0.000611
10	CELL CYCLE AND DNA PROCESSING	0.00138
36.20.18.05	abscisic acid response	0.00155
01.20.38	metabolism of toxins/drugs	0.00372
32.07.07.03	glutathione conjugation reaction	0.00553

42	BIOGENESIS OF CELLULAR COMPONENTS	0.00564
16	PROTEIN WITH BINDING FUNCTION OR COFACTOR REQUIREMENT (structural or catalytic)	0.00806

Cluster 18	Term	p-value
32.01.05	heat shock response	0.000636
32.01	stress response	0.0072

Cluster 19	Term	p-value
1.05	C-compound and carbohydrate metabolism	6.50E-05
2	ENERGY	0.000107
1	METABOLISM	0.000187
1.06	lipid, fatty acid and isoprenoid metabolism	0.000301
01.20.19.01	metabolism of porphyrins	0.000701
01.20.19	metabolism of secondary products derived from glycine, L-serine and L-alanine	0.00157
01.06.06	isoprenoid metabolism	0.0025
1.2	secondary metabolism	0.0025
01.05.02	sugar, glucoside, polyol and carboxylate metabolism	0.00329
2.07	pentose-phosphate pathway	0.0033
32.01	stress response	0.0033
01.05.12.01	Calvin cycle	0.00643

16.21	complex cofactor/cosubstrate/vitamine binding	0.00643
01.05.03.04	starch metabolism	0.00797
01.05.03.04.04	starch anabolism	0.00797
2.3	photosynthesis	0.00841

Cluster 20	Term	p-value
14.13.01.01	proteasomal degradation (ubiquitin/proteasomal pathway)	2.86E-07
14.13.01	cytoplasmic and nuclear protein degradation	2.86E-07
16.01	protein binding	7.67E-06
36.20.18.02	ethylen response	0.000166
14	PROTEIN FATE (folding, modification, destination)	0.000989
14.07.05	modification by ubiquitination, deubiquitination	0.00108
34.11.03	chemoperception and response	0.00147
34.11.03.12	water response	0.00263
36	SYSTEMIC INTERACTION WITH THE ENVIRONMENT	0.00263
14.04	protein targeting, sorting and translocation	0.00339
14.07	protein modification	0.00339
16	PROTEIN WITH BINDING FUNCTION OR COFACTOR REQUIREMENT (structural or catalytic)	0.00475

Cluster 21	Term	p-value
70.22	endosome	0.00974
1.01	amino acid metabolism	0.0014
01.01.11.04	metabolism of leucine	0.00155
01.01.11	metabolism of the pyruvate family (alanine, isoleucine, leucine, valine) and D-alanine	0.00454
34.11.03.12	water response	0.00454
01.01.11.04.02	degradation of leucine	0.00608
34.11.03	chemoperception and response	0.00688
01.01.11.02	metabolism of isoleucine	0.00959
34.11	cellular sensing and response to external stimulus	0.00959
Cluster 22	Term	p-value
01.20.17.07	metabolism of glycosinolates and derivatives	0.000284
70.01	cell wall	0.000284
1	METABOLISM	0.000315
1.05	C-compound and carbohydrate metabolism	0.00159
42.01	cell wall	0.00229
01.20.17	metabolism of secondary products derived from primary amino acids	0.00294
32.07.07.05	peroxidase reaction	0.00381

2.19	metabolism of energy reserves (e.g. glycogen, trehalose)	0.00444
1.2	secondary metabolism	0.00687
01.05.05.07	C-1 compound catabolism	0.00815
32.07	detoxification	0.00815
32.07.07	oxygen and radical detoxification	0.00815
30.05.01.12	transmembrane receptor protein tyrosine kinase signalling pathways	0.00922
32.01.01	oxidative stress response	0.00922

Cluster 23	<i>no terms found</i>	p-value
------------	-----------------------	---------

Cluster 24	Term	p-value
32	CELL RESCUE, DEFENSE AND VIRULENCE	3.11E-06
16.17.01	calcium binding	0.000263
32.01	stress response	0.000263
34.11	cellular sensing and response to external stimulus	0.00042
34.11.09	temperature perception and response	0.00042
34	INTERACTION WITH THE ENVIRONMENT	0.000746
01.20.23	metabolism of secondary products derived from L-methionine	0.00125
32.01.06	cold shock response	0.00216
34.11.03	chemoperception and response	0.00216

36.20.18	plant hormonal regulation	0.00216
36	SYSTEMIC INTERACTION WITH THE ENVIRONMENT	0.00391
36.25.16.08	response to wounding	0.00406
36.2	plant / fungal specific systemic sensing and response	0.00421
10.01.09.05	DNA conformation modification (e.g. chromatin)	0.00652
1.2	secondary metabolism	0.00761
10.01.09	DNA restriction or modification	0.00766
36.25.16	immune response	0.00766
36.25	animal specific systemic sensing and response	0.00877
42.1	nucleus	0.00877
42.10.03	organization of chromosome structure	0.00877
11.02.03.04	transcriptional control	0.00918

Cluster 25	Term	p-value
11.04	RNA processing	3.34E-08
16.19	nucleotide/nucleoside/nucleobase binding	3.34E-08
11.04.01	rRNA processing	6.34E-06
16	PROTEIN WITH BINDING FUNCTION OR COFACTOR REQUIREMENT (structural or catalytic)	1.59E-05
10.01.05.03	DNA recombination	2.84E-05

		Anejos
10.01.02	DNA topology	9.84E-05
11.04.03.01	splicing	0.00044
70	SUBCELLULAR LOCALIZATION	0.000457
16.19.03	ATP binding	7.00E-04
16.03.03	RNA binding	0.000907
11.04.03	mRNA processing (splicing, 5'-, 3'-end processing)	0.00133
10.01.05.01	DNA repair	0.00333
10.01.05	DNA recombination and DNA repair	0.00455
30.01.05.05.03	trimeric G-protein mediated signal transduction	0.00663
70.16	mitochondrion	0.00663

Anejo 3: Validación de los resultados obtenidos en los *microarrays*

