



UNIVERSIDAD
POLITECNICA
DE VALENCIA

**Origen y función de las espermidina
aminopropil transferasas
en *Arabidopsis thaliana***

TESIS DOCTORAL

EUGENIO GÓMEZ MINGUET

VALENCIA, 2008.

Portada: *El desarrollo normal de la vasculatura en Arabidopsis thaliana requiere la expresión de ACAULIS5 (en rojo), sólo en un subgrupo de células específicas que están diferenciándose, para prevenir la muerte celular prematura y permitir completar el proceso de diferenciación.*



UNIVERSIDAD
POLITECNICA
DE VALENCIA

Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos
Departamento de Biotecnología



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

Origen y función de las espermidina
aminopropil transferasas en
Arabidopsis thaliana

Trabajo presentado por Eugenio Gómez Minguet para optar al grado de
Doctor en Biotecnología por la Universidad Politécnica de Valencia

Valencia, septiembre de 2008

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

CERTIFICAN que el Licenciado en Ciencias Biológicas EUGENIO GÓMEZ MINGUET ha realizado bajo su dirección en el Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas el trabajo que lleva por título “Origen y función de las espermidina aminopropil transferasas en *Arabidopsis thaliana*”, y autorizan su presentación para optar al grado de Doctor.

Y para que así conste, expiden y firman el presente certificado en Valencia, septiembre de 2008.

Dr. Miguel Ángel
Blázquez Rodríguez

Dr. Juan
Carbonell Gisbert

La realización de este trabajo ha sido posible gracias a la concesión de una beca de Formación de Profesorado Universitario (FPU) del Ministerio de Educación y Ciencia (FP-2001-1735) y a la concesión de una beca I3P de Posgrado del CSIC (I3P-BPG2005).

Este proyecto se enmarca dentro de la financiación de los proyectos del Ministerio de Educación y Ciencia BIO99-1201-CO2-01, BIO2002-04083-C03-02 y BIO2005-07156-C02-01.

*“¡No! No lo intentes.
Hazlo o no lo hagas,
pero no lo intentes.”*

Yoda, Maestro Jedi.

Antes de empezar con los agradecimientos, quisiera advertir al lector sobre la extensión de éstos. Las razones para tal extensión son varias: en primer lugar, son muchos los años compartidos con compañeros en el IBMCP y mucha la gente conocida, y aunque es imposible nombrar personalmente a todos, que me disculpen los que no aparezcan explícitamente, sí quiero hacer referencia a muchos de los que me han acompañado estos años; en segundo lugar, los que me conocen bien saben que tengo gran tendencia a enrollarme y, en este apartado tan personal, pienso poner poco freno a este defecto; y por último, por una simple cuestión de “morbosa mala leche”, pues siendo mucha la gente que tiene el vicio morboso de leer sólo los agradecimientos de las Tesis, al menos que le suponga un esfuerzo algo mayor al habitual... y empiezo...

No puedo empezar de otra forma que dándoles las gracias a mis directores de Tesis, Juan y Miguel, que durante todos estos años se han esforzado por enderezar mi natural tendencia a la dispersión. Me habéis guiado y apoyado siempre, y me habéis enseñado cómo debe realizarse una buena investigación y, al mismo tiempo, me habéis dado libertad suficiente para desarrollarme independientemente, enseñándome de esa manera a pensar por mi mismo. Me habéis formado como investigador pero también como persona y me considero un afortunado por haberos tenido como directores.

De entre las personas que debo destacar, la primera, sin ninguna duda, es M^aÁngeles Argomainz. Pocas cosas pueden añadirse a lo que de ella ya se ha dicho en tantas Tesis. Hay muy pocas personas como tú, tan pacientes, tan dispuestas a ayudar y tan comprensiva con todos, en definitiva, tan necesaria. Muchas gracias por todo.

Mis andanzas por el IBMCP se iniciaron en el laboratorio 12 (actual 3.11). Después, por cuestiones prácticas fui acogido físicamente en el laboratorio 13 (actual 3.10) y final y definitivamente me apropié de un sitio en el laboratorio 20 (actual 3.07). Mi agradecimiento a todas las personas que he conocido durante todo este tiempo, todos sois responsables de que me haya encontrado tan a gusto todos estos años, todos me habéis enriquecido científica y personalmente. Hemos compartido tantas experiencias, cenas, bodeguitas, viajes, excursiones, fiestas, “monovolumen”, congresos... habéis sido una segunda familia. Tantos quiero nombrar que no sé por dónde empezar... pero todos habéis sido y seguís siendo buenos amigos.

La primera persona que conocí en el L12 fue a Carlos. Te convertiste en el gran amigo que eres hoy y te debo gran parte de los buenos y divertidos momentos de estos años, tanto dentro como fuera del labo. Eres una gran persona y un gran luchador, no cambies nunca. Miguel A. Pérez (L3.08), siempre has estado dispuesto a ayudarme y te tengo un gran aprecio. Cristina Úrbez, gracias por ser como eres, eres una bellísima persona, como muy pocas. Eavan, te agradezco tu sinceridad (la de los buenos amigos) para “tirarme de las orejas” cuando lo merecía, eso me ha hecho ser mejor. Pablo (y su *alter ego* Antonio), por tantos divertidos momentos y por compartir las vicisitudes de la agotadora etapa final de nuestras Tesis (¡Suerte pasado mañana!). Dolo, qué bien nos lo hemos pasado y lo que nos hemos divertido. MD, el último fichaje estrella, porque no sólo eres una persona fantástica, sino que sin tu ayuda la “incursiones” en microscopía no hubieran sido tan fructíferas.

Un abrazo fortísimo para las chicas del 13, que después de acogerme y aguantarme me premiaron admitiéndome como “Chica del 13” honorífica, título que ostento con orgullo. Cárol, mi “rubia preferida del segundo piso”, gracias por tu amistad y por brindarme siempre tu apoyo científica y personalmente. Begoña, mi autoasignada “madrina de laboratorio”, gracias por enseñarme los entresijos de la hibridación *in situ*, tú me ayudaste a tener las preciosas imágenes que finalmente han llegado a ser portada de *Development*. Yolanda, me encanta tu sinceridad aplastante pero cierta. Clara, es enriquecedor discutir de ciencia contigo aunque no haya conseguido convencerte, no pierdo la esperanza. Cristina Martí, por esos momentos inolvidables (¡Dios de la Biotecnología!).

Sophie, eres una persona fantástica y soy afortunado por tener tu amistad. Aurora, de verdad que eres una persona encantadora (Pako, asegúrate de no dejarla escapar; ni tú a él). José Luis, siempre es muy estimulante conversar contigo y compartir puntos de vista diferentes, y por eso valoro nuestra amistad.

Marta, gracias por tu amistad, aún cuando he metido la pata, y por apoyarme fuera y dentro del labo. Leo, durante tantos años compartiendo alegrías y frustraciones, te mereces toda la felicidad del mundo. Pako, llegaste para hacer el proyecto y te “engañamos” para hacer la Tesis, no sólo eres un gran compañero sino que también eres un buen amigo (siento dejarte como único “poliaminólogo”; te echaré de menos en mi postdoc). Javi, también un buen amigo y gran compañero, eres una gran persona, no cambies. Martín, hemos compartido momentos muy entretenidos, de verdad espero que encuentres el camino que te haga realmente feliz. David, tu acelerado dinamismo es muy estimulante y valioso. Berta, verano a verano te has hecho querer.

Otros han llegado en los últimos años a nuestro “Todos Labo12” y aunque algunos los he conocido sólo durante un tiempo limitado, han conseguido que les tenga un gran cariño. Sólo nombraré a unos pocos. Lucas, por tu dinamismo, por introducirme en el divertido mundo de la “Pocha” y por las agotadoras partidas de Pádel. Paco, eres garantía de pasar un buen rato entre amigos, mucha suerte. Sara, una encantadora italiana con la que me he divertido mucho. Andries... “claaaro, claaaro”. Espe, al final estamos haciendo “provecho” de ti, eres genial. Patricia, Raquel, Amparo, Asun, Diego, Verónica, Tere, Sonia... gracias por vuestra ayuda cuando la he pedido y por todos los buenos momentos...

No puedo olvidarme de “las chicas de Carmen”, con las que hemos compartido físicamente laboratorio. Pachi, Aurora, Pili, Olga, Sandra y Leticia, lo he pasado muy bien compartiendo laboratorio con vosotras. Loli, nuestra técnico compartida, eres increíble, gracias por toda tu ayuda.

He compartido tantas cosas con tanta gente del IBMCP que ponerlos a todos es imposible y el límite entre los que nombre y los que no, difuso e injusto. A todos, mi agradecimiento por todos estos años tan agradables y fructíferos, por vuestra ayuda científica y por vuestra amistad fuera del labo, por las fiestas, por los viajes, por las excursiones, por los congresos y por tantas cosas. Algunas personas, por la amistad que hemos compartido en algún momento, las debo nombrar. Las “Leonas”: Cristina, un fuerte abrazo, y M^aCruz, mañana defiendes tu Tesis ¡Ánimo! A TODOS los de los laboratorios 2.01, 2.02 y 2.03, por vuestra ayuda siempre, por hacer amenas tantas comidas, por tanto momentos tan agradables y por vuestra amistad. A las compañeras y compañeros de todo el IBMCP... Cinta, M^aÁngeles, Astrid, Julia, Laura, Jorge, Alberto, Silvia, Emilio, Pedro, Mónica, Capa, Selma, Stephanie, Sofía, José Luis, Albor, Mar, Regina, ... y tantos y tantos que no os puedo nombrar a todos; en diferentes momentos hemos compartido viajes, cenas y fiestas, me lo he pasado muy bien y me acuerdo mucho de todos, aunque ahora las circunstancias nos hagan coincidir menos. Patricia, Ana, Nico, etc., una pequeña “metedura de pata” me llevó a poder conoceros mucho más y nunca me he alegrado tanto de haber metido la pata... Y cómo no a los compañeros y compañeras con los que tanto me he divertido jugando al Pádel: Roberto, Miguel, Pako, Lucas, Martín, José Luis, Pablo, Sofía, Stephanie, Selma, Nico y Consuelo.

Aunque me tilden de pelota, de verdad quiero darles mi agradecimiento también a las chicas de administración, gracias a todas por ser tan agradables y tan eficientes, siempre me habéis facilitado lo que he necesitado. Un saludo a Ana, a la que tengo especial aprecio. Eugenio, eres un “mago” de la secuenciación. A los informáticos, Alexis y Ramón, y a los de mantenimiento, con Santiago a la cabeza, por

luchar para que las cosas funcionen. A Juni y Estela, por su amabilidad siempre y por facilitarnos tanto el hacer pedidos. Al personal del invernadero, al servicio de esterilizado, a Assumpta, que nos facilitan tanto el trabajo cotidiano, con especial afecto a Rafa y Toni (espero llegar a ser “cabrón” pero intentaré no olvidar los inicios). A dirección, por permitirnos organizar las fiestas que ayudan tanto a consolidar el gran compañerismo que se respira en el IBMCP.

No puedo olvidarme de Anna y José M., que me acogieron como uno más de su familia cuando estuve de estancia en su laboratoto en *North Caroline State University*, y por los que tengo un especial cariño. Lo pasé muy bien y me divertí como un niño decorando las “Halloween Pumpkins” con la pequeña Clara.

Los mismos agradecimientos o más merecen mis amigos de fuera del IBMCP, con los que he compartido preocupaciones y alegrías. A todos mis amigos de la Falla, especialmente a Pilar, por su enorme bondad y cariño, a mi “primo” Vicente por su divertida y ácida dialéctica, a Susana, que ha sido como la hermana que no tengo para apoyarme en momentos personales difíciles y a Dani por esas divertidas partidas de dardos. A José Vte., mi amigo de toda la vida, aunque las circunstancias nos hacen vernos menos de lo que nos gustaría. A mis amigos de la Universidad, Isabel, Eva, Alegría, Vicente, Marcos, Pedro, M^a José, y sus parejas respectivas, vuestra amistad no tiene precio.

A toda mi Familia, me siento muy orgulloso de pertenecer a una familia tan unida como la nuestra. Primos, somos prácticamente como hermanos y vuestro cariño y vuestro apoyo han sido siempre fuente de fortaleza para luchar por mis sueños. Os quiero a todos. Mi máximo agradecimiento a mis padres por haberme dado siempre todo lo que he necesitado, apoyarme en todo lo que he emprendido y por inculcarme los valores que me guían siempre y que me dictan intentar ser cada día un poco mejor. Soy lo que soy gracias a vosotros, os quiero. Isidro, no eres sólo mi hermano, eres mi mejor amigo y tu apoyo, incondicional, no tiene precio.

Por último, mi agradecimiento a la Salsa, porque gracias a mi pasión por este baile conocí a mi media naranja. Ella ha sufrido tanto como yo todos estos meses de escritura de la Tesis, y su apoyo y su comprensión no han tenido límites. Eres maravillosa. Te quiero.

ABREVIATURAS

ABA	ácido abscísico.
ACL5	gen At5g19530 de <i>Arabidopsis thaliana</i> .
ADC	arginina descarboxilasa.
AdoMet/SAM	S-adenosilmetionina.
AdoMetdc/SAMdc	S-adenosilmetionina descarboxilada.
BAC	cromosoma artificial de Levadura.
BAP	bencil amino purina.
cDNA	DNA complementario al RNA mensajero.
Col-0	<i>Arabidopsis thaliana</i> ecotipo Columbia-0.
DNA	ácido desoxirribonucleico.
DT-A	subunidad A de la toxina de la difteria.
g	gramo.
GA	giberelina.
h	hora.
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
IAA	ácido indolacético.
JA	ácido jasmónico.
<i>Ler</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i> ecotipo Landsberg <i>erecta</i> .
min	minuto.
µg	microgramo.
ml	mililitro.
ODC	ornitina descarboxilasa.
ORF	pauta abierta de lectura.
PCR	reacción en cadena de la polimerasa.
PMT	putrescina N-metiltransferasa.
RNA	Ácido ribonucleico.
rRNA	RNA ribosómico.
SAMDC	S-adenosilmetionina descarboxilasa.
seg	segundo.
SPDS	espermidina sintasa.
<i>SPD1</i>	gen At1g23820 de <i>Arabidopsis thaliana</i> .
<i>SPD2</i>	gen At1g70310 de <i>Arabidopsis thaliana</i> .
SPMS	espermina sintasa.
<i>SPM</i>	gen At5g53120 de <i>Arabidopsis thaliana</i> .
TSPMS	termoespermina sintasa.
UTR	región del RNA mensajero no traducida.

ÍNDICE

1.- INTRODUCCIÓN	1
Historia de las poliaminas	3
Biosíntesis de las poliaminas	5
Catabolismo de las poliaminas	7
Función de las poliaminas	9
Consideraciones	12
Objetivos	13
2.- <i>SPM</i>, UNA ESPERMINA SINTASA DE <i>ARABIDOPSIS THALIANA</i>	15
Identificación de <i>SPM</i>	18
Comprobación en Levadura de la actividad SPMS codificada por <i>SPM</i>	21
3.- FUNCIÓN DE LA ESPERMINA EN EL DESARROLLO DE <i>ARABIDOPSIS THALIANA</i>	23
Expresión de los genes <i>ACL5</i> y <i>SPM</i> en <i>Arabidopsis thaliana</i>	25
Identificación de mutantes nulos en genes implicados en la síntesis de espermina	30
Sobreexpresión del gen <i>SPM</i>	32
4.- FUNCIÓN DE <i>ACL5</i> EN EL DESARROLLO Y DIFERENCIACIÓN DEL XILEMA	35
Introducción	37
La función de <i>ACL5</i> es autónoma	39
Ausencia de crecimiento secundario en los mutantes <i>acl5</i>	40
5.- ORIGEN EVOLUTIVO DE LAS ESPERMIDINA AMINOPROPIL TRANSFERASAS	49
Homólogos en las bases de datos	51
Origen evolutivo de las actividades SPDS, SPMS, PMT y TSPMS	52
Características estructurales de las aminopropil transferasas y las PMTs	60

6.- DISCUSIÓN	65
La neofuncionalización como principal mecanismo generador de complejidad en el metabolismo de poliaminas	69
Modelo de evolución del metabolismo de poliaminas	73
Nuevas funciones para las nuevas poliaminas	74
Perspectivas futuras	78
Conclusiones	79
7.- MATERIAL Y MÉTODOS	81
7.1- CARACTERÍSTICAS Y MANEJO DEL MATERIAL BIOLÓGICO	83
7.1.1- Material Vegetal	83
Condiciones de Cultivo	83
Transformación de <i>Arabidopsis thaliana</i>	83
Selección de Transformantes	83
Identificación de Inserciones de T-DNA: Colección Alonso-Ecker	84
Esterilizado y Preparación de las Semillas de <i>Arabidopsis thaliana</i>	85
<i>Esterilización mediante Tratamiento con Alcohol</i>	85
<i>Esterilización mediante Tratamiento en Atmósfera de Cloro</i>	85
7.1.2- Levadura	85
Condiciones de Cultivo	86
Transformación de Levadura por Choque Térmico	86
7.1.3- Cepas Bacterianas	86
Condiciones de cultivo	87
Transformación de Cepas Bacterianas	87
7.2- MÉTODOS DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR	88
7.2.1- Identificación y Cuantificación de Poliaminas	88
Extracción	88
Dansilación	88
HPLC	88
Identificación y Cuantificación de ¹⁴C-espermina	89
7.2.2- Clonación de insertos en vectores plasmídicos	89
Digestiones	89
Purificación de bandas de DNA a partir de geles de agarosa	89
Ligaciones	89
Rellenado de extremos cohesivos	90

Construcciones generadas	90
<i>Identificación de SPM en una genoteca vírica</i>	90
<i>Expresión en levadura</i>	91
<i>Sobreexpresión de SPM en Arabidopsis</i>	91
<i>Expresión de ACL5 bajo el control de pRCH1</i>	91
7.2.3- Extracción de Ácidos Nucleicos	92
<i>Extracción de RNA</i>	92
<i>Extracción de DNA genómico</i>	92
<i>Extracción de DNA plasmídico</i>	92
7.2.4- Análisis Northern Blot	92
Muestras	92
Electroforesis en geles de formaldehído-agarosa y transferencia a membrana	93
Hibridación de membranas, lavados y detección de la señal	93
7.2.5- Procesamiento de Tejidos para Microscopía	94
Muestras	94
Fijación	94
Inclusión en Parafina	94
Cortes histológicos	95
Hibridación “in situ” de mRNA	95
<i>Obtención de las Ribosondas</i>	95
<i>Hibridación “in situ”</i>	96
<i>Lavados e inmunodetección</i>	96
 7.3- ANÁLISIS FILOGENÉTICO	 97
Rastreo de Secuencias	97
Análisis de Secuencias	97
Modelización y análisis estructural	98
 BIBLIOGRAFÍA	 101
 ANEXO I - Referencia de las secuencias utilizadas en el Análisis Filogenético I	 109
ANEXO II - Referencia de las secuencias utilizadas en el Análisis Filogenético II	112
 Fe de erratas	

Introducción

*“Lo que sabemos es una gota de agua;
lo que ignoramos es el océano.”*

Isaac Newton

Historia de las poliaminas

Cuando se repasa la historia del estudio de las poliaminas se encuentra un interesante recorrido, incluyendo un temprano conocimiento de su existencia (1678) pero un relativamente tardío conocimiento de su naturaleza real (1926). A pesar de hacer más de 80 años que se conoce su estructura química y de haber investigado un gran número de procesos para los que las poliaminas son importantes, seguimos teniendo una gran cantidad de incertidumbres y lagunas en el conocimiento de la función de estas pequeñas moléculas.

La primera referencia a una poliamina se remonta a la descripción de unos cristales en la famosa comunicación de Leeuwenhoek en 1678 a la Royal Society en la que se describía el descubrimiento de los espermatozoides (Figura 1). La siguiente referencia importante se produjo más de un siglo después, con desconocimiento del trabajo previo, cuando Vauquelin en 1791 describió con gran detalle los mismos cristales. Vauquelin fue el primero en intentar dilucidar su composición química, pero la impureza de sus muestras le hizo describirlas como fosfatos de calcio. En 1833,

Berzelius mencionó de nuevo estos cristales en sus estudios sobre el semen y sugirió, sin intentar su análisis, que se trataba de cristales de fosfato de amonio de magnesio, una visión que se mantuvo durante décadas. Fue Böttcher, con aparente desconocimiento de los trabajos previos, quien redescubrió en 1865 estos cristales y les atribuyó naturaleza proteica con argumentos poco convincentes (Rosenheim 1924)¹.



Fig. 1

Figura 1: Cristales de fosfato de espermina descritos por Leeuwenhouk en 1678.

¹ El interés histórico en estos cristales debemos quizás atribuirlo a su origen en el fluido seminal de animales. En una época donde las leyes y naturaleza de la herencia son aún desconocidas, cualquier cosa relacionada con ese misterio que constituía la creación de vida nueva, resultaba sin duda de gran interés.

El primero en reconocer la verdadera naturaleza de estos cristales fue Schreider en 1878, describiéndolos como cristales de fosfato de una nueva base orgánica, que además se podía encontrar en una gran variedad de animales. Dedujo erróneamente la fórmula C_2H_5N , a pesar de que sus cálculos analíticos, correctos, no concuerdan con esta formulación. Lo más curioso es que tras Schreider, muchos investigadores intentaron sin éxito obtener de nuevo estos cristales, haciendo que algunos autores llegaran a negar su existencia en el fluido seminal. El término de “spermine” para el compuesto del que están formados estos cristales no parece ser utilizado hasta finales del siglo XIX, siendo en primer lugar usado el término “spermin”. Fue el fisiólogo Ruso A. von Poehl en 1891 quien dedujo correctamente la fórmula de la espermina: $C_5H_{13}N_2$; no obstante, los vagos e incompletos detalles de su investigación hicieron que sus datos no fueran tomados con demasiada seriedad. Resulta no obstante destacable que en su trabajo se hiciera ya referencia a una utilización terapéutica de la espermina (Rosenheim 1924).

A principios del siglo XX se recopiló la información existente y se describieron con detalle los pasos necesarios para obtener los cristales descritos por Schreider a partir de semen y testículos (Rosenheim 1924), así como a partir de otros tejidos animales (Dudley *et al.* 1924). La estructura exacta de la espermina constituyente de los cristales de fosfato de espermina descritos por Leewenhoek, fue determinada en 1926 (Dudley *et al.* 1926). Los nombres de las distintas poliaminas han derivado comúnmente del origen de su descubrimiento, resultando obvia, por lo contado hasta ahora, la denominación de espermina. La espermidina fue denominada así por ser obtenida en el mismo proceso de obtención de la espermina, y presentar grandes semejanzas estructurales con la primera (Dudley *et al.* 1927). La putrescina debe su nombre a su abundancia en carne putrefacta, si bien fue aislada por primera vez de *Vibrio cholerae* (Wallace *et al.* 2003).

Durante mucho tiempo tras conocerse su naturaleza química correcta, la importancia de las poliaminas se sospechó sólo por su ubicuidad en todas las muestras analizadas. A medida que aumentaron el número de trabajos se comprobó cada vez con mayor evidencia la gran importancia que las poliaminas tienen para la vida, sin embargo el mecanismo exacto por el cual ejercen sus funciones sólo estamos empezando a comprenderlo.

Síntesis de las poliaminas

Las poliaminas son compuestos alifáticos con carga positiva a pH fisiológico y con un peso molecular relativamente pequeño. Las más abundantes y más ampliamente distribuidas entre todos los seres vivos son la putrescina y la espermidina con dos y tres grupos amino, respectivamente. La espermina, con cuatro grupos amino, constituye la tercera poliamina más abundante, aunque no se detecta en todos los organismos (Tabor and Tabor 1984).

La biosíntesis de poliaminas (Figura 2) se inicia con la síntesis de putrescina, generalmente por descarboxilación de la L-ornitina catalizada por la ornitina descarboxilasa (ODC). En las plantas existe una vía alternativa en la que se descarboxila la L-arginina por acción de la arginina descarboxilasa (ADC) produciendo agmatina que es hidrolizada por la acción de la agmatina iminohidrolasa (AIH), dando lugar a N-carbamoylputrescina (NCP). La NCP es metabolizada por la acción de la enzima NCP-amidohidrolasa (NCPasa) produciendo CO_2 , NH_3 y putrescina. La ornitina y la arginina son metabólicamente interconvertibles, de modo que la L-ornitina puede convertirse en L-arginina a través de la vía de la citrulina y, por otro lado, la L-arginina puede ser convertida en L-ornitina por acción de la enzima arginasa. La actividad espermidina sintasa (SPDS) añade un grupo aminopropilo a uno de los grupos amino de la putrescina. El grupo aminopropilo es donado por la S-adenosilmetionina descarboxilada (AdoMetdc) procedente de la descarboxilación de la S-adenosilmetionina (SAM) mediante la SAM descarboxilasa (SAMDC). La SAMdc es utilizada también en la conversión de la espermidina en espermina por acción de la espermina sintasa (SPMS). Los valores de las K_m de las aminopropil transferasas son aproximadamente del orden de las concentraciones celulares de sus sustratos, por lo que se considera que su actividad está regulada por la disponibilidad de éstos (Walden *et al.* 1997; Wallace *et al.* 2003).

La putrescina también es utilizada como precursor de la síntesis de alcaloides, tras ser convertida en N-metilputrescina por la putrescina N-metiltransferasa (PMT). Este paso es crítico para la síntesis de alcaloides como la nicotina (Figura 2), de gran importancia en Solanáceas debido a su papel en defensa (Steppuhn *et al.* 2004), aparte del interés antropocéntrico debido al tabaco, pudiéndose alterar su contenido alterando la actividad PMT (Sato *et al.* 2001).

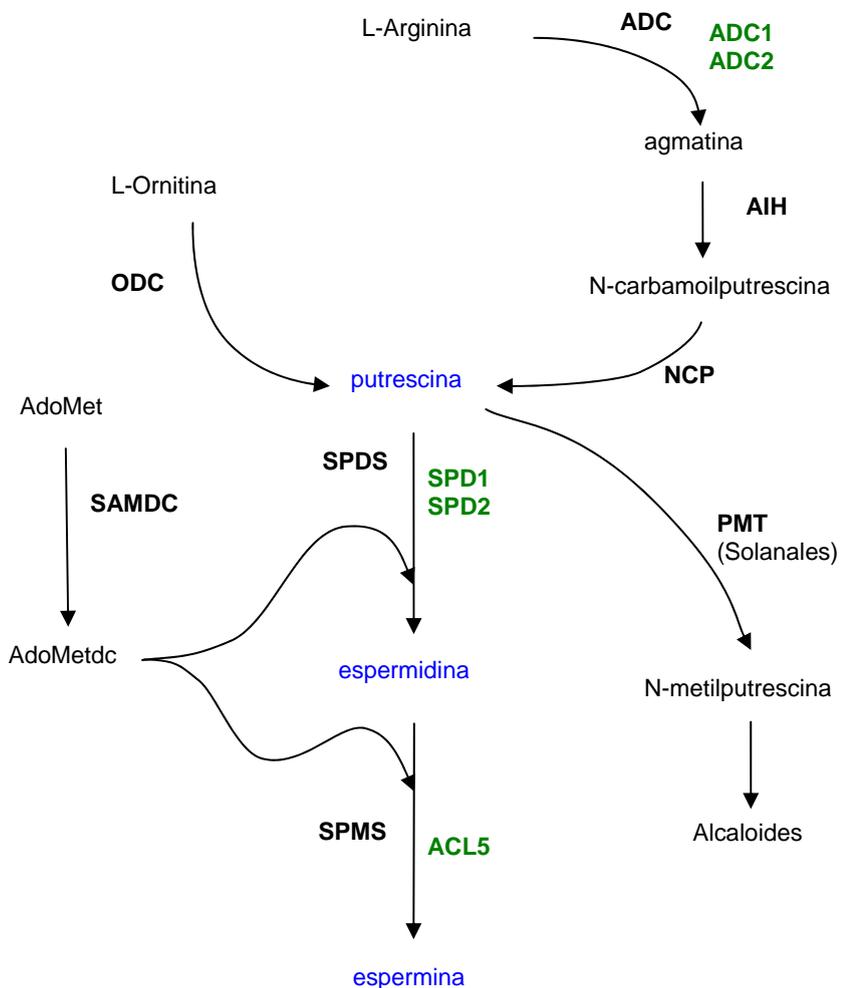


Figura 2: Ruta de biosíntesis de poliaminas. En verde se destacan los genes identificados hasta el año 2000 en *Arabidopsis thaliana*, responsables de las actividades ADC, SPDS y SPMS (no existe actividad ODC).

En el caso particular de la planta *Arabidopsis thaliana* utilizada en esta Tesis, podemos destacar en primer lugar la ausencia de la ruta de síntesis de putrescina a partir de L-ornitina. Los estudios bioquímicos y el análisis de su genoma indican que no parece existir actividad ODC y por tanto la putrescina se produciría sólo mediante la actividad ADC. Se han identificado dos genes que codifican esta actividad, así como otros dos genes que codifican la actividad SPDS, responsable de la producción de espermidina. Genes que codificaran estas dos actividades se habían descrito en diversas plantas; sin embargo, al inicio de esta Tesis, sólo se había identificado un gen, *ACL5*, que posiblemente codificara una espermina sintasa en *Arabidopsis thaliana*, cuyo mutante de pérdida de función presenta un defecto en la elongación del tallo (Hanzawa *et al.* 2000).

Catabolismo de las poliaminas

En las plantas, las poliaminas son catabolizadas mediante reacciones de oxidación, acompañadas de formación de H_2O_2 (Figura 3). La putrescina puede ser oxidada por la acción de la diamina oxidasa (DAO) formándose 4-aminobutanal y produciéndose NH_3 y H_2O_2 . El 4-aminobutanal cicla espontáneamente a $\Delta 1$ -pirrolina que es transformada en ácido γ -aminobutírico (GABA) por acción de la pirrolina deshidrogenasa (PDH). El GABA es desaminado y posteriormente oxidado para dar lugar a ácido succínico, que se incorpora al Ciclo de Krebs. La espermidina y la espermina pueden ser oxidadas por acción de la poliamina oxidasa (PAO), formándose 1,3-diaminopropano (DAP) y 4-aminobutanal en el caso de la oxidación de la espermidina, y DAP y N-(3-aminopropil)-pirrolina en el caso de la oxidación de la espermina, originándose en ambos casos H_2O_2 (Alcazar *et al.* 2006; Walters 2003).

Los animales catabolizan la putrescina de igual modo que las plantas, pero difieren en el catabolismo de la espermidina y la espermina, las cuales son reconvertidas, a través de una acetilación, en putrescina y espermidina, respectivamente, con formación de H_2O_2 y 3-acetamidopropanal, el cual es finalmente transformado en β -Alanina. Una diferencia importante entre plantas y animales es que el catabolismo en plantas es terminal, esto quiere decir que una vez la poliamina entra en la ruta del catabolismo no regresa a la ruta de biosíntesis, lo que sí sucede en los animales donde sólo el catabolismo de la putrescina es terminal. Existe una forma alternativa de catabolizar la espermina por la que es directamente transformada en espermidina por acción de una espermina oxidasa (SMO) (Wallace *et al.* 2003) y que hasta hace poco se

pensaba que era exclusiva de animales, sin embargo, recientemente, se ha identificado una poliamina oxidasa en plantas que presenta la misma actividad que la SMO de animales, indicando que en plantas también existiría esta ruta catabólica de retroconversión de la espermina en espermidina, lo que indica que en plantas no todas las rutas catabólicas de las poliaminas son terminales (Tavladoraki *et al.* 2006).

Función de las poliaminas

La ubicuidad de las poliaminas, tanto a nivel de organismos como de tejidos en los que se han detectado, así como las elevadas concentraciones a las que se encuentran (del orden de milimolar), ha despertado gran interés por estas pequeñas moléculas (Tabor and Tabor 1984). A pesar de ello, se conoce muy poco sobre el mecanismo por el cual las poliaminas ejercen sus funciones.

El estudio de las poliaminas se ha basado fundamentalmente en la identificación de correlaciones con diferentes procesos celulares, así como en efectos debidos a su aplicación exógena o al uso de inhibidores de su síntesis. A medida que los genes responsables de su síntesis o catabolismo han sido identificados y caracterizados en diversos organismos, las herramientas genéticas han permitido confirmar de forma clara su participación en importantes procesos celulares y de desarrollo (Evans and Malmberg 1989; Tabor and Tabor 1984; Malmberg *et al.* 1998) aunque los detalles de los mecanismos moleculares por el que ejercen su función no se conocen.

La cantidad de trabajos que reflejan todas las correlaciones que existen entre cambios en la concentración de las poliaminas y los diferentes procesos en los que han sido implicadas es muy extensa y no tiene sentido reunir las aquí, no obstante podemos dar algunas pinceladas que ilustran esta situación.

Las poliaminas han sido relacionadas con procesos fundamentales para la vida, como son la división, el crecimiento y la muerte celular (Thomas and Thomas 2001). En todos los organismos en los que se han conseguido mutantes deficientes en la síntesis de poliaminas se ha confirmado que las poliaminas son esenciales. Así por ejemplo, la ausencia de actividad ODC en el nematodo *Caenorhabditis elegans* da lugar a embriones inviábiles a menos que se suplementen con poliaminas (MacRae *et al.* 1998). En levadura, el mutante *spe4* (deficiente en espermina) es completamente viable en medio mínimo (Hamasaki-Katagiri *et al.* 1998) mientras que el mutante *spe3* (deficiente

en espermidina y espermina) es completamente dependiente de espermidina (Chattopadhyay *et al.* 2002; Hamasaki-Katagiri *et al.* 1997). En ratón la ausencia de espermina da lugar a problemas en el desarrollo y fertilidad, aunque los individuos deficientes son viables (Wang *et al.* 2004). En *A. thaliana*, el doble mutante *spd1 spd2* es inviable (Imai *et al.* 2004) mientras que el mutante *acl5* es viable pero presenta graves defectos en la elongación del tallo (Hanzawa *et al.* 1997; Hanzawa *et al.* 2000).

A nivel celular, se han establecido correlaciones entre las poliaminas y múltiples procesos, tales como el ciclo celular, la apoptosis, la transcripción y la traducción, el transporte de iones y la señalización intracelular (Moinard *et al.* 2005; Seiler and Raul 2005; Thomas and Thomas 2001; Tabor and Tabor 1984). En plantas se han encontrado también múltiples correlaciones entre la variación en la concentración de las poliaminas y procesos tales como la germinación, la embriogénesis, la formación de raíces, la iniciación floral o el desarrollo de flores y frutos (Evans and Malmberg 1989). El conocimiento del efecto de las poliaminas en el ciclo celular ha conducido en animales a estudios que han asociado las poliaminas con la proliferación celular en cáncer, lo que ha dado lugar a la utilización de inhibidores para su tratamiento (Bachrach 2004).

El carácter policatiónico de las poliaminas permite su interacción con moléculas de carga negativa, habiéndose demostrado la interacción “*in vivo*” con DNA (modificando su conformación), RNA (afectando la traducción de proteínas), proteínas (modulando su actividad) y fosfolípidos (influyendo en la rigidez de las membranas). Se ha planteado que las poliaminas funcionan simplemente como policationes celulares, pero la complejidad de la regulación del contenido de poliaminas apunta a que estas moléculas, aunque en algunos casos puedan funcionar simplemente como policationes, tienen además otras funciones críticas más allá de la simple interacción de cargas (Wallace *et al.* 2003).

Aunque en algunos procesos varias de las poliaminas pueden ejercer un efecto similar, no lo hacen con la misma eficiencia. Por ejemplo, la espermidina y la putrescina potencian la actividad de una ribonucleasa de *Citrobacter* mientras que la espermina parece reducirla (Levy *et al.* 1973). En el caso de la interacción con canales iónicos, parece que en muchos casos es la espermina la que tiene el efecto más eficiente sobre estos canales, bloqueándolos o modulándolos (Williams 1997). Uno de los efectos más estudiados de la espermina sobre canales iónicos es sobre el transporte de Ca^{2+} en la mitocondria (donde la espermidina tiene una eficiencia 5 veces menor que la espermina

y la putrescina no tiene ningún efecto), lo que tiene importantes consecuencias en la ruta apoptótica mediada por este orgánulo (Salvi and Toninello 2004).

Las poliaminas han sido también relacionadas con la respuesta a diferentes tipos de estrés tanto biótico como abiótico en plantas, y se ha planteado su actuación como moléculas señalizadoras primarias, como modificadoras de la expresión específica de genes y también en algunos casos como neutralizadoras de los radicales generados en situaciones de estrés oxidativo (Groppa and Benavides 2007; Rhee *et al.* 2007; Walters 2003). En *Arabidopsis thaliana* se ha sugerido que la ausencia de espermina da lugar a un fenotipo de hipersensibilidad a NaCl (Yamaguchi *et al.* 2006). Asimismo, se ha descrito cómo los genes de síntesis de poliaminas responden ante diferentes efectores de estrés abiótico como NaCl, ABA o deshidratación (Alcazar *et al.* 2006). Un estudio en células de raíz de *Hordeum vulgare* mostró que la espermina, y en menor medida la espermidina, alteran los canales de Na⁺/K⁺ de forma que se mantienen los niveles celulares ante una concentración externa mayor, postulándose como el mecanismo por el que la planta responde ante el estrés salino (Zhao *et al.* 2007).

Ya hemos descrito que aunque las poliaminas pueden actuar en algunos casos simplemente como policationes, en otras ocasiones parece importar su estructura, haciendo que cada una de ellas presente eficiencias diferentes en diferentes procesos. Una de las funciones de la espermidina, su participación en la hipusinación, es tan específica de esta poliamina como importante en eucariotas. El eIF5A es un factor de traducción necesario para el crecimiento en eucariotas (Park 2006) que contiene un aminoácido especial, la hipusina, que se forma por una modificación postraduccional totalmente dependiente de la espermidina y ninguna otra poliamina puede sustituirla (Chattopadhyay *et al.* 2003).

En conclusión, podemos afirmar que las poliaminas son de una importancia indiscutible para los seres vivos y que su ubicuidad y su capacidad de interactuar con una gran cantidad de macromoléculas biológicas justifican su participación tanto en procesos del crecimiento y desarrollo de los organismos, como en su reacción frente a situaciones de estrés. No obstante, los datos revelan que las poliaminas tienen funciones muy diversas, algunas de las cuales debidas a sus características como policationes y por tanto pueden ser ejercidas por cualquiera de ellas y otras en las que su estructura es importante y son específicas de alguna de ellas. Esta heterogeneidad y complejidad en sus funciones dificultan enormemente su estudio.

CONSIDERACIONES

Cualquier lector de esta Tesis habrá apreciado, o apreciará muy pronto si el estudio de las poliaminas no es su habitual campo de estudio, que en la introducción no se ha hablado sobre los recientes datos respecto a la actividad de la proteína codificada por *ACL5*. Las razones para hacerlo de esta manera es que gran parte de las estrategias iniciales seguidas durante la realización de esta Tesis estaban completamente justificadas con la información disponible en el momento en el que se plantearon pero no tanto con la información actual, por lo que se pretende seguir en esta Tesis esa coherencia temporal.

La información referente a la actividad de la proteína *ACL5*, como una termoespermina sintasa, y las implicaciones que ésta ha tenido sobre los conocimientos actuales en el campo de las poliaminas se mostrarán en los momentos que se consideren más adecuados. Creemos que de esta forma no sólo se entiende mejor todo la lógica seguida en el trabajo expuesto, si no que además se transmite la interesante circunstancia de que algunos datos que no parecían encajar en el modelo existente del metabolismo de poliaminas se pudieron explicar con los nuevos datos.

OBJETIVOS

En el momento de iniciar esta Tesis, sólo se había descrito un gen en plantas, *ACL5*, que codificara una putativa espermina sintasa. Paradójicamente, como mostraremos en el capítulo 3, el mutante nulo para este gen, contenía niveles normales de espermina. En ese momento, nos preguntamos qué otro gen, u otros genes, podían ser responsables de la síntesis de espermina y qué funciones específicas en el desarrollo tendría cada uno. Además, el mutante *acl5* presentaba un grave defecto en la elongación del tallo así como una sobreproducción de haces vasculares, por lo que también decidimos conocer con mayor detalle la relación entre las poliaminas y la formación de los haces vasculares.

Asimismo, nos resultaba interesante que diversas actividades enzimáticas (SPDS, PMT y SPMS) estuvieran codificadas por genes que presentaban una elevada similitud de secuencia, haciendo que nos preguntáramos si este parecido se debía a un origen evolutivo común o si se trataba de convergencia evolutiva.

Para responder a estas preguntas nos planteamos los siguientes objetivos:

- 1.- Identificar todos los genes implicados en la síntesis de espermina.
- 2.- Determinar la función de los genes con actividad espermidina aminopropil transferasa en el desarrollo de *Arabidopsis thaliana*.
- 3.- Establecer la función de *ACL5* en el desarrollo de los haces vasculares.
- 4.- Estudiar el origen evolutivo de la actividad espermidina aminopropil transferasa y su relación con las actividades SPDS y PMT.

SPM,
una espermina sintasa
de Arabidopsis thaliana

*“La ciencia es como la tierra;
sólo se puede poseer un poco de ella.”*

François-Marie Arouet Voltaire

Al inicio de este trabajo, el único gen de plantas identificado como una SPMS era *ACL5* (Hanzawa *et al.* 2000). Esta asignación de función se basaba en dos observaciones: 1) el alto grado de similitud de su secuencia con las de SPMS de otros organismos; y 2) la detección por HPLC de espermina en extractos de bacterias transformadas con el gen *ACL5*. Además, se disponía de varios alelos de pérdida de función que mostraban un grave defecto en el alargamiento del tallo: el alelo *acl5-1* corresponde con una mutación puntual que cambia E123 por K, el alelo *acl5-3* corresponde con una inserción de un elemento transponible y el alelo *acl5-4* corresponde a una delección producida por la movilización del elemento transponible del alelo *acl5-3*.

Para saber si el enanismo causado por las mutaciones en *ACL5* correlacionaba con un defecto en la síntesis de espermina, cultivamos plántulas silvestres y del mutante *acl5-4* durante 15 días y medimos la concentración de poliaminas. Como se ve en la Figura 3, el contenido de poliaminas (y de espermina en particular) era el mismo en ambos extractos, lo cual sugería que debía existir, al menos, un segundo gen en *A. thaliana* que codificara una SPMS.

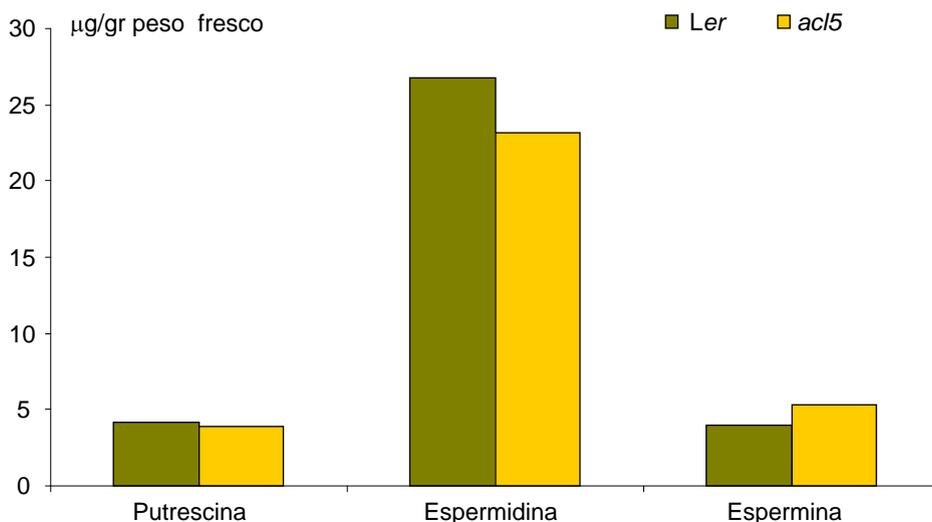


Figura 3: Niveles de Poliaminas en plántulas de 15 días, en el mutante *acl5-4* en comparación con el ecotipo silvestre Ler.

Identificación de SPM

Nuestra primera aproximación fue la de rastrear las bases de datos de *A. thaliana* utilizando la secuencia de *ACL5*, pero no encontramos secuencias que presentaran un nivel de similitud lo suficientemente alto, siendo las *SPDs* ya conocidas las que aparecían en primer lugar.

Se utilizó entonces la secuencia de aminoácidos de la espermina sintasa de levadura (*SPE4*) y obtuvimos la identificación de varios BACs que contenían ORFs con una alta similitud a *SPE4*, dos de los cuales contenían las dos *SPDs* ya conocidas: BAC F1707 y BAC F508. Otro de los BACs identificado fue el BAC MFH8 (del cromosoma 5) que no contenía ninguno de los genes de la biosíntesis de poliaminas identificados hasta el momento, por lo que se consideró como un candidato a contener un gen que codificara una nueva espermina/espermidina sintasa. La secuencia candidata correspondiente del BAC MFH8 se utilizó en las bases de datos para rastrear clones de cDNA con el objeto de identificar un clon completo que pudiéramos solicitar, pero sólo se encontraron clones que correspondían a las *SPDS* ya descritas.

Se consideró entonces analizar la secuencia genómica para tratar de pronosticar los posibles exones y utilizar dicha información para obtener el cDNA mediante PCR. Para ello, se tradujo la secuencia genómica en todas las pautas de lectura y se seleccionaron secuencias de más de 20 aminoácidos. Las secuencias de aminoácidos se compararon con las secuencias conocidas de las *SPDs* de *A. thaliana* y de *SPE4* de levadura, identificando varias posibles regiones codificantes de un nuevo gen (Figura 4).

Para comprobar si este posible gen realmente se expresaba, se diseñaron dos cebadores: uno en la región que potencialmente podía contener el codón de inicio de la traducción y otro ubicado en una región cuyos aminoácidos están altamente conservados en las espermina/espermidina sintasas (JC001 y JC002 respectivamente). Estos cebadores se utilizaron sobre cDNA proveniente de diferentes tejidos (flores, hojas, raíces y tallos) y en todos ellos apareció una banda de aproximadamente 350 pb. La secuenciación de esta banda purificada confirmó que se trataba de nuestro gen candidato, y esta misma banda se utilizó como sonda sobre una genoteca vírica disponible en el laboratorio para conseguir el cDNA completo de este gen. Se identificaron dos positivos que fueron recuperados y secuenciados (F1.b.1 y F2.a.2),

Comprobación en levadura de la actividad SPMS codificada por *SPM*

Para comprobar la actividad enzimática codificada por *SPM*, elegimos la complementación de cepas de *Saccharomyces cerevisiae* deficientes en la síntesis de espermidina (*spe3*) o espermina (*spe4*), con la ventaja de que al ser un sistema eucariota presenta la capacidad de introducir modificaciones postraduccionales que pueden resultar muy importantes para la actividad de una proteína. La ORF completa se transfirió desde el clon F2.a.2 al vector *pAN10* que permite expresar genes heterólogos en *S. cerevisiae* bajo el control del promotor constitutivo *ADHI* (Navas *et al.* 1993). Se seleccionó una construcción en sentido para los ensayos de complementación de levadura, así como una construcción en antisentido como control negativo.

A pesar del alto grado de similitud entre *SPM* y los genes que codifican SPDS, la introducción de *SPM* en el mutante *spe3* no complementó su defecto de crecimiento (resultados no mostrados) (Panicot *et al.* 2002), indicando que *SPM* no presenta en este sistema actividad espermidina sintasa. Sin embargo, la introducción de *SPM* en el mutante *spe4*, sí que permitió la recuperación de la síntesis de espermina (Figura 6).

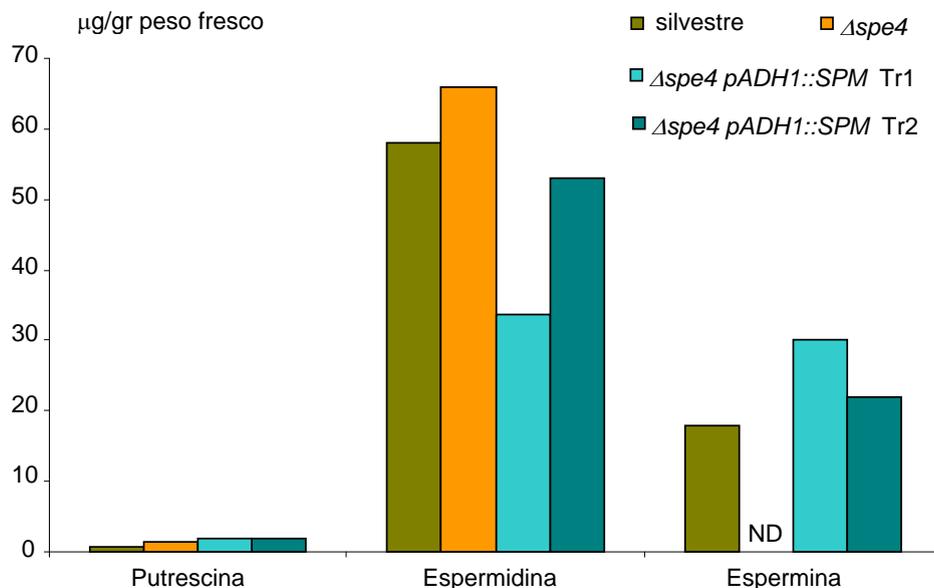


Figura 6: Complementación de la cepa $\Delta spe4$ de *Saccharomyces cerevisiae* con *SPM* en dos transformantes independientes. (ND: No detectado)

Capítulo 2

De hecho, se pudieron confirmar estos resultados al incubar los cultivos con ^{14}C -espermidina, cuando se comprobó que aparecía ^{14}C -espermina (Figura 7), lo que indicaba que la espermina detectada en los extractos procede de la conversión enzimática de la espermidina. Todos los datos aportados confirmaron que la proteína codificada por *SPM* es una espermina sintasa.

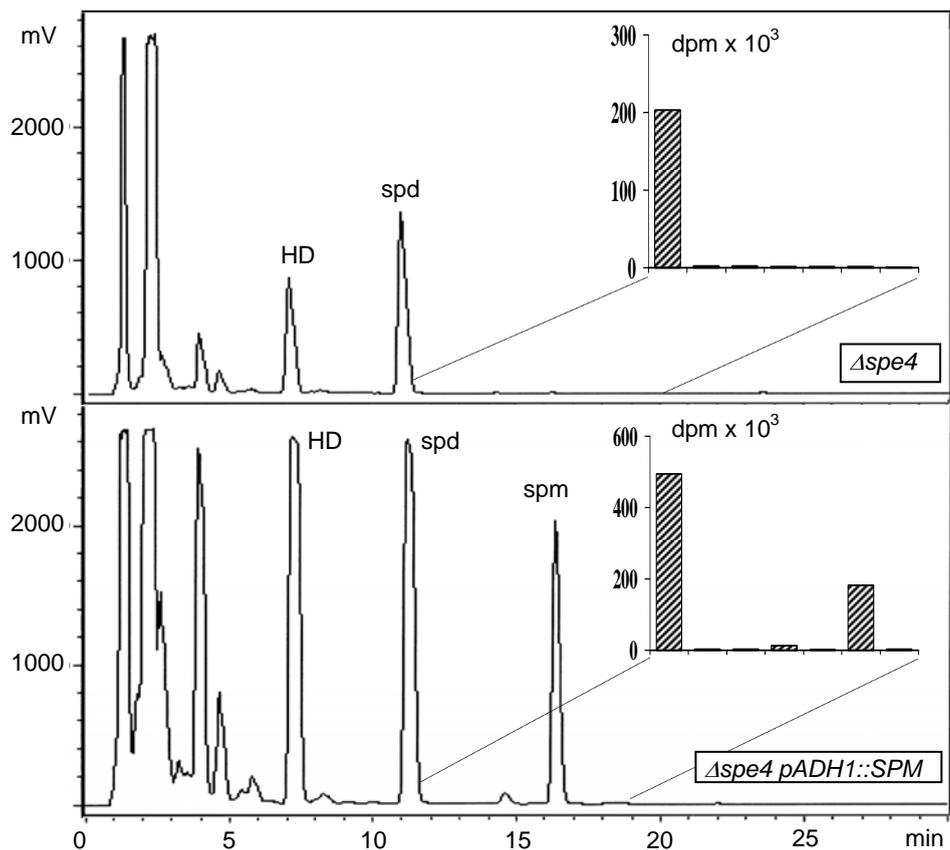


Figura 7: Conversión de ^{14}C -espermidina en ^{14}C -espermina en *Saccharomyces cerevisiae* por la actividad codificada por *SPM*. (HD: hexanodiamina; spd: espermidina; spm: espermina). Las gráficas representan la radiactividad, cuantificada en un contador de centelleo, en fracciones recogidas cada min.

*Función de la espermina
en el desarrollo
de Arabidopsis thaliana*

*“Una experiencia nunca es un fracaso,
pues siempre viene a demostrar algo.”*

Thomas Alva Edison

Hemos demostrado que en *A. thaliana* existen al menos dos genes que codifican espermina sintetas. No obstante, resulta paradójico que sólo el mutante en uno de ellos (*ACL5*) provoque un fenotipo tan llamativo como el enanismo (Hanzawa *et al.*, 1997; Hanzawa *et al.*, 2000), manteniendo sin embargo unos niveles prácticamente normales de espermina. Por lo tanto, surgen varias preguntas obvias: ¿Cuál es el motivo de que exista más de un gen para esta actividad? ¿Cuál es el papel de cada uno de ellos en la vida de la planta?

Existen, a priori, al menos dos posibles explicaciones. Una es que ambos genes tengan un patrón de expresión no solapante, espacial o temporalmente, que haga a ambos necesarios para el organismo. Y otra, no excluyente, es que ambas proteínas tengan funciones diferentes, ya sea por actividad, por sustrato disponible (si existe compartimentalización diferencial de las enzimas) o por asociación con otras proteínas que modifiquen su función.

Para distinguir entre estas posibilidades, decidimos estudiar el patrón de expresión de ambos genes y averiguar su respuesta frente a diferentes hormonas vegetales, comparándolos entre sí. Asimismo, era necesario obtener mutantes nulos para *SPM* que nos permitieran estudiar su papel mediante un abordaje genético.

Expresión de los genes *ACL5* y *SPM* en *Arabidopsis thaliana*

Como se ve en la Figura 8, la expresión de *ACL5* es más intensa en raíces, tallos y hojas de 15 días, mientras que en el caso de *SPM* la expresión más fuerte se detecta en tallo, flores y silicuas. Si bien existen diferencias en el nivel de expresión de *ACL5* y *SPM* en los distintos órganos de la planta, también hay un alto grado de coincidencia, por ejemplo en el tallo (que es el órgano más afectado en el mutante *acl5*). Este resultado sugiere que la ausencia de *ACL5* puede estar siendo compensada, a nivel global, por *SPM* y que ésta sea la causa de no ver cambios en los niveles de espermina en los mutantes *acl5*.

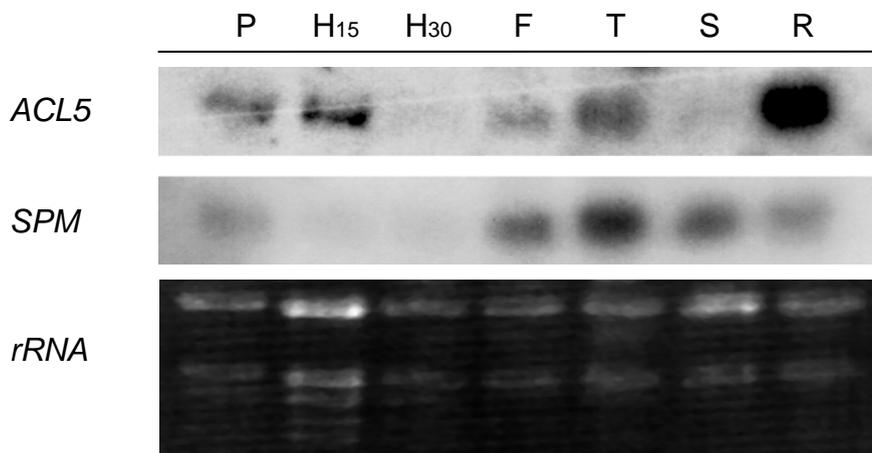


Figura 8: Análisis Northern de la expresión de *ACL5* y *SPM* en diferentes tejidos. Tejidos: Plántulas de 7 días (P), Hojas de roseta de 15 días (H15), Hojas de roseta de 30 días (H30), Flores (F), Tallo (T), Silículas (S), Raíz (R).

Las diferencias observadas también revelan que existe una diferente regulación de ambos genes. Dado que las poliaminas han sido relacionadas con gran variedad de procesos de desarrollo que son regulados por hormonas vegetales (Kusano *et al.* 2008), es de esperar que su expresión esté regulada, al menos en parte, por estas hormonas. En efecto, como se muestra en la Figura 9, pudimos observar que los dos genes muestran diferente respuesta a tratamientos hormonales en plántulas de 10 días de edad. Mientras que *ACL5*, como ya había sido descrito, aumenta su expresión en presencia de auxinas (Hanzawa *et al.* 2000), la expresión de *SPM* no es afectada por las auxinas y, sin embargo, aumenta en respuesta al tratamiento con ácido abscísico (ABA). Curiosamente, ninguno de los otros genes del metabolismo de poliaminas muestra regulación hormonal en estas condiciones, a excepción del gen *ADC2*, que aumenta su expresión en respuesta al tratamiento con auxinas, ABA, giberelinas y ácido jasmónico.

La diferente regulación hormonal puede explicar las diferencias que existen en su expresión en diferentes tejidos, pero también sabemos que en algunos órganos la expresión está solapada, como ocurre justamente en el tallo donde el fenotipo de *acl5* es más acusado, por lo que nos preguntamos si existirían diferencias más específicas, por

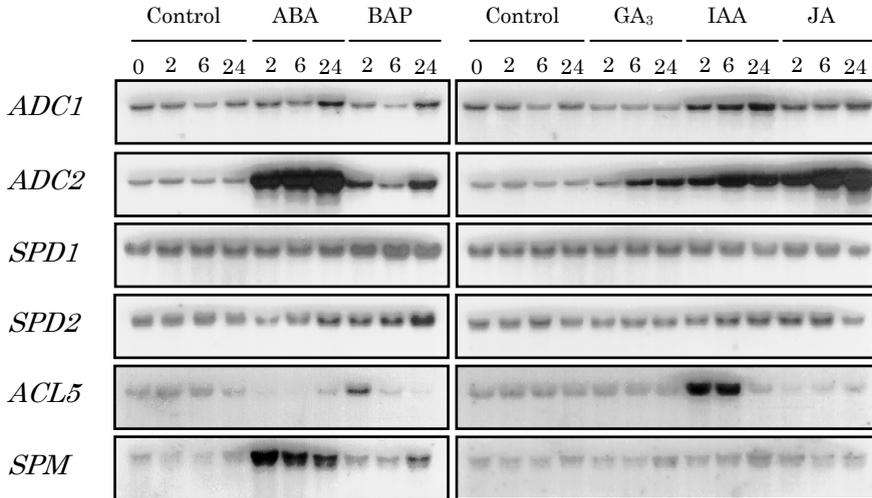


Figura 9: Análisis Northern de la respuesta hormonal de genes implicados en la biosíntesis de poliaminas. ABA (ácido abscísico), BAP (citoquininas), GA₃ (giberelinas), IAA (auxinas), JA (ácido jasmónico).

ejemplo a nivel tisular, de tal forma que el proceso de homogeneización del órgano para la comparación mostrada en la Figura 8, las hubiera ocultado.

Para responder a esta pregunta decidimos determinar el patrón espacial de expresión génica de *ACL5* y *SPM* mediante la técnica de hibridación “*in situ*”, utilizando para ello cortes transversales de tallo de plantas adultas. La hibridación “*in situ*” con sonda para *ACL5* nos mostró que este gen se expresa con extraordinaria especificidad en unas pocas células muy próximas al tejido vascular, más específicamente, al xilema (Figura 10). Esta observación podría dar respuesta a algunas de nuestras preguntas iniciales. En primer lugar, una expresión tan discreta y específica hace factible la posibilidad de que *ACL5* contribuya sólo minoritariamente a los niveles globales de espermina, y que por tanto su ausencia no dé lugar a una reducción grave de la espermina. Al mismo tiempo, esta expresión tan concreta podría indicar que en las células donde se expresa se produce un aumento importante de su concentración, pero de forma tan específica que en el mutante *acl5* el gen *SPM* no puede suplirlo (cuya expresión parece ser más ubicua y uniforme, *datos no mostrados*).

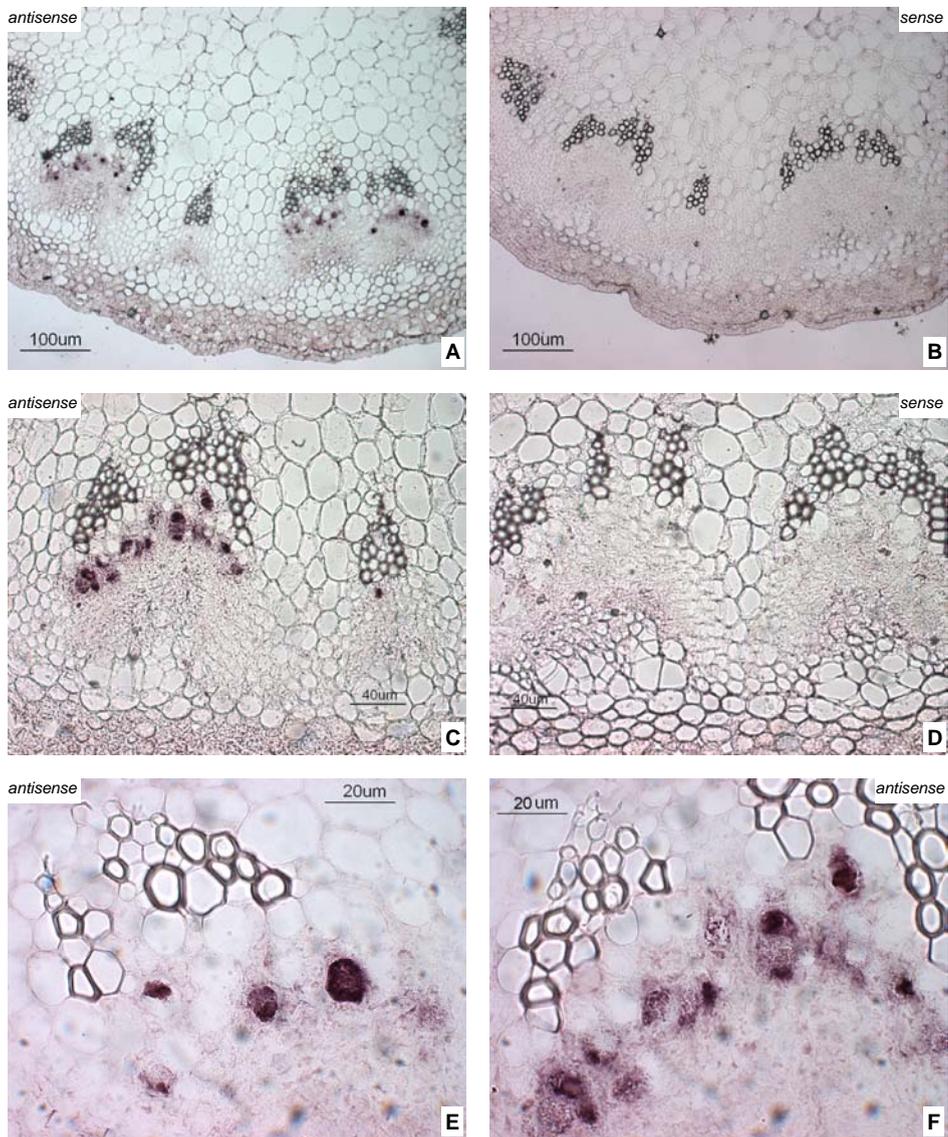


Figura 10: Análisis de la expresión de *ACL5* mediante hibridación “*in situ*” en cortes transversales de tallo de plantas silvestres del ecotipo *Ler* (10X A y B; 20X C y D; 40X E y F). La expresión de *ACL5* se detecta de forma muy específica en una pocas células asociadas al xilema. A, C, E y F sonda *antisense*. B y D sonda *sense*.

Esta específica asociación de la expresión de *ACL5* con los haces vasculares no se restringe únicamente al tallo, si no que también la hemos encontrado en otros órganos examinados como por ejemplo peciolo o frutos (Figura 11).

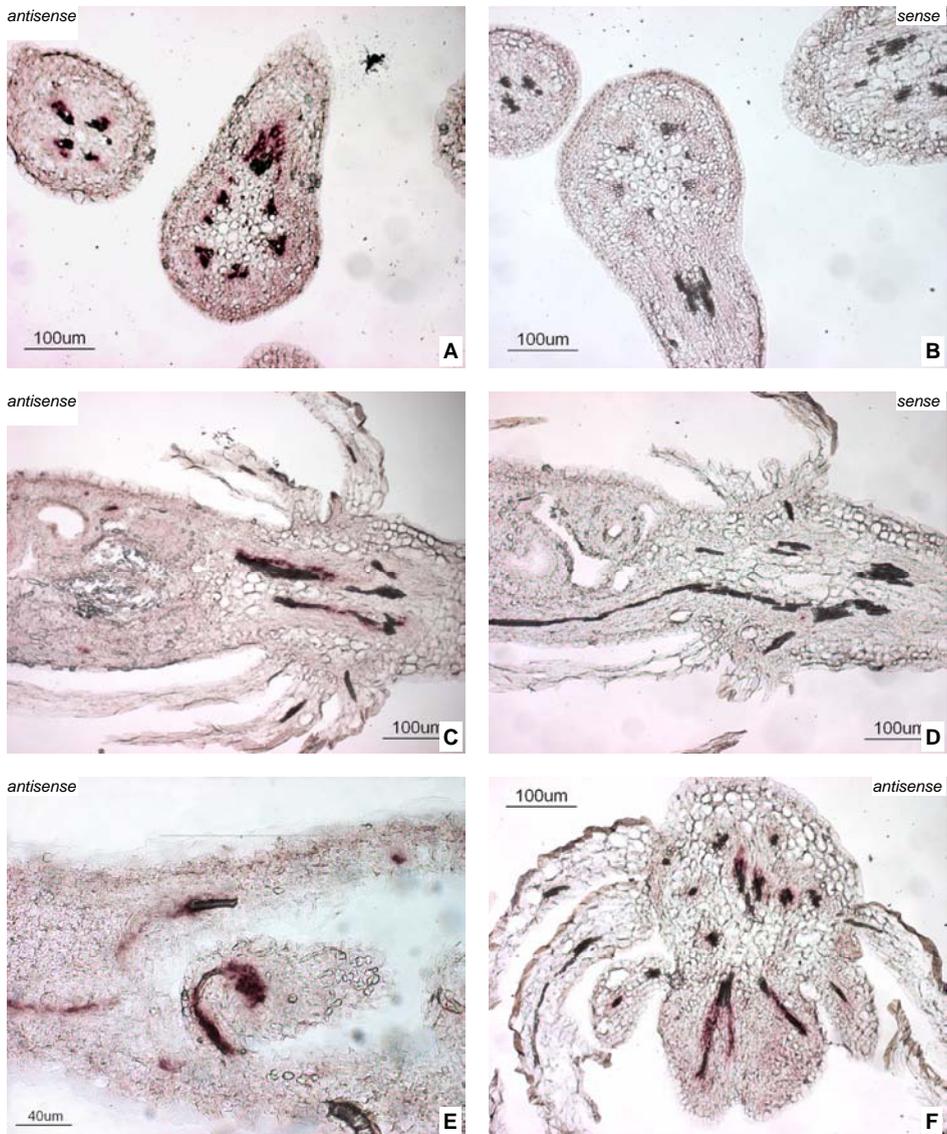


Figura 11: Análisis de la expresión de *ACL5* mediante hibridación “*in situ*” en plantas silvestres del ecotipo Ler. A y B: tallo subapical y peciolo; C y D: silicua; E: detalle de semilla en silicua; F: flor en antesis.

Los datos obtenidos muestran que parece existir una relación directa entre la función de *ACL5* y el desarrollo de los haces vasculares, y esta relación se apoya tanto en el fenotipo conocido del mutante *acl5*, (sobreproducción de haces vasculares (Hanzawa *et al.* 2000), como en la clara asociación espacial entre la expresión de este gen y el tejido en el que se observa dicho fenotipo.

Identificación de mutantes nulos en genes implicados en la síntesis de espermina.

En el momento en el que iniciamos este trabajo no existía ninguna inserción de T-DNA en el locus de *SPM* en las colecciones de dominio público. Sin embargo, en un rastreo por PCR sobre DNA de una colección de líneas de inserción en la variedad Columbia (Col-0) generadas en el laboratorio del Prof. J. Ecker (Alonso *et al.* 2003), pudimos identificar dos líneas de inserción en *SPM*, SALK_018902 y SALK_044087, a las que denominamos *spm-1* y *spm-2* respectivamente (ver Materiales y Métodos). Debido a que no se conocía ningún alelo mutante de *ACL5* en Col-0, también buscamos e identificamos en esta colección una inserción en el gen *ACL5*, SALK_028736, que denominamos *acl5-5*. La identificación exacta de los puntos de inserción se obtuvo secuenciando el producto de PCR obtenido utilizando un cebador específico del T-DNA y un cebador del gen correspondiente (Figura 12-A).

El alelo *acl5-5* presenta un fenotipo similar al descrito para los alelos en fondo *Ler* (Figura 12-B), pero el defecto en la elongación del tallo está ligeramente atenuado, sugiriendo que el alelo *erecta*, u otra diferencia entre ambos ecotipos, influye en el fenotipo de *acl5*. Este efecto del ecotipo fue confirmado posteriormente cuando dispusimos del alelo *acl5-1* retrocruzado en fondo Columbia durante 7 generaciones (Imai *et al.* 2004), que presentaba también un fenotipo atenuado respecto del mismo alelo en fondo *Ler*. Por el contrario, las líneas *spm-1* y *spm-2*, no mostraron aparentemente diferencia alguna respecto del parental silvestre en ninguna etapa del desarrollo (Figura 12-B).

La línea portadora del alelo *acl5-5* se cruzó con las líneas *spm-1* o *spm-2* para obtener dobles mutantes (*spm/acl5*) a los que me referiré como *doble1* o *doble2*. Una vez disponibles líneas homocigotas para cada una de las líneas, se analizó su contenido en poliaminas (Figura 13). Al contrario que la mutación en *ACL5*, la pérdida de función de *SPM* provocó una fuerte disminución en la concentración de espermina, que

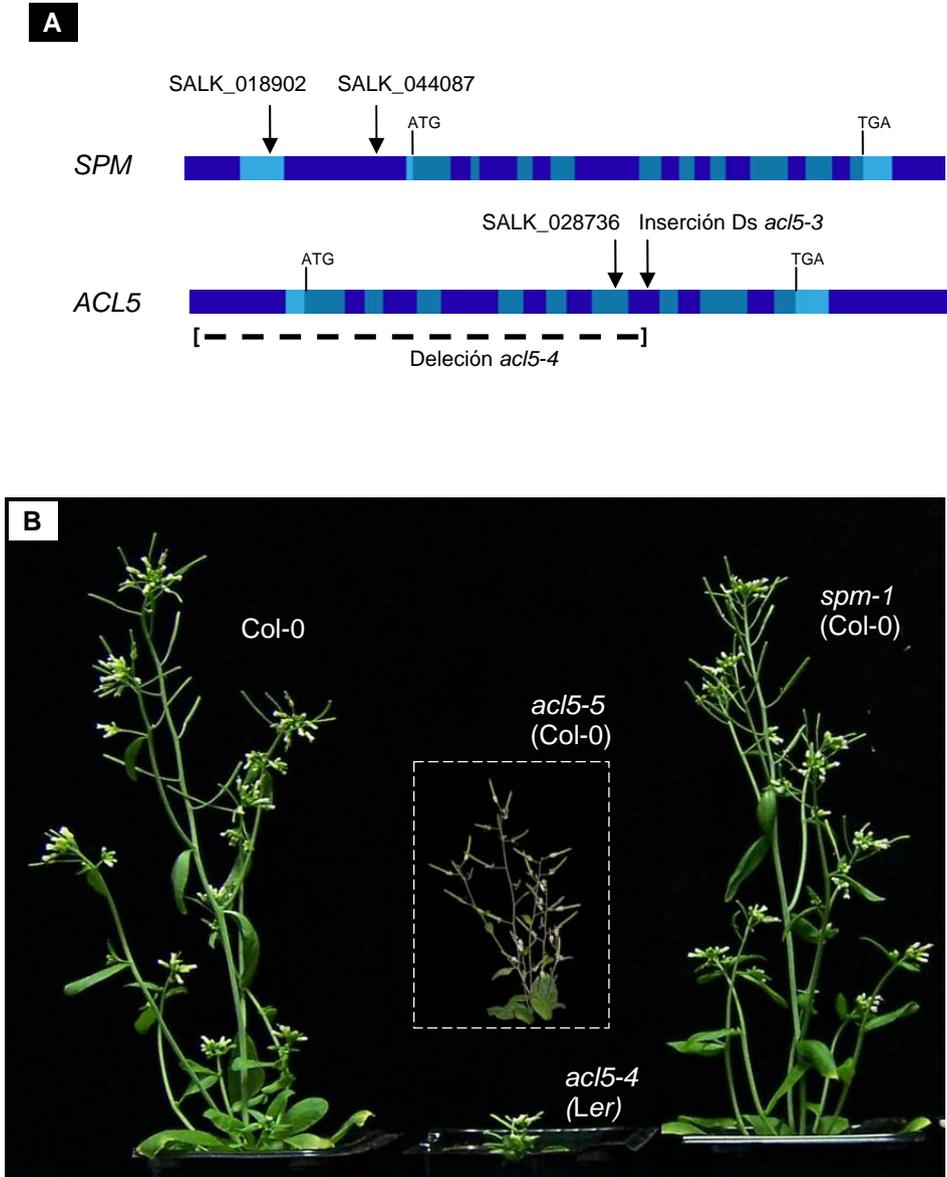


Figura 12: Líneas de inserción de T-DNA. A) Localización de los puntos de inserción en *SPM* y *ACL5* de las líneas SALK, además de la inserción del alelo *ac15-3* y la delección del alelo *ac15-4* (Azul claro: 3' y 5' UTR; Gris: secuencia codificante; Azul oscuro: genómico no transcrito). B) Fotografía comparativa entre Col-0, *ac15-4* (fondo Ler), la línea *ac15-5* y la línea *spm1*.

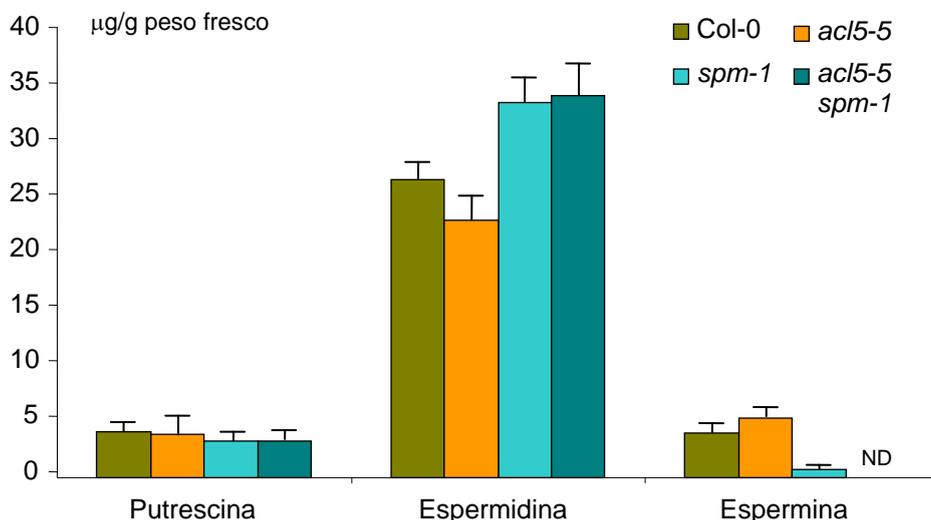


Figura 13: Efecto en el contenido en poliaminas por la pérdida de función de *SPM* y *ACL5*. (ND: No detectado)

fue indetectable en el doble mutante. Este resultado apoya la hipótesis de que no hay más genes que codifiquen la actividad SPMS.

Sobreexpresión del gen *SPM*

Dado que la pérdida de función de *SPM* no afectaba al desarrollo normal de *A. thaliana*, decidimos examinar el efecto causado por la expresión constitutiva y ectópica de *SPM*. Para ello se construyeron plantas transgénicas de la variedad Col-0 que expresaran *SPM* bajo el control del promotor 35S (ver Materiales y Métodos) Sin embargo, a pesar de contar con líneas con una elevada sobreexpresión (Figura 14), ninguna de estas líneas mostró ninguna alteración aparente que las diferenciara de las plantas silvestres, incrementándose el contenido en poliaminas entre 2 y 5 veces (resultados no mostrados).

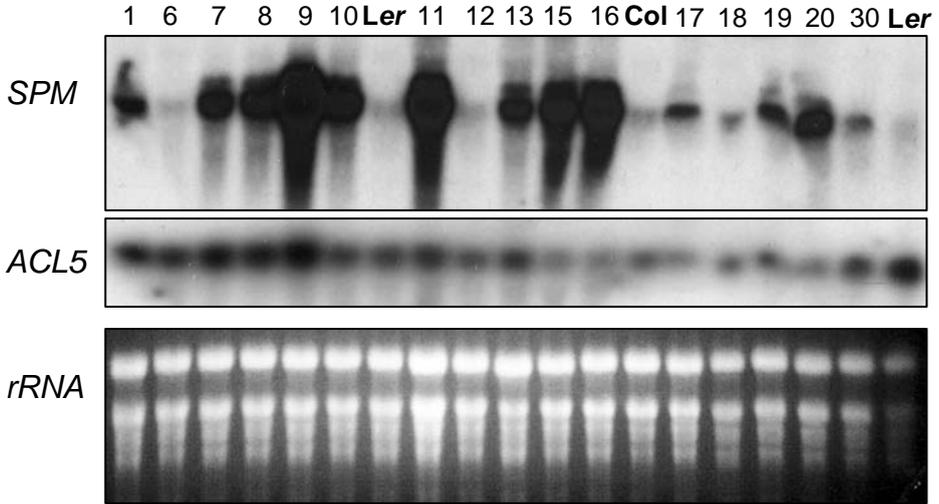


Figura 14: Expresión de *SPM* y *ACL5* en varias líneas que expresan *SPM* bajo el control del promotor 35S en plántulas de 10 días.

La ausencia de niveles de espermina superiores a 5 veces en las plantas *35S::SPM* podría explicarse por ejemplo porque el catabolismo de poliaminas impida la acumulación de espermina o porque exista limitación en la disponibilidad del sustrato (la espermidina). Ha sido ya propuesto que la homeostasis de las poliaminas está finamente regulada (Mayer and Michael, 2003). En cualquier caso, este abordaje no nos ha permitido asignar una función a *SPM* en el desarrollo de *A. thaliana*.

Por otra parte, la gravedad del fenotipo causado por la pérdida de función de *ACL5* no se correlaciona con el pequeño impacto que tiene sobre la síntesis de espermina, y no puede ser rescatado por la espermina producida en las células adyacentes a las que expresan *ACL5*. Una explicación podría ser que dicha espermina ha de sintetizarse *in situ* y no puede ser importada. Sin embargo, la introducción de *35S::SPM* en el mutante *acl5* no permitió recuperar el fenotipo silvestre, lo que plantea la duda de si *ACL5* actúa *in vivo* como una SPMS, o si su papel en el crecimiento del tallo se refiere a una función bioquímica alternativa.

Para nuestra sorpresa, *ACL5* ha sido descrita muy recientemente como una termoespermina sintasa (TSPMS), basándose en el alto grado de similitud entre esta enzima de *A. thaliana* y la *TSPM* de la diatomea *Thalassiosira pseudonana*, y en la

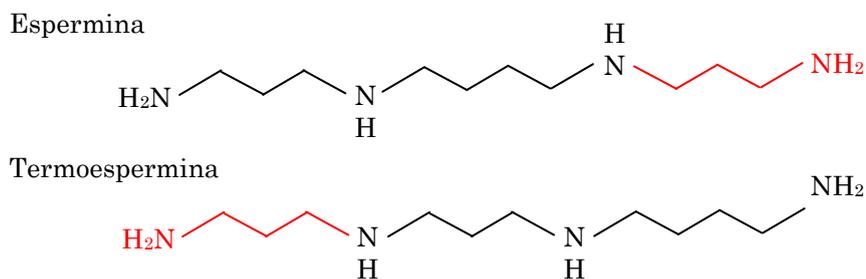


Figura 15: Representación de las moléculas de espermina y termoespermina. Cada vértice representa un CH₂. En negro la parte correspondiente a la espermidina y en rojo la incorporación del segundo grupo aminopropilo.

capacidad de *ACL5* expresado “*in vitro*”, de producir termoespermina a partir de espermidina (Knott *et al.* 2007). La termoespermina es una molécula idéntica a la espermina en composición, enlaces y grupos reactivos, pero con una simetría molecular diferente (Figura 15).

Las técnicas utilizadas de forma generalizada para identificar y cuantificar las poliaminas emplean el HPLC como técnica separativa, tras derivatizarlas con cloruro de dansilo, sin embargo este método no es capaz de separar la termoespermina y la espermina por lo que no pueden distinguirse en el cromatograma. Hasta la fecha, la opinión general era que la termoespermina estaba presente sólo en algunos procariontas, por lo que nadie consideraba que pudiera estar presente en organismos eucariotas, en los que sólo se encontraba, por tanto, la espermina.

La nueva identidad de *ACL5* como una TSPMS explica por qué *SPM* no puede complementar la pérdida de función de *ACL5*, ni siquiera cuando se expresa bajo el control del promotor 35S. Aunque es necesaria la confirmación *in vivo*, los datos son claros e indican una función diferente para *ACL5* y *SPM*.

Con los datos que tenemos hasta ahora no tenemos indicios de la función que tiene la espermina en el desarrollo de *Arabidopsis* y, aunque consideramos que se debe investigar esta función, el interesante fenotipo que muestra la pérdida de función de *ACL5* nos inclinó a concentrar nuestros esfuerzos en profundizar en su función en el desarrollo de los haces vasculares.

*Función de ACL5
en el desarrollo y
diferenciación del xilema*

*“Lo poco que sé,
se lo debo a mi ignorancia.”*

Platón

Introducción

La pérdida de función de *ACL5* da lugar, además de a una drástica reducción de la elongación del tallo, a una sobreproducción de haces vasculares (Hanzawa *et al.* 1997) que correlaciona con la expresión específica de *ACL5* asociada a dicho tejido según se muestra en el Capítulo 3 (Figuras 10 y 11). La reciente evidencia de que *ACL5* no codifica una SPMS, sino una TSPMS, permite explicar por qué la sobreexpresión de *SPM* no alivia el defecto en la elongación del tallo. Los datos indican que la función del producto de *ACL5*, la termoespermina, es tan específica de esta molécula que la espermina no puede sustituirla (al menos con la misma eficacia), lo que indica que no sólo depende de sus características como tetraamina.

Cualquier proceso del desarrollo en eucariotas requiere en general la correcta coordinación entre diferentes programas de diferenciación. A lo largo de toda la vida de una planta, el crecimiento debe ir acompañado por la generación de un sistema vascular funcional que permita la circulación tanto de nutrientes como de señales, lo que incluye la correcta formación y elongación del sistema vascular. Centrándonos en el tallo, durante la fase activa de elongación de este tejido, los elementos vasculares primarios del protoxilema se diferencian con engrosamientos de la pared celular del tipo espiral o anular, lo que permite la expansión celular. Cuando la elongación de los entrenudos cesa, los elementos vasculares primarios del metaxilema se diferencian con engrosamiento de la pared celular del tipo reticulado o punteado (Figura 16). El desarrollo vascular primario es seguido por la formación de cambium vascular y crecimiento secundario, que además de diferenciación vascular incluye la formación de fibras xilemáticas.

Las hormonas vegetales están implicadas en el control de la mayor parte de los procesos de diferenciación y desarrollo del xilema. Estudios fisiológicos y farmacológicos han demostrado un importante papel de las auxinas y las citoquininas en el control de la actividad del cambium vascular e iniciación del desarrollo del xilema, mientras que los brasinosteroides, el etileno y las giberelinas han sido asociados con importantes funciones en la modulación de la actividad del cambium y especialmente en los programas de diferenciación, a pesar de que ha sido difícil determinar las funciones específicas de cada una de las hormonas en el desarrollo del xilema debido a la

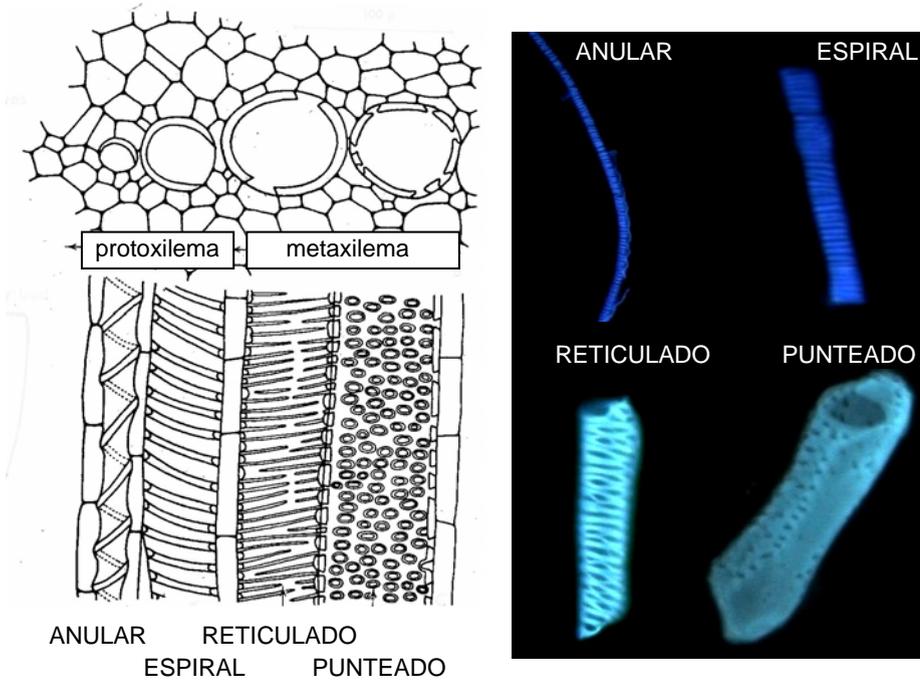


Figura 16: Tipos celulares del xilema. A la izquierda esquema ilustrativo (Esau, 1977). A la derecha imágenes al microscopio óptico, bajo iluminación con luz ultravioleta, de elementos vasculares del xilema teñidos con calcoflúor (imágenes cedidas por D. Francisco Vera).

complejidad de la acción hormonal (Ye 2002). Mutaciones en diferentes componentes de la síntesis, el transporte o la transducción de las señales hormonales en *A. thaliana* han probado sobradamente la acción de varias hormonas así como la de otros compuestos, como por ejemplo los esteroides (Fukuda 2004). Los mutantes afectados en el transporte o la señalización hormonal evidencian la acción de las auxinas en la iniciación del meristemo vascular y su mantenimiento (Gälweiler *et al.* 1998; Hardtke and Berleth 1998; Hobbie *et al.* 2000), el papel de las citoquininas en la especificación del floema y en la inhibición de la diferenciación del protoxilema (Mahonen *et al.* 2006; Mahonen *et al.* 2000), y el papel de los brasinosteroides en la estimulación de la diferenciación del xilema (Caño-Delgado *et al.* 2004). No obstante, estos mismos mutantes han mostrado evidencia de la participación de otras señales reguladoras del desarrollo del xilema (Koizumi *et al.* 2000; Parker *et al.* 2003). Las señales que controlan la maduración de los elementos vasculares del xilema son aún desconocidas.

Ya se ha propuesto que las poliaminas participan en el desarrollo vascular basándose en sus implicaciones en la división celular, sus interacciones con hormonas vegetales y la producción de H₂O₂ durante el catabolismo de las poliaminas que potencialmente pueden afectar la actividad del cambium vascular, la diferenciación y la muerte celular (Bais and Ravishankar 2002; Møller and McPherson 1998; Šebela *et al.* 2001). Evidencia indirecta que apoya esta visión se obtuvo con plantas de patata transgénicas deficientes en la síntesis de espermidina y espermina, que mostraban un fenotipo de enanismo (Kumar *et al.* 1996). Además, mutantes de Arabidopsis en la S-adenosilmetionina descarboxilasa muestran niveles reducidos de espermidina y espermina, y muestran un aspecto enano y alteraciones severas en el desarrollo del tejido vascular (Ge *et al.* 2006). Sin embargo, una prueba mucho más sugerente es el fenotipo de hipertrofia de haces vasculares que muestra el mutante *acl5*, que de hecho fue identificado en base a sus problemas en la elongación del tallo tras la transición de fase vegetativa a la fase reproductiva (Akamatsu *et al.* 1999; Hanzawa *et al.* 1997).

En este momento nos planteamos varias preguntas relacionadas con el fenotipo del mutante *acl5*: ¿Cómo está específicamente afectado el desarrollo de los haces vasculares en dicho mutante? ¿Qué función tiene *ACL5* durante dicho proceso? ¿Es su función requerida de forma tan específica como indica su expresión?

La función de *ACL5* es autónoma

Aunque se había propuesto que la función celular de *ACL5* era no autónoma (Hanzawa *et al.* 2000), según lo cual este gen podría ejercer su función expresándose en cualquier tejido, la precisa localización de sus transcritos únicamente asociada a las células del cambium vascular nos sugiere que su función podría ser autónoma celular, es decir, sólo tendría un papel allí donde se expresa, y no en células vecinas. Si esta hipótesis es correcta, la predicción que se deriva es que la expresión forzada de *ACL5* fuera de su dominio normal de expresión no será suficiente para complementar el defecto del mutante *acl5*.

Para expresar *ACL5* en células alejadas del cambium, decidimos utilizar el promotor del gen *RCHI*, específico de la raíz (Casamitjana-Martinez *et al.* 2003), con la ventaja de que justamente es en la raíz donde la expresión de *ACL5* es más fuerte (Figura 8, Cap.3). Se introdujo el cDNA con la ORF completa de *ACL5* bajo el control del promotor *pRCHI* en el mutante *acl5* y ninguna de las plantas T1 mostró

recuperación del fenotipo silvestre. Se identificaron plantas T2 homocigotas de 3 líneas, y todas siguieron mostrando un fenotipo mutante *acl5* (Figura 17), lo que encajaba con que la expresión de *ACL5* en estas plantas estuviera circunscrita exclusivamente a la raíz. Estos datos apoyan nuestra hipótesis de que la función de *ACL5* es autónoma, y que por tanto este gen sólo puede ejercer su función en las células que lo expresan.

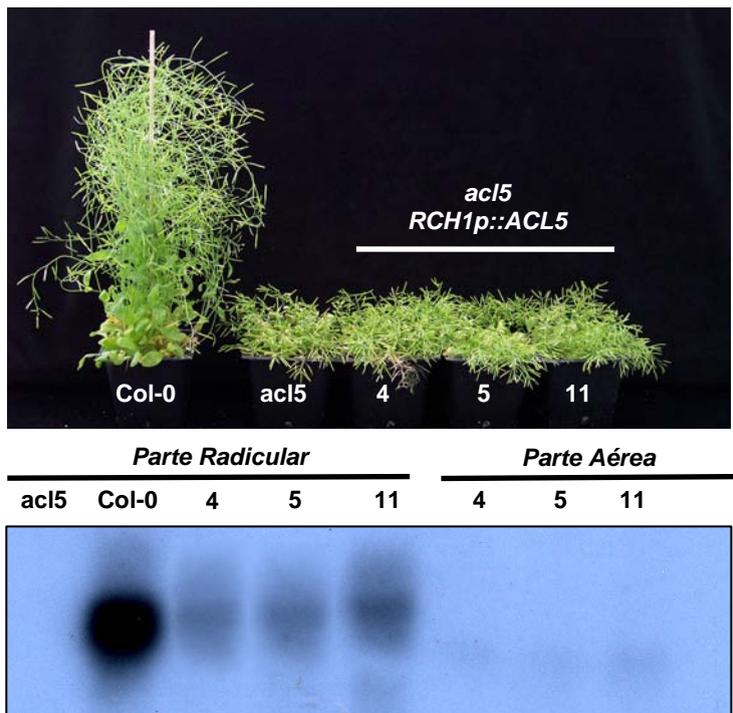


Figura 17: La expresión de *ACL5* en raíces de plantas *acl5-5*, comprobada mediante Northern, no revirtió el fenotipo mutante. Se muestran plantas T2 de 3 líneas independientes

Ausencia de crecimiento secundario en los mutantes *acl5*

Como se ha indicado anteriormente, la pérdida de función de *ACL5* da lugar a una sobreproducción de haces vasculares, aunque se desconocía la naturaleza concreta de los tipos celulares afectados. Para identificarlos, se utilizó la tinción con azul de toluidina en cortes transversales y longitudinales del tallo (Figura 18). Además del aumento general de la zona que cubren los haces vasculares ya descrito, también se

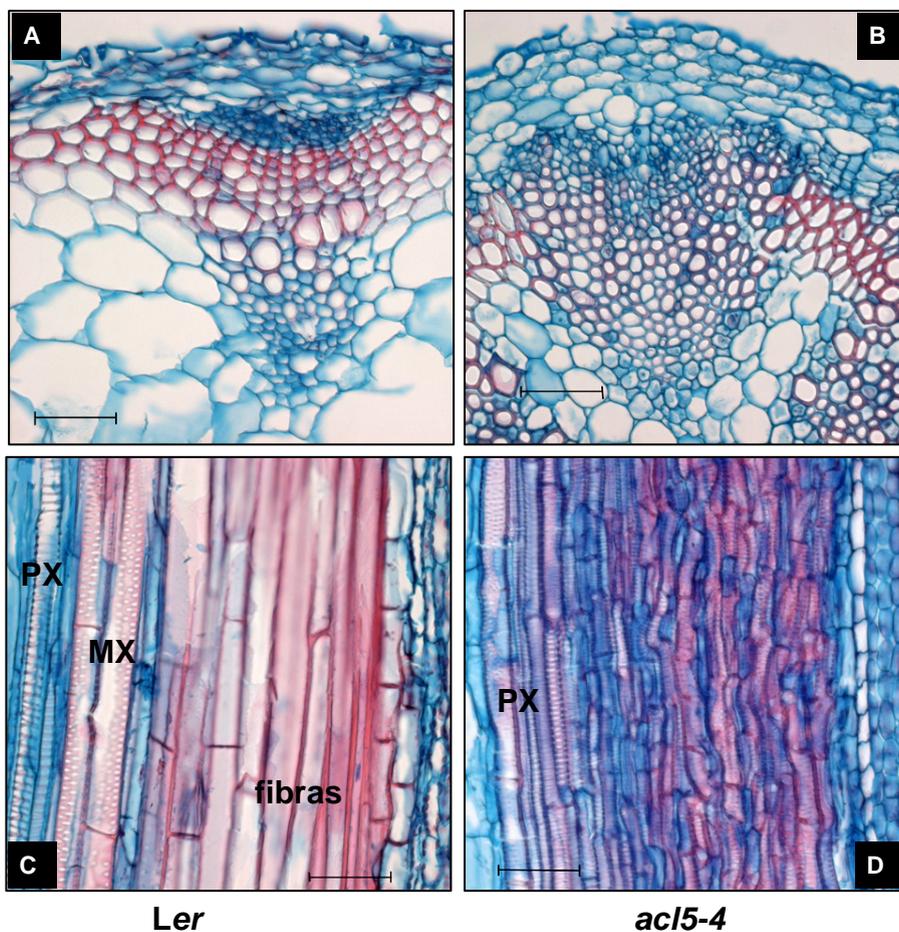


Figura 18: Secciones histológicas de tallo de *Ler* y *acl5-4* teñidos con Azul de Toluidina. La pérdida de función de *ACL5* da lugar a la desaparición de las fibras, observándose en su lugar haces vasculares desorganizados y sin crecimiento secundario. PX: Protoxilema, MX: Metaxilema.

pudo apreciar la ausencia de fibras xilemáticas. En los cortes transversales se pudo también observar que la región donde se localizan las fibras xilemáticas en el fondo silvestre es ocupada en el mutante *acl5* por haces vasculares sin crecimiento secundario y sin aparente organización.

Nos preguntamos en qué momento del desarrollo del mutante *acl5* se hacían evidentes las alteraciones en el tejido vascular, para lo cual decidimos observar este tejido en el hipocotilo. Siete días después de la germinación, aunque la vasculatura del mutante y del silvestre son muy similares y el diámetro de la estela del mutante es indistinguible del silvestre (Figura 19-A,B), puede vislumbrarse ya una ligera asimetría. El fenotipo típico de sobreproducción de haces vasculares xilemáticos es claro en plántulas de 13 días (Figura 19-E,F), cuando el cambium vascular se ha formado y el crecimiento secundario se ha iniciado. No obstante, a lo largo del crecimiento de la planta, el mutante *acl5* no muestra más crecimiento secundario y los hipocotilos de plántulas de 35 días son significativamente más finos que los del silvestre (Figura 19-G,H). La ausencia de crecimiento secundario está acompañada por una pérdida total de fibras del xilema en los hipocotilos, idéntico a lo que habíamos observado en el tallo. Además de los problemas en el crecimiento secundario, se observaron defectos en el patrón de la pared celular del mutante *acl5*. En lugar de mostrar protoxilema de tipo espiral y metaxilema de tipo punteado claros y definibles, como se observaba en el fondo silvestre, el mutante *acl5* parece formar haces de tipo espiral ligeramente reticulados con unas pocas bandas de interconexión entre los anillos espirales (Figura 19-C,D).

La microscopía electrónica también mostró una alteración en la cantidad y la organización de material depositado en la pared celular secundaria de los elementos vasculares de *acl5* (Figura 20). La formación de la pared secundaria y la consecuente muerte celular de los haces vasculares es un proceso rápido, haciendo que normalmente sólo puedan observarse unas pocas células en cada corte con la pared completamente formada y que aún no hayan sufrido un proceso senescente. En el mutante *acl5*, sin embargo, no se consiguió observar ningún vaso con pared secundaria formada y con el contenido citoplasmático intacto. Todos los vasos que mostraban signos evidentes de haber iniciado el proceso senescente, no habían completado el proceso de formación de la pared secundaria. La explicación puede deberse tanto a un retraso en la formación de pared secundaria, como a una diferenciación acelerada o a una muerte prematura.

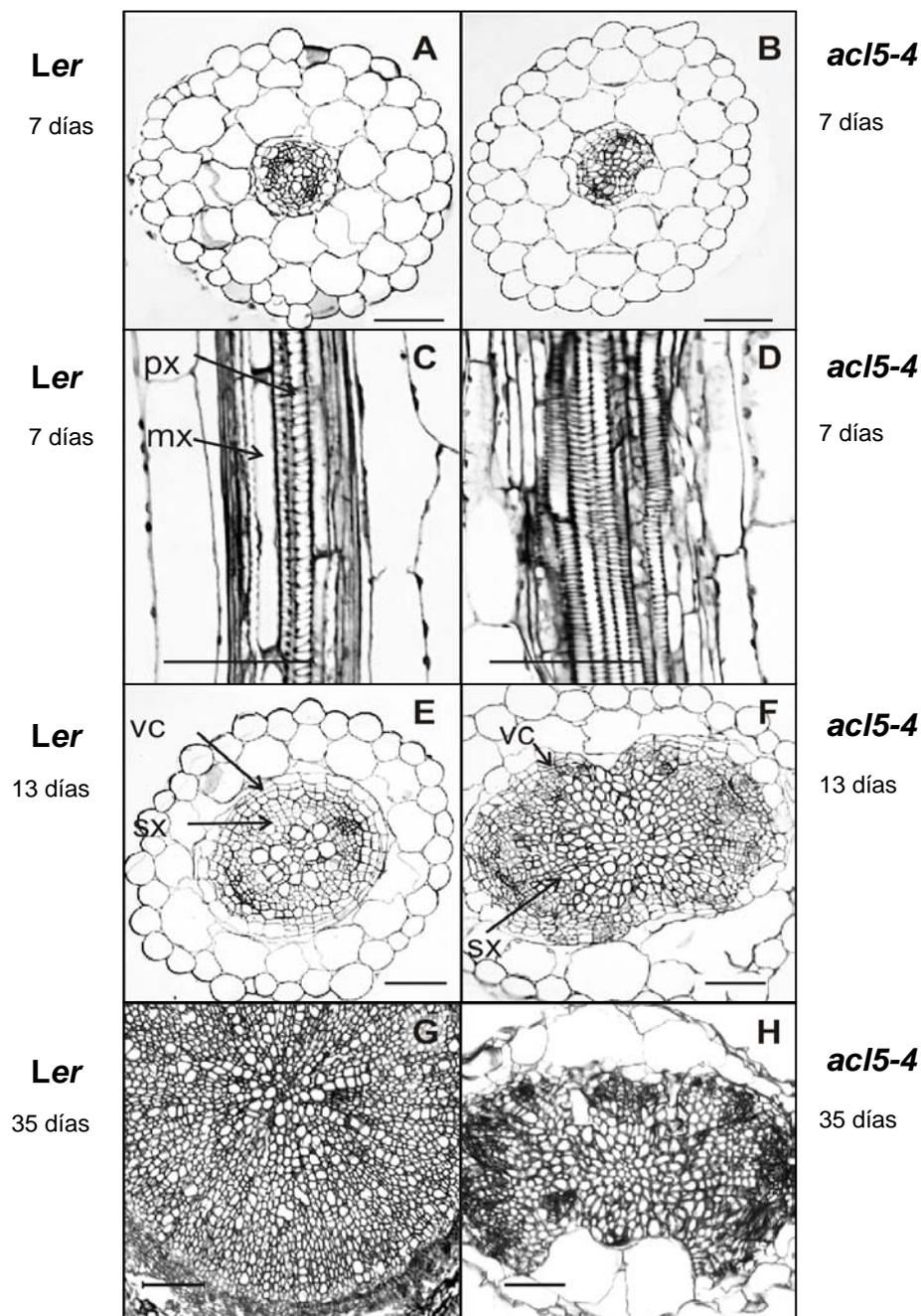


Figura 19: Secciones histológicas de hypocotilo de *Ler* y *acl5-4*. A y B: Hipocotilos de 7 días; C,D,E y F: Hipocotilos de 13 días; G y H: Hipocotilos de 35 días.

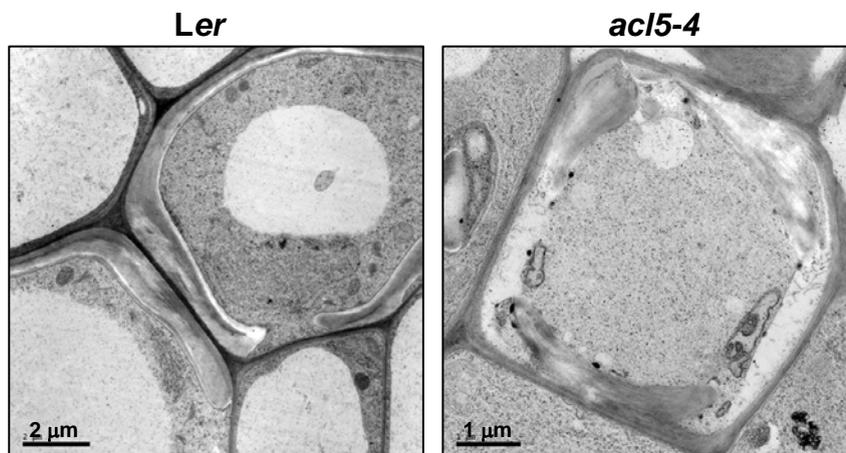


Figura 20: Imágenes obtenidas por microscopía electrónica de secciones de tallo de *Ler* y *acl5-4* mostrando la deposición de material de la pared secundaria en elementos vasculares.

Para cuantificar las alteraciones morfológicas observadas de los elementos xilemáticos, se maceraron hipocotilos de dos meses de edad y se observó el tamaño y la arquitectura de la pared secundaria de elementos individuales, clasificándolos como anulares, espirales, reticulados o punteados (Esau, 1977). Como se ve en la Figura 21a, la mayoría de los elementos vasculares de *acl5* eran de tipo espiral, mientras que sólo una pequeña proporción de los elementos vasculares eran de este tipo en el ecotipo silvestre. Además, los elementos vasculares de tipo punteado, el tipo más abundante en el fondo silvestre, desaparecían completamente en el mutante *acl5*.

Una observación importante es que diversos genes relacionados con tejido xilemático estaban ya sobreexpresados en plántulas de 15 días del mutante *acl5*: tres de síntesis de celulosa (*IRX1*, *IRX3* e *IRX5*), y dos que codifican enzimas hidrolíticas relacionadas con muerte celular (*XCPI* y *BFNI*). El gen At2g32560, que codifica una proteína F-box sin relación conocida con el desarrollo vascular, no mostraba el mismo tipo de alteraciones en los niveles de expresión (Figura 21b). Estos datos apoyan en primer lugar la idea de que los haces vasculares formados en el mutante *acl5* son inmaduros y no han terminado de sintetizar la pared y, en segundo lugar, permiten plantear la hipótesis de que *ACL5* es necesario para impedir una muerte celular prematura. De acuerdo con esta hipótesis, se puede predecir que la inducción de muerte

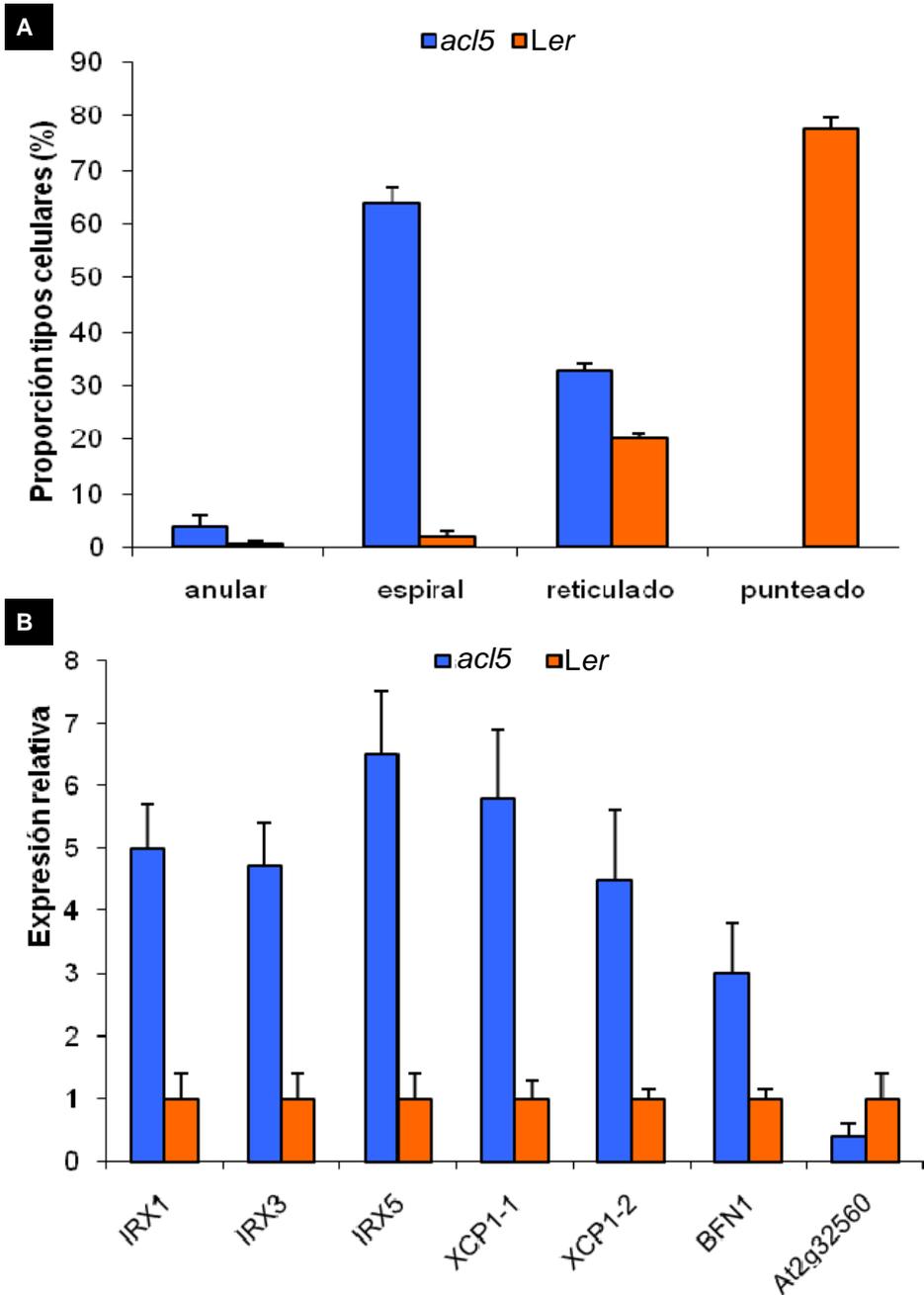


Figura 21: A) Cuantificación de los tipos celulares de protoxilema y metaxilema en el mutante *acl5-4*. B) Expresión de diversos genes relacionados o con proliferación vascular o con muerte celular mediante qRT-PCR.

celular prematura en las células que expresan *ACL5* daría lugar a un fenotipo similar a la pérdida de función de este gen. Para comprobar esta predicción, generamos plantas transgénicas de *A. thaliana* que expresaban la subunidad A de la toxina de la difteria (DT-A), una estrategia utilizada frecuentemente para eliminar tipos celulares específicos (Nilsson *et al.* 1998), bajo el control del promotor de *ACL5*. Como se ve en la Figura 22A, las plantas *pACL5::DT-A* mostraron un fenotipo equivalente al del mutante *acl5*, con una severidad dependiente de la dosis génica. Las plantas hemicigotas para el transgén son sólo ligeramente más pequeñas y menos ramificadas que las silvestres, mientras que las plantas homocigotas mostraron una drástica reducción del tamaño de las hojas de roseta, la longitud del tallo y el diámetro del hipocotilo. Secciones transversales de hipocotilos de plantas homocigotas revelaron una drástica reducción en el crecimiento secundario, similar al observado en el mutante *acl5* (*resultados no mostrados*). Y, lo que es aún más importante, la comparación de los tipos celulares presentes mediante maceración de hipocotilos confirmó la semejanza de las plantas *ACL5::DT-A* y el mutante *acl5*. Los elementos vasculares de tipo reticulado fueron los predominantes en las líneas *pACL5::DT-A*, mientras que los de tipo punteado habían desaparecido casi completamente (Figura 22B).

Todos estos datos indican una importante función de *ACL5* en el desarrollo y diferenciación del xilema. En concreto, parece que en el mutante *acl5* es la muerte prematura de las células que en el ecotipo silvestre expresarían *ACL5* lo que impide culminar la diferenciación del metaxilema. Además, los elementos presentes son más cortos y finos que los encontrados en el silvestre, lo cual, junto a la ausencia total de fibras, parece ser la causa de la deficiencia de *acl5* en la elongación del tallo.

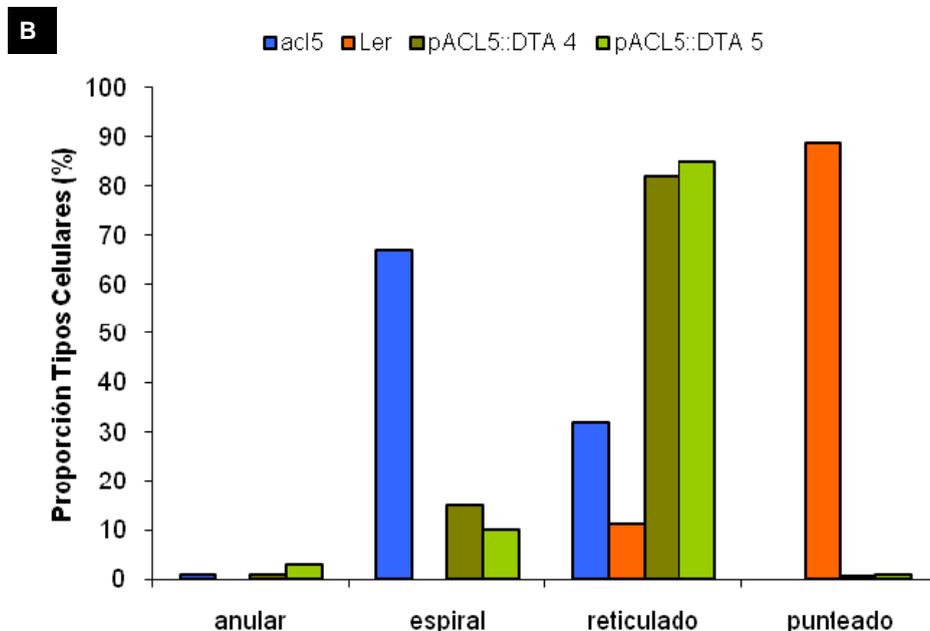
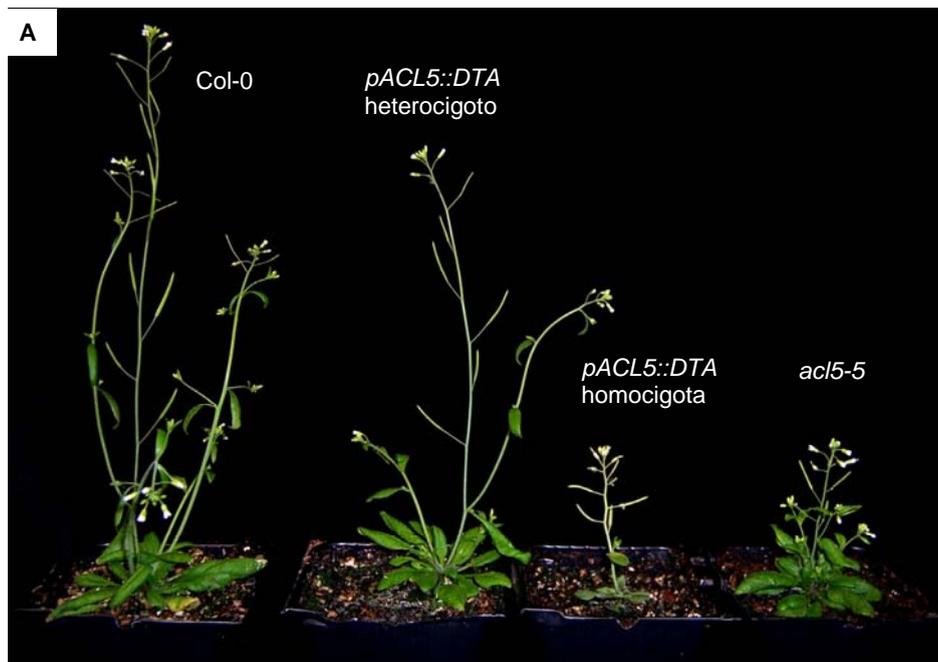


Figura 22: A) Fenotipo de plantas *pACL5::DT-A*. B) Proporción de tipos celulares del protoxilema y metaxilema en plantas *pACL5::DTA* en comparación con el ecotipo parental y *acl5-5*.

*Origen evolutivo
de las espermidina
aminopropil transferasas*

*“A veces hay que estropear un poquito el cuadro
para poder terminarlo.”*

Eugène Delacroix

Como ya hemos dicho anteriormente, las poliaminas están presentes en todos los organismos vivos, lo que evidencia que se trata de una ruta metabólica con un origen tan antiguo que debemos remontarnos a los primeros procariotas. No obstante, no todas las poliaminas están presentes en todos los seres vivos, así como tampoco son iguales las proporciones relativas de cada una. Por ejemplo, la espermina no ha sido detectada en ningún procariota hasta la fecha, pero otra tetraamina, la termoespermina, que en los eucariotas sólo se encuentra en Plantas, sí ha sido identificada en algunos procariotas (Hamana *et al.* 2001; Hamana *et al.* 1991; Knott *et al.* 2007).

Las aminopropil transferasas son las enzimas clave para la síntesis de espermidina, espermina y termoespermina, y todas ellas presentan una elevada similitud de secuencia (Hanzawa *et al.* 2002; Panicot *et al.* 2002) que comparten también con las PMTs (Teuber *et al.* 2007), por lo que nos planteamos analizar la historia evolutiva de estas actividades enzimáticas y averiguar, en concreto, si su parecido se debe a convergencia evolutiva o si todas ellas tienen un origen común.

Homólogos en las Bases de Datos

Utilizando las secuencias aminoacídicas de las proteínas correspondientes a las actividades SPDS, TSPM y SPMS de *A. thaliana*, SPDS y SPMS de *H. sapiens*, y SPMS de *S. cerevisiae*, realizamos una búsqueda iterativa mediante BLAST en las bases de datos públicas, hasta obtener 127 secuencias aminoacídicas completas (AnexoI) putativamente correspondientes a actividades SPDS, PMT, SPMS y TSPMS de todos los reinos (Arqueas, Bacterias, Animales, Hongos y Plantas).

Como se muestra en la Figura 23, las comparaciones por parejas de todas las secuencias dio como resultado tres agrupaciones distinguibles al ser interpretadas con el programa CLANS (Frickey and Lupas 2004). Este análisis confirmó por tanto el alto grado de similitud entre la mayoría de las proteínas ($p < 10^{-50}$), quedando las SPMS de animales en un grupo más distante, igual que las TSPMS de plantas y algunas secuencias de arqueas y bacterias. Este resultado sugiere que el parecido funcional entre las actividades de todas las aminopropil transferasas y las PMTs se correlaciona con un

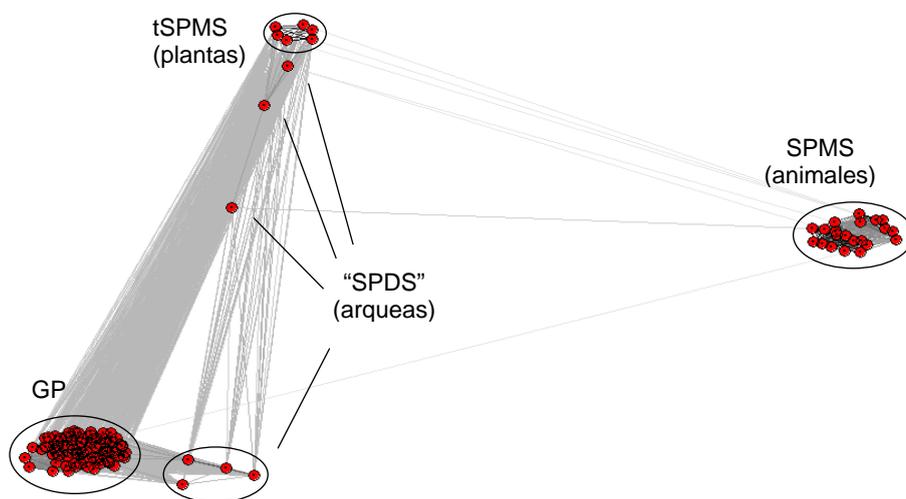


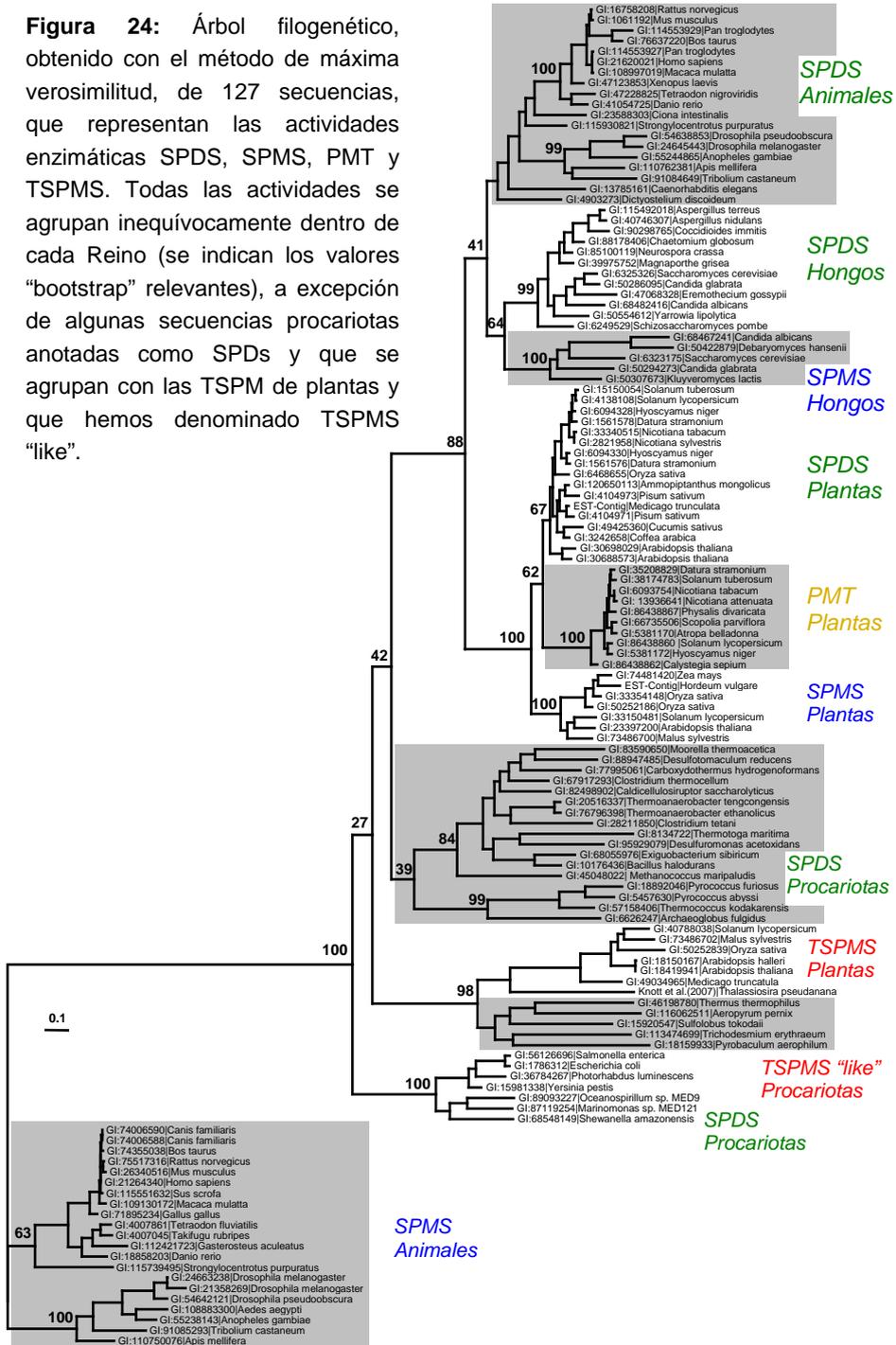
Figura 23: Agrupación CLANS de 127 secuencias de aminoácidos representando actividades SPD, SPM, PMT y TSPM representativas de los 5 reinos de los seres vivos. Sólo algunos grupos y secuencias específicas se separan del grupo principal (GP) que incluye secuencias con diferentes actividades enzimáticas.

parecido entre las correspondientes secuencias en todos los organismos, y que este parecido no se debe a convergencia evolutiva..

Origen evolutivo de las actividades SPDS, SPMS, PMT y TSPMS

Para establecer qué relaciones filogenéticas existen entre todos estos genes, realizamos un alineamiento con las 127 secuencias utilizando el programa ClustalX y obtuvimos un árbol filogenético con el método de máxima verosimilitud. El mejor modelo de sustitución aminoacídica (modelo WAG) se determinó mediante el programa ProtTest (Abascal, 2005; ver material y métodos); no obstante, se utilizó también el segundo y tercer modelos mejor valorados (modelo Blosum62 y modelo JTT) y en todos los casos se obtuvieron topologías equivalentes a la mostrada en la Figura 24.

Figura 24: Árbol filogenético, obtenido con el método de máxima verosimilitud, de 127 secuencias, que representan las actividades enzimáticas SPDS, SPMS, PMT y TSPMS. Todas las actividades se agrupan inequívocamente dentro de cada Reino (se indican los valores “bootstrap” relevantes), a excepción de algunas secuencias procariotas anotadas como SPDs y que se agrupan con las TSPM de plantas y que hemos denominado TSPMS “like”.



Lo más interesante es la clara separación, respaldada por valores “bootstrap” elevados, de los distintos grupos de actividades enzimáticas en los diferentes reinos, con excepción de algunas secuencias de arqueas y bacterias que no se resuelven en un único grupo. Las agrupaciones correspondientes a las SPDS se distribuyen de acuerdo con nuestro conocimiento general sobre la evolución de los seres vivos, sugiriendo que esta actividad estaba ya presente en los procariotas que han dado lugar a todos los organismos vivos actuales.

Una de las agrupaciones de secuencias de procariotas (TSPMS “like” de procariotas en la Figura 24) se relaciona de forma muy consistente con las TSPMS de plantas. En las bases de datos estas secuencias de procariotas están anotadas como SPDS por similitud de secuencia, pero es razonable pensar que de hecho se trate de una agrupación de TSPMS de procariotas, ya que entre las secuencias pertenecientes a este grupo se encuentra una enzima de *T. thermophilus* con actividad aminopropil transferasa preferentemente sobre la agmatina, aunque también puede utilizar, con menor eficiencia, otros sustratos, como la espermidina, para formar termoespermina (Hamana *et al.* 2001; Ohnuma *et al.* 2005; Oshima 1979). Si esto es así, la hipótesis más simple para explicar la presencia de TSPMS en plantas, pero no en hongos ni animales, sería la adquisición por parte de aquéllas de las TSPMS de procariotas mediante transferencia horizontal, suceso que pudo darse a partir de la cianobacteria precursora de los cloroplastos.

Un resultado muy llamativo es que las SPMS, al contrario que las TSPMS, no comparten un único ancestro, sino que las SPMS de Hongos, Plantas y Animales son grupos parafiléticos relacionados con sus correspondientes SPDS (Figura 24). La definición de estas tres familias como SPMS difícilmente puede ser errónea. Por ejemplo, la identidad de varias de las SPMS de levaduras ha sido confirmada experimentalmente a través del análisis genético (Hamasaki-Katagiri *et al.* 1997; Hamasaki-Katagiri *et al.* 1998; Chattopadhyay *et al.* 2002). En el caso de las SPMS de las plantas, la única confirmación experimental de que los componentes de este grupo eran en efecto SPMS era nuestra caracterización del gen *SPM* de *Arabidopsis* (Capítulo 2 de esta Tesis, y Panicot *et al.* 2002). Por ello decidimos reconstruir el cDNA completo del homólogo en tomate (*Solanum lycopersicum*) de *AtSPM* a partir de las ESTs disponibles en las bases de datos, y lo expresamos en levadura bajo el control del promotor *CYC1* (Gari *et al.* 1997). Como se ve en la Figura 25, dicho cDNA (*SISPM*)

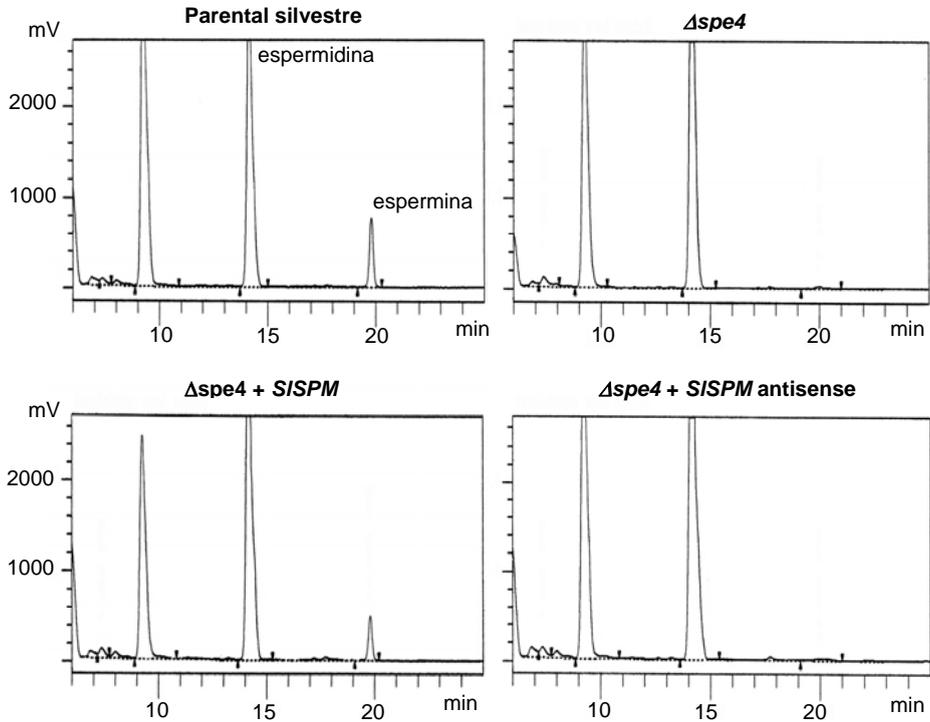


Figura 25: Complementación de una cepa de levadura deficiente en la síntesis de espermina ($\Delta spe4$) con *SISPM*. Cuantificación e identificación del contenido en poliaminas mediante HPLC.

de tomate complementó el defecto en la síntesis de espermina del mutante *spe4*, pero no restableció la síntesis de espermidina en el mutante *spe3*, por lo que pudimos confirmar que este cDNA codifica una SPMS. En la actualidad también se dispone de evidencia experimental que demuestra que el homólogo en manzano presenta actividad SPMS (Kitashiba *et al.* 2005), lo que permite hacer extensible esta identidad al resto de los miembros de la agrupación de forma razonable. En resumen, el análisis filogenético de las SPMS sugiere que esta actividad surgió tres veces durante la evolución, de forma independiente en hongos, animales y plantas, a partir de un ancestro común a las correspondientes SPDS actuales. Este mismo mecanismo puede extenderse a las PMT de acuerdo a su posición en el árbol y al hecho de que sólo se han encontrado en Solanales.

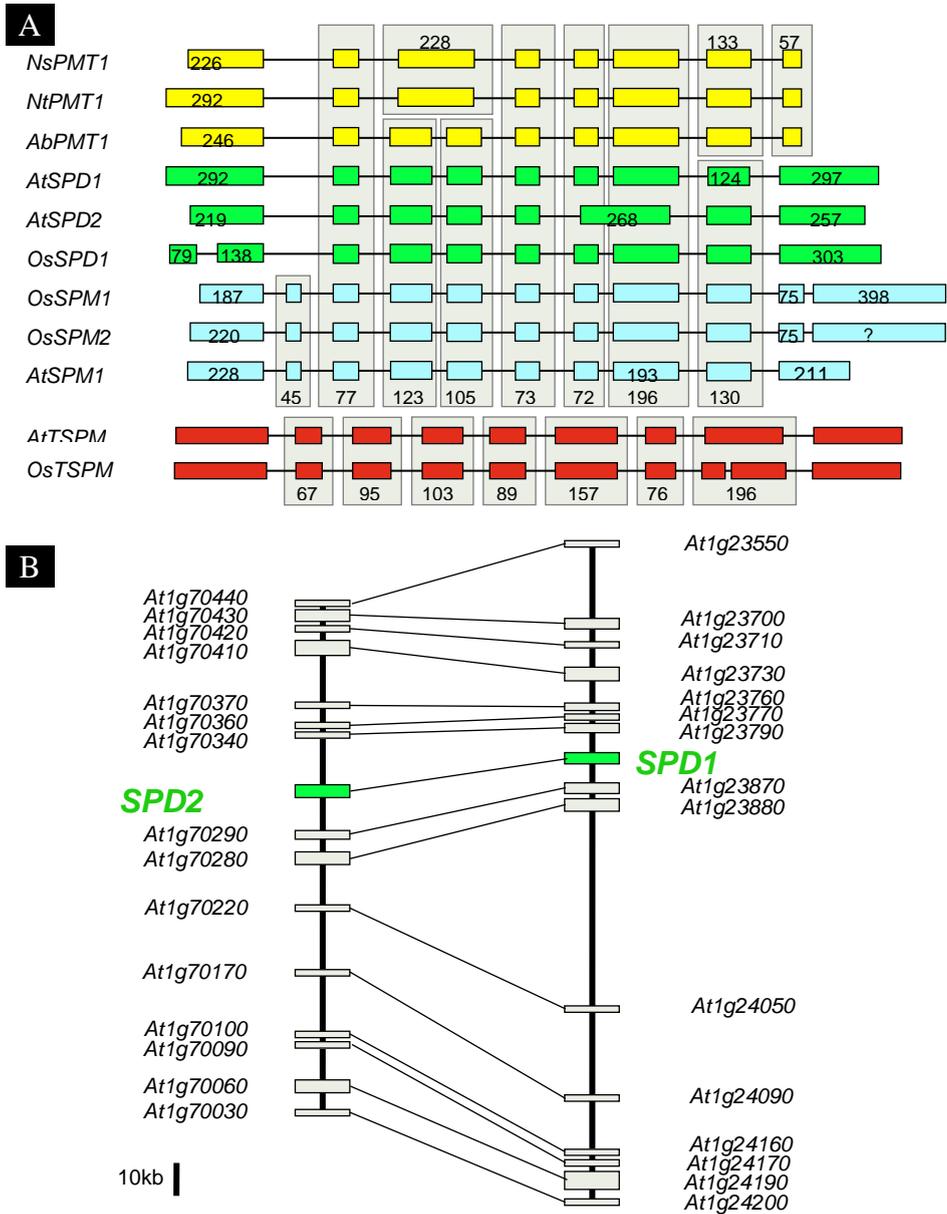


Figura 26: Las actividades PMT y SPMS en Plantas se originaron a partir de la duplicación de una SPDS. A) La correspondencia entre el tamaño y orden de los exones de *PMTs*, *SPDs* y *SPMs* de plantas sugiere un origen común de todos ellos. Las *TSPMs* no muestran esta correspondencia. B) Un paralógón en el cromosoma 1 sugiere que el origen de la duplicación de la *SPD* en *A. thaliana* fue una translocación.

Si extendemos la comparación de estas secuencias a su estructura génica (Figura 26-A), se evidencia más claramente la relación entre estos genes y cómo su origen puede explicarse por eventos de duplicación y cambio de actividad. Es interesante comprobar que la estructura génica se ha mantenido altamente conservada incluso entre monocotiledóneas y dicotiledóneas, que se separaron hace 130 millones de años (Crane *et al.* 2002). Un ejemplo del mecanismo que ha permitido estas hipotéticas duplicaciones lo proporciona el rastro que ha dejado la traslocación intracromosómica de un gran fragmento del cromosoma 1 en Arabidopsis, dando como resultado un paralogón que contiene los dos genes de SPDS en este organismo (Figura 26-B).

Un problema en nuestro análisis es la ausencia de secuencias completas para genes homólogos a las SPMS de plantas fuera del grupo de las Angiospermas. Para determinar si el origen de las SPMS es anterior a la aparición de las Angiospermas decidimos extender nuestro rastreo en las bases de datos para incluir también secuencias parciales (AnexoII). Encontramos diversas secuencias anotadas como SPMS, SPDS o PMT que no obstante, quedaron claramente clasificadas al incluirlas en el análisis filogenético con el resto de las secuencias que ya teníamos de plantas (Figura 27). Todas las plantas, incluyendo musgos y algas, parecen tener secuencias que se clasifican inequívocamente como SPDS o como TSPMS, sin embargo, secuencias que se agruparan con las SPMS sólo las encontramos en Angiospermas. Únicamente en el caso de la primitiva Traqueofita *Selaginella moellendorffii* y en la gimnosperma *Picea glauca*, encontramos tres secuencias relacionadas con esta gran familia, de las cuales dos se agrupaban claramente con los grupos correspondiente a las TSPMS y las SPDS pero una tercera no podía ser asociada sin ambigüedad a ninguno de los tres grupos de aminopropil transferasas establecidos (Figura 27).

Para averiguar si estas secuencias “huérfanas” correspondían en realidad a SPMS (lo que dataría la aparición de esta actividad en plantas a un momento próximo a la aparición del sistema vascular), decidimos comprobar experimentalmente la identidad de la secuencia #2 de la gimnosperma *P. glauca*, que era la única para la que estaba disponible un cDNA entero. Como se ve en la Figura 28, dicho cDNA codifica una SPDS, puesto que su expresión fue capaz de restablecer la síntesis de espermidina en el mutante *spe3* de levadura, pero no la síntesis de espermina en el mutante *spe4*.

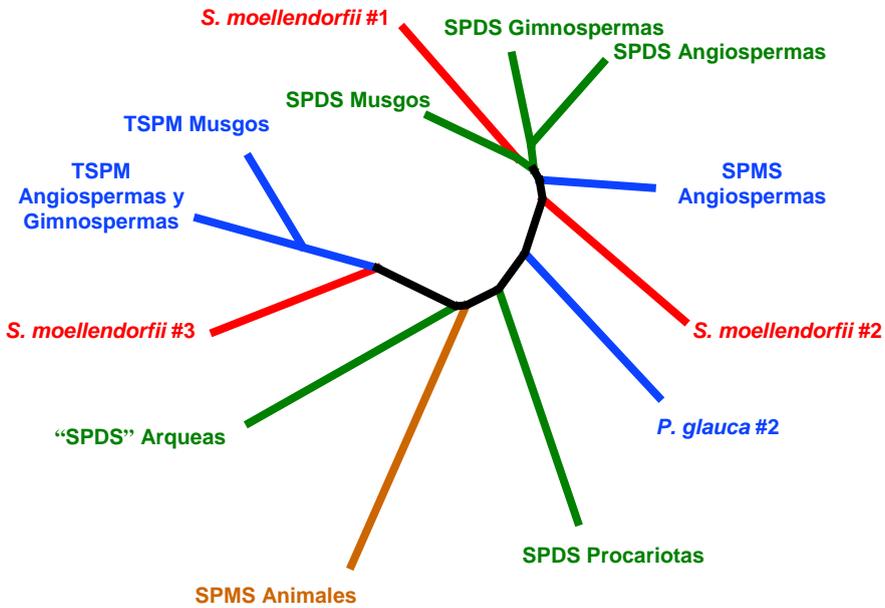


Figura 27: Esquema filogenético mostrando de forma agrupada las SPDS, SPMS y TSPMs de plantas (SPMS de animales y SPDS de procariotas como referencias). En el caso de *P. glauca* y Selaginella (*S. moellendorffii*) hay una secuencia que no se agrupa claramente con ningún grupo establecido.

Nuestros datos indican que en la especie *P. glauca* existe una SPDS que se agrupa perfectamente con el resto de SPDS de plantas pero, además, dispone de otra (PsSPD2) en la que se han acumulado cambios que la han distanciado del grupo “ortodoxo”. Sin más datos, no podemos saber con certeza cuál ha sido el mecanismo por el que esta segunda SPDS ha acumulado cambios y se ha distanciado del resto de SPDS. No obstante, podemos afirmar que no presenta actividad SPMS en nuestro sistema experimental y que por tanto, todos los datos de que disponemos actualmente sugieren que las SPMS sólo están presentes en las angiospermas, descartándose que pueda existir una relación entre su aparición y la aparición del sistema vascular.

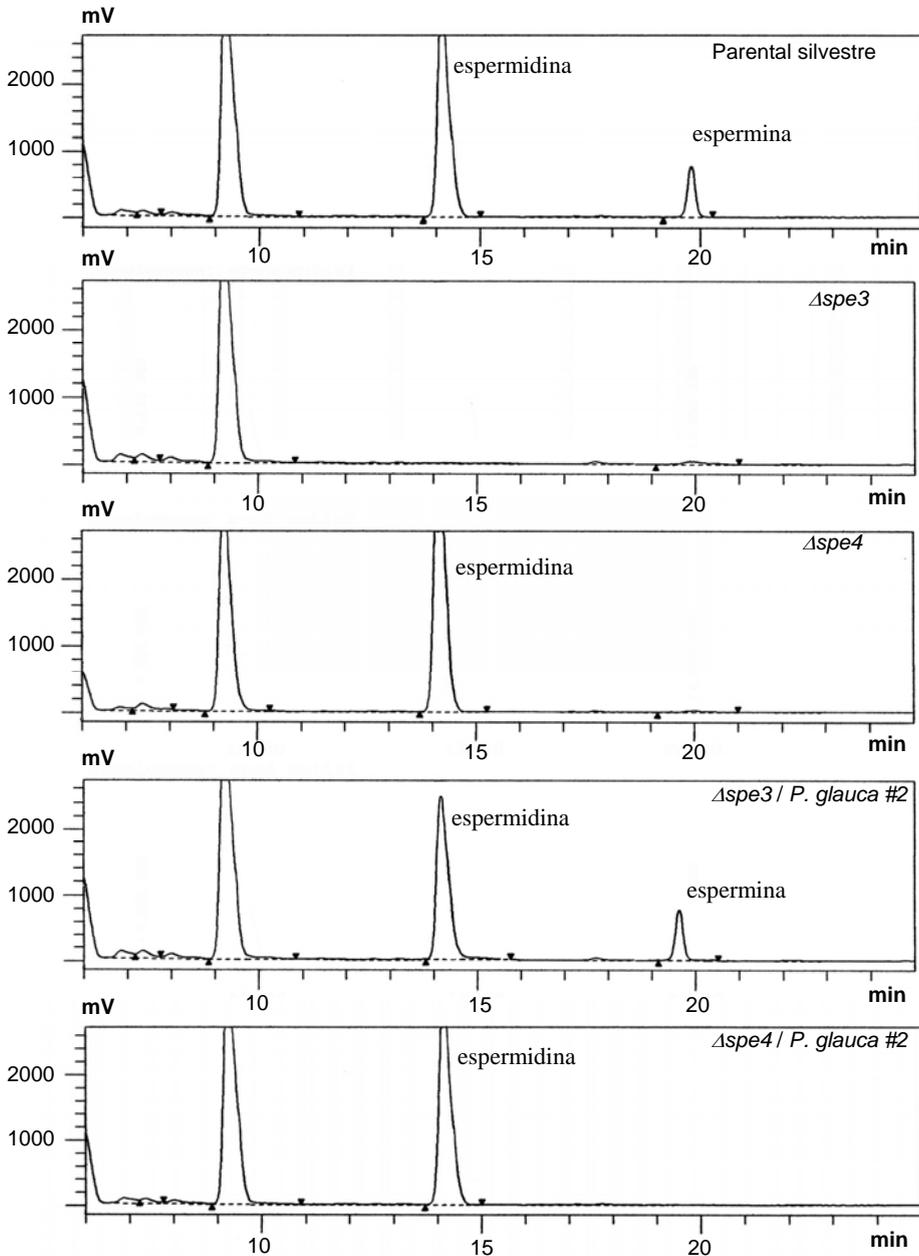


Figura 28: Complementación de una cepa de levadura deficiente en la síntesis de espermidina ($\Delta spe3$) con la secuencia #2 de *P. glauca*; esta secuencia no complementó a la cepa de levadura deficiente en la síntesis de espermina ($\Delta spe4$).

Características estructurales de las aminopropil transferasas y las PMT

Dada la diversificación funcional que las SPDS han sufrido a lo largo de la evolución, cabe pensar que es posible encontrar una explicación estudiando la estructura tridimensional de estas enzimas y su conformación en el centro activo y en la región de reconocimiento de los sustratos. Para identificar los aminoácidos relevantes que puedan explicar la diferente especificidad de sustrato hemos comparado las estructuras de proteínas con las diferentes actividades enzimáticas. Entre las estructuras resueltas que se pueden encontrar en las bases de datos públicas, hemos centrado nuestro análisis en la SPDS y SPMS de *Homo sapiens* (códigos PDB: 2O06, 2O0L and 2QFM), la SPD1 de *Arabidopsis thaliana* (código PDB: 2Q41) y la putativa TSPM de *Thermus thermophilus* (código PDB: 1UIR). A pesar de la distancia evolutiva, muestran una elevada similitud estructural en el centro activo, lo que nos permite suponer que la modelización puede ser una estrategia válida para obtener información tridimensional de las PMTs, de reciente aparición, usando las estructuras de las SPDS como modelo.

La comparación entre los centros activos de la SPD de *A. thaliana* y la modelización de la PMT de *Nicotiana tabacum* revela la existencia de cambios importantes que afectan considerablemente al centro activo y sus interacciones con el AdoMet (Figura 29). Particularmente importante parece el cambio de la D131 a I y la Q107 a T en las PMTs, dado que estos residuos proporcionan cargas negativas en las aminopropil transferasas que impedirían al AdoMet encajar en el centro activo debido al grupo carboxilo que no existe en el AdoMetdc (Korolev *et al.* 2002). Por otro lado, la sustitución de la V134 por T y la L98 por H en las PMT, que cambia residuos hidrofóbicos por residuos polares, parecen ser necesarios para la unión y estabilización de dicho grupo carboxilo del AdoMet (Figura 29B). De hecho, la sustitución solo del residuo equivalente de la I172 por D en una PMT de *Datura stramonium* no cambio su actividad por SPDS, dando lugar sin embargo a la pérdida de toda actividad (Teuber *et al.* 2007), lo que sugiere que el cambio de actividad de la SPDS a PMT no requiere únicamente un espacio adecuado para el grupo carboxilo del AdoMet.

La observación de que las diferentes propiedades catalíticas de las SPDS y las PMT pueden residir en unos pocos cambios de aminoácidos que dan lugar a centros activos mutuamente excluyentes, apoyan la idea de que el mecanismo de la aparición de la actividad PMT fue la neofuncionalización a partir de una SPDS ancestral más que por subfuncionalización de una enzima que tuviera ambas actividades catalíticas

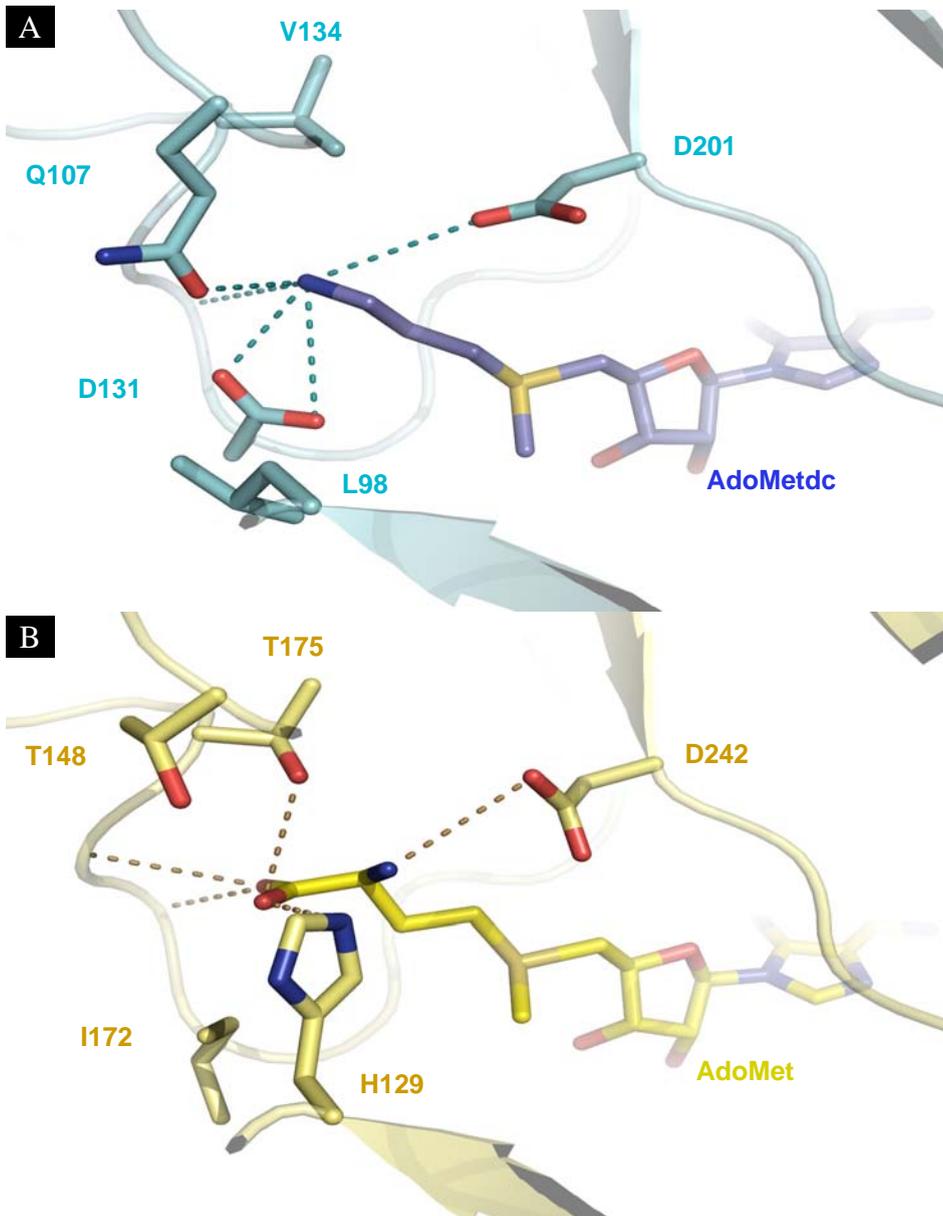


Figura 29: Comparación del centro activo de la *SPD1* de *A. thaliana* modelizada con el AdoMetdc (A) y la *PMT1* de *N. tabacum* modelizada con el AdoMet (B). Los cambios de D131 a I y de Q107 a T en la PMT permite la acomodación del grupo carboxilo del AdoMet. Los cambios en L98 a T y V134 a H, cambio de residuos hidrofóbicos por polares, parece requerirse para estabilizar dicho grupo carboxilo.

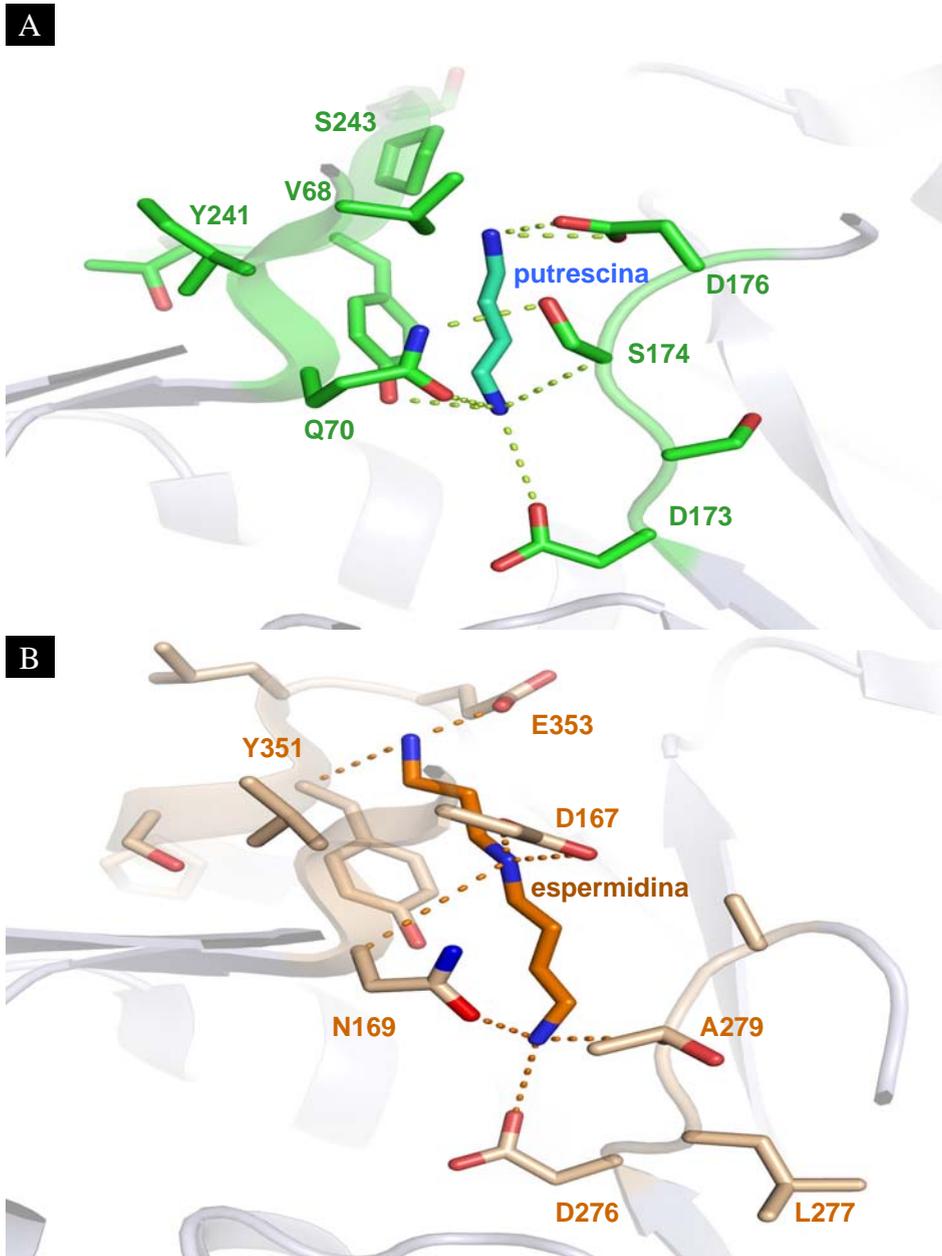
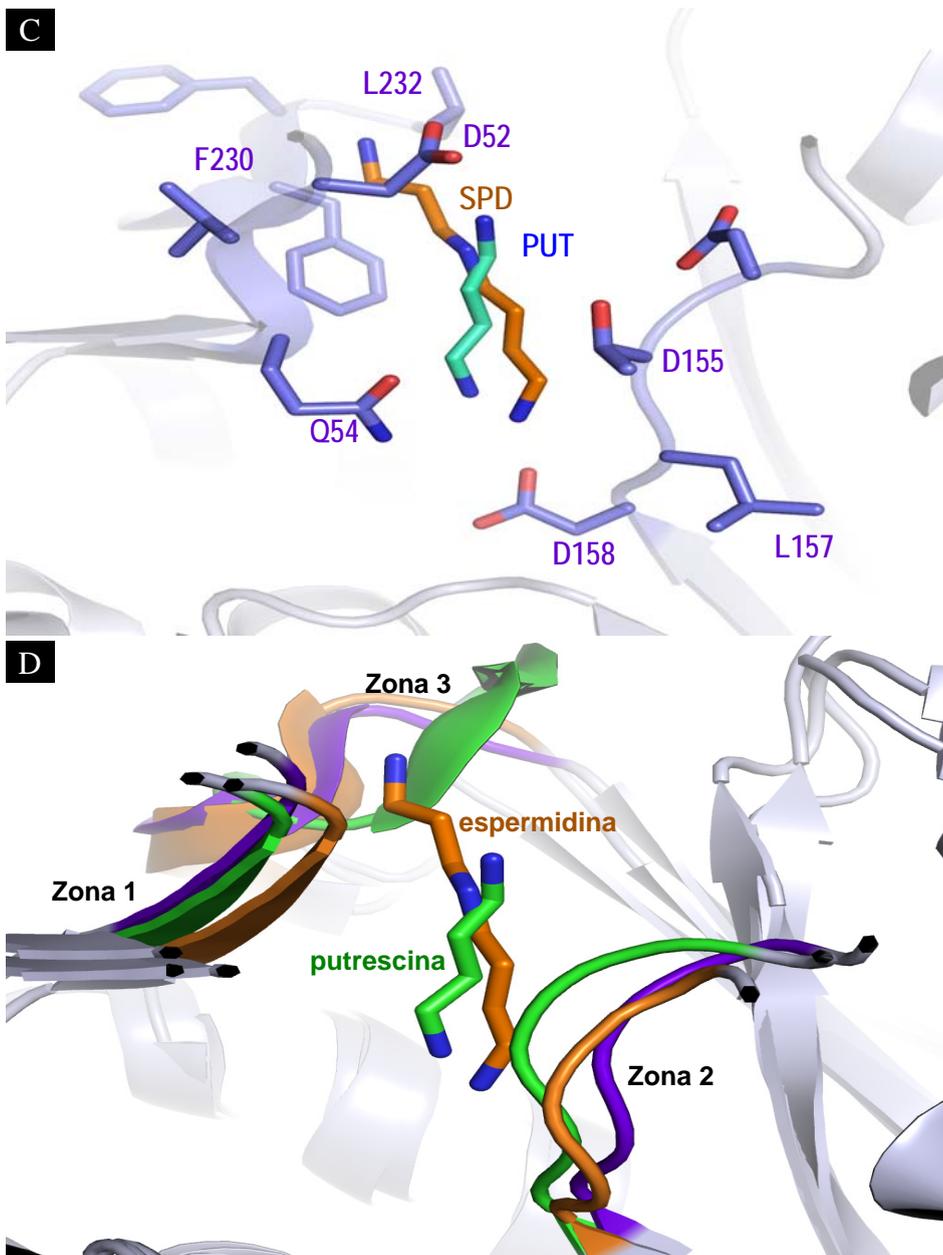


Figura 30: Comparación de la región de reconocimiento de la poliamina sustrato. A) SPDS de *H. sapiens*; B) SPMS de *H. sapiens*; C) TSPMS de *T. thermophilus*; D) Superposición esquemática de las tres aminopropil transferasas. En la SPDS la mayor parte de las interacciones las establece el motivo 2, mientras que en la SPMS las establece el motivo 1 (la modelización de los sustratos en la TSPMS sugieren que las



interacciones se asemejan a las de la SPMS). La Zona 3 en las SPDS genera impedimento estérico para el acomodamiento de la espermidina. El diferente posicionamiento de la Zona 2 en las SPMS y la TSPMS sugieren que la putrescina no puede establecer las interacciones necesarias para poder ser utilizada eficientemente como sustrato.

(Force *et al.* 1999; He and Zhang 2005; Ohno 1970), lo que se ajusta adecuadamente con nuestro análisis filogenético y la conservación de la estructura génica.

En el caso de las SPMS y las TSPMS no es tan sencillo identificar cambios de aminoácidos específicos que puedan explicar las nuevas actividades derivadas de SPDS ancestrales. Al parecer, la conformación global del canal que acomoda la poliamina que actúa como sustrato presenta sutiles cambios estructurales en las SPDS en comparación con las SPMS y las TSPMS que pueden influir significativamente en la especificidad de sustrato. La comparación de la geometría de los centros activos mediante superposición de las tres estructuras correspondientes (Figura 30C) muestra una mayor proximidad entre las paredes opuestas que forman el canal de la poliaminas en la SPDS (motivos 1 y 2) en comparación con la SPMS y la TSPM. Adicionalmente, la presencia del motivo 3 en la SPDS impediría la acomodación de la espermidina en el centro activo. Por otro lado, no hay diferencias de aminoácidos que puedan explicar por qué la putrescina no puede acomodarse en el centro activo de la SPMS o la TSPMS, en comparación con la SPDS. La inexistencia de estructuras cristalizadas obtenidas a partir de SPMS y TSPMS con sus sustratos impide presentar una respuesta definitiva, pero cuando la posición de la putrescina y la espermidina se modelizan en las estructuras disponibles, algunas diferencias de aminoácidos parecen tener relevancia. Por ejemplo, el residuo D176 que estabiliza uno de los grupos amino de la putrescina en la SPDS (Figura 30A) ha desaparecido en la SPMS (Figura 30B) y en la TSPMS está presente pero en una posición distante que le impide interactuar con la putrescina (Figura 30D). La putrescina, debido a su menor tamaño y a la presencia de sólo dos grupos amino, no sería capaz de establecer las interacciones necesarias con los residuos del canal del sustrato en la SPMS o la TSPMS.

La conclusión de que los cambios de actividad se basan en el efecto aditivo de sutiles cambios de aminoácidos, que no obstante mantienen la estructura del canal de entrada de la poliamina sustrato, es compatible con la idea de que en algún momento de la evolución la actividad ancestral y la nueva pudieron coexistir en una sola proteína. Una dato que apoya esta hipótesis lo encontramos en la capacidad de algunas aminopropil transferasas de utilizar varios sustratos pero con diferente afinidad, como en el caso de la aminopropil transferasa de *Pyrococcus furiosus* (Cacciapuoti *et al.* 2007). Sin embargo, la afinidad por los sustratos que no son el principal es relativamente baja y podemos considerar poco probable, en base a la información del centro activo, que pudiera existir una enzima que pudiera considerarse realmente bi o multifuncional.

Discusión

*“Ciencia es aquello sobre lo cual
cabe siempre discusión.”*
José Ortega y Gasset

El relativamente escaso conocimiento que se tenía sobre la síntesis de espermina y su función fisiológica en plantas motivaron inicialmente el planteamiento de varias preguntas que han intentado responderse a lo largo de esta Tesis. Sin embargo, las observaciones que hemos recogido durante el desarrollo de este trabajo nos han permitido enfocar las preguntas iniciales alrededor de dos cuestiones de índole más general:

- ¿Cómo se ha originado la diversificación del metabolismo de las poliaminas?

- ¿Cuál es la función de las poliaminas que las ha hecho conservarse durante la evolución?

Aunque la comprensión completa de estas cuestiones trasciende el desarrollo de esta Tesis, los abordajes mostrados en los capítulos anteriores nos permiten obtener algunas respuestas sobre las que sustentar trabajos futuros.

La visión del metabolismo de las poliaminas en Plantas ha cambiado durante el transcurso de esta Tesis de una forma tal que ha implicado también un importante cambio conceptual: en lo referente a poliaminas de cuatro aminos, la termoespermina es la poliamina común a todas las Plantas, mientras que la espermina es exclusiva de las Angiospermas. Todas las enzimas implicadas en la síntesis de poliaminas comparten el mecanismo enzimático, además de los sustratos utilizados, y han resultado estar relacionadas, lo que abre la cuestión de cuál ha sido el mecanismo que ha permitido la aparición de todas estas actividades (Figura 31).

La observación de que todas las aminopropil transferasas y las PMTs están emparentadas evolutivamente pero han surgido de manera independiente en distintas especies, sugiere que el mecanismo más frecuente en la evolución del metabolismo de las poliaminas es la duplicación de SPDS ancestrales y posterior neofuncionalización, añadiendo complejidad y diversificación a este metabolismo. Además, que la TSPMS de plantas fuera reclutada para la correcta diferenciación del xilema proporciona la evidencia funcional para justificar su existencia y conservación por presión selectiva durante la evolución en las plantas vasculares.

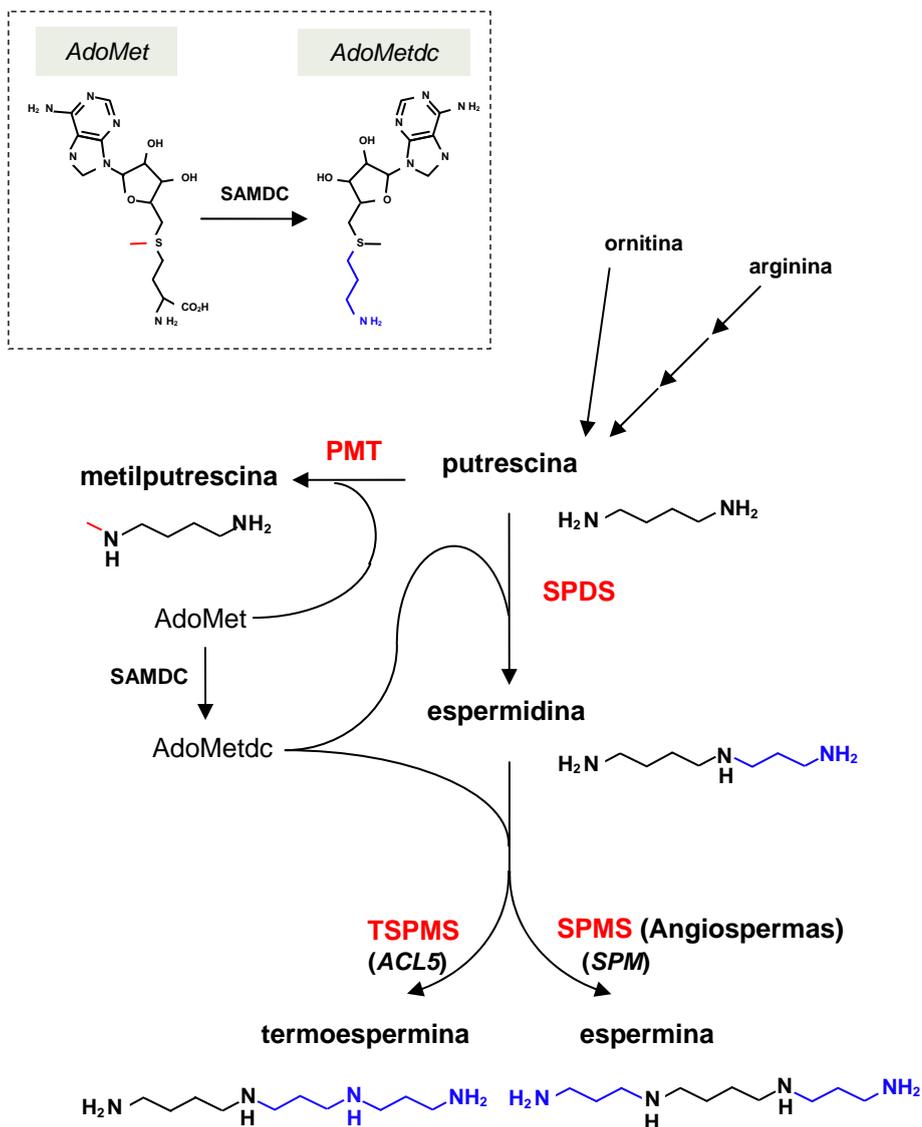


Figura 31: Ruta de biosíntesis de Poliaminas en Plantas. Todas las plantas verdes poseen la actividad TSPMS, mientras que sólo las Angiospermas tienen el gen *SPM*, responsable de la actividad SPMS. La actividad PMT ha aparecido exclusivamente en Solanales.

La neofuncionalización como principal mecanismo generador de complejidad en el metabolismo de poliaminas

La duplicación de genes está ampliamente considerada como el principal mecanismo generador de nuevas actividades (Ohno 1970). Tras la duplicación de un gen, cada una de las duplicaciones puede seguir un camino: 1) acumulación de mutaciones, que eliminan su función y lo convierten en un pseudogen; 2) mantenimiento de su actividad, convirtiéndose en un gen redundante; 3) cambio de función. En cualquier genoma pueden encontrarse rastros de estos tres procesos, pero sólo el cambio de función resulta de forma efectiva en una conservación funcional de ambas duplicaciones. Este cambio puede conseguirse a través de variaciones tanto en la regulación de la expresión de uno o de los dos parálogos, como en las actividades de las proteínas codificadas. Respecto a la actividad del gen ancestral, los nuevos parálogos pueden sufrir *subfuncionalización* o *neofuncionalización* (Lynch *et al.* 2001). En el primer caso los dos genes se reparten las funciones que realizaba el gen ancestral, por ejemplo mediante la distribución de los diferentes dominios de expresión del gen ancestral entre los nuevos parálogos. En el segundo caso, una de las nuevas copias adquiere una nueva función inexistente en el gen ancestral. Esta nueva función puede ser debida tanto a nuevos dominios de expresión como a cambios en la actividad de la proteína codificada. Se ha propuesto también que en algunos casos de duplicación, la fuerza inicial que evita que una de las copias se convierta en pseudogen es la subfuncionalización seguida por una neofuncionalización prolongada, lo que se denomina subneofuncionalización (He and Zhang 2005).

En el caso de las aminopropil transferasas y las PMT, el análisis filogenético es compatible, en principio, con al menos dos modelos evolutivos. El primero se basaría en que los genes ancestrales codificaran enzimas capaces de realizar las funciones de varias aminopropil transferasas indistintamente, es decir, con requerimientos relativamente laxos respecto a los sustratos utilizados (AdoMet *vs.* dcAdoMet; putrescina *vs.* espermidina); de esta manera, los genes resultantes de la duplicación habrían derivado, mediante un proceso de subfuncionalización, hacia la especialización por caminos distintos, rindiendo por ejemplo SPDS y SPMS, o SPDS y PMT. En el modelo alternativo, el gen ancestral codificaría una SPDS que, al duplicarse, habría permitido el cambio de función de uno de los parálogos mediante la acumulación de cambios discretos en el centro activo de la enzima codificada por éste, siguiendo un proceso de neofuncionalización.

A favor del primer modelo se cuenta con la observación de que algunas aminopropil transferasas de bacterias muestran capacidad para utilizar distintas poliaminas como sustratos, aunque con eficacias muy diferentes (Cacciapuoti *et al.* 2007). Sin embargo, son varios los argumentos que apuntan al segundo modelo como el más probable. En primer lugar, de acuerdo con la topología del árbol obtenido en el análisis filogenético (Figura 24), el primer modelo requeriría que la actividad SPMS se hubiera perdido en varias ocasiones de forma independiente. Además, los grupos de SPDS de eucariotas deberían distribuirse en grupos separados por haber sufrido procesos de subfuncionalización independientes, presentando distancias mucho mayores a las observadas. En segundo lugar, el análisis estructural del centro activo de las PMT y las SPDS sugiere que la utilización del AdoMet es excluyente respecto a la del dcAdoMet debido a diferentes interacciones de cargas (Figura 29). Aunque esto no es tan evidente cuando se comparan SPDS y SPMS, también en este caso pueden observarse interacciones diferentes entre la putrescina o la espermidina y el canal donde se sitúan dichas poliaminas, indicando que tampoco parece probable que ambas puedan ser estabilizadas indistintamente. Por otra parte, el análisis también proporciona evidencia suficiente para justificar la existencia de cierta flexibilidad en la especificidad de sustrato, como se discutía más arriba en favor del primer modelo.

En definitiva, parece bastante probable que el mecanismo de la aparición de nuevas actividades del metabolismo de poliaminas, y con ello el aumento de la complejidad de la ruta, se basara en la duplicación de SPDS ancestrales seguida de neofuncionalización. No deja de ser menos sorprendente, entonces, que la interpretación más parsimoniosa para explicar la presencia de las distintas actividades en todos los reinos sugiera que la SPDS haya dado lugar repetidas veces a la actividad SPMS por separado en animales, hongos y algunas plantas, además de haber originado la actividad TSPMS en bacterias, y la actividad PMT en las Solanales (Figura 32).

Los datos filogenéticos obtenidos nos indican que la actividad SPMS ha aparecido independientemente en animales, hongos y plantas. Las secuencias obtenidas de cada grupo indican que en animales el suceso se dio poco después de separarse de la línea de eucariotas que dio lugar a los hongos, donde, en base a su elevado parecido a sus correspondientes SPDS y a que no lo hemos encontrado en todos los hongos, debió suceder más tarde. En Plantas, la actividad SPMS apareció en la línea que dio lugar a las Angiospermas. Por otro lado, la actividad PMT la hemos encontrado exclusivamente en Solanales donde ha sido crucial para el metabolismo de los alcaloides. En todos estos

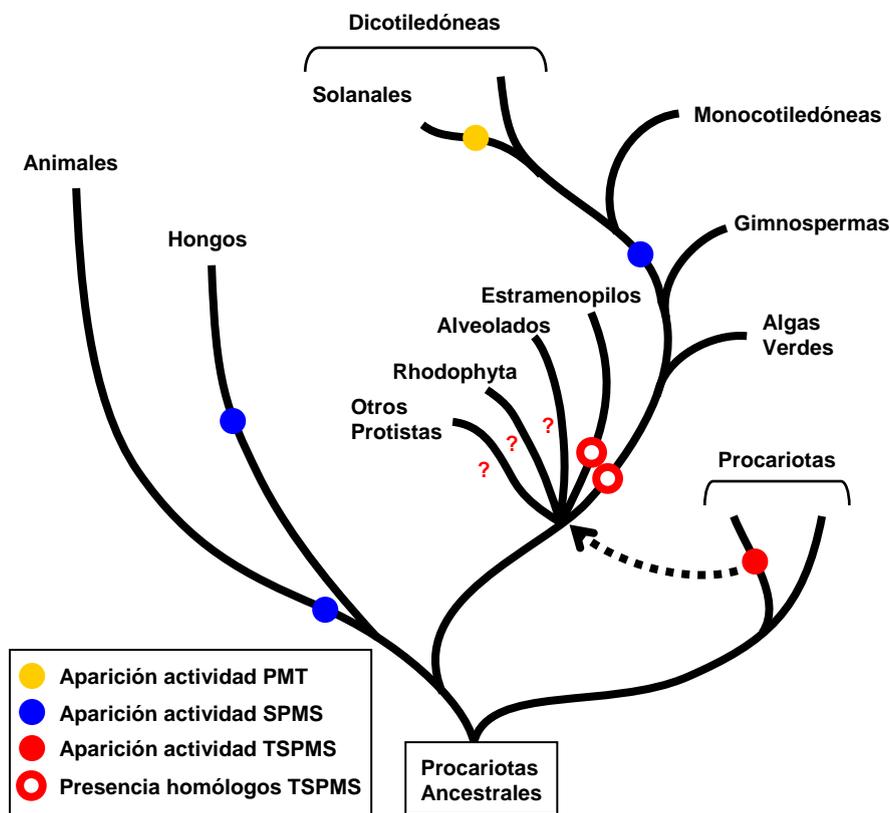


Figura 32: Aparición de nuevas actividades en el Metabolismo de las Poliaminas. La actividad SPDS estaba presente en los primeros procariotas y ha sido el núcleo generador a partir del cual han aparecido las actividades SPMS, TSPMS y PMT.

casos, los datos indican que estas actividades surgieron en un proceso de neofuncionalización tras la duplicación de una SPDS.

Una explicación mecánica para esta “promiscuidad” puede radicar precisamente en la comparación de los centros activos de las distintas aminopropil transferasas. El hecho de que la especificidad de sustrato pudiera determinarse por unos pocos cambios discretos de aminoácidos, hace bastante plausible que estos cambios hayan ocurrido en varias ocasiones a lo largo de la evolución, aunque hay que hacer dos consideraciones: que no existe prueba experimental de que tales variaciones en el centro activo sean la causa de la diferencia en actividad; y que, ya que es muy improbable que

los cuatro o cinco cambios hayan surgido simultáneamente, habría que encontrar el “camino” por el que esos cambios han tenido lugar de forma sucesiva sin que se haya producido una pérdida de función en los pasos intermedios.

Hay que destacar, como excepción, que la aparición de la actividad TSPMS en plantas puede tener una explicación alternativa. La ausencia de secuencias en animales y hongos que se agrupen con las TSPMS y la elevada similitud entre algunas de las secuencias de procariotas y las TSPMS de plantas sugiere que las plantas podrían haber adquirido esta actividad mediante transferencia horizontal (Figura 32). Aunque no es un mecanismo común, la transferencia horizontal de genes de procariotas a plantas se ha descrito en otros casos, como la actividad enolasa de plantas (Keeling y Palmer 2001), los transportadores de glicerol (Zardoya *et al.* 2002), o las proteínas WHy (Ciccarelli and Bork 2005). Incluso, otra parte de la ruta de síntesis de poliaminas, la que permite obtener putrescina a partir de arginina, parece haber sido adquirida de la cianobacteria precursora de los cloroplastos (Illingworth *et al.* 2003). Para intentar determinar cuándo pudo darse esta transferencia horizontal, hemos buscado homólogos a las TSPMS de forma sistemática y hemos encontrado secuencias que se relacionan inequívocamente con las TSPMS de plantas en los estramenopilos pero no en alveolados, algas rojas u otros protistas. Las relaciones filogenéticas entre estos grupos de eucariotas no están bien definidas, y no podemos discernir entre una transferencia horizontal a un ancestro común a todos estos grupos (hipótesis 1), pero que en algunos grupos se perdió (algas rojas, alveolados y otros protistas), y una transferencia horizontal a un ancestro común a plantas y estramenopilos no compartido con los otros grupos (hipótesis 2). Aunque la pérdida de un gen en varios grupos (hipótesis 1) se considera generalmente menos parsimoniosa, en este caso, en el que todos estos grupos se separaron en un “breve” periodo de tiempo (evolutivamente hablando), ambas hipótesis son igualmente factibles. Una evidencia que apoyaría la hipótesis 2 sería la identificación de otros genes compartidos entre plantas verdes y estramenopilos que no existiesen en los otros grupos de eucariotas, mientras que la hipótesis 1 se vería reforzada si, a medida que hay disponibles secuencias de más organismos, se identificasen homólogos de las TSPMS en los otros grupos.

Algunas de las secuencias de procariotas relacionadas con las TSPMS que hemos encontrado muestran cierta flexibilidad en el uso de sustratos (Cacciapuoti *et al.* 2007), siendo la agmatina el principal sustrato, aunque pueden usar espermidina para dar lugar a termoespermina. Existen razones para pensar que el gen ancestral a las TSPMS de plantas debía tener similares características (caso de *Thermus thermophilus*

desarrollado en el siguiente punto) por lo que podemos imaginar que en plantas fue esa actividad no principal la que proporcionó una ventaja evolutiva y que ésta fue la fuerza selectiva para que se diera un proceso hacia la optimización de la actividad TSPMS.

Modelo de evolución del metabolismo de poliaminas

Existen tres modelos básicos sobre la evolución del metabolismo, y cada uno de ellos presenta implicaciones distintas en la interpretación funcional, en términos generales (Schmidt *et al.* 2003). En los casos de evolución *hacia atrás* (“backward model”), el producto final de una ruta metabólica suele representar una función importante para el organismo, y el refinamiento de dicha ruta metabólica consiste en la adición de nuevas etapas que permiten una obtención más eficiente o mejor regulada de los precursores de la ruta. Por otro lado, existen casos documentados que responden a un modelo de evolución *en mosaico* en los que una ruta metabólica se origina por composición a partir del reclutamiento de actividades (etapas) ya existentes en otras rutas metabólicas. El producto final de esta nueva ruta debe conferir alguna ventaja, mientras que los intermediarios nuevos, es suficiente con que no sean tóxicos. En el tercer modelo, de evolución *hacia adelante* (“forward model”), una ruta metabólica adquiere complejidad por la adición de nuevas actividades que actúan sobre el producto final de una ruta ya existente. Este nuevo producto final debe presentar alguna ventaja que favorezca su fijación en la fisiología del organismo.

Nuestros datos indican que el metabolismo de las poliaminas ha evolucionado siguiendo el tercer modelo, aumentando progresivamente la complejidad de los productos finales, lo que implica que en cada caso la nueva poliamina ha conferido alguna ventaja que ha favorecido su fijación, pero en cada caso esa ventaja puede haber sido diferente. Esta hipótesis está apoyada por el hecho de que la espermina no parece tener las mismas funciones según las examinemos en animales, en hongos o en plantas, en concordancia con que en cada grupo la actividad SPMS haya surgido independientemente, y por tanto que el proceso evolutivo en cada caso haya sido diferente. También explica por qué cada poliamina parece estar implicada en funciones diferentes, y por qué mutantes en diferentes pasos de la ruta tienen fenotipos diferentes. En el caso de las rutas metabólicas que han evolucionado hacia atrás, cualquier mutación que impida obtener el producto final tiene el mismo fenotipo, pues dicho producto final es el realmente importante; en el caso de las poliaminas, sin embargo, la pérdida de la capacidad de sintetizar espermina o termoespermina no es letal (aunque pueda tener efectos diferentes dependiendo de si hablamos de plantas, animales u

hongos), mientras que la pérdida de la capacidad de sintetizar espermidina (que implica la ausencia también de espermina y termoespermina) es letal en todos los casos.

En el caso particular de *T. thermophilus* (y otros procariotas relacionados) los datos indican que se ha producido una evolución del metabolismo siguiendo el modelo de evolución *en mosaico*. En un ancestro a estos procariotas actuales se alteró la afinidad por sustrato de la SPDS permitiendo que esta enzima, que seguía siendo una aminopropil transferasa (APT), utilizara como sustrato a la agmatina para dar lugar a N₁-aminopropilagmatina. La aparición de la actividad agmatina aminopropil transferasa dio lugar a un producto nuevo que no obstante podía ser utilizado por actividades ya existentes para dar lugar igualmente a espermidina (Figura 33), siendo un cambio de actividad que tiene un efecto neutro para la síntesis de espermidina. Esto concuerda con la ausencia de otro gen en los genomas de estos procariotas relacionado con las SPDS y nos proporciona evidencia sobre cómo pudo aparecer la actividad TSPMS (como se comentó al final del punto anterior). Aunque no podamos estar completamente seguros, parece improbable que la actividad SPDS adquiriera la actividad TSPMS sin perder la actividad original, por lo que podemos imaginar que el ancestro de las TSPMS de plantas es el mismo que el de la agmatina aminopropil transferasa de *T. thermophilus* y que muy probablemente presentaba propiedades similares a esta última, presentando cierta actividad, aunque minoritaria, como TSPMS. Resulta muy interesante cómo un cambio de actividad, sin trascendencia fisiológica a corto plazo, unido a una transferencia horizontal, haya permitido que una función minoritaria, aparecida como un “consecuencia secundaria”, haya llegado a ser tan importante para el correcto desarrollo del sistema vascular xilemático en plantas.

Nuevas funciones para las nuevas poliaminas

Una condición implícita en el modelo de evolución *hacia delante* que parece haber seguido el metabolismo de las poliaminas, es que los nuevos compuestos sintetizados proporcionen ventajas evolutivas que justifiquen su conservación. En el caso de la espermina no es fácil inferir dicha función esencial, y tampoco tiene por qué ser la misma en todos los organismos, puesto que la SPMS surgió de forma independiente en animales, hongos y plantas. Según el análisis genético funcional, en levadura la pérdida de función de la actividad SPMS no parece tener efectos en el crecimiento, mientras que en animales, en base a estudios realizados en ratón, se ha podido comprobar que la ausencia de espermina afecta claramente al desarrollo normal,

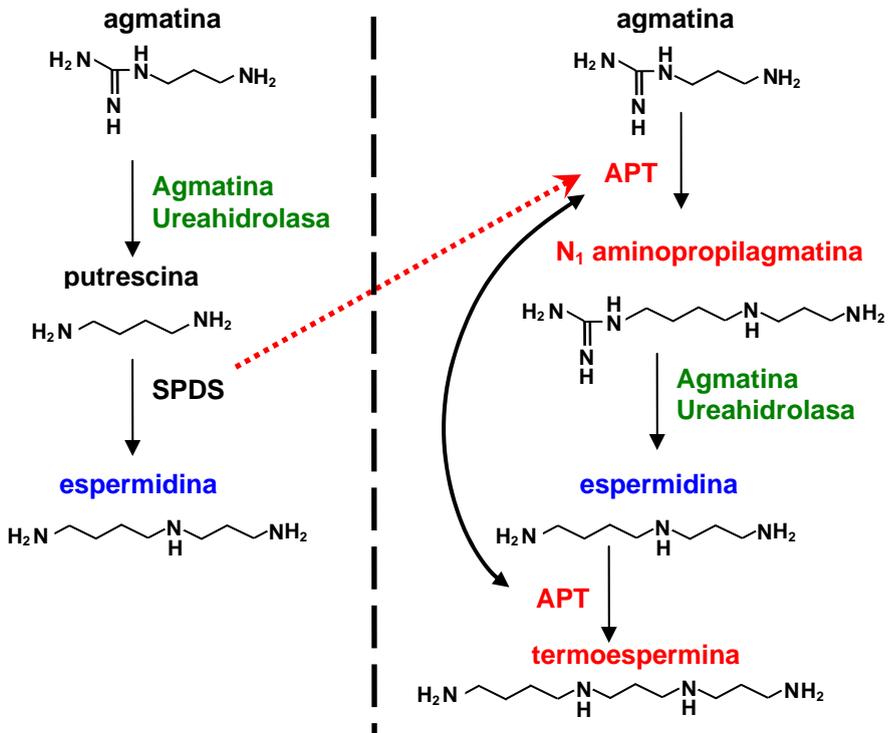


Figura 33: Biosíntesis de espermidina en *Thermus thermophilus*. Generalmente la actividad agmatina ureahidrolasa (AUH) da lugar a putrescina a partir de agmatina. La actividad AUH en *T. thermophilus* es la responsable de originar putrescina y espermidina a partir de agmatina y de N₁-aminopropilagmatina, respectivamente.

aunque los individuos son viables (Hamasaki-Katagiri *et al.* 1998; Wang *et al.* 2004). En cualquier caso, ninguno de estos datos aporta información sobre la función molecular de la espermina en estos organismos.

Nuestro trabajo con *A. thaliana* también parece descartar una función vital de la espermina en el desarrollo vegetal, puesto que los mutantes sin SPMS son indistinguibles, en condiciones normales, de un silvestre. Sin embargo, estudios realizados en otros laboratorios parecen indicar que el gen *SPM* está implicado en procesos de respuesta a estrés (Groppa and Benavides 2007), lo que añade contexto a la inducción aquí mostrada de la expresión de *SPM* por ABA (Figura 9), una hormona clásicamente relacionada con estrés (Christmann *et al.* 2006; Giraudat *et al.* 1994; Zhu

2002), y que es necesaria para la inducción de los genes de síntesis de poliaminas en situaciones de estrés hídrico (Alcazar *et al.* 2006).

Nuestro análisis del fenotipo del mutante *acl5* ha confirmado una importante función para este gen en el correcto desarrollo del sistema vascular. No obstante, también hemos mostrado que el gen *ACL5* está presente tanto en plantas vasculares como no vasculares; de hecho lo hemos encontrado en todas las plantas de las que se dispone información suficiente, lo que plantea las preguntas de cuál sería su función en las primeras plantas y en qué momento el programa de desarrollo de haces vasculares reclutó la actividad TSPMS para controlar la muerte celular hasta la culminación del programa de diferenciación del metaxilema. Sería posible que esta función en la regulación de la muerte celular fuera una función ya ejercida por este gen con anterioridad a la aparición de las plantas vasculares, ya que existen diversos datos que establecen una relación entre las poliaminas y procesos de muerte celular y senescencia (Mea *et al.* 2007; Pandey *et al.* 2000). Por otro lado, también es posible que la función original fuera otra ya que, en diatomeas por ejemplo, la termoespermina, en asociación a cadenas peptídicas, parece estar implicada en la regulación de la deposición de la estructura calcárea que las cubre (Kroger *et al.* 2000; Sumper *et al.* 2005).

A pesar de no haber podido definir con precisión el mecanismo molecular a través del cual actúa *ACL5*, las observaciones nos conducen a plantear un modelo en el que la actividad de este gen retrasa la muerte celular de las células que están diferenciándose en metaxilema. Así lo sugieren: 1) la activación de genes relacionados con muerte celular programada en el mutante *acl5* (Figura 21B); 2) una incompleta deposición de la pared celular en elementos vasculares (Figura 20); y 3) que la inducción de muerte celular utilizando la toxina DT-A en las células que expresan *ACL5* dé lugar a plantas que fenocopian las alteraciones en el sistema vascular del mutante *acl5* (Figura 22). Además, el grupo de Hannele Tuominen (UPSC, Umeå, Suecia), con el que mantenemos una estrecha colaboración, ha utilizado el sistema de diferenciación de elementos traqueales en cultivos celulares de *Zinnia elegans* (Fukuda *et al.* 1994; Fukuda and Komamine 1980) y ha observado que la adición de espermina alarga el proceso de diferenciación y permite alcanzar una mayor proporción de elementos diferenciados como metaxilema.

Una alternativa a la función de *ACL5* en la regulación de la muerte celular, podría ser que este gen formara parte de la señal instructiva que determina el programa de diferenciación del metaxilema (y de las fibras). Esta señal se sabe que está

principalmente compuesta por las auxinas y las citoquininas, además de la participación de los brasinosteroides, algunos miRNA, factores de transcripción y los péptidos CLE (Turner *et al.* 2007). Sin embargo, pensamos que es poco probable que *ACL5* forme parte de dicha señal instructiva porque la inducción de la expresión de *ACL5* se produce después de que las células hayan entrado en el programa de diferenciación del xilema (comunicación personal de Ykä Helariutta, U. de Helsinki, Finlandia).

Por otro lado, aunque no lo hemos explorado en profundidad, la ausencia de fibras en el mutante *acl5* es casi tan llamativa como la del metaxilema. Los dos defectos están lógicamente relacionados, pero en este momento es imposible distinguir si la ausencia de fibras es una consecuencia secundaria del fallo en el programa de diferenciación del metaxilema, o si *ACL5* regula de forma adicional la formación de las fibras. En el primer caso, habría que hipotetizar la existencia de alguna señal proveniente del metaxilema en maduración que dirigiera la diferenciación de las fibras. Y en el segundo caso, es probable que el mecanismo primario de acción de *ACL5* estuviera también relacionado con el control de la muerte celular, puesto que en las líneas *pACL5::DT-A* también se fenocopiaba este aspecto del mutante *acl5*.

A pesar de estar clara la actividad de *ACL5* como una TSPMS *in vitro* (Knott *et al.* 2007) y que la termoespermina ya haya sido identificada en plantas acuáticas (Hamana *et al.* 1994), aún carecemos de la prueba definitiva que implique inequívocamente al producto de la actividad enzimática, la termoespermina, en la diferenciación del metaxilema. Un obstáculo importante es que dicha poliamina no está disponible de forma comercial. Mientras que dicha prueba experimental no se realice, no se puede descartar la posibilidad formal de que *ACL5* posea una función adicional independiente de su función como TSPMS, en lo que sería uno de los primeros casos documentados de “moonlighting” en plantas (Gancedo and Flores 2008). Una aproximación alternativa, careciendo de termoespermina, sería examinar el fenotipo de mutantes puntuales en *ACL5* que eliminen la actividad TSPMS (y, posiblemente, no la hipotética función alternativa). Sin embargo, la observación de que la adición de espermina en concentraciones elevadas en cultivos de *Zinnia* tiene un efecto igual al esperable para la termoespermina, como hemos mencionado más arriba, sugiere que es el producto de la actividad enzimática el que controla el proceso de formación del xilema.

Perspectivas futuras

Aunque nuestros resultados ponen de manifiesto la importante función que cumple *ACL5* en la diferenciación del sistema vascular, aún se desconoce el mecanismo a través del cuál ejerce su papel. Sería necesario conocer cómo los genes implicados en la muerte celular programada pueden estar regulados por *ACL5*, además de investigar de qué forma está alterado el proceso normal de diferenciación del metaxilema en el mutante *acl5*. Actualmente las técnicas de microdissección láser podrían permitirnos conocer con mayor especificidad las alteraciones en la expresión génica que sufren las células específicas que expresan *ACL5*. En este sentido, nuestro laboratorio ha identificado genes supresores del defecto en la altura y/o el desarrollo de las haces vasculares en un mutante *acl5*, que podrían mediar la acción de *ACL5*.

Otra cuestión que nos parece un punto de partida atractivo para una futura línea de investigación es la posibilidad de modificar el metabolismo de las poliaminas mediante ingeniería enzimática. El análisis estructural de los centros activos de SPDS, PMT y SPMS (Figura 29) apunta a varios aminoácidos concretos como los determinantes de la afinidad de cada enzima por sus sustratos. Por supuesto, este modelo necesita confirmación experimental pero, si es correcto, no sería imposible diseñar un centro activo que pudiera catalizar nuevas reacciones. Por ejemplo, la modificación del centro activo de la SPMS para acomodar AdoMet en lugar de dcAdoMet podría dar lugar a una actividad “espermidina metiltransferasa”.

Por último, en el plano evolutivo, existen actualmente métodos estadísticos que permiten pronosticar cuál sería la posible secuencia del ancestro común para una determinada familia actual de proteínas (Thornton 2004). En plantas, la comparación de la posible SPDS ancestral, para las Angiospermas o para las Solanales, con la SPMS ancestral o la PMT ancestral, deducidas por el mismo método estadístico, podría darnos indicaciones de cuáles han sido los pasos requeridos para cada cambio de actividad. Además, la generación en el laboratorio de estas “enzimas ancestrales” nos permitiría estudiar sus propiedades cinéticas y verificar la hipótesis de que el ancestro codificaba una SPDS.

CONCLUSIONES

1.- *ACL5* y *SPM* son los únicos genes presentes en el genoma de *Arabidopsis thaliana* que codifican las actividades aminopropil transferasas responsables de la síntesis de termoespermina y espermina, respectivamente.

2.- El gen *ACL5* está implicado en el desarrollo del sistema vascular de *Arabidopsis thaliana* modulando el proceso de muerte celular y permitiendo que el programa de diferenciación del xilema se complete correctamente. Esta función es necesaria para la correcta formación del metaxilema y de las fibras xilemáticas.

3.- Todas las aminopropil transferasas y las PMTs provienen de un ancestro común que presumiblemente codificaba una SPDS. Aunque la actividad SPMS está presente en animales, hongos y plantas, su aparición se debe a procesos independientes de neofuncionalización en cada uno de los Reinos.

Material y Métodos

1- CARACTERÍSTICAS Y MANEJO DEL MATERIAL BIOLÓGICO

1.1- Material Vegetal

En este trabajo se ha utilizado como sistema experimental la planta *Arabidopsis thaliana*, de los ecotipos Columbia-0 (Col-0) y Landsberg *erecta* (Ler).

Condiciones de Cultivo

El cultivo en invernadero de las plantas de *Arabidopsis* se realizó con una mezcla de turba:perlita:vermiculita (2:1:1), en cámaras de cultivo con temperatura en el rango 21-23° C, humedad relativa entre 50-80%. Las plantas se cultivaron en condiciones de fotoperiodo de día largo (16h de luz y 8h de oscuridad). Las plantas se iluminaron mediante tubos fluorescentes que proporcionan luz blanca con una intensidad de 120 mmol/m²s (Sylvania standard).

El cultivo *in vitro* se realizó en medio MS (Murashige and Skoog 1962) (MS 0'22 p/v, sacarosa 1'5% p/v, MES 0'05% p/v, pH 5'7) y en las mismas condiciones de cultivo descritas previamente en este apartado. Para cultivo en líquido, se utilizaron matraces cónicos de 100 ó 250 ml. Para cultivo en sólido se añadió, al medio MS, Phytoagar al 0'7% y se utilizaron placas Petri circulares.

Transformación de *Arabidopsis thaliana*

Para la obtención de plantas transgénicas de *A. thaliana*, se siguió el protocolo de transformación descrito por Clough y Bent (Clough and Bent 1998) ligeramente modificado. Las plantas de *A. thaliana* fueron cultivadas en condiciones de día largo hasta la aparición de los tallos florales (aproximadamente 4 semanas). Las inflorescencias se sumergieron en una suspensión de *Agrobacterium tumefaciens* cepa C58, portadora de la construcción requerida, en medio de infiltración (sacarosa 1'5% p/v, Silwett 0'02% v/v), durante 5 min a temperatura ambiente. Las plantas se colocaron tumbadas en bandejas recubiertas con papel transparente y guardadas en oscuridad durante 24h, tras lo cual fueron llevadas a cabinas de invernadero hasta la obtención de semillas.

Selección de Transformantes

La selección de las semillas T1 transformadas con el vector pCHF3, se realizó sembrando las semillas en medio MS con kanamicina (50 µg/ml). Las plántulas resistentes al antibiótico se transplantaron a macetas, se cultivaron en invernadero en fotoperiodo de día largo y se recolectaron las correspondientes semillas T2. Se transplantaron al menos 10 plantas T2 resistentes a kanamicina por cada transformante

primario T1 y se identificaron líneas homocigotas sembrando las correspondientes semillas T3 en medio MS con kanamicina.

El vector pFP101 (Bensmihen *et al.* 2004), contiene como marcador la proteína GFP, cuya expresión está regulada por un promotor específico de semillas. Las semillas transformadas emiten fluorescencia verde y pueden seleccionarse mediante observación directa con lupa de las semillas iluminadas con luz adecuada, para su siembra directa en tierra. La misma selección se utilizó para identificar semillas T2, así como para la identificación de las líneas homocigotas mediante la observación de las semillas T3.

Identificación de Inserciones de T-DNA: Colección Alonso-Ecker

Esta colección (Alonso *et al.* 2003) está generada con la idea de originar una vasta colección de líneas que, debido a la inserción azarosa del T-DNA, pudiera contener inserciones sobre la casi totalidad de los genes presentes en el genoma de *Arabidopsis thaliana*.

Una vez generada esta colección, se puede rastrear en busca de inserciones en la región de interés. Existe un proyecto de identificación sistemática de la posición de cada una de las inserciones que dispone de una página web donde rastrear el genoma de *A. thaliana* (<http://signal.salk.edu/cgi-bin/tdnaexpress>). Actualmente casi la totalidad de las líneas -si no todas- están identificadas y no es necesario el rastreo directo de la colección, como el que realizamos nosotros.

La colección está dividida en grupos de 10.000 líneas, y cada uno de estos grupos está organizado en 4 subgrupos de 10 “pooles”. Diseñamos tres oligos para el gen *SPM* (Tabla 1: EGM005, EGM006 y EGM024), que se utilizaron en combinación con oligos específicos de los dos extremos del T-DNA. Para el rastreo se realiza una PCR sobre cada uno de los “pooles” de cada grupo utilizando todas las combinaciones posibles entre los dos oligos de cada gen y los oligos del T-DNA. La electroforesis con todas las PCRs de cada uno de los grupos se transfirieron a membrana de nylon (Amersham N+) y ésta fue hibridada con una sonda del gen correspondiente marcada con ³²P. Para identificar una inserción es necesario obtener un positivo en cada uno de los subgrupos (lo que proporciona un código de 4 números) y verificar el producto de la PCR mediante secuenciación. La identificación del punto de inserción se realizó secuenciando el producto de PCR obtenido con un oligo del gen y un oligo del T-DNA.

Tabla 1: Oligos utilizados en el rastreo de inserciones de T-DNA

Oligo	Secuencia	GEN
EGM005	AGTATACAGAGGCTGGAGCTGGGGA	<i>SPM</i>
EGM006	GCGCACAATACGTAGGAGCGGATCAGT	<i>SPM</i>
EGM024	CCCTGCATCCAATTAAGAACAAGATCCA	<i>SPM</i>

Esterilizado y Preparación de las Semillas de *Arabidopsis thaliana*

Para la siembra en tierra, las semillas necesarias fueron vertidas en un tubo de cultivo que contenía 12 ml de agua con agarosa al 0.05% y se agitó vigorosamente para repartir las semillas de forma homogénea. A continuación las semillas se vernalizaron durante 3-5 días a 4° C y en oscuridad, tras lo cual se procedió a su sembrado con micropipeta.

Para la siembra y cultivo *in vitro* se han utilizado indistintamente dos métodos para la esterilización de las semillas, que se describen a continuación. Tras la esterilización, las semillas se colocaron en el medio sólido o líquido deseado y se vernalizaron durante 3-5 días a 4° C y en oscuridad, tras lo cual se trasladaron a las cámaras de cultivo *in vitro*.

Esterilización mediante Tratamiento con Alcohol

Se colocan las semillas en un tubo "ependorf" de 1'5 ml (el máximo aconsejado por eppendorf corresponde al equivalente a un volumen de agua de 100 µl) y se añade 1 ml de etanol al 70% en agua y con SDS al 0,05%. Durante 3 min se lavan las semillas mediante inversiones continuas, tras lo cual se elimina el etanol con micropipeta. A continuación se añade 1 ml de etanol al 96% en agua y se repiten los lavados mediante inversiones durante 1 min, tras lo cual se recuperan las semillas con pipeta y se dejan secar sobre círculos de papel estériles en cabina de flujo.

Esterilización mediante Tratamiento en Atmósfera de Cloro.

Se colocan las semillas en un tubo "ependorf" de 1'5 ml (el máximo aconsejado por eppendorf corresponde al equivalente a un volumen de agua de 100 µl) y se colocan en un contenedor que pueda ser cerrado herméticamente, manteniendo los eppendorf abiertos. Se coloca dentro del contenedor un vaso de precipitados con 100 ml de lejía y se añaden 3 ml de ácido clorhídrico fumante. La reacción con la lejía es muy rápida por lo que el contenedor debe cerrarse con la mayor celeridad posible inmediatamente después de añadir el HCl. Las semillas se dejan en este ambiente esterilizador durante un mínimo de 5 h, no aconsejando prolongar el tiempo más allá de 8 h. A continuación se sacan los eppendorf y se dejan abiertos en cabina de flujo durante unos minutos antes de utilizar las semillas.

1.2- Levadura

Para los estudios de actividad enzimática se utilizaron dos cepas de *Saccharomyces cerevisiae* deficientes en la síntesis de espermidina o espermina (Tabla 2), así como el correspondiente parental silvestres como control.

Tabla 2: Cepas de levadura utilizadas

Genotipo	Fenotipo	Requerimientos	Bibliografía
<i>wt</i>	Silvestre	Hist, Ura, Leu	
<i>spe3</i>	Pérdida de función de la actividad SPDS.	His, Ura	(Hamasaki-Katagiri <i>et al.</i> 1997)
<i>spe4</i>	Pérdida de función de la actividad SPMS.	His, Ura	(Hamasaki-Katagiri <i>et al.</i> 1998)

Condiciones de Cultivo

El cultivo de levadura se realizó en medio YPD (1% p/v Extracto de levadura, 1% p/v Bactopeptona, 2% p/v Glucosa) o YNB (0'7% p/v YNB, 0'5% p/v sulfato de amonio, 2% p/v Glucosa), suplementado según los requerimientos de cada cepa, en agitadores orbitales (200 rpm) situados en cámaras termoreguladas a 28° C. Para el cultivo en líquido, se utilizaron matraces cónicos de 100 ó 250 ml. Para cultivo en sólido se añadió, al medio correspondiente, Agar al 2% p/v y se utilizaron placas Petri circulares.

Transformación de Levadura por Choque Térmico

Se utilizó el método descrito por Gietz *et al.* (Gietz *et al.* 1992) con algunas modificaciones. Se inoculó 25 ml de medio de cultivo con 10 µl de cultivo saturado de la cepa requerida y se creció durante aproximadamente 15 h hasta una densidad óptica de 1. El cultivo se dividió en dos tubos cónicos de 15 ml y se centrifugó 5 min a 3000 g. Se eliminó el sobrenadante y el sedimento se resuspendió en 15 ml de agua destilada estéril. Se realizó otra centrifugación con las mismas condiciones, se desechó el sobrenadante y se resuspendió de nuevo el sedimento en 15 ml de agua destilada estéril. Se centrifugó 3 ml (dos veces de 1'5 ml en eppendorfs de 1'5 ml) por cada transformación que se necesitase. Se eliminó el sobrenadante y se añadió 480 µl de PEG 50%, 72 µl de, 50 µl de DNA de simple cadena y 100 µl de agua conteniendo 1-2 ug de plásmido. Se centrifugó vigorosamente hasta una resuspensión completa y se incubó durante 30 min a 30° C. Para el choque térmico se incubó a 42° C durante 15 min (mezclando mediante inversiones cada 5 min). Se centrifugó para recuperar las células y, tras eliminar el sobrenadante, se resuspendieron en 300 µl de agua destilada estéril y se depositaron en placas de medio de cultivo mínimo con los requerimientos adecuados.

1.3 Cepas Bacterianas

Durante el transcurso de esta tesis se han utilizado diversas cepas de la bacteria *Escherichia coli* (TOP10, XL1Blue, DH5α) como vehículo de almacenamiento y producción de las diversas construcciones que han sido generadas y empleadas. En casi todos los casos la elección de una u otra cepa ha sido debida a razones de disponibilidad más que de objetivos y en todos los casos podría haber sido utilizada cualquier otra de las cepas disponibles.

Asimismo se ha utilizado también la bacteria *Agrobacterium tumefaciens* C58 para su utilización en la transformación de *A. thaliana*.

Condiciones de cultivo

Tanto el cultivo de *E. coli* como el de *A. tumefaciens* se realizó en medio LB (extracto de levadura 0.5% p/v, triptona 1% p/v, NaCl 1% p/v) suplementado, según el caso, con el antibiótico correspondiente. Para cultivos en líquido se utilizaron tubos de cultivo de 14 ml y se incubaron en cámara termoregulada a 37° C y en agitación continua (230 rpm). Para cultivo en medio sólido se añadió, al medio LB, agarosa al 1.5% p/v y se utilizaron placas Petri circulares. En los casos en los que era posible la selección por interrupción del gen β -Galactosidasa (LacZ) se añadió también IPTG (10 μ l por placa, 0.5 M) y X-Gal (40 μ l por placa; 20 mg/ml).

Transformación de Cepas Bacterianas

A lo largo de esta Tesis se ha utilizado tanto el método de transformación por choque térmico como el método de electroporación, dependiendo de las necesidades y las características del plásmido a transformar. El sistema por electroporación puede ser utilizado en todos los casos, mientras que el método por choque térmico pierde eficiencia con vectores de más de 10 Kb, resultando prácticamente inviable transformaciones con plásmidos superiores a 20 Kb. La electroporación es generalmente un método más eficiente, pero es muy sensible a la presencia de sales, a diferencia del método por choque térmico, por lo que en los casos en los que era preferible usar un volumen importante de la ligación y era preferible el uso de la electroporación, se eliminaron las sales mediante la utilización de membranas Millipore tipo VS (0.025 μ m) sobre glicerol al 30%. Se deposita toda la ligación sobre la membrana y se deja a temperatura ambiente durante 30 min. Después se recupera todo el volumen posible y se utiliza hasta un máximo de 4 μ l para electroporar. Pueden utilizarse volúmenes mayores sin peligro de perder la transformación, pero la eficiencia también disminuye notablemente.

2- MÉTODOS DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

2.1- Identificación y Cuantificación de Poliaminas

Para la identificación y cuantificación de poliaminas libres se utilizó el protocolo descrito por Carbonell y Navarro (Carbonell and Navarro 1989).

Extracción

En el caso de muestras de *A. thaliana*, el material fresco recogido para la cuantificación de poliaminas fue pesado y congelado en nitrógeno líquido. La muestra congelada fue homogeneizada en mortero y a continuación se adicionó 2 volúmenes (1 volumen = 1 ml por cada mg) de ácido perclórico 0'2M y 1 volumen de 1,6-diamina-hexano (HD) como patrón interno (126 µg/ml). Tras 15 min de centrifugación a 13000 rpm a 4° C, se recuperó todo el sobrenadante para su posterior dansilación. Las muestras no dansiladas inmediatamente fueron guardadas a -20° C.

En el caso de muestras de *S. cerevisiae*, el material fresco pesado fue el obtenido tras centrifugación a 5000 rpm durante 10 min y posterior eliminación completa del sobrenadante. El procesado posterior fue realizado siguiendo el mismo método indicado para las muestras de *A. thaliana*.

Dansilación

Para cada muestra se partió de 100 µl del sobrenadante, obtenido en la extracción, y se adicionó 200 µl de una solución saturada de Na₂CO₃ y 400 µl de una solución de cloruro de dansilo (10 mg/ml en acetona). La solución se mezcló mediante vórtex durante 1 min tras lo cual fue incubada en un baño a 60° C en oscuridad durante 1 h. Se adicionó 100 µl de una solución de L-prolina (100 mg/ml), se mezcló con vórtex durante 30 seg y se incubó nuevamente en baño a 60° C en oscuridad durante 30 min para eliminar el exceso de cloruro de dansilo. Los derivados dansilados se extrajeron con 1 ml de tolueno. La fase orgánica se secó en corriente de nitrógeno a 40° C y el residuo se resuspendió en 100 µl de acetonitrilo (grado HPLC, Romil). Antes de su análisis por HPLC, las muestras se filtraron a través de filtros Millex-HV de 0'45 µm (Millipore).

HPLC

Para el análisis por HPLC, se utilizó una columna de reparto en fase inversa de Hypersil ODS (C18, 200 x 4'6 mm, 5 µm de partícula, Tracer analítica, Teknokroma) equilibrada con acetonitrilo:agua al 60% v/v. Se inyectaron 30 µl de cada muestra derivatizada y filtrada. Los derivados dansilados se eluyeron en un gradiente de acetonitrilo:agua hasta 90% v/v en 30 min, manteniendo siempre un flujo de 1'5 ml/min impulsado por dos bombas Waters modelo 510. La columna se mantuvo a 36° C durante todo el análisis. Para la detección se utilizó un fluorímetro 420 (Waters) con filtros de

excitación y emisión de 365 y 425 nm, respectivamente. Todo el proceso cromatográfico estuvo controlado por el programa Millennium 2.10 (Waters). La cuantificación se realizó utilizando la HD como patrón interno.

Identificación y Cuantificación de ^{14}C -espermina

Se adicionó 5 μCi de ^{14}C -espermidina (Amershan) a 25 ml de cada uno de los cultivos de levadura utilizados (*spe4* transformado con pAN10-SPM) a una densidad de 7 mg/ml (peso fresco) y se recogió el cultivo a las 6 h. El procesamiento de las muestras se realizó siguiendo el método descrito en el apartado de identificación y cuantificación de poliaminas, con la modificación de que las muestras fueron pinchadas en el HPLC manualmente y se recogieron fracciones, tras pasar por la columna, con intervalos de 1 min. La radiactividad de cada una de estas muestras fue determinada en un contador de centelleo líquido.

2.2- Clonación de insertos en vectores plasmídicos

Digestiones

Las reacciones de digestión se realizaron en el tampón indicado por el fabricante de cada enzima de restricción utilizada, y el número de unidades requeridas (1u = cantidad de enzima requerida para digerir completamente 1 μg del DNA de Referencia indicado por cada fabricante) en cada caso se calculó utilizando la fórmula que se muestra a continuación:

$$\frac{\text{Kb DNA Ref}}{\text{Kb DNA Diana}} \times \frac{n^\circ \text{ cortes DNA Diana}}{n^\circ \text{ cortes DNA Ref}} \times \mu\text{g DNA Diana} = n^\circ \text{ unidades requeridas}$$

Purificación de bandas de DNA a partir de geles de agarosa

El DNA contenido en las bandas se purificó por medio del sistema de extracción de bandas QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN). En el caso de DNA con tamaño superior a 5 Kb se utilizó el QIAEX II Gel Extraction Kit (QIAGEN).

Ligaciones

Las reacciones de ligación se realizaron manteniendo una proporción molar entre inserto y vector de 3:1 en los casos de ligaciones sencillas; cuando la diferencia entre el tamaño del vector y el tamaño del inserto superaba las 8 veces se empleó una relación 5:1. En los casos de ligaciones dobles (vector más dos insertos) se mantuvo una proporción molar entre inserto 1, inserto 2 y vector de 6:6:1. La reacción contenía tampón de ligación 1X (Tris-HCl 20 mM, EDTA 1 mM, ditioeritritol 5 mM, KCl 60 mM, glicerol 50% v/v, pH 7.5, Roche Molecular Biochemicals) y 1 u de DNA ligasa del Fago T4 (Roche Molecular Biochemicals). Las reacciones de ligación de extremos

protuberantes se incubaron a 16° C durante 12 h. Las reacciones de ligación de extremos romos se incubaron a 4° C durante 16 h.

Rellenado de extremos cohesivos

El relleno de extremos cohesivos se realizó con 1 u del fragmento Klenow de la DNA polimerasa I (Roche Molecular Biochemicals), en presencia de dNTPs 1 mM. La reacción se incubó a temperatura ambiente durante 1 h, al cabo de la cual se inactivó la enzima mediante una incubación a 65° C durante 1h y posterior fenolización y precipitación con etanol.

Contrucciones generadas

Identificación de SPM en una genoteca vírica

El fragmento de PCR obtenido con los oligos JC001 y JC002 (Tabla3) se recuperó mediante el Kit QIAEX II (QIAGEN) para proceder a su secuenciación usando el oligo JC001. Una vez confirmado que se trataba de nuestro gen candidato, se utilizó este mismo fragmento como sonda para rastrear una genoteca vírica disponible en el laboratorio.

Tabla3: Oligos utilizados para la identificación de SPM en una genoteca vírica

Nombre	Secuencia
JC001	5'GTTTCTGGGTGGTTCGGA3'
JC002	5'CCTCAACAGAACTATGGCGAGA3'

Se utilizó 1 ml de cultivo saturado de la cepa XL1 Blue (*E. coli*) cultivado sobre 6 placas NCZYM (Life Science) en presencia de 7 µl de la genoteca. Una vez confirmada la presencia de calvas, se realizó una réplica en membrana (Hybond, Amershan) y se fijó mediante radiación UV. La hibridación con la sonda, marcada con dCTP-P³², permitió la identificación de dos positivos (denominados F1 y F2) y se procedió a la recuperación de las calvas correspondientes de las placas originales.

Se realizó la extracción de las partículas víricas de estas calvas y se sembraron de nuevo en un cultivo saturado de XL1 Blue en placas de cultivo NCZYM. Se realizó una réplica de cada placa mediante transferencia a membrana y se hibridaron con la misma sonda. Se seleccionaron dos calvas positivas para cada uno de los positivos originales y se procedió a su excisión mediante el protocolo ExAssist (Stratagene) que recirculariza el vector pBluescript KS+ con el inserto introducido en la región de policlonaje y se utiliza para transformar *E. coli*. Se seleccionaron 3 colonias para cada una de las contrucciones y se verificaron mediante digestión doble con XhoI/EcoRI y se seleccionó un clon positivo y verificado de cada uno de los clones originales para secuenciar, comprobando que ambos contenían cDNA con la pauta abierta de lectura completa, variando únicamente en la longitud de la secuencia 5'UTR.

Expresión en levadura

Para comprobar la actividad enzimática de la proteína SPM, el clon F2.a.2 fue digerido con EcoRI y XhoI para obtener un fragmento con la ORF completa de *SPM*. Los extremos protuberantes de cadena sencilla del fragmento purificado fueron convertidos en extremos romos con Klenow antes de ser ligado al vector pAN10, digerido con HindIII e igualmente romado, que permite expresar genes heterólogos en *S. cerevisiae* bajo el control del promotor constitutivo ADH1 (Navas *et al.* 1993).

Para comprobar la actividad enzimática de la proteína SPM de tomate (*Solanum lycopersicon*), la ORF completa a partir de cDNA de frutos de tomate se obtuvo utilizando el oligo SISPM1 y el oligo SISPM2 (Tabla 4), ambos con el sitio SalI introducido. El producto de PCR se introdujo en el vector pCR2.1 (Invitrogen) y transferido al vector de expresión en levadura pCM190 bajo el control del promotor CYC1 (Gari *et al.* 1997). La secuencia se comprobó por secuenciación en el vector pCR2.1.

El cDNA completo del clon #2 identificado en *Picea glauca* se obtuvo por petición a la base de datos del proyecto Arborea (www.arborea.ulaval.ca). Este clon fue amplificado utilizando los oligos Pg001 y Pg002 (Tabla 4), y el producto de PCR fue introducido en el vector pCR2.1 (Invitrogen) y transferido al vector de expresión en levadura pCM190 bajo el control del promotor CYC1 (Gari *et al.* 1997). La secuencia se comprobó por secuenciación en el vector pCR2.1.

Tabla 4: Oligos utilizados para amplificar la ORF completa de *SISPM* y de *PgSPD2*

Nombre	Secuencia
SISPM1	5'-GGGTCGACGGTTTGGACAGCCGGAGGAC-3'
SISPM2	5'-GGGTCGACTTGAGCTTACTCCAGCAGCA-3'
Pg001	5'-GCGTAATACGACTCACT-3'
Pg002	5'-CACTAAAGGGAACAAAAG-3'

Sobreexpresión de *SPM* en *Arabidopsis*

Para sobreexpresar *SPM* en *Arabidopsis* decidimos utilizar el vector pCHF3. Este vector tiene un promotor 35S a continuación del cual se sitúa el "polylinker". El fragmento que contenía el gen *SPM* se obtuvo del clon F2.a.2 por digestión con SacI y KpnI y ligado al vector tras purificar la banda aislada de gel de agarosa.

Expresión de *ACL5* regulada por *pRCH1*

Para expresar *ACL5* fuera de su dominio normal y comprobar si su función es, o no, autónoma, decidimos utilizar el promotor de *RCH1* específico de raíz (Casamitjana-Martinez *et al.* 2003). Este promotor en pBluescript nos fue cedido amablemente por la Dr. Eva Casamitjana. Se obtuvo un fragmento de 0'8 Kb mediante digestión con HindIII (presente en el promotor) y BamHI y ligado en el vector pFP101 digerido con HindIII y BamHI (lo que sustituyó el promotor 35S por el promotor de

RCH1). Este nuevo vector, pFP-pRCH1, fue digerido con Sall para introducir por ligación la ORF completa de *ACL5* obtenida por digestión Sall de un clon completo de cDNA aislado de una librería génica PRL1 (Newman *et al.* 1994), cedido amablemente por el Dr. Miguel A. Pérez.

2.3- Extracción de Ácidos Nucleicos

Extracción de RNA

La extracción de RNA total se llevó a cabo a partir de 100 mg de tejido, utilizando el sistema RNAeasy (QIAGEN), siguiendo las indicaciones del fabricante. La cuantificación del RNA se realizó en un espectrofotómetro Nanodrop (Thermo Scientific). Las muestras fueron almacenadas a -80°C hasta su utilización.

Extracción de DNA genómico

Las extracciones de DNA genómico para el análisis de plantas por PCR se realizaron a partir de hojas mediante el método descrito por Edwards *et al.* (Edwards *et al.* 1991). Un círculo de hoja de aproximadamente 1 cm de diámetro se trituró en un tubo con un émbolo durante medio minuto. Se añadió 400 μl de tampón de extracción (200 mM Tris-HCl pH 7.5, 250 mM NaCl, 25 mM EDTA, 0.5% SDS p/v). Se mezcló bien con el mismo émbolo utilizado en la homogeneización de la muestra (en este paso pueden dejarse las muestras a temperatura ambiente hasta 1h mientras se procesan otras muestras) y se centrifugó durante 1 min a 13000 rpm. Se transfirió 300 μl de sobrenadante a un nuevo tubo y se añadió 300 μl de isopropanol. Se mezcló mediante inversiones y se dejó a temperatura ambiente durante 2 min, antes de centrifugar durante 5 min a 13000 rpm. Se eliminó todo el sobrenadante y se dejó secar al aire. El sedimento se resuspendió en 100 μl de agua destilada.

Extracción de DNA plasmídico

La extracción de DNA plasmídico se realizó a partir de 1.5 ml ó 3 ml del cultivo correspondiente siguiendo el método descrito por Sambrook (Sambrook *et al.* 1989), o con el sistema Plasmid Mini Kit I (E.Z.N.A.), siguiendo las indicaciones del fabricante. La cuantificación se realizó en un espectrofotómetro Nanodrop o, por comparación con marcadores adecuados, en geles de agarosa.

2.4- Análisis Northern Blot

Muestras

Para el análisis northern de tejidos, semillas de Col-0 fueron sembradas en placas con MS y las plántulas cultivadas en cámaras de cultivo o en maceta en el

invernadero. Los diferentes tejidos utilizados fueron cortados y congelados en nitrógeno líquido para la posterior extracción de RNA.

Para el análisis northern tras el tratamiento con hormonas, semillas de Col-0 fueron sembradas en matraces de 250 ml con 50 ml de MS líquido (50-100 semillas/matraz) y las plántulas cultivadas en agitación en cámaras de cultivo de fotoperiodo de día largo durante 7 días. En el séptimo día, se adicionó el volumen adecuado de cada hormona (concentración final 50 μ M) y se recogió material (matraces independientes) justo antes del tratamiento, a las 2 h, a las 6 h y a las 24 h. El material fue congelado en nitrógeno líquido y guardado a -80° C hasta la extracción de RNA.

Electroforesis en geles de formaldehído-agarosa y transferencia a membrana

El RNA total se separó en geles de agarosa al 1'2% en tampón MSE 0'5X (MOPS 10 mM, acetato sódico 4 mM pH5'4, EDTA 5 mM) con 6'7% de formaldehído v/v. Las muestras (10-15 μ g de RNA total) se secaron primero en un evaporador centrífugo y se resuspendieron en 20 ml de tampón de carga 1X (formamida desionizada 50% v/v, MOPS 1X, formaldehído 6% v/v, glicerol 5'3% v/v, azul de bromofenol). Antes de cargarlas en el gel, las muestras se desnaturalizaron incubándolas a 65° C durante 10 min. La electroforesis se llevó a cabo a 100 V hasta que el colorante recorrió dos terceras partes del gel.

El RNA se transfirió por capilaridad desde el gel a membranas de nylon (Hybond N⁺, Amersham Pharmacia Biotech), utilizando tampón SSC 10X de acuerdo al protocolo de Sambrook et al. (Sambrook *et al.* 1989). El RNA se fijó a la membrana mediante irradiación ultravioleta (120 mJ/cm²) utilizando el sistema UV-Stratalinker (Stratagene).

Hibridación de membranas, lavados y detección de la señal

Las sondas radiactivas se obtuvieron mediante el marcaje de cDNA, mediante "random priming" con el sistema Ready to Go (Amersham Pharmacia Biotech) a partir de 50 ng de DNA y 50 μ Ci de α -[³²P]dCTP, de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Las sondas se purificaron para eliminar los nucleótidos no incorporados, usando columnas de cromatografía de exclusión molecular Sephadex G50 Quick Spin Columns (Roche Molecular Biochemicals), de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Las hibridaciones se realizaron en solución de hibridación descrita por Church y Gilbert (1984) (fosfato sódico 0'5M pH 7'2, SDS 7% p/v, EDTA 1 mM, BSA 1% p/v) a 65° C durante 16 h, tras lo cual se realizaron 2 lavados, de 5 y 15 min a 65° C con SSC2X, SDS 0'1% p/v y un lavado de 15 min con SSC 1X, SDS 0'1% p/v.

Las membranas fueron expuestas sobre películas HyperfilmMP (Amersham Pharmacia Biotech) a -80°C con pantallas intensificadoras 3M Trimax t16. Las autorradiografías se revelaron en una procesadora automática M-35-x-OMAT (Kodak).

Sondas

Las sondas que se utilizaron para la detección de cada uno de los genes analizados mediante Northern se obtuvieron por PCR utilizando los oligos T7 y T3. Para SPM se utilizó el clon F2.a.2 (descrito anteriormente). Para el resto de genes se utilizaron las construcciones con el cDNA correspondiente, de la colección PRL2 (Newman *et al.* 1994): 161H24T7 (ACL5), 180K7T7 (ADC1), 143F19T7 (ADC2), 202M15T7 (SPD1), 89I6T7 (SPS2), 295F11T7 (SAMDC).

2.5- Procesamiento de Tejidos para Microscopía

Muestras

Semillas de *Ler* fueron sembradas en tierra y las plántulas cultivadas en el invernadero en fotoperiodo de día largo. Se obtuvo material de tallo, inflorescencias, flores y frutos a partir de plantas de 5-6 semanas para su procesamiento según el protocolo descrito a continuación.

Fijación

Las muestras se fijaron, inmediatamente después de su recolección, en una solución de paraformaldehído (Sigma) al 4% p/v en tampón fosfato de sodio 0.1 M pH 7.2. Para favorecer la fijación, las muestras se sometieron a 2 pulsos de vacío, de 5 min cada uno, proporcionado por una bomba de membrana, cambiando la solución de fijación en cada pulso. La fijación se prolongó durante 16 h a 4°C con solución de fijación fresca. A continuación se realizaron 2 lavados, de 5 min cada uno, en tampón fosfato de sodio 0.1 M pH 7.2, a temperatura ambiente. Seguidamente, las muestras se deshidrataron en soluciones con concentraciones crecientes de etanol del 15%, 30% y 50%, durante 30 min en cada concentración, hasta llegar al 70%, donde se mantuvieron a 4°C hasta su utilización.

Inclusión en Parafina

Las muestras vegetales sumergidas en etanol 70% se deshidrataron en etanol en concentraciones crecientes de 80%, 96%, durante 30 min cada concentración, hasta llegar a etanol absoluto, donde se dejaron durante 12 h a 4°C . La inclusión se realizó mediante series dobles de etanol absoluto, etanol absoluto:Histoclear (1:1), Histoclear (Histological clearing agent, National Diagnostic) durante 1 h cada paso, hasta llegar a Histoclear:parafina (1:1), donde se dejaron durante 12 h a 58°C , después en parafina pura (Paraplast embedding media, Sigma), donde se mantuvieron a 58°C durante 2 días, realizando 2 cambios de parafina por día. Para la formación de los bloques, las muestras

resuspendidas en parafina líquida se vertieron en moldes metálicos donde se mantuvieron a 4° C durante un mínimo de 24 h hasta su utilización.

Cortes histológicos

Las muestras incluidas en parafina se seccionaron en un microtomo rotatorio (MicromHM330) a un espesor de 8-10 µm. Las secciones se colocaron en un baño a 42° C y se montaron sobre portaobjetos previamente tratados con TESPA (3-aminopropil-trietoxilano, Sigma) como agente adherente (Rendrop et al, 1986). Dichos portaobjetos conteniendo las secciones se secaron sobre una placa térmica a 40° C durante 16h. Se realizó una selección de los cortes a utilizar mediante su observación en un microscopio óptico, asegurándose que el tejido no estuviera dañado y que representara la zona de interés en cada caso.

Hibridación “*in situ*” de mRNA

Obtención de las Ribosondas

Se sintetizaron dos ribosondas monocatenarias en direcciones sentido y antisentido, a partir del cDNA de *ACL5* (clon 161H24T7; colección PRL2) (Newman *et al.* 1994). La transcripción de la sonda en antisentido (utilizando la RNA polimerasa SP6 y la enzima de restricción EcoRI) generó una molécula de RNA complementaria al mRNA celular, mientras que la sonda en sentido (utilizando la RNA polimerasa T7 y la enzima de restricción XbaI) produjo una molécula idéntica a éste, que se utilizó como control negativo con el objeto de identificar hibridaciones inespecíficas. Las ribosondas se marcaron mediante transcripción *in vitro* incorporando un ribonucleótido UTP conjugado a una molécula de digoxigenina, a partir de 2 µg de plásmido linearizado. La transcripción se realizó a 37° C durante 90 min y a continuación se eliminó el DNA molde por tratamiento con 2 u de DNAsI (Roche Molecular Biochemicals) durante 15 min a 37° C.

Las sondas se sometieron a una hidrólisis alcalina por incubación a 60° C, durante un tiempo calculado según la longitud inicial de la ribsonda producida, de acuerdo con la siguiente fórmula [T = tiempo de hidrólisis; L₀ = longitud inicial de la sonda; L_f = longitud final deseada de la sonda (usualmente 150 pb); y K es la constante 0.11 cortes/kb-min (Fisher and Williams 1979)]:

$$T = \frac{L_0 - L_f}{K \cdot L_0 \cdot L_f}$$

La eficiencia de la síntesis de las ribosondas se comprobó en un análisis “dot blot” (Sambrook *et al.* 1989) mediante comparación con un control de RNA de concentración conocida.

Hibridación “*in situ*”

Las secciones se desparafinaron 2 veces en xilol durante 10 min cada vez. A continuación se hidrataron comenzando con 2 lavados de etanol absoluto de 1 min cada uno, continuando con etanol 95%, etanol 85% con NaCl 8'5 g/L, etanol 50% con NaCl 8'5 g/L y etanol 30% con NaCl 8'5 g/L durante 30 seg cada uno, hasta llegar a un último lavado de 2 min con NaCl 8'5 g/L. Seguidamente las secciones fueron tratadas primero con HCl 0'2 M y luego con proteinasa K en tampón Tris-HCl 20 mM, CaCl₂ 2 mM pH 8'0, con el propósito de permeabilizar el tejido e incrementar así la accesibilidad de la sonda.

Tras esto, las secciones se sometieron a una acetilación con anhídrido acético 0'5% en trietanolamina 100 mM pH 8'0 durante 10 min, con el objeto de reducir uniones inespecíficas de la sonda. Posteriormente las secciones se deshidrataron en soluciones crecientes de etanol (30%, 50% y 85%) hasta llegar a etanol absoluto y finalmente se secaron en campana de extracción de gases.

La cantidad de sonda necesaria para una concentración final de 0'6 µg/ml en formamida desionizada al 50% (v/v) se desnaturalizó a 80° C durante 2 min, tras lo cual se añadieron 4 volúmenes de tampón de hibridación (Tampón salino 1X (Tris-HCl 10 mM pH 6'8, NaCl 0'3M, Na₃PO₄ 10 mM, EDTA 5 mM), formamida desionizada 50% (v/v), tRNA 1 mg/ml, Denhart's 10X y sulfato de dextrano 10%). Se depositaron 60 µl de la solución de hibridación sobre cada muestra en el portaobjetos, tras lo cual se colocó un cubreobjetos. La hibridación se realizó a 50° C durante 16 h en cámara húmeda con SSC 1X y formamida 50% (v/v).

Lavados e inmunodetección

Se realizaron 3 lavados con SSC 2X, formamida 50% a 50° C durante 30, 90 y 60 min respectivamente. Entre el segundo y el tercer lavado las secciones fueron tratadas con 20 µg/ml de RNAsa A (Roche Molecular Biochemicals) en NTE (TrisHCl 10 mM pH 7'5, NaCl 1 M, EDTA 1 mM) durante 30 min. Previo a la inmunolocalización, las secciones se trataron con agente bloqueante (Blocking agent, Amersham) en TBS 1X (Tris-HCl 100 mM pH 7'5, NaCl 400 mM) durante 1 h. A continuación se realizó un lavado de 30 min con BSA 1%, Tritón X-100 0'3%. La localización inmunológica se realizó con un anticuerpo anti-DIG conjugado a fosfatasa alcalina (Roche Molecular Biochemicals), diluido 1:3000 en TBS 1X, BSA 1%, Tritón X-100 0'3% durante 90 min. Tras esto se realizaron tres lavados de 20 min cada uno con BSA 1%, Tritón X-100 0'3% y un último lavado con TBS 1X de 5 min. La actividad fosfatasa se detectó utilizando sustratos NBT 125 µg/ml y BCIP 75 µg/ml en tampón de detección 1X (Tris-HCl 0'1 M pH 9'5, NaCl 0'1 M, MgCl₂ 50 mM). La reacción se incubó en oscuridad durante 24 h a temperatura ambiente, o hasta que la señal de hibridación fue visible. La reacción se detuvo mediante un lavado con agua destilada y los cortes se secaron al aire. Para la observación al microscopio, los cortes se cubrieron con medio de montaje (Agar Scientific) y un cubreobjeto.

3- ANÁLISIS FILOGENÉTICO

Rastreo de Secuencias

Se rastrearon de forma iterativa diversas bases de datos disponibles por internet (NCBI[www.ncbi.nlm.nih.gov];TIGR[www.tigr.org];MGI[www.noble.org/medicago/index.html];JGI[www.jgi.doe.gov]) utilizando las secuencias de aminoácidos de las proteínas ACL5 (GI:18419941), SPMS (GI:23397200), SPDS 1 y 2 (GI:30688573 y GI:30698029) de *A. thaliana*, SPE4 (GI:6323175) de *S. cerevisiae*, SPD (GI:1786312) de *E. coli* y SPM (GI:21264340) de *H. sapiens*. Cuando no se obtenía una secuencia completa, se buscaba secuencias de ESTs a partir de las cuales reconstruir una ORF completa. Se obtuvieron un total de 127 secuencias procedentes de todos los Reinos (datos suplementarios). Se recopilaron también secuencias incompletas que se utilizaron en el análisis de la aparición de *ACL5* y *SPM* en Plantas.

Análisis de Secuencias

Las secuencias de aminoácidos en formato FASTA fueron analizadas con el programa CLANS (Frickey and Lupas 2004) con los parámetros definidos por defecto y con un valor de corte para las interacciones de $1.0 \cdot 10^{-50}$ y aplicando una secuencia de 110 rondas.

Para los análisis filogenéticos, el alineamiento de las secuencias de aminoácidos se generó utilizando el programa CLUSTALX utilizando los parámetros definidos por defecto (Thompson *et al.* 1997).

El programa ProtTest (Abascal *et al.* 2005) se utilizó para evaluar los mejores modelos de sustitución de aminoácidos para su posterior uso en el cálculo de distancias. El modelo WAG fue el mejor en todos los análisis, seguido por Blosum62 y JTT. Todos ellos fueron utilizados en los siguientes análisis.

El alineamiento obtenido con CLUSTALX fue procesado con el programa Gblock para eliminar los sitios menos significativos, utilizando los parámetros en la conformación menos restrictiva.

El alineamiento fue analizado mediante el paquete de programas PHYLIP (versión 3.66) (Felsenstein 2005). Se generaron 500 réplicas del alineamiento utilizando el programa Bootstrap (PHYLIP) y se utilizó el programa ProtDist (PHYLIP) para el cálculo de distancias, obteniendo finalmente el árbol consenso con el programa Consense (PHYLIP). Para el análisis por máxima verosimilitud se utilizó el programa *phyml* (version 2.4.4) (Guindon and Gascuel 2003). La visualización final y manipulación de los árboles obtenidos en cada caso se realizó con el programa TreeView (Page 1996).

Modelización y análisis estructural

La estructura tridimensional de la PMT de *Nicotiana tabacum* (GI:6093754) fue generada utilizando el servidor MODWEB (<http://salilab.org/modweb>) (Pieper *et al.* 2004)). La PMT modelada y la estructura de la SPDS de *H. sapiens* (PDB “accession code” 2O0L) se superpusieron utilizando el programa LSQKAB del paquete CCP4 (CCP4 1994). La molécula de AdoMet en el centro activo de la PMT fue generada utilizando como molde la molécula del dcAdoMet de la estructura de la SPDS. Para mejorar la modelización del complejo AdoMet-PMT se aplicó dinámicas de ángulos de torsión y minimización de energía con el programa CNS (Brunger *et al.* 1998). La calidad del modelo final fue evaluada utilizando el paquete de programas PROCHECK (Morris *et al.* 1992).

Para evaluar los sitios de unión de las poliaminas en las proteínas SPDS, SPMS y TSPMS, se superpusieron las estructuras de la TSPMS de *Thermus thermophilus* (PDB “accession code”: 1UIR) y las SPDS y SPMS de *H. sapiens* cristalizadas en presencia de putrescina o espermidina (PDB “accession codes”: 2O06 and 2QFM), respectivamente, utilizando el programa LSQKAB. El análisis de las interacciones de las poliaminas en los diferentes centros activos se realizó con el paquete CCP4 y visualizado con el programa gráfico COOT (Emsley and Cowtan 2004). La representación estructural se llevó a cabo con el programa PYMOL (DeLano).

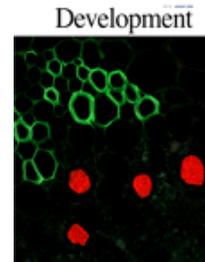
Parte del trabajo presente en esta Tesis está incluido en las siguientes publicaciones:

Mireia Panicot, Eugenio G. Minguet, Alejandro Ferrando, Miguel A. Blázquez, Juan Carbonell, Teresa Altabella, Csaba Koncz y Antonio F. Tiburcio. “A Polyamine Metabolon Complex of Aminopropyl Transferases in *Arabidopsis*”. *The Plant Cell*, 14 (Octubre 2002): 2539-2551.

Luis Muñiz*, Eugenio G. Minguet*, Sunil Kumar Singh*, Edouard Pesquet, Francisco Vera-Sirera, Charleen Courtois-Moreau, Juan Carbonell, Miguel A. Blázquez, Hannele Tuominen. “*ACAULIS 5* controls *Arabidopsis* xylem specification through the prevention of premature cell death”. *Development*, 135(15): 2573-2582.

Portada de la Revista.

*** Estos autores han contribuido por igual.**



Eugenio G. Minguet, Francisco Vera-Sirera, Alberto Marina, Juan Carbonell, Miguel A. Blázquez. “Evolutionary diversification in polyamine biosynthesis”. *Molecular Biology and Evolution*.
doi: 10.1093/molbev/msn161.

BIBLIOGRAFÍA

- Abascal, F, Zardoya, R and Posada, D** (2005). "ProtTest: selection of best-fit models of protein evolution." *Bioinformatics* **21**(9): 2104-5.
- Akamatsu, T, Hanzawa, Y, Ohtake, Y, Takahashi, T, Nishitani, K and Komeda, Y** (1999). "Expression of endoxyloglucan transferase genes in acaulis mutants of *Arabidopsis*." *Plant Physiol* **121**(3): 715-22.
- Alcazar, R, Cuevas, JC, Patron, M, Altabella, T and Tiburcio, AF** (2006). "Abscisic acid modulates polyamine metabolism under water stress in *Arabidopsis thaliana*." *Physiol Plant* **128**: 448-455.
- Alcazar, R, Marco, F, Cuevas, JC, Patron, M, Ferrando, A, Carrasco, P, Tiburcio, AF and Altabella, T** (2006). "Involvement of polyamines in plant response to abiotic stress." *Biotechnol Lett* **28**(23): 1867-76.
- Alonso, JM, Stepanova, AN, Leisse, TJ, Kim, CJ, Chen, H, Shinn, P, Stevenson, DK, Zimmerman, J, Barajas, P, Cheuk, R, Gadriab, C, Heller, C, Jeske, A, Koesema, E, Meyers, CC, Parker, H, Prednis, L, Ansari, Y, Choy, N, Deen, H, Geralt, M, Hazari, N, Hom, E, Karnes, M, Mulholland, C, Ndubaku, R, Schmidt, I, Guzman, P, Aguilar-Henonin, L, Schmid, M, Weigel, D, Carter, DE, Marchand, T, Risseuw, E, Brogden, D, Zeko, A, Crosby, WL, Berry, CC and Ecker, JR** (2003). "Genome-wide insertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*." *Science* **301**(5633): 653-7.
- Bachrach, U** (2004). "Polyamines and cancer: minireview article." *Amino Acids* **26**(4): 307-9.
- Bais, HP and Ravishankar, GA** (2002). "Role of polyamines in the ontogeny of plants and their biotechnological applications." *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **69**: 1-34.
- Bensmihen, S, To, A, Lambert, G, Kroj, T, Giraudat, J and Parcy, F** (2004). "Analysis of an activated ABI5 allele using a new selection method for transgenic *Arabidopsis* seeds." *FEBS Lett* **561**(1-3): 127-31.
- Brunger, AT, Adams, PD, Clore, GM, DeLano, WL, Gros, P, Grosse-Kunstleve, RW, Jiang, JS, Kuszewski, J, Nilges, M, Pannu, NS, Read, RJ, Rice, LM, Simonson, T and Warren, GL** (1998). "Crystallography & NMR system: A new software suite for macromolecular structure determination." *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **54**(Pt 5): 905-21.
- Cacciapuoti, G, Porcelli, M, Moretti, MA, Sorrentino, F, Concilio, L, Zappia, V, Liu, ZJ, Tempel, W, Schubot, F, Rose, JP, Wang, BC, Brereton, PS, Jenney, FE and Adams, MW** (2007). "The first agmatine/cadaverine aminopropyl transferase: biochemical and structural characterization of an enzyme involved in polyamine biosynthesis in the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*." *J Bacteriol* **189**(16): 6057-67.
- Caño-Delgado, A, Yin, Y, Yu, C, Vafeados, D, Mora-Garcia, S, Cheng, JC, Nam, KH, Li, J and Chory, J** (2004). "BRL1 and BRL3 are novel brassinosteroid receptors that function in vascular differentiation in *Arabidopsis*." *Development* **131**(21): 5341-51.

- Carbonell, J and Navarro, JL** (1989). "Correlation of spermine levels with ovary senescence and with fruit set and development in *Pisum sativum* L." *Planta* **178**: 482-487.
- Casamitjana-Martinez, E, Hofhuis, HF, Xu, J, Liu, C-M, Heidstra, R and Scheres, B** (2003). "Root-Specific CLE19 Overexpression and the *sol1/2* Suppressors Implicate a CLV-like Pathway in the Control of Arabidopsis Root Meristem Maintenance." *Current Biology* **13**(16): 1435-1441.
- CCP4** (1994). "The CCP4 suite: programs for protein crystallography." *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **50**(Pt 5): 760-3.
- Ciccarelli, FD and Bork, P** (2005). "The WHY domain mediates the response to desiccation in plants and bacteria." *Bioinformatics* **21**(8): 1304-7.
- Clough, SJ and Bent, AF** (1998). "Floral dip: a simplified method for Agrobacterium-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*." *Plant J* **16**(6): 735-43.
- Crane, P, Friis, E and Pedersen, K** (2002). "The origin and early diversification of angiosperms." *Nature* **374**: 27-33.
- Chattopadhyay, MK, Tabor, CW and Tabor, H** (2002). "Absolute requirement of spermidine for growth and cell cycle progression of fission yeast (*Schizosaccharomyces pombe*)." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(16): 10330-4.
- Chattopadhyay, MK, Tabor, CW and 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 U S A* **100**(24): 13869-74.
- Christmann, A, Moes, D, Himmelbach, A, Yang, Y, Tang, Y and Grill, E** (2006). "Integration of abscisic acid signalling into plant responses." *Plant Biol (Stuttg)* **8**(3): 314-25.
- DeLano, WL** "The PyMOL molecular graphics system. [<http://www.pymol.org>]."
- Dudley, HW, Rosenheim, MC and Rosenheim, O** (1924). "The Chemical Constitution of Spermine. I. The Isolation of Spermine from Animal Tissues, and the Preparation of its Salts." *Biochem J* **18**(6): 1263-72.
- Dudley, HW, Rosenheim, O and Starling, WW** (1926). "The Chemical Constitution of Spermine: Structure and Synthesis." *Biochem J* **20**(5): 1082-94.
- Dudley, HW, Rosenheim, O and Starling, WW** (1927). "The Constitution and Synthesis of Spermidine, a Newly Discovered Base Isolated from Animal Tissues." *Biochem J* **21**(1): 97-103.
- Edwards, K, Johnstone, C and Thompson, C** (1991). "A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis." *Nucleic Acids Res* **19**(6): 1349.
- Emsley, P and Cowtan, K** (2004). "Coot: model-building tools for molecular graphics." *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **60**(Pt 12 Pt 1): 2126-32.
- Esau, K.** (1977). *Anatomy of seed plants*, 2nd Edition. Eds. John Wiley & Sons, NY.
- Evans, LT and Malmberg, RL** (1989). "Do polyamines have roles in plant development?" *Annu Rev Plant Biol* **40**(235-269).
- Felsenstein, J** (2005). "PHYLYP (Phylogeny Inference Package) version 3.6. Distributed by the author. Department of Genome Sciences, University of Washington, Seattle, USA."

- Fisher, HW and Williams, RC** (1979). "Electron microscopic visualization of nucleic acids and of their complexes with proteins." *Annu Rev Biochem* **48**: 649-79.
- Force, A, Lynch, M, Pickett, FB, Amores, A, Yan, YL and Postlethwait, J** (1999). "Preservation of duplicate genes by complementary, degenerative mutations." *Genetics* **151**(4): 1531-45.
- Frickey, T and Lupas, A** (2004). "CLANS: a Java application for visualizing protein families based on pairwise similarity." *Bioinformatics* **20**(18): 3702-4.
- Fukuda, H** (2004). "Signals that control plant vascular cell differentiation." *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**(5): 379-91.
- Fukuda, H, Ito, M, Sugiyama, M and Komamine, A** (1994). "Mechanisms of the proliferation and differentiation of plant cells in cell culture systems." *Int J Dev Biol* **38**(2): 287-99.
- Fukuda, H and Komamine, A** (1980). "Establishment of an Experimental System for the Study of Tracheary Element Differentiation from Single Cells Isolated from the Mesophyll of *Zinnia elegans*." *Plant Physiol* **65**(1): 57-60.
- Gälweiler, L, Guan, C, Müller, A, Wisman, E, Mendgen, K, Yephremov, A and Palme, K** (1998). "Regulation of polar auxin transport by AtPIN1 in Arabidopsis vascular tissue." *Science* **282**(5397): 2226-30.
- Gancedo, C and Flores, CL** (2008). "Moonlighting proteins in yeasts." *Microbiol Mol Biol Rev* **72**(1): 197-210, table of contents.
- Gari, E, Piedrafito, L, Aldea, M and Herrero, E** (1997). "A set of vectors with a tetracycline-regulatable promoter system for modulated gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*." *Yeast* **13**(9): 837-48.
- Ge, C, Cui, X, Wang, Y, Hu, Y, Fu, Z, Zhang, D, Cheng, Z and Li, J** (2006). "BUD2, encoding an S-adenosylmethionine decarboxylase, is required for Arabidopsis growth and development." *Cell Res* **16**(5): 446-56.
- Gietz, D, St Jean, A, Woods, RA and Schiestl, RH** (1992). "Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells." *Nucleic Acids Res* **20**(6): 1425.
- Giraudat, J, Parcy, F, Bertauche, N, Gosti, F, Leung, J, Morris, PC, Bouvier-Durand, M and Vartanian, N** (1994). "Current advances in abscisic acid action and signalling." *Plant Mol Biol* **26**(5): 1557-77.
- Groppa, MD and Benavides, MP** (2007). "Polyamines and abiotic stress: recent advances." *Amino Acids*.
- Guindon, S and Gascuel, O** (2003). "A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood." *Syst Biol* **52**(5): 696-704.
- Hamana, K, Matsuzaki, S, Niitsu, M and Samejima, K** (1994). "Distribution of unusual polyamines in aquatic plants and gramineous seeds." *Can J Bot* **72**: 1114-1120.
- Hamana, K, Niitsu, M, Samejima, K and Itoh, T** (2001). "Polyamines of the thermophilic eubacteria belonging to the genera *Thermosiphon*, *Thermaerobacter* and *Caldicellulosiruptor*." *Microbios* **104**(409): 177-85.
- Hamana, K, Niitsu, M, Samejima, K and Matsuzaki, S** (1991). "Polyamine distributions in thermophilic eubacteria belonging to *Thermus* and *Acidothermus*." *J Biochem (Tokyo)* **109**(3): 444-9.

- Hamasaki-Katagiri, N, Katagiri, Y, Tabor, CW and Tabor, H** (1998). "Spermine is not essential for growth of *Saccharomyces cerevisiae*: identification of the SPE4 gene (spermine synthase) and characterization of a spe4 deletion mutant." *Gene* **210**(2): 195-201.
- Hamasaki-Katagiri, N, Tabor, CW and Tabor, H** (1997). "Spermidine biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*: polyamine requirement of a null mutant of the SPE3 gene (spermidine synthase)." *Gene* **187**(1): 35-43.
- Hanzawa, Y, Imai, A, Michael, AJ, Komeda, Y and Takahashi, T** (2002). "Characterization of the spermidine synthase-related gene family in *Arabidopsis thaliana*." *FEBS Lett* **527**(1-3): 176-80.
- Hanzawa, Y, Takahashi, T and Komeda, Y** (1997). "ACL5: an *Arabidopsis* gene required for internodal elongation after flowering." *Plant J* **12**(4): 863-74.
- Hanzawa, Y, Takahashi, T, Michael, AJ, Burtin, D, Long, D, Pineiro, M, Coupland, G and Komeda, Y** (2000). "ACAULIS5, an *Arabidopsis* gene required for stem elongation, encodes a spermine synthase." *Embo J* **19**(16): 4248-56.
- Hardtke, CS and Berleth, T** (1998). "The *Arabidopsis* gene MONOPTEROS encodes a transcription factor mediating embryo axis formation and vascular development." *Embo J* **17**(5): 1405-11.
- He, X and Zhang, J** (2005). "Rapid subfunctionalization accompanied by prolonged and substantial neofunctionalization in duplicate gene evolution." *Genetics* **169**(2): 1157-64.
- Hobbie, L, McGovern, M, Hurwitz, LR, Pierro, A, Liu, NY, Bandyopadhyay, A and Estelle, M** (2000). "The axr6 mutants of *Arabidopsis thaliana* define a gene involved in auxin response and early development." *Development* **127**(1): 23-32.
- Illingworth, C, Mayer, MJ, Elliott, K, Hanfrey, C, Walton, NJ and Michael, AJ** (2003). "The diverse bacterial origins of the *Arabidopsis* polyamine biosynthetic pathway." *FEBS Lett* **549**(1-3): 26-30.
- Imai, A, Akiyama, T, Kato, T, Sato, S, Tabata, S, Yamamoto, KT and Takahashi, T** (2004). "Spermine is not essential for survival of *Arabidopsis*." *FEBS Lett* **556**(1-3): 148-52.
- Imai, A, Hanzawa, Y, Komura, M, Yamamoto, KT, Komeda, Y and Takahashi, T** (2006). "The dwarf phenotype of the *Arabidopsis* acl5 mutant is suppressed by a mutation in an upstream ORF of a bHLH gene." *Development* **133**(18): 3575-85.
- Keeling, PJ and Palmer, JD** (2001). "Lateral transfer at the gene and subgenomic levels in the evolution of eukaryotic enolase." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(19): 10745-50.
- Kitashiba, H, Hao, YJ, Honda, C and Moriguchi, T** (2005). "Two types of spermine synthase gene: MdACL5 and MdSPMS are differentially involved in apple fruit development and cell growth." *Gene* **361**: 101-11.
- Knott, JM, Romer, P and Sumper, M** (2007). "Putative spermine synthases from *Thalassiosira pseudonana* and *Arabidopsis thaliana* synthesize thermospermine rather than spermine." *FEBS Lett* **581**(16): 3081-3086.
- Koizumi, K, Sugiyama, M and Fukuda, H** (2000). "A series of novel mutants of *Arabidopsis thaliana* that are defective in the formation of continuous vascular

- network: calling the auxin signal flow canalization hypothesis into question." *Development* **127**(15): 3197-204.
- Korolev, S, Ikeguchi, Y, Skarina, T, Beasley, S, Arrowsmith, C, Edwards, A, Joachimiak, A, Pegg, AE and Savchenko, A** (2002). "The crystal structure of spermidine synthase with a multisubstrate adduct inhibitor." *Nat Struct Biol* **9**(1): 27-31.
- Kroger, N, Deutzmann, R, Bergsdorf, C and Sumper, M** (2000). "Species-specific polyamines from diatoms control silica morphology." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(26): 14133-8.
- Kumar, A, Taylor, MA, Arif, SAM and Davies, HV** (1996). "Potato plants expressing antisense and sense S-adenosylmethionine decarboxylase (SAMDC) transgenes show altered levels of polyamines and ethylene: antisense plants display abnormal phenotypes." *The Plant Journal* **9**(2): 147-158.
- Kusano, T, Berberich, T, Tateda, C, Takahashi, Y** (2008). "Polyamines: essential factors for growth and survival." *Planta* DOI 10.1007/s00425-008-0772-7.
- Levy, CC, Mitch, WE and Schmukler, M** (1973). "Effect of polyamines on a ribonuclease which hydrolyzes ribonucleic acid at uridylic acid residues." *J Biol Chem* **248**(16): 5712-9.
- Lynch, M, O'Hely, M, Walsh, B and Force, A** (2001). "The probability of preservation of a newly arisen gene duplicate." *Genetics* **159**(4): 1789-804.
- MacRae, M, Kramer, DL and Coffino, P** (1998). "Developmental effect of polyamine depletion in *Caenorhabditis elegans*." *Biochem J* **333** (Pt 2): 309-15.
- Mahonen, AP, Bishopp, A, Higuchi, M, Nieminen, KM, Kinoshita, K, Tormakangas, K, Ikeda, Y, Oka, A, Kakimoto, T and Helariutta, Y** (2006). "Cytokinin signaling and its inhibitor AHP6 regulate cell fate during vascular development." *Science* **311**(5757): 94-8.
- Mahonen, AP, Bonke, M, Kauppinen, L, Riikonen, M, Benfey, PN and Helariutta, Y** (2000). "A novel two-component hybrid molecule regulates vascular morphogenesis of the *Arabidopsis* root." *Genes Dev* **14**(23): 2938-43.
- Malmberg, RL, Watson, MB, Galloway, GL and Yu, W** (1998). "Molecular Genetic Analyses of Plant Polyamines." *Critical Reviews in Plant Sciences* **17**(2): 199 - 224.
- Mayer, MJ and Michael, AJ** (2003). "Polyamine homeostasis in transgenic plants overexpressing ornithine decarboxylase includes ornithine limitation." *Journal of Biochemistry* **134**(5): 765-772.
- Mea, MD, Serafini-Fracassini, D and Duca, SD** (2007). "Programmed cell death: similarities and differences in animals and plants. A flower paradigm." *Amino Acids* **33**(2): 395-404.
- Moinard, C, Cynober, L and de Bandt, JP** (2005). "Polyamines: metabolism and implications in human diseases." *Clin Nutr* **24**(2): 184-97.
- Møller, SG and McPherson, MJ** (1998). "Developmental expression and biochemical analysis of the *Arabidopsis* *atao1* gene encoding an H₂O₂-generating diamine oxidase." *Plant J* **13**(6): 781-91.
- Morris, AL, MacArthur, MW, Hutchinson, EG and Thornton, JM** (1992). "Stereochemical quality of protein structure coordinates." *Proteins* **12**(4): 345-64.

- Murashige, T and Skoog, F** (1962). "A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures." *Physiol Plant* **15**: 473-479.
- Navas, MA, Cerdan, S and Gancedo, JM** (1993). "Futile cycles in *Saccharomyces cerevisiae* strains expressing the gluconeogenic enzymes during growth on glucose." *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(4): 1290-4.
- Newman, T, de Bruijn, FJ, Green, P, Keegstra, K, Kende, H, McIntosh, L, Ohlrogge, J, Raikhel, N, Somerville, S, Thomashow, M and et al.** (1994). "Genes galore: a summary of methods for accessing results from large-scale partial sequencing of anonymous *Arabidopsis* cDNA clones." *Plant Physiol* **106**(4): 1241-55.
- Nilsson, O, Wu, E, Wolfe, DS and Weigel, D** (1998). "Genetic ablation of flowers in transgenic *Arabidopsis*." *Plant J* **15**(6): 799-804.
- Ohno, S** (1970). *Evolution by gene duplication*. New York, Springer-Verlag.
- Ohnuma, M, Terui, Y, Tamakoshi, M, Mitome, H, Niitsu, M, Samejima, K, Kawashima, E and Oshima, T** (2005). "N1-aminopropylagmatine, a new polyamine produced as a key intermediate in polyamine biosynthesis of an extreme thermophile, *Thermus thermophilus*." *J Biol Chem* **280**(34): 30073-82.
- Oshima, T** (1979). "A new polyamine, thermospermine, 1,12-diamino-4,8-diazadodecane, from an extreme thermophile." *J Biol Chem* **254**(18): 8720-2.
- Page, RD** (1996). "TreeView: an application to display phylogenetic trees on personal computers." *Comput Appl Biosci* **12**(4): 357-8.
- Pandey, S, Ranade, SA, Nagar, PK and Kumar, N** (2000). "Role of polyamines and ethylene as modulators of plant senescence." *J Biosci* **25**(3): 291-9.
- Panicot, M, Minguet, EG, Ferrando, A, Alcazar, R, Blazquez, MA, Carbonell, J, Altabella, T, Koncz, C and Tiburcio, AF** (2002). "A polyamine metabolon involving aminopropyl transferase complexes in *Arabidopsis*." *Plant Cell* **14**(10): 2539-51.
- Park, MH** (2006). "The post-translational synthesis of a polyamine-derived amino acid, hypusine, in the eukaryotic translation initiation factor 5A (eIF5A)." *J Biochem* **139**(2): 161-9.
- Parker, G, Schofield, R, Sundberg, B and Turner, S** (2003). "Isolation of COV1, a gene involved in the regulation of vascular patterning in the stem of *Arabidopsis*." *Development* **130**(10): 2139-48.
- Pieper, U, Eswar, N, Braberg, H, Madhusudhan, MS, Davis, FP, Stuart, AC, Mirkovic, N, Rossi, A, Marti-Renom, MA, Fiser, A, Webb, B, Greenblatt, D, Huang, CC, Ferrin, TE and Sali, A** (2004). "MODBASE, a database of annotated comparative protein structure models, and associated resources." *Nucleic Acids Res* **32**(Database issue): D217-22.
- Rhee, HJ, Kim, EJ and Lee, JK** (2007). "Physiological polyamines: simple primordial stress molecules." *J Cell Mol Med* **11**(4): 685-703.
- Rosenheim, O** (1924). "The Isolation of Spermine Phosphate from Semen and Testis." *Biochem J* **18**(6): 1253-1262 1.
- Salvi, M and Toninello, A** (2004). "Effects of polyamines on mitochondrial Ca(2+) transport." *Biochim Biophys Acta* **1661**(2): 113-24.
- Sambrook, J, Fritsch, EF and Maniatis, T** (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

- Sato, F, Hashimoto, T, Hachiya, A, Tamura, K, Choi, KB, Morishige, T, Fujimoto, H and Yamada, Y** (2001). "Metabolic engineering of plant alkaloid biosynthesis." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(1): 367-72.
- Schmidt, S, Sunyaev, S, Bork, P and Dandekar, T** (2003). "Metabolites: a helping hand for pathway evolution?" *Trends Biochem Sci* **28**(6): 336-41.
- Šebela, M, Radova, A, Angelini, R, Tavladoraki, P, Frebort, II and Pec, P** (2001). "FAD-containing polyamine oxidases: a timely challenge for researchers in biochemistry and physiology of plants." *Plant Sci* **160**(2): 197-207.
- Seiler, N and Raul, F** (2005). "Polyamines and apoptosis." *J Cell Mol Med* **9**(3): 623-42.
- Steppuhn, A, Gase, K, Krock, B, Halitschke, R and Baldwin, IT** (2004). "Nicotine's defensive function in nature." *PLoS Biol* **2**(8): E217.
- Sumper, M, Brunner, E and Lehmann, G** (2005). "Biomineralization in diatoms: characterization of novel polyamines associated with silica." *FEBS Lett* **579**(17): 3765-9.
- Tabor, CW and Tabor, H** (1984). "Polyamines." *Annu Rev Biochem* **53**: 749-90.
- Tavladoraki, P, Rossi, MN, Saccuti, G, Perez-Amador, MA, Polticelli, F, Angelini, R and Federico, R** (2006). "Heterologous expression and biochemical characterization of a polyamine oxidase from Arabidopsis involved in polyamine back conversion." *Plant Physiol* **141**(4): 1519-32.
- Teuber, M, Azemi, ME, Namjoyan, F, Meier, AC, Wodak, A, Brandt, W and Drager, B** (2007). "Putrescine N-methyltransferases--a structure-function analysis." *Plant Mol Biol* **63**(6): 787-801.
- Thomas, T and Thomas, TJ** (2001). "Polyamines in cell growth and cell death: molecular mechanisms and therapeutic applications." *Cell Mol Life Sci* **58**(2): 244-58.
- Thompson, JD, Gibson, TJ, Plewniak, F, Jeanmougin, F and Higgins, DG** (1997). "The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools." *Nucleic Acids Res* **25**(24): 4876-82.
- Thornton, JW** (2004). "Resurrecting ancient genes: experimental analysis of extinct molecules." *Nat Rev Genet* **5**(5): 366-75.
- Turner, S, Gallois, P and Brown, D** (2007). "Tracheary element differentiation." *Annu Rev Plant Biol* **58**: 407-33.
- Walden, R, Cordeiro, A and Tiburcio, AF** (1997). "Polyamines: small molecules triggering pathways in plant growth and development." *Plant Physiol* **113**(4): 1009-13.
- Walters, DR** (2003). "Polyamines and plant disease." *Phytochemistry* **64**(1): 97-107.
- Wallace, HM, Fraser, AV and Hughes, A** (2003). "A perspective of polyamine metabolism." *Biochem J* **376**(Pt 1): 1-14.
- Wang, X, Ikeguchi, Y, McCloskey, DE, Nelson, P and Pegg, AE** (2004). "Spermine synthesis is required for normal viability, growth, and fertility in the mouse." *J Biol Chem* **279**(49): 51370-5.
- Williams, K** (1997). "Interactions of polyamines with ion channels." *Biochem J* **325** (Pt 2): 289-97.

- Yamaguchi, K, Takahashi, Y, Berberich, T, Imai, A, Miyazaki, A, Takahashi, T, Michael, A and Kusano, T** (2006). "The polyamine spermine protects against high salt stress in *Arabidopsis thaliana*." *FEBS Lett* **580**(30): 6783-8.
- Ye, ZH** (2002). "Vascular tissue differentiation and pattern formation in plants." *Annu Rev Plant Biol* **53**: 183-202.
- Zardoya, R, Ding, X, Kitagawa, Y and Chrispeels, MJ** (2002). "Origin of plant glycerol transporters by horizontal gene transfer and functional recruitment." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(23): 14893-6.
- Zhao, F, Song, CP, He, J and Zhu, H** (2007). "Polyamines improve K⁺/Na⁺ homeostasis in barley seedlings by regulating root ion channel activities." *Plant Physiol* **145**(3): 1061-72.
- Zhu, JK** (2002). "Salt and drought stress signal transduction in plants." *Annu Rev Plant Biol* **53**: 247-73.

ANEXO I - Referencia de las secuencias utilizadas en el Análisis Filogenético I

An-AaSPM |NCBI|GI:108883300| *Aedes aegypti*
An-AgSPD |NCBI|GI:55244865| *Anopheles gambiae*
An-AgSPM |NCBI|GI:55238143| *Anopheles gambiae* str. PEST
An-AmSPD |NCBI|GI:110762381| *Apis mellifera*
An-AmSPM |NCBI|GI:110750076| *Apis mellifera*
An-BtSPD |NCBI|GI:76637220| *Bos taurus*
An-BtSPM |NCBI|GI:74355038| *Bos taurus*
An-CeSPD |NCBI|GI:13785161| *Caenorhabditis elegans*
An-CfSPM1 |NCBI|GI:74006590| *Canis familiaris*
An-CfSPM2 |NCBI|GI:74006588| *Canis familiaris*
An-CiSPD |NCBI|GI:23588303| *Ciona intestinalis*
An-DdSPD |NCBI|GI:4903273| *Dictyostelium discoideum*
An-DmSPDa |NCBI|GI:24645443| *Drosophila melanogaster*
An-DmSPMa |NCBI|GI:24663238| *Drosophila melanogaster*
An-DmSPMb |NCBI|GI:21358269| *Drosophila melanogaster*
An-DpSPD |NCBI|GI:54638853| *Drosophila pseudoobscura*
An-DpSPM |NCBI|GI:54642121| *Drosophila pseudoobscura*
An-DrSPD |NCBI|GI:41054725| *Danio rerio*
An-DrSPM |NCBI|GI:18858203| *Danio rerio*
An-FrSPM |NCBI|GI:4007045| *Takifugu rubripes*
An-GaSPM |NCBI|GI:112421723| *Gasterosteus aculeatus*
An-GgSPM |NCBI|GI:71895234| *Gallus gallus*
An-HsSMS |NCBI|GI:21264340| *Homo sapiens*
An-HsSPD |NCBI|GI:21620021| *Homo sapiens*
An-MamSPD |NCBI|GI:108997019| *Macaca mulatta*
An-MamSPM |NCBI|GI:109130172| *Macaca mulatta*
An-MmSPD |NCBI|GI:1061192| *Mus musculus*
An-MmSPM |NCBI|GI:26340516| *Mus musculus*
An-PtSPD1 |NCBI|GI:114553929| *Pan troglodytes*
An-PtSPD2 |NCBI|GI:114553927| *Pan troglodytes*
An-RnSPD |NCBI|GI:16758208| *Rattus norvegicus*
An-RnSPM |NCBI|GI:75517316| *Rattus norvegicus*
An-SsSPM |NCBI|GI:115551632| *Sus scrofa*
An-StpSPD |NCBI|GI:115930821| *Strongylocentrotus purpuratus*
An-StpSPM |NCBI|GI:115739495| *Strongylocentrotus purpuratus*
An-TcSPDa |NCBI|GI:91084649| *Tribolium castaneum*
An-TcSPM |NCBI|GI:91085293| *Tribolium castaneum*
An-TfSPM |NCBI|GI:4007861| *Tetraodon fluviatilis*
An-TnSPD |NCBI|GI:47228825| *Tetraodon nigroviridis*
An-XISPD |NCBI|GI:47123853| *Xenopus laevis*
Ar-AfSPD |NCBI|GI:6626247| *Archaeoglobus fulgidus* DSM 4304
Ar-AsSPD |NCBI|GI:116062511| *Aeropyrum pernix* K1
Ar-MmSPD |NCBI|GI:45048022| *Methanococcus marisaludis* S2
Ar-PabSPD |NCBI|GI:5457630| *Pyrococcus abyssi* GE5

Ar-PaeSPD |NCBI|GI:18159933|*Pyrobaculum aerophilum* strain IM2
 Ar-PfSPD |NCBI|GI:18892046|*Pyrococcus furiosus* DSM 3638
 Ar-StSPD |NCBI|GI:15920547|*Sulfolobus tokodaii* str. 7
 Ar-TkSPD |NCBI|GI:57158406|*Thermococcus kodakarensis* KOD1
 B-BhSPD |NCBI|GI:10176436|*Bacillus halodurans*
 B-ChSPD |NCBI|GI:77995061|*Carboxydotherrmus hydrogenoformans* Z-2901
 B-CsSPD |NCBI|GI:82498902|*Caldicellulosiruptor saccharolyticus* DSM 8903
 B-CteSPD |NCBI|GI:28211850|*Clostridium tetani* E88
 B-CthSPD |NCBI|GI:67917293|*Clostridium thermocellum* ATCC 27405
 B-DaSPD |NCBI|GI:95929079|*Desulfuromonas acetoxidans* DSM 684
 B-DrSPD |NCBI|GI:88947485|*Desulfotomaculum reducens* MI-1
 B-EcSPD |NCBI|GI:1786312|*Escherichia coli* K12
 B-EsSPD |NCBI|GI:68055976|*Exiguobacterium sibiricum* 255-15
 B-M-SPD |NCBI|GI:87119254|*Marinomonas* sp. MED121
 B-MtSPD |NCBI|GI:83590650|*Moorella thermoacetica* ATCC 39073
 B-O-SPD |NCBI|GI:89093227|*Oceanospirillum* sp. MED92
 B-PISPD |NCBI|GI:36784267|*Photorhabdus luminescens* subsp. *laumondii* TTO1
 B-SaSPD |NCBI|GI:68548149|*Shewanella amazonensis* SB2B
 B-SeSPD |NCBI|GI:56126696|*Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Paratyphi* A
 str. ATCC 9150
 B-TeSPD |NCBI|GI:76796398|*Thermoanaerobacter ethanolicus* ATCC 33223
 B-TeTSPM |NCBI|GI:113474699|*Trichodesmium erythraeum* IMS101
 B-TmSPD |NCBI|GI:8134722|*Thermotoga maritima*
 B-TtSPD |NCBI|GI:20516337|*Thermoanaerobacter tengcongensis* MB4
 B-TtTSPM |NCBI|GI:46198780|*Thermus thermophilus* HB27
 B-YpSPD |NCBI|GI:15981338|*Yersinia pestis* CO92
 F-AnSPD |NCBI|GI:40746307|*Aspergillus nidulans* FGSC A4
 F-AtSPD |NCBI|GI:115492018|*Aspergillus terreus* NIH2624
 F-CaSPD |NCBI|GI:68482416|*Candida albicans* SC5314
 F-CaSPM |NCBI|GI:68467241|*Candida albicans* SC5314
 F-CglSPD |NCBI|GI:88178406|*Chaetomium globosum* CBS 148.51
 F-CgSPD |NCBI|GI:50286095|*Candida glabrata* CBS 138
 F-CgSPM |NCBI|GI:50294273|*Candida glabrata* CBS138
 F-CiSPD |NCBI|GI:90298765|*Coccidioides immitis* RS
 F-DhSPM |NCBI|GI:50422879|*Debaryomyces hansenii* CBS767
 F-EgSPD |NCBI|GI:47068328|*Eremothecium gossypii*
 F-KiSPM |NCBI|GI:50307673|*Kluyveromyces lactis* NRRL Y-1140
 F-MgSPD |NCBI|GI:39975752|*Magnaporthe grisea* 70-15
 F-NcSPD |NCBI|GI:85100119|*Neurospora crassa* OR74A
 F-ScSPD |NCBI|GI:6325326|*Saccharomyces cerevisiae*
 F-ScSPM |NCBI|GI:6323175|*Saccharomyces cerevisiae*
 F-SpSPD |NCBI|GI:6249529|*Schizosaccharomyces pombe*
 F-YiSPD |NCBI|GI:50554612|*Yarrowia lipolytica* CLIB122
 P-AbPMT2 |NCBI|GI:5381170|*Atropa belladonna*
 P-AhgACL5 |NCBI|GI:18150167|*Arabidopsis halleri* subsp. *gemmifera*
 P-AmSPD |NCBI|GI:120650113|*Ammopiptanthus mongolicus*

P-AtACL5 |NCBI|GI:18419941|*Arabidopsis thaliana*
 P-AtSPD1 |NCBI|GI:30688573|*Arabidopsis thaliana*
 P-AtSPD2 |NCBI|GI:30698029|*Arabidopsis thaliana*
 P-AtSPMS |NCBI|GI:23397200|*Arabidopsis thaliana*
 P-CaSPD |NCBI|GI:3242658|*Coffea arabica*
 P-CsPMT |NCBI|GI:86438862|*Calystegia sepium*
 P-CsSPD |NCBI|GI:49425360|*Cucumis sativus*
 P-DsPMT |NCBI|GI:35208829|*Datura stramonium*
 P-DsSPD1 |NCBI|GI:1561576|*Datura stramonium*
 P-DsSPD2 |NCBI|GI:1561578|*Datura stramonium*
 P-HnPMT |NCBI|GI:5381172|*Hyoscyamus niger*
 P-HnSPD1 |NCBI|GI:6094328|*Hyoscyamus niger*
 P-HnSPD2 |NCBI|GI:6094330|*Hyoscyamus niger*
 P-HvSPMS |NCBI|EST-Contig|AV939533, BF624060, AV932834, AL505092,
 AV934176, AV914107, AV924756, AV939868, BF626904, AV938234,
 BG344207| *Hordeum vulgare*
 P-MsACL5 |NCBI|GI:73486702|*Malus sylvestris*
 P-MsSPMS |NCBI|GI:73486700|*Malus sylvestris*
 P-MtACL5 |NCBI|GI:49034965|*Medicago truncatula*
 P-MtSPD |MGI-NCBI|EST-Contig| TC40033, TC2216, TC12953, TC19245,
 BG452175, BF647107, NF032G05PL1F1038, NF019F03EC1F1030,
 NF001B08ST1F1000, NF014E02DT1F1019, NF086D12IN1F1102, AL367693,
 NF042D02LF1F1015, AW736244, AW256700, NF034F04EC1F1042,
 NF059E07IN1F1054| *Medicago truncatula*
 P-NaPMT2 |NCBI|GI: 13936641|*Nicotiana attenuata*
 P-NsSPD |NCBI|GI:2821958|*Nicotiana sylvestris*
 P-NtPMT1 |NCBI|GI:6093754|*Nicotiana tabacum*
 P-NtSPD |NCBI|GI:33340515|*Nicotiana tabacum*
 P-OsACL5 |NCBI|GI:50252839|*Oryza sativa* (japonica cultivar-group)
 P-OsSPD |NCBI|GI:6468655|*Oryza sativa* (japonica cultivar-group)
 P-OsSPMS-1 |TIGR-NCBI|GI:50252186|*Oryza sativa* (japonica cultivar-group)
 P-OsSPMS-2 |TIGR-NCBI|GI:33354148|*Oryza sativa* (japonica cultivar-group)
 P-PdPMT |NCBI|GI:86438867|*Physalis divaricata*
 P-PsSPD1 |NCBI|GI:4104971|*Pisum sativum*
 P-PsSPD2 |NCBI|GI:4104973|*Pisum sativum*
 P-SiACL5 |NCBI|GI:40788038|*Solanum lycopersicum*
 P-SiPMT |NCBI|GI:86438860 |*Solanum lycopersicum*
 P-SiSPD |NCBI|GI:4138108|*Solanum lycopersicum*
 P-SiSPMS |TIGR|EST-Contig|GI:33150481|*Solanum lycopersicum*
 P-SpPMT |NCBI|GI:66735506|*Scopolia parviflora*
 P-StPMT |NCBI|GI:38174783|*Solanum tuberosum*
 P-StSPD |NCBI|GI:15150054|*Solanum tuberosum*
 P-TspACL5 |*Thalassiosira pseudanana*|Knott *et al.*(2007)
 P-ZmSPMS |NCBI|GI:74481420|*Zea mays*

ANEXO II - Referencia de las secuencias utilizadas en el Análisis Filogenético II

An-AmSPM |NCBI|GI:110750076|Apis mellifera
An-DmSPMa |NCBI|GI:24663238|Drosophila melanogaster
An-DpSPM |NCBI|GI:54642121| Drosophila pseudoobscura
An-TcSPM |NCBI|GI:91085293| Tribolium castaneum
An-AaSPM |NCBI|GI:108883300| Aedes aegypti
P-AtACL5 |NCBI|GI:18419941|Arabidopsis thaliana
P-SlACL5 |NCBI|GI:40788038|Solanum lycopersicum
P-OsACL5 |NCBI|GI:50252839|Oryza sativa (japonica cultivar-group)
P-MsACL5 |NCBI|GI:73486702|Malus sylvestris
P-MtACL5 |NCBI|GI:49034965|Medicago truncatula
P-TdACL5 |NCBI|GI:38603375|Taxodium distichum
P-AhgACL5 |NCBI|GI:18150167|Arabidopsis halleri subsp. gemmifera
P-AtSPD1 |NCBI|GI:30688573|Arabidopsis thaliana
P-AtSPD2 |NCBI|GI:30698029|Arabidopsis thaliana
P-CaSPD |NCBI|GI:3242658|Coffea arabica
P-CsSPD |NCBI|GI:49425360|Cucumis sativus
P-DsSPD1 |NCBI|GI:1561576|Datura stramonium
P-DsSPD2 |NCBI|GI:1561578|Datura stramonium
P-SlSPD |NCBI|GI:4138108|Solanum lycopersicum
P-NsSPD |NCBI|GI:2821958|Nicotiana sylvestris
P-PsSPD1 |NCBI|GI:4104971|Pisum sativum
P-PsSPD2 |NCBI|GI:4104973|Pisum sativum
P-HnSPD1 |NCBI|GI:6094328|Hyoscyamus niger
P-HnSPD2 |NCBI|GI:6094330|Hyoscyamus niger
P-MtSPD |MGI|EST-Contig|Medicago truncatula
P-NtSPD |NCBI|GI:33340515|Nicotiana tabacum
P-OsSPD |NCBI|GI:6468655|Oryza sativa (japonica cultivar-group)
P-StSPD |NCBI|GI:15150054|Solanum tuberosum
P-AmSPD |NCBI|GI:120650113|Ammopiptanthus mongolicus
P-AtSPM1 |NCBI|GI:23397200|Arabidopsis thaliana
P-MsSPM1 |NCBI|GI:73486700|Malus sylvestris
P-SlSPM1 |TIGR|EST-Contig|Solanum lycopersicum
P-OsSPM1-2 |TIGR-NCBI|GI:33354148|Oryza sativa (japonica cultivar-group)
P-OsSPM1-1 |TIGR-NCBI|GI:50252186|Oryza sativa (japonica cultivar-group)
P-ZmSPM1 |NCBI|GI:74481420|Zea mays
P-HvSPM1 |NCBI|EST-Contig|Hordeum vulgare
physc-1 |JGI|Contig14177|Physcomitrella patens
physc-2 |JGI|Contig8271|Physcomitrella patens
Pglauca1 |NCBI|Picea glauca|GenomeQuebec_Id: WS00731.B21_B04|GQ0205.B3_J13
Pglauca2 |NCBI|Picea glauca|GenomeQuebec_Id:GQ0195.TB_C07_3|GQ0195.B3_C07
Pglauca3 |NCBI|Picea glauca|GenomeQuebec_Id:GQ0166.B7_A11| WS0264.B21_F11|
WS03216.C21_I16
Ptaeda3 |NCBI-TIGR|Pinus taeda|COLD1_11_F10.g1_A029| GI:74155642
Ptaeda2 |NCBI|Pinus taeda|RTK1_36_F11.b1_A029| STRS1_40_C11.b1_A034

Ptaeda1 |NCBI-TIGR|ESTs|Pinus taeda|GI:70772187
Selagin1 |JGI|050718cr339|1585640_5|selaginella moellendorffii
Selagin2 |JGI|050718cr339|1581847_1|selaginella moellendorffii
Selagin3 |JGI|050718cr339|1584128_1|selaginella moellendorffii
B-EcSPD |NCBI|GI:1786312|Escherichia coli K12
Ar-PaeSPD |NCBI|GI:18159933|Pyrobaculum aerophilum strain IM2

FE DE ERRATAS

Errores

Página 31(Figura 12.B): Donde pone "Col-0" debe poner "Ler".

Página 47(Figura 22.A): Donde pone "heterocigoto" debe poner "hemocigoto".

Página 47(Figura 22.B): Donde pone "Ler" debe poner "Col-0".

Página 75(Figura 33): La parte de la agmatina que corresponde con la putrescina presenta 3 carbonos cuando deberían estar representados 4.

Omisiones identificadas

Página 43(Figura 19): Magnitud de la escala. Figuras A-F, H: 50 µm. Figura G: 100 µm.

Ausente una página completa de Material y Métodos (entre la página 96 y 97): A continuación se muestra una versión reducida pero suficiente para obtener todos los datos necesarios en caso de consulta.

Tinción Azul toluidina

Para la caracterización histológica de las alteraciones en el tejido vascular del tallo del mutante *acl5*, en comparación con *Ler*, se procesaron muestras de tallo siguiendo el mismo protocolo seguido en las hibridaciones "*in situ*". Las secciones se desparafinaron mediante dos lavados en etanol absoluto de 1 min cada uno, continuando con etanol 95%, etanol 70%, etanol 50%, etanol 30% y finalmente dos lavados en agua destilada. A continuación las tinciones se tiñeron con una solución al 0'05% de azul de toluidina (Merck).

Cuantificación elementos individuales del xilema

Hipocotilos de 2 meses de plantas en las que el crecimiento secundario había sido estimulado por la continua decapitación de los ápices inflorescente, fueron incubados a 95°C durante 4 horas en una solución al 3% H₂O₂ y 50% ácido acético. A continuación se realizaron dos lavados suaves en agua destilada y se neutralizó añadiendo Na₂CO₃ sólido al último lavado. Las muestras fueron disgregadas mecánicamente y guardadas a temperatura ambiente. La suspensión de células fue teñida con una solución al 0'01% Calcofluor. Las células se visualizaron utilizando un microscopio óptico Zeiss Axioplan II. Para cada línea analizada se utilizaron 3 plantas y se identificaron entre 100 y 300 elementos individuales por cada una.

Microscopía electrónica

Hipocotilos de las mismas características que los utilizados para la cuantificación de elementos individuales fueron embebidos en resina Spurr (Sigma) de acuerdo al protocolo descrito por Rensing (2002), y examinados en un microscopio electrónico de transmisión (Hitachi Ltd., Tokyo, Japan).

2.6 Análisis qRT-PCR

A partir del RNA obtenido (RNAeasy, QIAGEN) de plántulas de 15 días de líneas *acl5-4* y *Ler*, se obtuvo cDNA (SuperScript II First-Strand cDNA synthesis system, Invitrogen) que fue utilizado en una PCR cuantitativa con SYBERGreen, utilizando el sistema 7500 de Applied Biosystems.

Oligo	Secuencia	Oligo	Secuencia
IRX1-f	TACGGTTGCAGCGGAGGCCGC	IRX1-r	GCTTGCTAGGTTTGATAGCGT
IRX3-f	CATTCACAACCATGAAGAGCCA	IRX3-r	CACACTCATTGCAAGCTACG
IRX5-f	CTTTACAAACGCCACAAAGGCT	IRX5-r	GAATGGAGGAACCATCCTGG
XCP1-f	TTGTCAAGAGCAGAAAGAGG	XCP1.1-r	CGGTTTTTGAGAGAATGAAAGATTGG
XCP1-f	TTGTCAAGAGCAGAAAGAGG	XCP1.2-r	CTGGAAGTCTCTTCTCTGAAGCC
BFN1-f	TGGGAGATATTCATCAGCCG	BFN1-r	CGTGAGAATGATCTCTCTATCC
At2g32560	AATAGCATTAAAGAAGCTTTGC	At2g32560	CAACACAATATTTCTCAAATCG

2.7 Construcción pACL5::DT-A

La región 3'UTR de *ACL5* se amplificó y clonó en el vector pBluescript SK II a partir de genómico de Col-0. La secuencia de la toxina DT-A se obtuvo a partir del vector pEW3 (Nilsson et al. 1998) y se introdujo en 5' a la 3'UTR de *ACL5* y posteriormente se transfirió la fusión "DTA-utr" al vector pMDC205 (Curtis y Grossniklaus, 2003). Un fragmento de 2,48 Kb del promotor *ACL5* se introdujo en 5' por Gateway procedente del vector pK2GWFS7.0 (Karimi et al.,2002).

Oligo	Secuencia	Oligo	Secuencia
pACL5-f	CACAGTCGACAGACGAACCGGTTTCAGTTTC	pACL5-r	CACAGAATTCAGATTTGGTGTGGAGAAATAAG
DTA-f	GAGTCGACATGGATCCTGATGATGTGTTG	DTA-r	CCACGTCCAGACGTCGAC

