

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 pRCHI</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	