

**INSTITUTO POTOSINO DE INVESTIGACIÓN
CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA, A.C.**

POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOLOGIA MOLECULAR

**Caracterización funcional del uORF
del gen *poliamino oxidasa-2 (PAO2)*
de *Arabidopsis thaliana***

Tesis que presenta

M. en C. María de la Luz Guerrero González

Para obtener el grado de:

Doctora en Ciencias en Biología Molecular

Director de Tesis:

Dr. Juan Francisco Jiménez Bremont

San Luis Potosí, S.L.P., Febrero de 2014



Constancia de aprobación de la tesis

La tesis "**Caracterización funcional del uORF del gen *poliamino oxidasa-2 (PAO2)* de *Arabidopsis thaliana***" presentada para obtener el Grado de Doctora en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por **María de la Luz Guerrero González** y aprobada el **cuatro de febrero del dos mil catorce** por los suscritos, designados por el Colegio de Profesores de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Dr. Juan Francisco Jiménez Bremont
Director de la tesis

Dr. Samuel Lara González
Miembro del Comité Tutorial

Dr. J. Sergio Casas Flores
Miembro del Comité Tutorial

Dra. Catalina Arenas Huertero
Miembro del Comité Tutorial



Créditos Institucionales

La presente investigación se realizó en el laboratorio de Biología Molecular de Hongos y Plantas de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., bajo la dirección del Dr. Juan Francisco Jiménez Bremont.

Durante la realización del trabajo la autora recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (No. de registro 234965) y del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C.



Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Acta de Examen de Grado

El Secretario Académico del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., certifica que en el Acta 063 del Libro Primero de Actas de Exámenes de Grado del Programa de Doctorado en Ciencias en Biología Molecular está asentado lo siguiente:

En la ciudad de San Luis Potosí a los 4 días del mes de febrero del año 2014, se reunió a las 17:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

Dr. Samuel Lara González	Presidente	IPICYT
Dr. J. Sergio Casas Flores	Secretario	IPICYT
Dra. Catalina Arenas Huertero	Sinodal externo	UASLP
Dr. Juan Francisco Jiménez Bremont	Sinodal	IPICYT

a fin de efectuar el examen, que para obtener el Grado de:

DOCTORA EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

sustentó la C.

María de la Luz Guerrero González

sobre la Tesis intitulada:

Caracterización funcional del uORF del gen poliamino oxidasa-2 (PAO2) de Arabidopsis thaliana

que se desarrolló bajo la dirección de

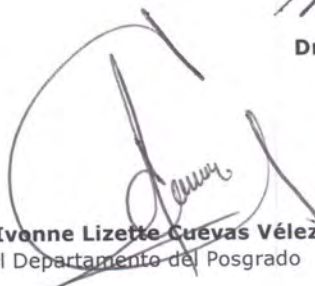
Dr. Juan Francisco Jiménez Bremont

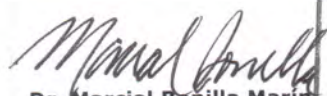
El Jurado, después de deliberar, determinó

APROBARLA

Dándose por terminado el acto a las 19:08 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fe el Secretario Académico del Instituto.

A petición de la interesada y para los fines que a la misma convengan, se extiende el presente documento en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P., México, a los 4 días del mes de febrero de 2014.


Mtra. Ivonne Lizette Cuevas Vélez
Jefa del Departamento del Posgrado


Dr. Marcial Bonilla Marín
Secretario Académico



Hoja para colocar la copia del acta de examen

Dedicatorias

Con mucho cariño

A mi mamá Sofía

A mi tío Juan

A mis hermanas Ely y Rocío

A Pablo

Sin ustedes esto no habría sido posible

Agradecimientos

Mi más profundo y sincero agradecimiento al Dr. Juan Francisco Jiménez Bremont, director de esta investigación, de quien admiro su genialidad y avidez por el conocimiento. Gracias por brindarme la oportunidad de formar parte de su laboratorio, por su orientación y ayuda para la realización de esta tesis.

A la Dra. Margarita Rodríguez y Domínguez Kessler, por su esfuerzo y dedicación, quien con su experiencia y conocimientos me ayudo a escribir mi trabajo de investigación y sobre todo gracias por su amistad.

Al Dr. Sergio Casas Flores, al Dr. Samuel Lara González y a la Dra. Catalina Arenas Huertero por aceptar ser parte de mi comité tutorial, por su tiempo y sus atinadas sugerencias a mi trabajo de tesis.

A Pablo Delgado, por sus palabras de aliento y por darme la mano cuando sentía que el camino se terminaba. Gracias por su cariño y la inmensa confianza que en mí tiene.

Gracias a mi familia que supo comprender mi ausencia, son mi fortaleza y ganas de seguir.

Gracias de todo corazón a Azucena, Fátima, Silvia y Jorge por sus consejos, amistad y por las experiencias compartidas.

A la M. en C. Alicia Becerra Flora, por el apoyo técnico brindado para el desarrollo de esta tesis.

Contenido

Constancia de aprobación de la tesis	ii
Créditos institucionales	iii
Acta de examen	iv
Dedicatorias	v
Agradecimientos	vi
Lista de figuras	ix
Anexos	x
Abreviaturas	xi
Resumen	xii
Abstract	xiii

I. Introducción

1.1 El metabolismo de las poliaminas	1
1.2 La biosíntesis de las poliaminas	2
1.3 Los papeles fisiológicos de las poliaminas	4
1.4 La regulación de los niveles intracelulares de las poliaminas	7
1.4.1 La regulación de la biosíntesis de las poliaminas	7
1.4.1.1 La Ornitina descarboxilasa	7
1.4.1.2 La Arginina descarboxilasa	11
1.4.1.3 La S-adenosilmetionina descarboxilasa	11
1.4.1.4 La Espermidina sintasa y la Espermina sintasa	13
1.4.2 El catabolismo de las poliaminas	13
1.5 La regulación de la traducción	18

II. Objetivo	24
III. Capítulo I. El uORF, un mecanismo regulatorio de la poliamino oxidasa-2 de <i>Arabidopsis thaliana</i>.	25
IV. Discusión	43
V. Referencias bibliográficas	48

Lista de figuras

Figura 1. Estructura química de las poliaminas más comunes.	1
Figura 2. La ruta de la biosíntesis de las poliaminas.	3
Figura 3. Rutas catabólicas de las poliaminas.	15
Figura 4. Representación de los complejos ribosomales implicados en el inicio de la traducción.	19
Figura 5. Un modelo hipotético del mecanismo de regulación mediado por el uORF de <i>AtPAO2</i> .	47

Anexos

1. Materiales y métodos

64

Abreviaturas

ADC	Arginina descarboxilasa
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementario
DAO	Diamino oxidasa
DAP	1,3 diaminopropano
DNA	Ácido desoxirribonucleico
eIF	Factor de iniciación eucariótico
GUS	<i>β-glucosidasa</i>
MGBG	Metilglioxal bis(guanilhidrazona)
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
MS	Medio nutritivo Murashine y Skood
ODC	Ornitina descarboxilasa
ORF	Marco de lectura abierta
PA	Poliamina
PAO	Poliamino oxidasa
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
Put	Putrescina
RNA	Ácido ribonucleico
RT-PCR	Transcripción reversa de reacción en cadena de la polimerasa
SAMDC	S-adenosilmetionina descarboxilasa
Spd	Espermidina
SPDS	Espermidina sintasa
Spm	Espermina
SPMS	Espermina sintasa
TSpm	Termoesperimina
uORF	Marco de lectura abierta río arriba
UTR	Región no traducible

Resumen

Caracterización funcional del uORF del gen *poliamino oxidasa-2 (PAO2)* de *Arabidopsis thaliana*

La región no-traducida 5' de un mRNA tiene señales de control que modulan la eficiencia traduccional, lo que resulta en un cambio rápido en el proteoma. Aproximadamente 30% de los cDNAs de *Arabidopsis* presentan un marco de lectura abierta río arriba (uORF); sin embargo su impacto en la traducción se ha estudiado en detalle en relativamente pocos casos. Las poliamino oxidasas dependientes de flavín adenín dinucleótido (PAOs; EC 1.5.3.3) catabolizan la desaminación oxidativa de la espermidina y espermina, contribuyendo de este modo a la homeostasis de las poliaminas así como en diversos procesos biológicos a través de sus productos de reacción. En el genoma de *A. thaliana* se han identificado cinco genes que codifican para PAOs, de estos los transcritos *AtPAO2* y *AtPAO3* poseen un uORF. En este estudio, caracterizamos el uORF del gen *AtPAO2* utilizando el gen reportero *GUS* bajo el control del promotor endógeno *AtPAO2* y bajo el control del promotor constitutivo CaMV 35S. Con ambos promotores, el uORF afectó negativamente la expresión de *GUS*. Las poliaminas exógenas modularon positivamente la expresión de *GUS*, mitigando así el efecto negativo del uORF de *AtPAO2*, mientras que la aplicación del inhibidor MGBG causó un efecto opuesto. Estos resultados sugieren que la regulación mediada por el uORF de *AtPAO2* es modulada por poliaminas. Además, presentamos un análisis *in silico* de los uORFs identificados en varios transcritos de *poliamino oxidasas* de las plantas. Estos datos sugieren que los uORFs podrían constituir un mecanismo importante de regulación traduccional de los genes *PAO*. Además, el hecho de que los uORFs sean comúnmente identificados en la ruta de las poliaminas sugiere que los mecanismos de control mediados por un uORF podrían modular la concentración intracelular de poliaminas durante el desarrollo y las respuestas ante el estrés de las plantas.

PALABRAS CLAVE Poliamino oxidasas; Regulación post-transcripcional; Espermidina; uORF

Abstract

Functional characterization of *polyamine oxidase-2 (PAO2)* uORF from *Arabidopsis thaliana*

The 5'-untranslated region of an mRNA contains control signals that modulate the translational efficiency that can result in rapid changes to the proteome. Approximately 30% of Arabidopsis cDNAs possess an upstream open reading frame (uORF); nevertheless their impact on translation has been studied in detail in relatively few cases. The flavin-containing polyamine oxidases (PAOs; EC 1.5.3.3) catabolize oxidative deamination of spermidine and spermine, thus contributing to polyamine homeostasis as well as in diverse biological processes through their reaction products. In *A. thaliana* genome five genes encoding PAOs have been identified, of these *AtPAO2* and *AtPAO3* transcripts possess an uORF. In this study, we characterized the uORF of *AtPAO2* gene using the *GUS* reporter gene. Transgenic lines harboring the native *AtPAO2* promoter or the constitutive CaMV 35S promoter showed that the uORF negatively affects *GUS* expression. Exogenous applications of polyamines positively modulate *GUS* expression, thus alleviating the negative effect of *AtPAO2* uORF, while treatments with MGBG inhibitor show an opposite effect. These results suggest that the uORF-mediated regulation of the *AtPAO2* is modulated by polyamines. In addition, we present a comparative *in silico* study of the putative uORFs identified in several plant transcripts encoding polyamine oxidases. This suggests that uORF might constitute an important mechanism of translational regulation of *PAO* genes. Moreover, the fact that uORFs are commonly found in polyamine pathway suggests that uORF-mediated control mechanisms might finely modulate the intracellular concentration of PAs in plant development and stress responses.

KEYWORDS Polyamine oxidases; Post-transcriptional regulation; Spermidine; uORF

I. INTRODUCCIÓN

1.1. El metabolismo de las poliaminas

Las poliaminas (PAs) son moléculas orgánicas de naturaleza policatiónica indispensables para todos los organismos. La putrescina (Put), la espermidina (Spd) y la espermina (Spm) son las PAs más comunes en los eucariontes y los procariontes (Fig. 1). Aun cuando a la fecha sus mecanismos específicos de funcionamiento son desconocidos, se ha reportado que las PAs están implicadas en diversos procesos celulares que incluyen la transcripción, la traducción, la replicación del DNA, el ciclo celular, la regulación de las actividades enzimáticas y la estabilización de las membranas (Fuell *et al.*, 2010; Tavladoraki *et al.*, 2012). Dichas funciones son atribuidas principalmente a su naturaleza policatiónica, que les confiere la capacidad de interactuar con macromoléculas cargadas negativamente como el DNA, el RNA, los fosfolípidos y las proteínas.

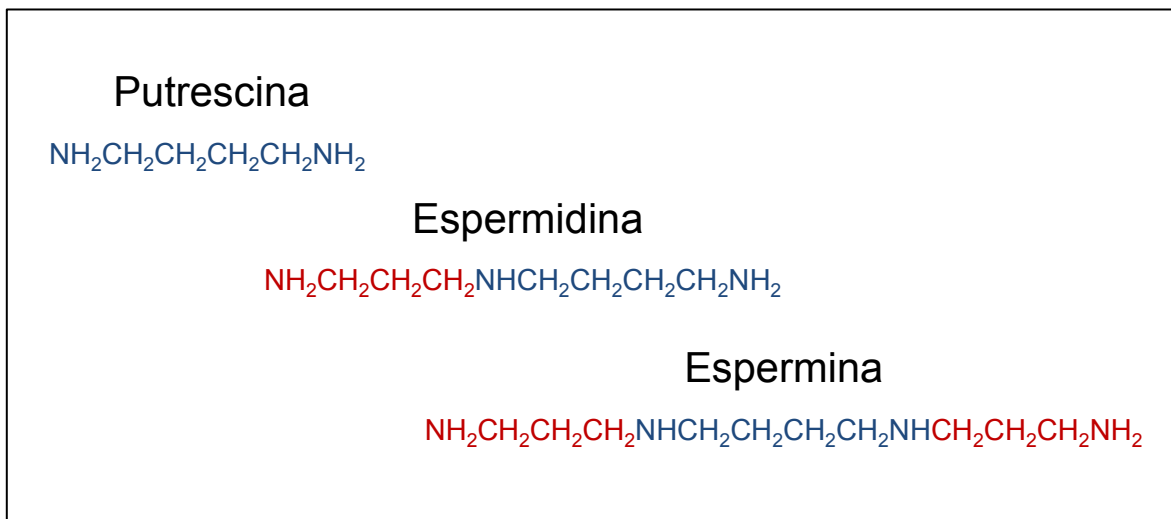


Figura 1. Estructura química de las poliaminas más comunes.

En estudios experimentales han mostrado que el número de cargas positivas así como el tamaño molecular de las PAs ejercen efectos importantes en la formación de complejos con el DNA. De esta manera, la fuerza de unión a regiones del DNA ricas en AT es más fuerte con la tetramina Spm, y continúa con

las tri- y di-aminas, mostrando la siguiente regla de unión: Spm>Spd>Put>Cadaverina (Kabir y Kumar, 2013). La interacción de las PAs con el DNA influye en su estabilidad y conformación (Rider *et al.*, 2007; Kabir y Kumar, 2013). En este sentido, se ha demostrado que las PAs, principalmente las superiores (Spd y Spm) estimulan la inter-conversión del DNA de la forma B a la A y a la Z (Hasan *et al.*, 1995). La conformación Z del DNA, modula la replicación de este, la expresión génica y los eventos de recombinación (Igarashi *et al.*, 2010). A su vez, las PAs actúan como reguladores transcripcionales de ciertos genes, ya que facilitan la oligomerización de los nucleosomas (Wang *et al.*, 2001; Igarashi *et al.*, 2010).

Además de interactuar con ácidos los nucleicos, las PAs también interactúan con fosfolípidos de la membrana celular. Se ha propuesto que la unión de Spd y Spm incrementan la rigidez de la membrana a través de la formación de complejos con fosfolípidos y proteínas (Wallace *et al.*, 2003). También se ha demostrado la interacción de las PAs con proteínas del fotosistema II, particularmente con los grupos C=O, N-H y C-N. Dichas interacciones afectan la estructura y dinámica de estas proteínas, ejerciendo así diferentes efectos en el aparato fotosintético (Hamdani *et al.*, 2011).

1.2. La biosíntesis de las poliaminas

El primer paso para la biosíntesis de las PAs es la formación de Put. La Put puede ser sintetizada directamente a partir de ornitina por la ornitina descarboxilasa (ODC; EC 4.1.1.17) o de arginina a través de varios pasos catalizados por la arginina descarboxilasa (ADC; EC 4.1.1.19), la agmatina iminohidrolasa (AIH; EC 3.5.3.12) y la N-carbamoylputrecina amidohidrolasa (NCPAH; EC 3.5.1.53). La ruta de la ODC predomina en los mamíferos y los hongos, mientras que la ruta de la ADC solo está presente en las plantas y en algunas bacterias. Una vez sintetizada la Put, es sucesivamente convertida a Spd y Spm por acción de la espermidina sintasa (SPDS; EC 2.5.1.16) y la espermina sintasa (SPMS; EC 2.5.1.22), respectivamente (Fig. 2). Estas reacciones involucran la adición de grupos

aminopropilo, los cuales son suplementados por la S-adenosilmetionina descarboxilada (dcSAM) cuya descarboxilación es mediada por la S-adenosilmetionina descarboxilasa (SAMDC; EC4.1.1.50) (Fuell *et al.*, 2010; Tavladoraki *et al.*, 2012).

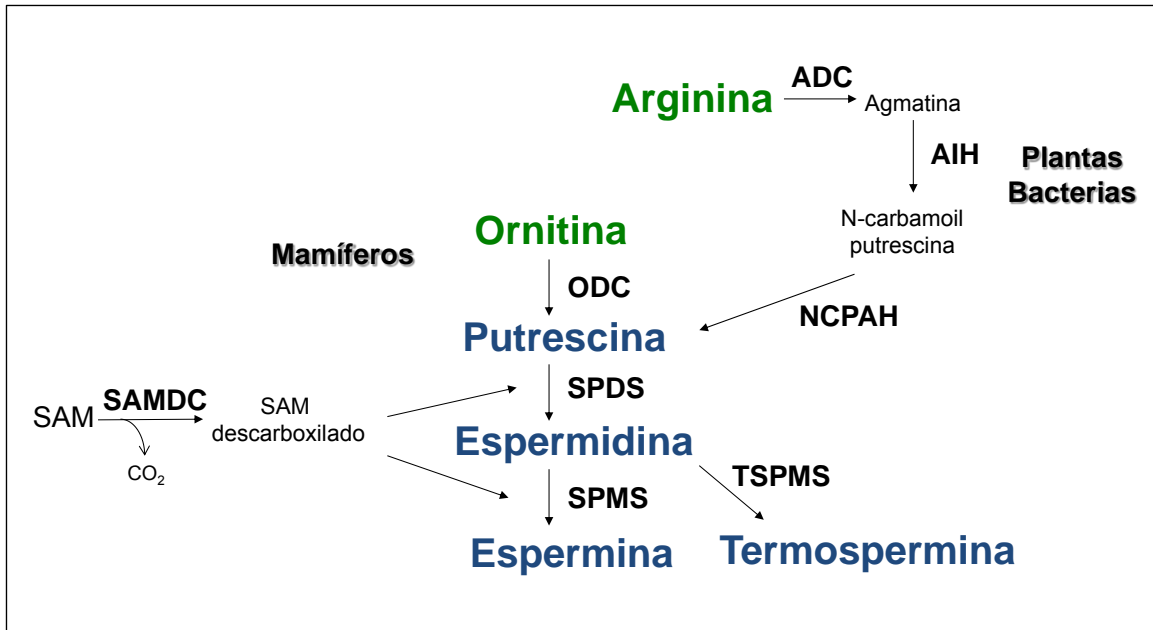


Figura 2. La ruta de la biosíntesis de las poliaminas. ADC, arginina descarboxilasa; AIH, agmatina iminohidrolasa; NCPAH, N-carbamoil-putrescina amidohidrolasa; ODC, ornitina descarboxilasa; SAMDC, S-adenosilmetionina descarboxilasa; SPDS, espermidina sintasa; SPMS, espermina sintasa; TSPMS, termoesperimina sintasa.

Las PAs pueden encontrarse de manera libre o conjugada a ácidos orgánicos como el cumárico, el ferúlico, y el caféico. Adicionalmente, pueden existir en fracciones insolubles unidas a macromoléculas como las proteínas, los polisacáridos de la pared celular y a la membrana plasmática (Martin-Tanguy, 2001; Bassard *et al.*, 2010).

La conjugación de las PAs con ácidos fenólicos reduce significativamente su polaridad e hidrofobicidad favoreciendo así su translocación, estabilidad y compartimentalización (Bassard *et al.*, 2010). En *Arabidopsis* se han identificado algunos de los genes que codifican para las enzimas encargadas de la formación de conjugados de Spd (Grienenberger *et al.*, 2009; Luo *et al.*, 2009). Sin embargo, aún no se han identificado aquellas enzimas implicadas en la formación de los

conjugados con las otras PAs (Alcázar *et al.*, 2010). Las PAs conjugadas han sido implicadas en el desarrollo floral, el desarrollo y la maduración de la semilla, el reforzamiento de la pared celular, así como en la respuesta al estrés biótico y abiótico (Muroi *et al.*, 2009; Bassard *et al.*, 2010).

1.3. Los papeles fisiológicos de las poliaminas

Las primeras evidencias de las funciones celulares de las PAS se obtuvieron gracias al empleo de inhibidores irreversibles de las enzimas biosintéticas ODC y ADC como son la α -difluorometilornitina (DFMO) y la difluometilarginina (DFMA), respectivamente; la ciclohexilamina (CHA), un inhibidor competitivo de la SPDS; y la metilglioxal bis(guanilhidrazona) (MGBG), un inhibidor de la SAMDC. Si bien, estos inhibidores son poco estables o inespecíficos, su empleo ha facilitado el conocimiento que ahora se tiene sobre los procesos fisiológicos en los que están implicadas las PAs (Mirza *et al.*, 1991; Berta *et al.*, 1997).

En las plantas, las PAs están presentes en todos los compartimentos celulares, incluyendo el núcleo, sugiriendo así su participación en diversos procesos celulares fundamentales. Se han encontrado cambios importantes en el metabolismo de PAs durante la respuesta de las plantas ante diversos estreses ambientales que incluyen el estrés oxidativo, la sequía, la salinidad y el frío. La habilidad de las plantas para hacer frente a las condiciones de estrés se correlaciona con su capacidad para acumular PAs (Kasinathan y Wingler, 2004; Pandolfi *et al.*, 2010). La expresión de los genes biosintéticos de las PAs (*ADC2*, *SPMS*, *SAMDC2*) es inducida por uno o más estreses abióticos (revisado por Alcázar *et al.*, 2010). Además, una gran cantidad de estudios muestra que la aplicación exógena de PAs estabiliza las membranas celulares, protegiéndolas de los daños causados por el estrés. Un ejemplo de ello, es la aplicación de PAs, principalmente Spm, durante el estrés inducido por la senescencia, la cual previene la pérdida de la clorofila y protege las membranas tilacoidales (Ioannidis y Kotzabasis, 2007).

El conocimiento del genoma completo de algunas plantas ha facilitado la identificación y el aislamiento de los genes de la biosíntesis de las PAs. Por lo anterior, ahora se sabe que muchos genes biosintéticos de las PAs se encuentran duplicados en algunas plantas, incluyendo *A. thaliana* (Urano *et al.*, 2005; Fuell *et al.*, 2010; Peremarti *et al.*, 2010). Lo anterior, sugiere una ventaja evolutiva ya que los genes duplicados pueden tener patrones de expresión diferentes, como especificidad para un tejido o un estrés (Hummel *et al.*, 2004).

Los estudios genéticos y moleculares han contribuido a un mejor entendimiento de las funciones celulares de las PAs. En este sentido, se sabe que la Spd es esencial para la viabilidad celular, ya que las mutantes dobles de los genes *ADC1/ADC2*, *SPDS1/SPDS2* y *SAMDC1/SAMDC4* son letales en el estado embrionario en *A. thaliana* (Imai *et al.*, 2004; Urano *et al.*, 2005; Ge *et al.*, 2006). Una de las razones por la que la Put/Spd es requerida para la embriogénesis de las plantas, es porque la Spd es requerida para la modificación post-traducciona de una lisina del factor eIF5A, para producir el aminoácido hipusina. Esta modificación es indispensable para el inicio de la traducción en los eucariontes (Park *et al.*, 2010). Por otro lado, las plantas deficientes en Spm no muestra defectos en el crecimiento (Imai *et al.*, 2004), mientras que la deficiencia en termoespermina (TSpm), isómero estructural de la Spm, causa un severo fenotipo de enanismo y la proliferación excesiva del xilema de la planta (Hanzawa *et al.*, 2000).

Los estudios moleculares de pérdida y/o ganancia de función de los genes biosintéticos de las PAs han provisto evidencias del papel protector de dichas aminos durante las condiciones de estrés. El progreso en el conocimiento de las funciones moleculares de las PAs ha facilitado la generación de plantas transgénicas resistentes a diferentes tipos de estres. Por ejemplo, la sobre-expresión heteróloga de los genes *ODC*, *ADC*, *SAMDC* y *SPDS* en plantas como el arroz (*Oryza sativa* L.), el tabaco y el tomate ha resultado en una mayor tolerancia a las diversas condiciones de estrés (revisado por Alcázar *et al.*, 2010).

En donde la tolerancia generalmente está asociada con niveles elevados de Put y/o Spd y Spm. Por mencionar un ejemplo, la sobre-expresión del gen de la

SPDS del chilacayote (*Cucurbita ficifolia* Bouché) en *Arabidopsis* causa un incremento en los niveles de Spd lo que conlleva a un aumento en la tolerancia de las plantas a varios tipos de estrés que incluyen el congelamiento, la salinidad, la sequía y la toxicidad por paraquat (Kasukabe *et al.*, 2004), este último ampliamente utilizado para inducir un estrés oxidativo en las plantas.

Los resultados obtenidos en los estudios de pérdida de función de los genes de biosíntesis de las PAs apoyan el efecto protector de las poliaminas durante el estrés. Por citar un ejemplo, plantas mutantes *acl5/spms* de *Arabidopsis* que no producen Spm son hipersensibles a la alta salinidad y la sequía, y el fenotipo es mitigado por la aplicación exógena de Spm (Kusano *et al.*, 2007). Las líneas mutantes insercionales *adc2-1* en donde el contenido de Put se ve disminuido hasta en un 75%, son más sensibles al estrés salino, mientras que el daño inducido por el estrés es parcialmente revertido por la adición exógena de Put (Urano *et al.*, 2004).

Por otro lado, existe una gran cantidad de evidencias que demuestran la implicación de las PAs en la respuesta de defensa de la planta al ataque de los patógenos. Sin embargo, los mecanismos moleculares de como ejercen su efecto aún no están bien entendidos. Esto se debe en parte a que la concentración de las PAs totales y la proporción de las PAs individuales varía dependiendo de la especie de la planta, del tejido y del patosistema en estudio (Marina *et al.*, 2008). En general, durante el ataque de un patógeno, las plantas experimentan cambios importantes en el metabolismo de PAs (Walters, 2003). Los niveles de las PAs libres y las conjugadas, así como la actividad de las enzimas de la biosíntesis y del catabolismo de las PAs incrementan durante la respuesta hipersensible en cebada (*Hordeum vulgare* L.) al patógeno *Blumeria graminis* f. sp. *hordei* (Cowley y Walters, 2002). Además, incrementos en los niveles de Put y Spd libres fueron observados en las plantas de cebada resistentes al ataque del patógeno (Asthir *et al.*, 2004). Plantas de *Arabidopsis* infectadas con *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 muestran un incremento significativo en la expresión de *ADC2* y en los niveles de Put, así como en la expresión del gen *PR-1a*. Consistentemente, las plantas mutantes *adc2* inoculadas con el patógeno, mostraron una

disminución en los niveles de Put y en la expresión de *PR-1a*, y fueron más sensibles al patógeno (Kim *et al.*, 2013). Debido a que la *PR-1a* es considerada un marcador de la ruta de señalización del ácido salicílico, la Put pudiera estar implicada en la respuesta de defensa mediada por ácido salicílico (Kim *et al.*, 2013).

Durante la interacción de las plantas con los patógenos, ocurre un incremento rápido en los niveles de Spd y/o Spm en el apoplasto. Se ha sugerido que la Spm actúa como una molécula de señalización activando la expresión de los genes relacionados a patogénesis e induce la respuesta hipersensible (Yamakawa *et al.*, 1998; Kusano *et al.*, 2007). Recientemente, se ha postulado que la interacción de las enzimas de la biosíntesis de las PAs con las proteínas efectoras de los patógenos podría ser una estrategia de la planta para activar las respuestas de defensa (Kim *et al.*, 2013). Estos ejemplos, ilustran el papel de las PAs en las respuestas de la planta a diversos factores estresantes.

1.4. La regulación de los niveles intracelulares de las poliaminas

Aunque las PAs son detectadas preferencialmente en los tejidos vegetales en crecimiento, su concentración varía dependiendo de la especie, el órgano, el tejido y del estadio del desarrollo de la planta (Galston y Sawhney, 1990). La homeostasis de las PAs correlaciona con varios procesos fisiológicos fundamentales en las plantas, incluyendo el control en el balance N:C, el ciclo celular, la diferenciación del xilema, la fluidez de la membrana y la respuesta al estrés (Moschou *et al.*, 2012). Debido a su importancia biológica, los niveles intracelulares de las PAs se mantienen a través de un control estricto en la biosíntesis, el transporte y el catabolismo.

1.4.1 La regulación de la biosíntesis de las poliaminas

1.4.1.1 La Ornitina descarboxilasa

La biosíntesis de las PAs es regulada a diferentes niveles que incluyen la expresión génica, la síntesis de proteínas y la formación de complejos multi-enzimáticos. En los mamíferos, la ODC es considerada la enzima limitante en la síntesis de las PAs. El gen de la *ODC* es regulado a nivel transcripcional a través de elementos localizados en su región promotora, los cuales se activan en respuesta a diversos estímulos y factores de crecimiento (Bellofernandez *et al.*, 1993). Los genes *ODC* de las plantas también están sujetos a regulación transcripcional bajo estímulos diferentes y por la aplicación de hormonas como las auxinas, las giberelinas y el ácido jasmónico (Carbonell y Blázquez, 2009). En este sentido, se ha sugerido que la regulación de la *ODC* por ácido jasmónico es mediada por cajas-G localizadas en su promotor (Xu *et al.*, 2004).

Por otro lado, el 5'-UTR de la *ODC* de ratón es rico en G+C, lo que le confiere una fuerte estructura secundaria, y además contiene un marco de lectura abierta río arriba del ORF principal (uORF, upstream Open Reading Frame) (Shantz *et al.*, 1996; Ivanov *et al.*, 2008). Experimentos *in vitro* han mostrado que tanto la estructura secundaria del 5'UTR como el uORF de la *ODC* contribuyen en la represión de la traducción cuando son fusionados a los genes reporteros (Shantz *et al.*, 1996). Los uORFs constituyen un importante mecanismo de regulación traduccional, previniendo generalmente que la maquinaria ribosomal inicie la traducción en el codón AUG del ORF principal (Wilkie *et al.*, 2003; Iacono *et al.*, 2005; Kozak, 2005).

La traducción de la *ODC* de los mamíferos es influenciada por los niveles de las PAs. Sin embargo, el mecanismo exacto por el cual las PAs regulan la traducción de la *ODC* aún es desconocido (Perez-Leal y Merali, 2012). Diferentes estudios han sugerido que ciertos factores que actúan en *trans* regulan la interacción entre las regiones 5' y 3'-UTR de la *ODC*, y que esta interacción podría contribuir al control traduccional de la *ODC* mediado por las PAs (Lorenzini y Scheffler, 1997). Manzella y Blackshear (1992) reportaron que una proteína de función desconocida interactúa con el 5'-UTR de la *ODC*. No obstante, dicha proteína permanece unida al mRNA de la *ODC* independientemente de los niveles

de PAs, por lo que se desconoce si esta interacción ejerce algún efecto en la traducción de la ODC.

En comparación con muchas enzimas de los mamíferos cuyas vidas medias frecuentemente son largas (días), la ODC tiene una vida media corta (10 min-1 h) (Wallace *et al.*, 2003). Este recambio rápido permitiría a la ODC responder rápidamente a diferentes estímulos regulatorios.

La ODC de ratón contiene dos regiones de degradación ricas en prolina, ácido glutámico, ácido aspártico, serina y treonina, conocidas como sitios PEST (Rogers *et al.*, 1986; Ghoda *et al.*, 1989). El primer sitio PEST se localiza entre los aminoácidos 298 a 333, y el segundo se localiza en el extremo C-terminal entre los aminoácidos 423 a 449. La región PEST localizada en el C-terminal de la ODC es esencial para la degradación de la enzima, y la eliminación o la mutación de dicha región resulta en la estabilización de la enzima (Ghoda *et al.*, 1989).

La actividad de la ODC depende de la formación de un homodímero en el sitio activo, que ocurre entre la interface de las dos subunidades. En los eucariontes, el mecanismo principal de regulación post-traducciona l de la ODC es mediado por una proteína conocida como la anti enzima (Hayashi *et al.*, 1996). La anti enzima inhibe a la ODC previniendo su dimerización y promoviendo su degradación vía el proteasoma 26S independiente de la ubiquitina (Murakami *et al.*, 1992). Además, la anti enzima también bloquea el transporte de las PAs (Hoshino *et al.*, 2005).

A su vez, la síntesis de la anti enzima es regulada a nivel traduccional de una manera dependiente de los niveles de PAs. En la mayoría de los casos, la anti enzima es codificada por dos ORFs parcialmente sobrelapados: el ORF1 codifica los primeros 68 aminoácidos, y el ORF2 codifica el resto pero en un marco de lectura desfasado +1 con respecto al ORF1. Cuando los niveles de las PAs son altos, para producir la proteína funcional de la anti enzima, debe ocurrir un desplazamiento por parte de los ribosomas al marco de lectura +1 antes de leer el codón de paro del ORF1 (Perez-Leal y Merali, 2012). El mecanismo exacto por el cual las PAs promueven el desplazamiento en el marco de lectura aún no es claro. Sin embargo, se sabe que un tallo y un pseudonudo, constituidos por los

nucleótidos circundando el codón de paro del ORF1, son necesarios para que ocurra el desplazamiento en el marco de lectura (Perez-Leal y Merali, 2012). Un estudio reciente, mostró que mientras el desplazamiento en el marco de lectura solo causa una pausa traduccional y reduce la velocidad de traducción, la unión de las PAs al péptido naciente (ORF1) de la antienzima promueve la terminación de su síntesis (Kurian *et al.*, 2011). Además, Rato y colaboradores (2011) reportaron que Put y Spm, pero no Spd, muestran una estimulación cooperativa en el desplazamiento en el marco de lectura y la existencia de múltiples sitios de unión al ribosoma.

A diferencia de otros eucariontes, la antienzima no ha sido identificada en las plantas. Por lo que se desconoce si este mecanismo de regulación traduccional dependiente de las PAs puede ser o no funcional en las plantas (Takano *et al.*, 2012).

Por otro lado, en los mamíferos se ha reportado que la antienzima también es regulada negativamente por una proteína llamada inhibidor de la antienzima (AZI). El inhibidor de la antienzima es un homólogo de la ODC que ha perdido la actividad de descarboxilación. La unión entre AZI y la antienzima es incluso más fuerte que entre ODC y la antienzima. Como resultado, AZI tiende a secuestrar a la antienzima lo que permite tener más ODC libre, por lo tanto se tiene actividad mayor de ODC y se incrementan los niveles de las PAs (Ivanov *et al.*, 2010).

Una evidencia reciente sugiere que AZI puede ser regulado por uORFs con propiedades inusuales, es decir con codones de inicio no-AUG. Ivanov y colaboradores (2008) identificaron en el 5'-UTR de AZI regiones conservadas río arriba (uCCs, upstream Conserved Coding regions) que reprimen la traducción del ORF principal. Dicha represión se incrementa en la presencia de niveles elevados de Spd y depende de la secuencia de aminoácidos cercana al C-terminal. Además, el inicio de la traducción en codones no-AUG, como AUU principalmente, de las regiones uCC incrementa en presencia de Spd. Por tanto, características como los codones no-AUG de las regiones uCC y la secuencia de aminoácidos cercana al C-terminal, son componentes clave de la regulación traduccional dependiente de las PAs (Ivanov *et al.*, 2008; 2010).

1.4.1.2 La Arginina descarboxilasa

Los genes *ADC* son regulados transcripcionalmente en respuesta a diferentes estímulos ambientales que incluyen la sequía, el frío y la salinidad, así como por hormonas como el ácido abscísico y el metil jasmonato (Alcázar *et al.*, 2010). En particular, los genes *ADC* de *Arabidopsis* son expresados diferencialmente, por un lado, *ADC1* se expresa en todos los tejidos, mientras que *ADC2* se expresa principalmente en hojas caulinares y silicuas. Además, cada uno es inducido por diferentes estreses ambientales (Perez-Amador *et al.*, 2002; Urano *et al.*, 2004). En *Escherichia coli*, el gen *speA*, que codifica para la *ADC*, es regulado transcripcionalmente por Put y Spd, así como por la concentración de ADC (Tabor y Tabor, 1969). El control transcripcional no es el único nivel de regulación de esta enzima.

En la planta de clavel, el 5'-UTR contiene un uORF que codifica el heptapéptido MQKSLHI, que inhibe la traducción del ORF principal en *cis* y *trans* (Chang *et al.*, 2000). Los uORFs también han sido identificados en los genes *ADC* del arroz, *Arabidopsis*, la mostaza, *Pringlea antiscorbutica*, el tabaco, *Datura stramonium* y la manzana (Peremarti *et al.*, 2010). Adicionalmente, la *ADC* está sujeta a mecanismos de regulación post-traduccionales. Borrell y colaboradores (1996) reportaron que la *ADC* de la avena es sintetizada como un precursor que después es escindido en dos péptidos pequeños. Dicho proceso proteolítico es inhibido por la aplicación exógena de Spm (Borrell *et al.*, 1996). La *ADC* de la vid (*Vitis vinifera* L.) también es sintetizada como un precursor de ~80 kDa, y se ha sugerido que la propia *ADC* tendría una actividad proteolítica, como un mecanismo autoregulatorio, la cual posiblemente modula post-traduccionalmente los niveles y/o la actividad de la *ADC* (Primikiriou y Roubelakis-Angelakis, 2001).

1.4.1.3 La S-adenosilmetionina descarboxilasa

A nivel transcripcional, la regulación más relevante reportada para los genes *SAMDC* es su inducción por la luz en *Pharbitis nil*, en la cual la señalización por

calcio también parece estar involucrada (Yoshida *et al.*, 2002). Además, la expresión de los genes *SAMDC* es inducida principalmente por factores abióticos como las altas concentraciones de ozono, el frío, la sequía y la salinidad (revisado por Carbonell y Blázquez, 2009). En concordancia con el hecho de que la *SAMDC* es un componente regulatorio esencial en la ruta de biosíntesis de las PAs, los genes *SAMDC* están sujetos a una fuerte regulación traduccional mediada por PAs. En el caso de los mamíferos, el mRNA de la *SAMDC* tiene un uORF que se localiza a 14 pb río abajo del 5'-cap y es necesario para mantener el control traduccional dependiente de las PAs. El uORF codifica el hexapéptido MAGDIS, responsable de la represión traduccional (Raney *et al.*, 2000). Los ribosomas que inician la traducción de este péptido quedan estancados antes de llegar al codón de término del uORF. Se ha sugerido que el término de la traducción del péptido MAGDIS se ve impedido por la interacción entre el tRNA-Ser y MAGDIS, causando el estancamiento del ribosoma; y que la estabilidad de los conjugados peptidil-tRNA se incrementa cuando los niveles de PAs son elevados (Law *et al.*, 2001; Raney *et al.*, 2002). El mRNA de la *SAMDC* de las plantas también es regulado por las PAs. La región 5'-UTR de los transcritos *SAMDC* de las plantas contiene dos uORF, el 5'-"tiny" y el 3'-"small", los cuales se sobrelapan por un nucleótido y controlan la traducción de la *SAMDC1* en una manera dependiente de los niveles de PAs (Franceschetti *et al.*, 2001; Hanfrey *et al.*, 2005; Ivanov *et al.*, 2010).

Finalmente, la *SAMDC* de humano que tiene una secuencia PEST, muestra una vida media corta y presenta una degradación mediada por el proteasoma 26S (Yerlikaya y Stanley, 2004). Las secuencias PEST en la *SAMDC* de las plantas también han sido identificadas (Tian *et al.*, 2004). Como en las bacterias y los mamíferos, la *SAMDC* de la papa es sintetizada como un precursor que sufre un corte proteolítico para generar dos subunidades que constituyen la forma activa de la enzima (Tiburcio *et al.*, 1997). En mamíferos, dicho corte autocatalítico es estimulado por Put, mientras que en la mayoría de las plantas las *SAMDCs* son monómeros que muestran una autocatálisis de activación que no depende de los niveles de Put (Bennett *et al.*, 2002).

1.4.1.4 La Espermidina sintasa y la Espermina sintasa

En muchas plantas dicotiledóneas, la SPDS es codificada por dos genes parálogos con estructuras exón-intrón conservadas (Rodríguez-Kessler *et al.*, 2010). La expresión de ambos genes está sujeta a regulación por diversos factores entre ellos el estrés hídrico, así como por el tejido y las etapas del desarrollo (Alcázar *et al.*, 2010). Otro ejemplo de regulación es la del gen *SPDS2* de manzana, el cual presenta dos variantes de “splicing” (empalme de exones), una identificada preferencialmente en las hojas maduras, y la otra en los tejidos en desarrollo (Zhang *et al.*, 2003). Adicionalmente, se ha sugerido que la SPDS de humano y de otros mamíferos pudiera estar sujeta a regulación traduccional, ya que se ha identificado en su 5'-UTR un uORF que sobrelapa por 70 pb el ORF de la *SPDS* (Ivanov *et al.*, 2010). Estos autores también detectaron en todos los mRNAs de *SPMS* de vertebrados un uORF que sobrelapa con el ORF principal y sugieren que si el uORF de la *SPMS* es un sensor de las PAs, el efector muy probablemente sería la Spm. Por otra parte, Panicot y colaboradores (2002) reportaron que *SPDS1* y *SPDS2* interactúan físicamente con *SPMS*. Recientemente, se ha sugerido que estos complejos heterodiméricos (*SPDS1*, *SPDS2* y *SPMS*) se localizan principalmente en el núcleo (Belda-Palazón *et al.*, 2012). La formación de un metabolon entre las aminopropil transferasas podría constituir un nuevo nivel de regulación en la biosíntesis de PAs, aunque aún no existe evidencia fisiológica que apoye esta posibilidad (Carbonell y Blázquez, 2009).

1.4.2 El catabolismo de las poliaminas

La oxidación es la principal ruta catabólica de las PAs, y se lleva a cabo a través de la actividad de las diamino oxidasas (DAOs; EC 1.4.3.6) y por las poliamino oxidasas (PAOs; EC 1.5.3.3). Las DAOs son homodímeros en los cuales cada subunidad de 70-90 kDa contiene un ion cobre y una 2,4,5 trihidroxifenilalanina quinona como cofactor. Las DAOs de las plantas oxidan preferencialmente a las

diaminas Put y Cad en el grupo amino primario produciendo 4-aminobutanal (el cual se cicla espontáneamente a Δ^1 pirrolina), peróxido de hidrogeno (H_2O_2) y amoniaco (NH_3), (Fig. 3). Aunque las DAOs caracterizadas a la fecha presentan principalmente una localización apoplástica en las plantas, recientemente Planas-Portell y colaboradores (2013) reportaron que las proteínas AtCuAO2 y AtCuAO3 de *A. thaliana* se localizan en el peroxisoma, en donde catalizan la oxidación de Put y Spd.

Las poliamino oxidasas dependientes de flavín adenín dinucleótido (FAD) catabolizan la desaminación oxidativa de Spd y Spm. Dos tipos de catabolismo de PAs mediado por las PAOs de las plantas han sido descritos: el terminal y el de inter-conversión. En el primero, que ocurre en el apoplasto, las PAOs oxidan el carbono en el lado-*endo* del nitrógeno- N^4 de la Spd y la Spm produciendo 4-aminobutanal y N-(3-aminopropil)-4-aminobutanal, respectivamente, además de 1,3 diaminopropano (DAP) y H_2O_2 (Fig. 3). Por otro lado, el catabolismo de inter-conversión es una ruta intracelular en la cual las PAOs oxidan el carbono en el lado-*exo* de la Spd y la Spm, generando Put o Spd, respectivamente, además de H_2O_2 y un aminoaldehído (Fig. 3) (Angelini *et al.*, 2010; Takahashi *et al.*, 2010; Fincato *et al.*, 2011; Ono *et al.*, 2012).

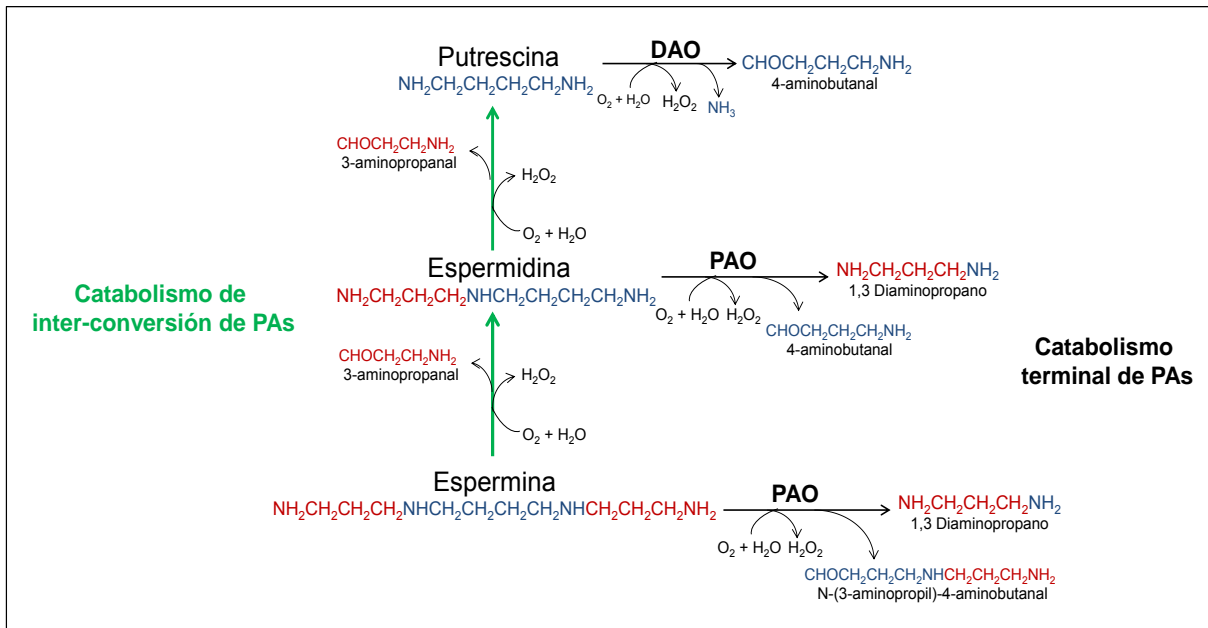


Figura 3. Rutas catabólicas de las poliaminas. DAO, diamino oxida; PAO, poliamino oxidasa.

Además de mantener la homeóstasis de las PAs, los productos del catabolismo de las PAs ejercen funciones esenciales en diversos procesos biológicos. En particular, el H_2O_2 derivado del catabolismo de las PAs participa en el desarrollo del tubo polínico, en el cierre estomático, la señalización, así como en la inducción de la muerte celular programada en respuesta al estrés (Moschou *et al.*, 2008; Wu *et al.*, 2010; Wimalasekera *et al.*, 2011; Hou *et al.*, 2013). El 4-aminobutanal derivado de la oxidación de Put y Spd puede ser metabolizado a ácido γ -amino butírico (GABA) a través de la acción de una amino aldehído deshidrogenasa (AMADH; EC 1.2.1.19) (Bouché y Fromm, 2004; Cona *et al.*, 2006). El GABA está asociado a procesos fisiológicos como en la regulación del pH citosólico, en el flujo de carbono dentro del ciclo de los ácidos tricarbónicos, en la defensa contra los insectos, la señalización, la protección contra el estrés oxidativo, la nodulación y en la respuesta al estrés abiótico (Angelini *et al.*, 2010; Sulieman y Schulze, 2010). El DAP, es precursor de las PAs no comunes norspermidina y norspermina, que están asociadas a la tolerancia al estrés (Cona *et al.*, 2006). Recientemente, Kakeni y colaboradores (2010) reportaron que la

aplicación exógena de noespermina (Nor-spm) revierte el fenotipo de enanismo de las plantas mutantes *acl5/spms* de *Arabidopsis*.

En las plantas, una de las primeras PAO en ser caracterizada fue la de maíz, la ZmPAO. La ZmPAO es una enzima apoplastica que oxida a la Spd y Spm a través del catabolismo terminal (revisado por Angelini *et al.*, 2010).

En la actualidad, diversos estudios muestran una asociación entre la activación del catabolismo de las PAs y las respuestas de las plantas a las condiciones ambientales desfavorables. A su vez, los genes de DAOs y PAOs son inducidos durante el estrés, así como por las hormonas relacionadas al estrés (revisado por Tavladoraki *et al.*, 2012).

Las investigaciones basadas en el empleo de inhibidores de las PAOs así como de plantas transgénicas sugieren que H₂O₂ derivado del catabolismo de las PAs en el apoplasto y/o las PAs apoplasticas inducen las cascadas de señalización que conducen a la expresión de los genes implicados en la respuesta al estrés (Tavladoraki *et al.*, 2012). En este sentido, Kusano y colaboradores (2008) reportaron que la aplicación exógena de Spm a las hojas de tabaco, incrementa la expresión de los genes marcadores de la respuesta hipersensible, un efecto que es suprimido por la aplicación de inhibidores de la DAO y la PAO.

A. thaliana posee en su genoma cinco genes que codifican para PAOs, *AtPAO1-5*. Debido a que los genes *AtPAO2-4* presentan la misma organización intrón-exón y a que la posición de los ocho intrones se encuentra altamente conservada, se ha propuesto que esta subfamilia de genes son derivados recientes de un ancestro común (Fincato *et al.*, 2011). En contraste, *AtPAO1* muestra una organización intrón-exón diferente, y *AtPAO5* carece de intrones. Cada miembro de la familia de genes *AtPAO* muestra diferentes patrones de expresión. En particular, *AtPAO1* es altamente expresado entre la zona meristemática y de elongación de la raíz, y en las anteras. *AtPAO2* se expresa principalmente en estadios tardíos del desarrollo, específicamente en las zonas meristemática del ápice y la raíz, en las estipulas y en las hojas de la roseta; mientras que *AtPAO3* se detecta principalmente en los estadios tempranos, los tricomas, las células guarda, y en el borde de las hojas de la roseta. *AtPAO4* se

expresa fuertemente en la raíz y en los tejidos de la flor, excepto en los pétalos. Finalmente, la expresión de *AtPAO5* se detecta en toda la planta, excepto en los pétalos y anteras (Takahashi *et al.*, 2010; Fincato *et al.*, 2012). En general, los patrones de expresión diferencial sugieren una diversidad funcional dentro de la familia de los genes *PAO* de *A. thaliana*.

Las proteínas *AtPAO2*, *AtPAO3* y *AtPAO4* mantienen una alta identidad entre ellas además, las tres se localizan en el peroxisoma; mientras que *AtPAO1* y *AtPAO5* se localizan en el citoplasma (Tavladoraki *et al.*, 2006; Kamada-Nobusada *et al.*, 2008; Moschou *et al.*, 2008; Fincato *et al.*, 2011). En los últimos años, se ha descrito que *AtPAO1*, -2, -3 y -4 están implicadas en el catabolismo de las PAs a través de la ruta de inter-conversión, aunque *AtPAO1* también es capaz de oxidar Spm a través de la ruta del catabolismo terminal (Moschou *et al.*, 2008; Takahashi *et al.*, 2010; Fincato *et al.*, 2011). A pesar de la elevada identidad entre *AtPAO2*, *AtPAO3* y *AtPAO4*, las tres muestran diferencias importantes en la especificidad del sustrato, lo que sugiere distintos papeles fisiológicos. Aunque *AtPAO2* y *AtPAO3* muestran mayor afinidad por Spd, también son capaces de degradar Spm, TSpd y Nor-Spd; mientras que *AtPAO4* oxida preferencialmente a Spm (Takahashi *et al.*, 2010; Fincato *et al.*, 2011). Aunque se han hecho grandes esfuerzos para determinar la especificidad de la *AtPAO5* por su sustrato, aún no ha sido posible.

En un estudio reciente realizado, por Wu y colaboradores (2010) se demostró que el H₂O₂ derivado de la oxidación de la Spd por la *AtPAO3* peroxisomal induce incrementos en la concentración de Ca²⁺ citosólico. Los autores reportaron que el polen de las plantas mutantes *atpao3* es incapaz de inducir a los canales permeables a Ca²⁺ en la presencia de la Spd, resultando en un crecimiento reducido del tubo polínico y en el número de semillas. Recientemente, se demostró que las proteínas *AtPAO2* y *AtPAO4* se localizan en el núcleo, el citoplasma y en la pared celular de las células guarda; y que participan en el cierre estomático inducido por etileno (Hou *et al.*, 2012).

Las investigaciones enfocadas en el estudio de las PAOs, principalmente aquellas en *A. thaliana*, están incrementando rápidamente, sin embargo, sus

papeles fisiológicos específicos y los mecanismos de regulación aún no están bien entendidos. En este sentido, Hayden y Jorgensen (2007) reportaron que los transcritos *AtPAO2* y *AtPAO3* de *A. thaliana* presentan un uORF en su región 5'-UTR, sin embargo su función aún no ha sido demostrada.

1.5. La regulación de la traducción

La expresión génica es regulada en múltiples niveles que incluyen transcripcional y post-transcripcional. La regulación post-transcripcional ocurre a nivel del pre-RNA mensajero (mRNA), el procesamiento (adición del cap, "splicing", poliadenilación), la estabilidad, y la traducción del mRNA (Floris *et al.*, 2009). Comparado con el control transcripcional, el control traduccional de los mRNAs permite cambios más rápidos en la concentración de las proteínas, ejerciendo así un mayor impacto en el proteoma celular. Lo anterior, es de particular importancia en las plantas, donde las tasas de traducción deben responder rápidamente a las fluctuantes condiciones ambientales (Martínez-Salas *et al.*, 2012; Muench *et al.*, 2012).

El proceso de traducción se divide en iniciación, elongación, terminación y reciclamiento del ribosoma. Aunque la regulación de la traducción no se limita al inicio, es en esta etapa en la que se ejerce más control (Sonenberg y Hinnebusch, 2009).

La traducción de los mRNAs de las células eucariotas inicia con el reconocimiento del cap (m^7GpppG), localizado en el 5' terminal de los mRNAs. Este proceso de iniciación involucra un gran número de proteínas auxiliares llamadas factores de iniciación eucarióticos (eIFs). El reconocimiento del 5'cap es mediado por eIF4E, que a su vez se encuentra unido a la proteína eIF4G y a la helicasa de RNA eIF4A, en conjunto este complejo trimérico es conocido como eIF4F. Adicionalmente, el factor eIF4G interactúa con el eIF3 y con la proteína de unión al poli(A) (PABP), la cual se encuentra unida a la cola de poli(A) del mRNA. Por otro lado, la subunidad ribosomal asociada con el complejo ternario integrado por el eIF2-GTP y el Met-tRNA_i, lleva a la formación del complejo de pre-inicio 43S

que es estabilizado por eIF1A y eIF3. Seguido del ensamblaje del complejo 43S con el eIF4F-unido al mRNA, comienza el escaneo del 5'-UTR en dirección 5'-3' hasta encontrar el primer codón AUG, reconocido por apareamiento de bases con el anti-codón en el Met-tRNA^{iMet}, llevando así a la formación del complejo de iniciación 48S (Fig. 4). Es en ese momento cuando el eIF1 es desplazado y el eIF5 medía la hidrólisis del GTP unido al eIF2, uniendo así a la subunidad ribosomal 60S para dar lugar a la formación del ribosoma 80S que dará inicio a la síntesis del poli-péptido (Martínez-Salas *et al.*, 2012; Muench *et al.*, 2012).

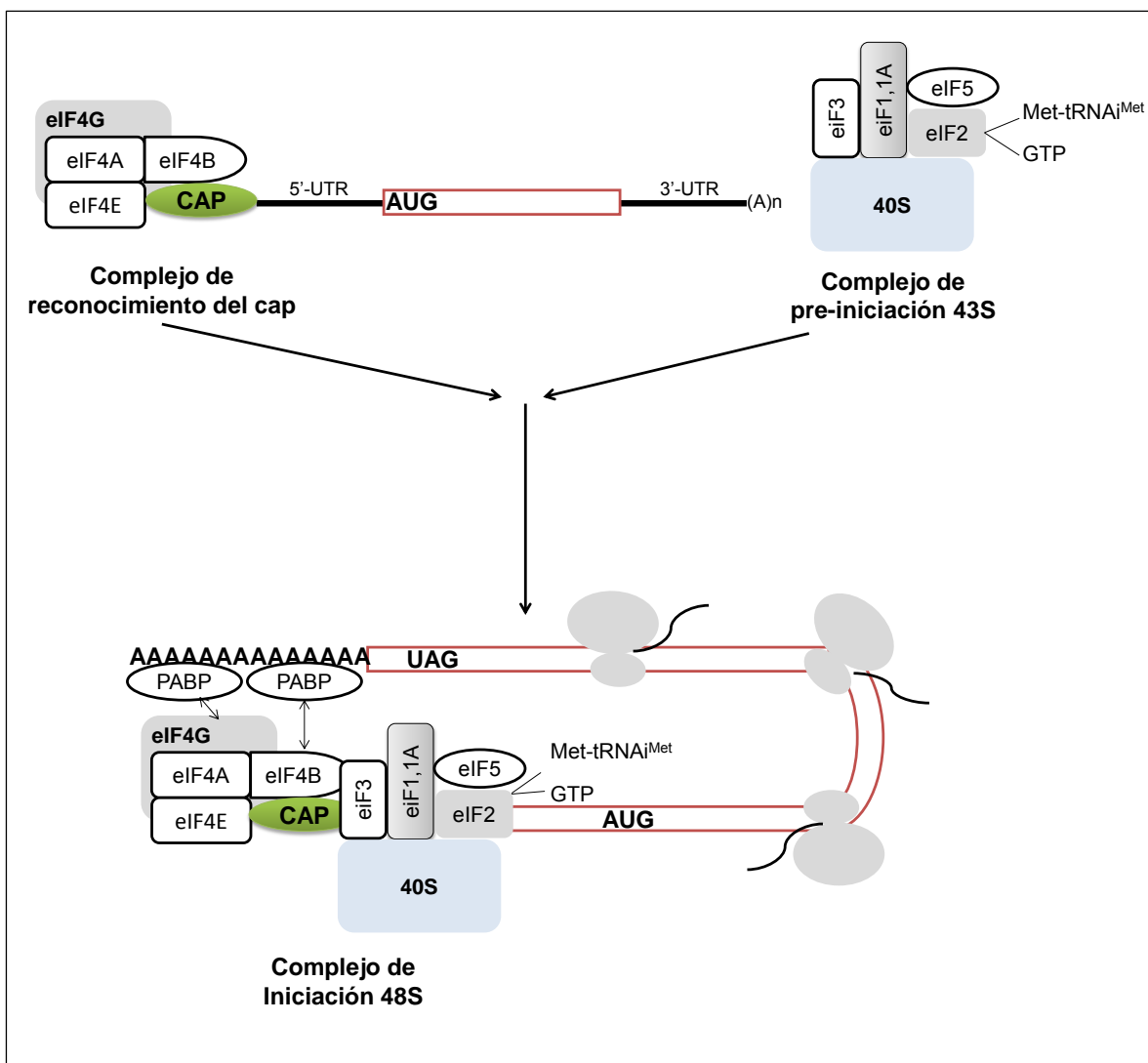


Figura 4. Representación de los complejos ribosomales implicados en el inicio de la traducción.

Para asegurar la fidelidad del inicio de la traducción, el complejo de pre-inicio debe tener mecanismos discriminatorios que prevengan el apareamiento parcial de tripletes en el 5'-UTR con el anti-codón Met-tRNA^{Met} y promuevan el correcto reconocimiento del codón de inicio. En general, se le considera como codón de inicio al primer triplete AUG que se localice en un contexto (nucleótidos circundando el codón AUG) óptimo, es decir, con una purina en la posición -3 y una guanina (G) en la posición +4 (relativa a la adenina (A) del condón AUG, la cual es designada como +1). Particularmente, en las plantas dicotiledóneas se determinó que el contexto óptimo es (A/G)AAAUGGC, mientras que en las monocotiledóneas es (G/A)CCAUGGC (Lukaszewicz *et al.*, 2000). A su vez, el factor eIF1 juega parte importante en mantener la fidelidad del inicio de la traducción, ya que éste ayuda al complejo 43S a discriminar entre tripletes no-AUG y tripletes AUG localizados en un contexto no-óptimo además de que disocia los complejos ribosomales que aberrantemente se ensamblan en tales tripletes (Pestova *et al.*, 1998; Jackson *et al.*, 2010).

Aun cuando muchas características de un mRNA pueden contribuir a su traducción, muchos de los elementos regulatorios se localizan en los UTRs. En general, la eficiencia traduccional es afectada por el contenido de G+C y la longitud de la región 5'-UTR. Además, los estudios a gran escala del mRNA han identificado elementos regulatorios en la región 5'-UTR que modulan la traducción, entre estos se encuentran los codones AUGs río arriba del ORF principal (uAUGs, upstream AUGs), el sitio interno de entrada al ribosoma (IRES), y los uORFs (Wilkie *et al.*, 2003; Iacono *et al.*, 2005; Kozak, 2005).

Un uORF está constituido de un codón uAUG, un codón de paro en el mismo marco de lectura que el uAUG y por al menos un codón diferente al de paro entre ambos (Calvo *et al.*, 2009). En los organismos procariontes y eucariontes los uORFs son considerados elementos regulatorios importantes, reduciendo en un 30-80% la síntesis de las proteínas (Calvo *et al.*, 2009). Hasta hace poco se consideraba que los uORFs con potencial de ser traducidos son aquellos que inician con un codón AUG. Sin embargo, en un estudio realizado en *Saccharomyces cerevisiae* por Ignolia y colaboradores (2009), se encontró que los

uORFs con codones de inicio diferentes a AUG también son traducidos. La traducción de estos uORFs es potenciada por ciertas características en el mRNA que facilitan su reconocimiento, entre estas un contexto óptimo y la presencia de estructuras terciarias estables río abajo del sitio de inicio no-AUG (Kochetov *et al.*, 2013).

Los análisis a gran escala del genoma y el transcriptoma han revelado que aproximadamente del 20-50% de los mRNAs eucarióticos contienen al menos un uORF (Kochetov *et al.*, 2002; Calvo *et al.*, 2009). En las plantas como *A. thaliana* y el arroz, se ha estimado que el 30% y el 24% de los transcritos presentan uORFs, respectivamente (Kochetov *et al.*, 2002; Hayden y Jorgensen 2007). Dichos elementos han sido identificados principalmente en los genes implicados en los procesos de desarrollo, el ciclo celular, el control transcripcional, la señalización y en la respuesta al estrés (Hanfrey *et al.*, 2005; Hu *et al.*, 2005; Hayden y Jorgensen, 2007; Rahmani *et al.*, 2009).

A pesar de que los uORFs se encuentran ampliamente distribuidos en los genomas procarióticos y eucarióticos, la función biológica de la mayoría de ellos aún es desconocida (Kochetov *et al.*, 2013).

Algunos de los uORFs caracterizados hasta ahora parecen ejercer su efecto inhibitorio independientemente de su secuencia de aminoácidos, mientras que algunos otros afectan la traducción del ORF principal de una manera dependiente de su secuencia (Lohmer *et al.*, 1993; Hanfrey *et al.*, 2005; Rahmani *et al.*, 2009). En las plantas, la importancia de la secuencia de aminoácidos codificados por el uORF ha sido demostrada en la regulación traduccional de los genes *bZIP11* y *SAMDC1* (Hanfrey *et al.*, 2005; Rahmani *et al.*, 2009).

Generalmente, la presencia de un uORF en el 5'-UTR resulta en la represión de la traducción del ORF principal, debido a que los ribosomas no pueden reiniciar la traducción después de traducir el uORF (Muench *et al.*, 2012). Sin embargo, en algunos mRNAs existen ciertos mecanismos que contrarrestan el efecto inhibitorio del uORF, los cuales involucran el re-inicio de la subunidad ribosomal 40S (Zhou *et al.*, 2010). Por ejemplo, el mRNA de la *SAMDC1* de las plantas, posee un par de uORFs, el "tiny" y el "small", los cuales modulan la

traducción de la SAMDC1. Cuando los niveles de Spd son altos, el complejo de pre-inicio 43S reconoce el AUG del “small” uORF, lo que resulta en su traducción y en la represión traduccional de la SAMDC1, disminuyendo así los niveles de las PAs. Por otro lado, cuando los niveles de PAs son bajos el complejo de pre-inicio reconoce el AUG del “tiny” uORF, y al término de su traducción los ribosomas reinician la traducción en el ORF de la SAMDC1 lo que resulta en el incremento en los niveles de las PAs (Hanfrey *et al.*, 2005; Ivanov *et al.*, 2010).

Se considera, que la eficiencia de re-inicio es alta cuando los uORFs son cortos, y que además depende de la secuencia dentro y cercana al uORF y de la distancia entre el codón de paro del uORF y el siguiente AUG (Kozak, 2002; Zhou *et al.*, 2010). De acuerdo a los datos experimentales, el re-inicio de la traducción puede ocurrir después de la traducción de péptidos de 5 a 28 aminoácidos, con una distancia inter-cistronica mínima de 50 nucleótidos (Roy *et al.*, 2010). La eficiencia de re-inicio de la traducción también depende de los factores de inicio implicados en la etapa inicial de la traducción (Pöyry *et al.*, 2004). En este sentido, se sabe que el factor eIF3h y la proteína ribosomal RPL24b están implicados en la competencia de re-inicio de los ribosomas en transcritos con uORFs (Kim *et al.*, 2007; Rahmani *et al.*, 2009; Roy *et al.*, 2010; Zhou *et al.*, 2010).

Para los uORFs que se ha demostrado experimentalmente su función regulatoria en la traducción, típicamente la región implicada en la regulación es de 10 a 20 aminoácidos (Ivanov *et al.*, 2008; Rahmani *et al.*, 2009). Resulta de vital interés la identificación de los uORFs con secuencias de aminoácidos conservados a lo largo de las especies, ya que esto pudiera estar ligado a un papel regulatorio, así como a una función dependiente de la secuencia de aminoácidos (Takahashi *et al.*, 2012). En las plantas, comparando genes ortólogos entre *A. thaliana* y el arroz, Hayden y Jorgensen (2007) identificaron 19 grupos de uORF con secuencia de aminoácidos conservada.

En la presente tesis Doctoral, con el objetivo de conocer si el uORF es una característica común en los genes de las poliamino oxidasas, realizamos un análisis *in silico* en los transcritos PAO identificados en 24 genomas de las plantas. A la fecha, el papel regulatorio de los uORFs en los genes PAO se

desconoce. Por ello, caracterizamos el uORF del gen *AtPAO2* de *A. thaliana*. La identificación de los uORFs en varios de los genes *PAO* sugiere que estos elementos juegan un importante papel regulatorio en el catabolismo de las poliaminas.

II. OBJETIVO GENERAL

Determinar si el uORF de la *AtPAO2* constituye un mecanismo de regulación traduccional del gen *AtPAO2*.

Objetivos específicos:

1. Identificar a los genes ortólogos de *AtPAO2*, *AtPAO3* y *AtPAO4*.
2. Identificar a los uORFs en los genes *PAO* de las plantas y analizar *in silico* la secuencia de aminoácidos de los posibles péptidos codificados por los uORFs.
3. Generar líneas reporteras de *Arabidopsis* para evaluar el efecto del uORF de *AtPAO2* utilizando al gen reportero *GUS* bajo el promotor endógeno *AtPAO2* y el promotor constitutivo CaMV 35S.
4. Evaluar si los niveles de las poliaminas influyen en la regulación mediada por el uORF de *AtPAO2*.

III. CAPITULO I

El uORF, un mecanismo regulatorio de la poliamino oxidasa-2 de *Arabidopsis thaliana*

Maria L. Guerrero-González, Margarita Rodríguez-Kessler, Juan F. Jiménez-Bremont (2014). uORF, a regulatory mechanism of the *Arabidopsis* polyamine oxidase 2. *Molecular Biology Reporter*. DOI: DOI 10.1007/s11033-014-3098-5

uORF, a regulatory mechanism of the Arabidopsis polyamine oxidase 2

Maria L. Guerrero-González ·
Margarita Rodríguez-Kessler ·
Juan F. Jiménez-Bremont

Received: 20 April 2013 / Accepted: 4 January 2014
© Springer Science+Business Media Dordrecht 2014

Abstract The translational efficiency of an mRNA can be modulated by elements located in the 5'-untranslated region. The flavin-containing polyamine oxidases catabolize oxidative deamination of spermidine and spermine, thus contributing to polyamine homeostasis as well as diverse biological processes through their reaction products. In this study, we characterized the uORF of *AtPAO2* gene using the *GUS* reporter gene. Transgenic lines harboring the native *AtPAO2* promoter or the constitutive CaMV 35S promoter show that the uORF negatively affects GUS expression. Exogenous applications of PAs positively modulate GUS expression, thus alleviating the negative effect of *AtPAO2* uORF, while treatments with MGBG inhibitor show an opposite effect. Our data suggest that *AtPAO2* uORF regulatory mechanism is modulated by polyamines. In addition, we present a comparative *in silico* study of the uORFs identified in several plant transcripts encoding polyamine oxidases in both mono- and dicotyledonous plants as well as in the Bryophyte *Physcomitrella patens*. The polyamine oxidase uORF-encoded peptides are conserved among families and share conserved features

such as their position, length, and amino acid sequence. Our findings provide new insights into the regulatory mechanism of *polyamine oxidase* genes and encourage further exploration to assess the biological significance of uORFs in the polyamine catabolic pathway.

Keywords Polyamine oxidases · Post-transcriptional regulation · Spermidine · Upstream open reading frame

Abbreviations

mORF Main open reading frame
MGBG Methylglyoxal bis(guanylhydrazone)
PAO Polyamine oxidase
uORF Upstream open reading frame

Introduction

Translational control is a fundamental mechanism in the regulation of gene expression and contributes to diverse biological processes [1]. Many intrinsic features of an mRNA can contribute to its translation, such as the 5'-untranslated region (5'-UTR) size, its GC content, the presence of upstream start codons (uAUGs), and internal ribosome entry site (IRES) [2, 3]. Another element that has crucial roles in the translational control found in both prokaryotes and eukaryotes is the upstream open reading frame (uORF), a small open reading frame located upstream from the main coding region [1, 3]. These elements have been associated to genes that need to be finely regulated such as those involved in developmental processes, transcriptional control, signaling, and stress responses [4–7].

It has been estimated that 24–30 % of plant genes contain uORFs within their 5'-UTR [8]. Nevertheless, few

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s11033-014-3098-5) contains supplementary material, which is available to authorized users.

M. L. Guerrero-González · J. F. Jiménez-Bremont (✉)
Division de Biología Molecular, Instituto Potosino de
Investigación Científica y Tecnológica, Camino a la Presa de San
Jose 2055, AP 3-74 Tangamanga, 78216 San Luis Potosi, SLP,
Mexico
e-mail: jbremont@ipicyt.edu.mx

M. Rodríguez-Kessler
Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de San Luis Potosi,
Av. Salvador Nava s/n, Zona Universitaria, 78290 San Luis
Potosi, SLP, Mexico

IV. DISCUSIÓN

El estudio de las características ya sea estructurales o de la secuencia específicas de los mRNAs, que influyen en la eficiencia de la traducción es una de las tareas más importantes y actuales de la biología molecular moderna (Kochetov *et al.*, 2013). La estructura del 5'-UTR de los mRNAs eucarióticos es con frecuencia bastante compleja ya que puede contener tripletes AUG, elementos de estructura secundaria estables y potenciales marcos de lectura abierta (Kochetov, 2008; Vaughn *et al.*, 2012). En los últimos años, los uORFs han emergido como un componente importante en el mecanismo de la regulación de la traducción. Estos elementos ocurren en el 20-50% de los transcritos de los eucariontes y se estima que aproximadamente la mitad de los mRNAs de humano y de ratón contienen al menos un uORF (Kochetov *et al.*, 2008; Calvo *et al.*, 2009). En las plantas como *Arabidopsis* y el arroz, los uORFs están presentes en un 30% y en un 24% de sus mRNAs, respectivamente (Shashikanth *et al.*, 2008).

A pesar de su amplia distribución, la función de los uORFs en las plantas ha sido estudiada solo en unos cuantos casos; en los cuales, el control traduccional del ORF principal mediado por el uORF generalmente es modulado por una pequeña molécula señalizadora (Jorgensen y Dorantes-Acosta, 2012). En este sentido, tres ejemplos son conocidos, el factor de transcripción bZIP11, traduccionalmente regulado por la sacarosa (Rahmani *et al.*, 2009); la N-metiltransferasa fosfoetanolamina, regulada traduccionalmente por fosfocolina (Alatorre-Cobos *et al.*, 2012); y la SAMDC, regulada traduccionalmente por poliaminas (Hanfrey *et al.*, 2005; Ivanov *et al.*, 2010).

Las poliaminas, Spd y Spm son oxidadas por las PAOs a través de una ruta de catabolismo terminal o de una ruta de inter-conversión de las poliaminas (Moschou *et al.*, 2008; Takahashi *et al.*, 2010; Fincato *et al.*, 2011). Las PAOs regulan los niveles intracelulares de poliaminas, y a través de sus productos de reacción participan en diversos procesos fisiológicos como la señalización, el desarrollo y la respuesta al estrés (Angelini *et al.*, 2010; Wu *et al.*, 2010).

Los genes de las *PAO* son regulados transcripcionalmente por diferentes estímulos que incluyen el desarrollo, la respuesta al estrés, y las fitohormonas (Lim *et al.*, 2006; Alcázar *et al.*, 2011; Fincato *et al.*, 2011). Por otra lado, aún no están bien descritos los mecanismos post-transcripcionales que regulan a las *PAOs*.

El genoma de *A. thaliana* contiene cinco genes (*AtPAO1-AtPAO5*) que codifican para *PAOs* (Tavladoraki *et al.*, 2006; Moschou *et al.*, 2008). De estos, los transcritos de *AtPAO2* y *AtPAO3* tienen un uORF en la región 5'-UTR (Hayden y Jorgensen, 2007). Sin embargo, hasta ahora su función como elementos regulatorios de las *AtPAOs* no había sido demostrada. En este estudio, mostramos evidencias que sugieren que el uORF de *AtPAO2* participa en la regulación traduccional del gen. Además, describimos la presencia de uORFs conservados en los genes *PAO* de las diferentes especies de plantas analizadas.

Fincato y colaboradores (2011) han propuesto que los genes *AtPAO2*, *AtPAO3* y *AtPAO4* derivan de un ancestro común. En concordancia con lo anterior, encontramos que además de los uORFs descritos en los transcritos de la *AtPAO2* y de la *AtPAO3* (Hayden y Jorgensen, 2007); el transcrito de *AtPAO4* presenta dos uORFs, *AtPAO4u1* y *AtPAO4u2* que codificarían un péptido predicho de 50 y 6 aminoácidos, respectivamente.

El péptido *AtPAO4u1* predicho comparte el 17% de identidad con *AtPAO2u* (55 aminoácidos) y el 24% con *AtPAO3u* (68 aminoácidos), mientras que *AtPAO2u* y *AtPAO3u* comparten una identidad del 44%. Por otro lado, en los genes *AtPAO1* y *AtPAO5*, que divergen más de la subfamilia de genes *AtPAO2-AtPAO4*, no identificamos uORFs.

La posible función regulatoria del uORF de *AtPAO2* de *A. thaliana* fue evaluada utilizando el gen reportero *GUS* bajo el control del promotor nativo *AtPAO2* y bajo el control del promotor constitutivo CaMV 35S. Plantas de *Arabidopsis* portando la construcción *AtPAO2prom-uORF::GUS* fueron denominadas líneas uORF, y aquellas portando la construcción *AtPAO2prom-no-uORF::GUS* como líneas no-uORF. Los germinados de las líneas uORF mostraron una débil expresión de *GUS*, localizada principalmente en el meristemo del ápice.

Estos resultados están en concordancia por lo reportado por Takahashi y colaboradores (2010) y Fincato y colaboradores (2012), quienes observaron que *AtPAO2* presenta una expresión tiempo-tejido específica, siendo baja en estadios tempranos del desarrollo. Contrariamente, las líneas no-uORF muestran una fuerte expresión de GUS. Estos resultados sugieren que el uORF afecta negativamente la expresión del gen reportero.

Como se ha reportado, en algunos casos la función regulatoria de un uORF es mediada por una molécula señalizadora (Jorgensen y Dorantes-Acosta, 2012). Por ello, germinados de las líneas uORF y no-uORF fueron tratados con diferentes poliaminas (Put, Spd y Spm) a concentraciones de 0 y 100 μM durante 3 días. Bajo las condiciones control (MS 0.5x), las líneas uORF mostraron una baja expresión de GUS (15.63 pmol 4-MU $\text{mg}^{-1}\text{min}^{-1}$). Notablemente, cuando estas plantas fueron tratadas con Spd y Spm se observó un incremento en la actividad de GUS de 20.13 y 18.97 pmol 4-MU $\text{mg}^{-1}\text{min}^{-1}$, respectivamente. Además, el tratamiento con Put, precursor de las poliaminas superiores, también causó un incremento en la actividad de GUS (18.68 pmol 4-MU $\text{mg}^{-1}\text{min}^{-1}$). La línea no-uORF tratada con poliaminas también mostró un incremento en la actividad de GUS.

Por otro lado, las plantas de las líneas uORF y no-uORF también fueron tratadas con MGBG, un inhibidor competitivo de la SAMDC, a concentraciones de 0, 1, 2 y 4 mM durante 2 días. En las plantas de las líneas uORF la actividad de GUS disminuyó con el incremento en la concentración de MGBG, alcanzando una reducción de aproximadamente 53.37% en el tratamiento de MGBG 4 mM. En las plantas de las líneas no-uORF se observó una disminución menor en la actividad de GUS con una reducción de aproximadamente 22.35 y 26.03% a 2 y 4 mM de MGBG, respectivamente. En conjunto, estos resultados sugieren una regulación mediada por el uORF dependiente de los niveles de las poliaminas.

Para excluir una regulación mediada por los elementos localizados en el promotor *AtPAO2*, el uORF fue evaluado bajo el promotor constitutivo 35S. En comparación con los germinados 35S::GUS que muestran la fuerte señal característica del gen reportero *GUS* bajo el promotor 35S, los germinados de la

línea 35S-UTR::GUS mostraron una disminución en la señal de GUS principalmente en el meristemo del ápice y en los cotiledones. Adicionalmente, las líneas 35S-UTR::GUS y 35S::GUS fueron tratadas con poliaminas (1 y 100 μM) y MGBG 2mM . Estos experimentos mostraron que en las plantas de las líneas 35S-UTR::GUS las poliaminas causaron un incremento en la señal de GUS, en comparación con las plantas no tratadas. En concordancia, el tratamiento con MGBG causó una notable disminución en la señal de GUS en las líneas 35S-UTR::GUS. En los germinados de la línea 35S::GUS, el tratamiento con poliaminas no causó cambios significativos en la señal de GUS, y con MGBG solo se observó una disminución en la señal de GUS en el meristemo del ápice.

El efecto del uORF sobre el gen reportero *GUS* podría reflejar la regulación mediada por el uORF de la *AtPAO2 in vivo*. Es posible, que cuando los niveles de poliaminas son altos el complejo de pre-inicio 43S ignore el uORF e inicie la traducción del ORF de *AtPAO2*, llevando a una disminución en los niveles de Spd y Spm debido a la actividad PAO. Por otro lado, cuando los niveles de poliaminas son bajos, el uORF podría ser reconocido por los ribosomas causando una represión traduccional del ORF principal (Fig. 5).

El control traduccional mediado por las poliaminas en asociación con los elementos que actúan en *cis* y/o *trans* parece no estar limitado a los genes del metabolismo de las poliaminianas. En este sentido, Imai y colaboradores (2006) han sugerido que la termoespermina bloquea el efecto inhibitorio de un uORF presente en el 5'-UTR del gen *SAC51*, el cual codifica un factor de transcripción del tipo bHLH. Por otro lado, Mandal y colaboradores (2013) reportaron que una reducción en los niveles de Spd y Spm causa una disminución en la síntesis de proteínas y en el crecimiento celular. Debido a que en estas células no se identificaron polisomas, los autores sugieren que dicho efecto se debe a un bloqueo en el inicio de la traducción. Por lo tanto, los resultados obtenidos en la presente investigación se suman a la evidencia que sugiere el importante papel de las poliaminas como reguladores traduccionales.

Por otro lado, debido a que el 93% (52 de 56) de los genes *PAO* analizados tienen al menos un uORF, es posible que dichos elementos jueguen un papel

importante en la regulación de los genes *PAO*. Además, que los péptidos predichos de los uORFs se encuentren conservados en diferentes especies de plantas soporta la idea de una función regulatoria de dichos elementos.

La presencia de los uORFs tanto en los genes de la biosíntesis como en los del catabolismo de las poliaminas sugiere un control estricto en los niveles de poliaminas. A su vez, las poliaminas podrían actuar como reguladores traduccionales de genes implicados en diversos procesos fisiológicos, así como reguladores de la traducción en general (Ivanov *et al.*, 2010).

En conclusión, las evidencias aquí presentadas indican que el uORF de *AtPAO2* ejerce una función regulatoria mediada por los niveles de poliaminas. Además, el hecho de que los uORFs se encuentren ampliamente distribuidos en los genes *PAO* sugiere que estos elementos constituyen un mecanismo importante de regulación traduccional de dichos genes.

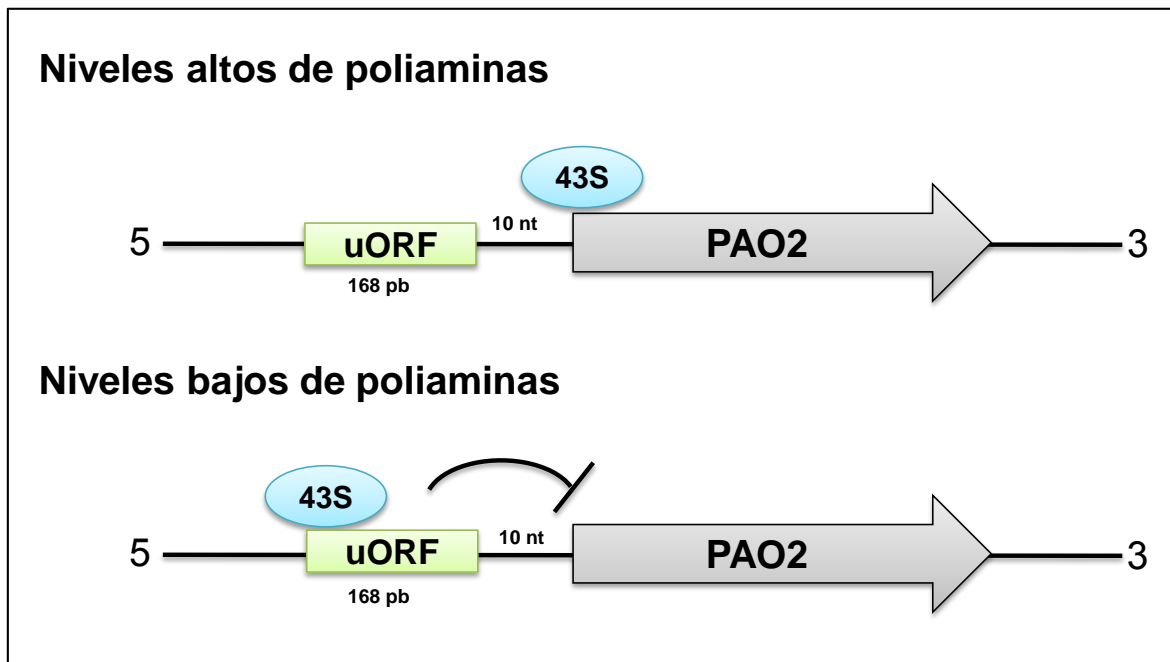


Figura 5. Un modelo hipotético del mecanismo de regulación mediado por el uORF de *AtPAO2*. El ORF de la *PAO2* está representado por una flecha, el ovalo representa al complejo de pre-inicio 42S y el uORF está representado por un rectángulo.

V. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alatorre-Cobos F, Cruz-Ramírez A, Hayden CA, Pérez-Torres CA, Chauvin A, Ibarra-Laclette E, Alva-Cortés E, Jorgensen RA, Herrera-Estrella L (2012) Translational regulation of Arabidopsis XIPOTL1 is modulated by phosphocholine levels via the conserved upstream open reading frame 30. *J Exp Bot* 63:5203-522.
- Alcázar R, Altabella T, Marco F, Bortolotti C, reymond M, Koncz C, Carrasco P, Tiburcio AF (2010) Polyamines: molecules with regulatory functions in plant abiotic stress tolerance. *Planta* 231:1237-1249.
- Alcázar R, Bitrián M, Bartels D, Koncz C, Altabella T, Tiburcio AF (2011) Polyamine metabolic canalization in response to drought stress in Arabidopsis and the resurrection plant *Craterostigma plantagineum*. *Plant Signal Behav* 6:243-250.
- Angelini R, Cona A, Federico R, Fincato P, Tavladoraki P, Tisi A (2010) Plant amine oxidases “on the move”: An update. *Plant Physiol Bioch* 48:560-564.
- Asthir B, Spoor W, Duffus CM (2004) Involvement of polyamines, diamine oxidase and polyamine oxidase in resistance of barley to *Blumeria graminis* f. sp. *hordei*. *Euphtica* 136:307-312.
- Bassard JE, Ullmann P, Bernier F, Werck-Reichhart D (2010) Phenolamides: Bridging polyamines to the phenolic metabolism. *Phytochemistry* 71:1808-1824.
- Belda-Palazón B, Ruiz L, Martí E, Tárraga S, Tiburcio AF, Culiáñez F, Farràs R, Carrasco P, Ferrando A (2012) Aminopropyltransferases involved in polyamine biosynthesis localize preferentially in the nucleus of plant cells. *PLoS ONE* 7: e46907. doi:10.1371/journal.pone.0046907.
- Bellofernandez C, Packham G, Cleveland JL (1993) The ornithine decarboxylase gene a transcriptional target of C-MYC. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:7804-7808.

- Bennett EM, Ekstrom JL, Pegg AE, Ealick SE (2002) Monomeric S-adenosylmethionine decarboxylase from plants provides an alternative to putrescine stimulation. *Biochemi* 41:14509-14517.
- Berta G, Altamura MM, Fusconi A, Cerruti F, Capitani F, Bagni N (1997) The plant cell wall is altered by inhibition of polyamine biosynthesis. *New Phytol* 137:569-577.
- Borrell A, Besford RT, Altabella T, Masgrau C, Tiburcio AR (1996) Regulation of arginine decarboxylase by spermine in osmotically-stressed oat leaves. *Physiol Plant* 98:105-110.
- Bouché N, Fromm H (2004) GABA in plants: just a metabolite? *Trends Plant Sci* 9:110-115.
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254.
- Calvo SE, Pagliarini DJ, Mootha VK (2009) Upstream open reading frames cause widespread reduction of protein expression and are polymorphic among humans. *Proc Natl Acad Sci USA* 106:7507-7512.
- Carbonell J, Blázquez MA (2009) Regulatory Mechanisms of Polyamine Biosynthesis in Plants. *Genes Genome* 31:107-118.
- Chang KS, Lee SH, Hwang SB, Park KY (2000) Characterization and translational regulation of the *arginine decarboxylase* gene in carnation (*Dianthus caryophyllus* L.). *Plant J* 24:45-56.
- Clough SJ, Bent AF (1998) Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 16:735-743.
- Cona A, Giuseppina R, Angelini R, Federico R, Tavladoraki P (2006) Function of amine oxidases in plant development and defence. *Trends Plant Sci* 11:1360-1385.

- Cowley T, Walters DR (2002). Polyamine metabolism in barley reacting hypersensitively to the powdery mildew fungus *Blumeria graminis* f. sp. *hordei*. Plant Cell Environ 25:461-468.
- Curtis MD, Grossniklaus U (2003) Gateway cloning vector set for high-throughput functional analysis of genes in planta. Plant Physiol 133:462-469.
- Felsenstein J (1989) PHYLIP-Phylogeny Inference Package (version 3.2). Cladistics 5:164-166.
- Feng DR, Liu B, Li WY, He YM, Qi KB, Wang HB, Wang JF (2009) Over-expression of a cold-induced plasma membrane protein gene (MpRCI) from plantain enhances low temperature-resistance in transgenic tobacco. Environ Exp Bot 65:395-402.
- Fincato P, Moschou NP, Ahou A, Angelini R, Roubelakis-Angelakis KA, Federico R, Tavladoraki P (2012) The members of *Arabidopsis thaliana* PAO gene family exhibit distinct tissue- and organ-specific expression pattern during seedling growth and flower development. Amino Acids 42:831-841.
- Fincato P, Moschou PN, Spedaletti V, Tavazza R, Angelini R, Federico R, Roubelakis-Angelakis KA, Tavladoraki P (2011) Functional diversity inside the *Arabidopsis polyamine oxidase* gene family. J Exp Bot 62:1155-1168.
- Floris M, Mahgoub H, Lanet E, Robaglia C, Menand B (2009) Post-transcriptional regulation of gene expression in plants during abiotic stress. Int J Mol Sci 10:3168-3185.
- Franceschetti M, Hanfrey C, Scaramagli S, Torrigiani P, Bagni N, Burtin D, Michael AJ (2001) Characterization of monocot and dicot plant *S-adenosyl-L-methionine decarboxylase* gene families including identification in the mRNA of a highly conserved pair of upstream overlapping open reading frames. Biochem J 353:403-409.

- Fuell C, Elliott KA, Hanfrey CC, Franceschetti M, Michael AJ (2010) Polyamine biosynthetic diversity in plants and algae. *Plant Physiol Biochem* 48:513-520.
- Galston AW, Sawhney RK (1990) Polyamines in plant physiology. *Plant Physiol* 94:406-410.
- Ge C, Cui X, Wang Y, Hu Y, Fu Z, Zhang D, Cheng Z, Li J (2006) *BUD2*, encoding an S-adenosylmethionine decarboxylase, is required for Arabidopsis growth and development. *Cell Res* 16:446-456.
- Ghoda L, Wetters T van D, Macrae M, Ascherman D, Coffino P (1989). Prevention of rapid intracellular degradation of ODC by a carboxyl-terminal truncation. *Science* 243:1493-1495.
- Grienenberger E, Besseau S, Geoffroy P, Debayle D, Heintz D, Lapierre C, Pollet B, Heitz T, Legrand M (2009) A BAHD acyltransferase is expressed in the tapetum of Arabidopsis anthers and is involved in the synthesis of hydroxycinnamoyl spermidines. *Plant J* 58:246-259.
- Hamdani S, Yaakoubi H, Carpentier R (2011) Polyamines interaction with thylakoid proteins during stress. *J Photochem Photobiol B: Biol* 104:314-319.
- Hanfrey C, Elliott KA, Franceschetti M, Mayer MJ, Illingworth C, Michael AJ (2005) A dual upstream open reading frame-based autoregulatory circuit controlling polyamine-responsive translation. *J Biol Chem* 280:39229-39237.
- Hanfrey C, Franceschetti M, Mayer MJ, Illingworth C, Michael AJ (2002) Abrogation of upstream open reading frame mediated translational control of a plant S-adenosylmethionine decarboxylase results in polyamine disruption and growth perturbations. *J Biol Chem* 277:44131-44139.
- Hanzawa Y, Takahashi T, Michael AJ, Burtin D, Long D, Pineiro M, Coupland G, Komeda Y (2000) *ACAULIS5*, an Arabidopsis gene required for stem elongation, encodes a spermine synthase. *EMBO J* 19:4248-4256.

- Hasan R, Alam RK, Ali R. 1995. Polyamine induced Z-conformation of native calf thymus DNA. FEBS Lett 368:27-30.
- Hayashi SL, Murakami Y, Matsufuji S (1996) Ornithine decarboxylase anti-enzyme: a novel type of regulatory protein, Trends Biochem Sci 21:27-29.
- Hayden CA, Jorgensen RA (2007) Identification of novel conserved peptide uORF homology groups in Arabidopsis and rice reveals ancient eukaryotic origin of select groups and preferential association with transcription factor-encoding genes. BMC Biol 5:32.
- Hoshino K, Momiyama E, Yoshida K, Nishimura K, Sakai S, Toida T, Kashiwagi K, Igarashi K (2005) Polyamine transport by mammalian cells and mitochondria: role of antizyme and glycosaminoglycans. J Biol Chem 280:42801-42808.
- Hou Z, Liu G, Hou L, Wang L, Liu X (2013) Regulatory function of polyamine oxidase-generated hydrogen peroxide in ethylene-induced stomatal closure in *Arabidopsis thaliana*. J Integ Agr 12:251-262.
- Hummel I, Gouesbet G, El Amrani A, Aïnouche A, Couée I (2004) Characterization of the two arginine decarboxylase (polyamine biosynthesis) paralogues of the endemic subantarctic cruciferous species *Pringlea antiscorbutica* and analysis of their differential expression during development and response to environmental stress. Gene 342:199-209.
- Hu WW, Gong H, P C (2005) The pivotal roles of the plant S-Adenosylmethionine decarboxylase 5'untranslated leader sequence in regulation of gene expression at the transcriptional and posttranscriptional levels. Plant Physiol 138:276-286.
- Iacono M, Mignone F, Pesole G (2005) uAUG and uORFs in human and rodent 5'untranslated mRNAs. Gene 349:97-105.
- Igarashi K, Kashiwagi K (2010) Modulation of cellular function by polyamines. Int J Biochem Cell Biol 42:39-51.

- Imai A, Hanzawa Y, Komura M (2006) The dwarf phenotype of the Arabidopsis *acl5* mutant is suppressed by a mutation in an upstream ORF of a bHLH gene. *Development* 133:3575-3585.
- Imai A, Matsuyama T, Hanzawa Y, Akiyama T, Tamaoki M, Saji H, Shirano Y, Kato T, Hayashi H, Shibata D, Tabata S, Komeda Y, Takahashi T (2004) Spermidine synthase genes are essential for survival of Arabidopsis. *Plant Physiol* 135:1565-1573.
- Ingolia NT, Ghaemmaghami S, Newman JR, Weissman JS (2009) Genome-wide analysis in vivo of translation with nucleotide resolution using ribosome profiling. *Science* 324:218-223.
- Ioannidis NE, Kotzabasis K (2007) Effects of polyamines on the functionality of photosynthetic membrane *in vivo* and *in vitro*. *Biochim Biophys Acta* 1767:1372-1382.
- Ivanov IP, Atkins JF, Michael AJ (2010) A profusion of upstream open reading frame mechanisms in polyamine-responsive translational regulation. *Nucleic Acids Res* 38:353-359.
- Ivanov IP, Loughran G, Atkins JF (2008) uORFs with unusual translational start codons autoregulate expression of eukaryotic ornithine decarboxylase homologs. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:10079-10084.
- Jackson RJ, Hellen CUT, Pestova TV (2010) The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. *Nature Review Mol Cell Biol* 11:113-127.
- Jefferson RA (1987) Assaying chimeric genes in plants: The *GUS* gene fusion system. *Plant Mol Biol* 5:387-405.
- Jorgensen RA, Dorantes-Acosta AE (2012) Conserved peptide upstream open reading frames are associated with regulatory genes in angiosperms. *Frontiers Plant Sci* 3:191.

- Kabir A, Kumar GS (2013) Binding of the Biogenic polyamines to deoxyribonucleic acids of varying base composition: base specificity and the associated energetics of the interaction. *PLoS ONE* 8(7):e70510. doi:10.1371/journal.pone.0070510.
- Kakeni J-I, Kuwashiro Y, Motose H, Igarashi K, Takahashi T (2010) Norspermine substitutes for thermospermine in the control of stem elongation in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett* 584:3042-3046.
- Kamada-Nobusada T, Hayashi M, Fukazawa M, Sakakibara H, Nishimura M (2008) A putative peroxisomal polyamine oxidase, AtPAO4, is involved in polyamine catabolism in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* 49:1272-1282.
- Karimi M, Inze D, Depicker A (2002) GATEWAY vectors for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Trends Plant Sci* 7:193-195.
- Kasinathan V, Wingler A (2004) Effect of reduced arginine decarboxylase activity on salt tolerance and on polyamine formation during salt stress in *Arabidopsis thaliana*. *Physiol Plant* 121:101-107.
- Kasukabe Y, He L, Nada K, Misawa S, Ihara I, Tachibana S (2004) Overexpression of *spermidine synthase* enhances tolerance to multiple environmental stresses and up-regulates the expression of various stress-regulated genes in transgenic *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* 45:712-722.
- Kim BH, Cai X, Vaughn JN, von Arnim AG (2007). On the functions of the h subunit of eukaryotic initiation factor 3 in late stages of translation initiation. *Genome Biol* 8.
- Kim S-H, Kim S-H, Yoo S-J, Min K-H, Nam S-H, Cho BH, Yang K-Y (2013) Putrescine regulating by stress-responsive MAPK cascade contributes to bacterial pathogen defense in *Arabidopsis*. *Biochem Bioph Res Co* 437:502-508.

- Kochetov AV, Prayaga PD, Volkova OA, Sankararamakrishnan R (2013) Hidden coding potential of eukaryotic genomes: nonAUG started ORFs. *J Biomol Struct Dyn* 31:103-114.
- Kochetov AV, Sirnik OA, Rogosin IB, Glazko GV, Komarova ML, Shumny VK (2002) Contextual features of higher plant mRNA 5'-Untranslated Regions. *Mol Biol* 36:510-516.
- Kozak M (2002) Pushing the limits of the scanning mechanism for initiation of translation. *Gene* 299:1-34.
- Kozak M (2005) Regulation of translation via mRNA structure in prokaryotes and eukaryotes. *Gene* 361:13-37.
- Kurian L, Palanimurugan R, Göderz D, Dohmen RJ (2011) Polyamine sensing by nascent ornithine decarboxylase antizyme stimulates decoding of its mRNA. *Nature* 477:490-494.
- Kusano T, Berberich T, Tateda C, Takahashi Y (2008) Polyamines:essential factors for growth and survival. *Planta* 228:367-381.
- Kusano T, Yamaguchi K, Berberich T, Takahashi Y (2007) Advances in polyamine research in 2007. *J Plant Res* 120:345-350.
- Law GL, Raney A, Heusner C, Morris DR (2001) Polyamine regulation of ribosome pausing at the upstream open reading frame of S-adenosylmethionine decarboxylase. *J Biol Chem* 276:38036-38043.
- Lim TS, Chitra TR, Han P, Pua EC, Yu H (2006) Cloning and characterization of *Arabidopsis* and *Brassica juncea* flavin-containing amine oxidases. *J Exp Bot* 57:4155-4169.
- Lorenzini EC, Scheffler IE (1997) Co-operation of the 5' and 3' untranslated regions of ornithine decarboxylase mRNA and inhibitory role of its 3' untranslated region in regulating the translational efficiency of hybrid RNA species via cellular factor(s). *Biochem J* 326:361-367.

- Lowmer S, Maddaloni M, Motto M, Salamini F, Thompson RD (1993) Translation of the mRNA of the maize transcriptional activator *Opaque-2* is inhibited by upstream open reading frames present in the leader sequence. *Plant Cell* 5:65-73.
- Lukaszewicz M, Feuermann M, Jérrouville B, Stas A, Boutry M (2000) In vivo evaluation of the context sequence of the translation initiation codon in plants. *Plant Sci* 154:89-98.
- Luo J, Fuell C, Parr A, Hill L, Bailey P, Elliott K, Fairhurst SA, Martin C, Michael AJ (2009) A novel polyamine acyltransferase responsible for the accumulation of spermidine conjugates in *Arabidopsis* seed. *Plant Cell* 21:318-333.
- Malamy JE, Benfey PN (1997) Organization and cell differentiation in lateral roots of *Arabidopsis thaliana*. *Development* 124:33-44
- Mandal S, mandal A, Johansson HE, Orjalo AV, Park MH (2013) Depletion of cellular polyamines, spermidine and spermine, causes a total arrest in translation and growth in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 110:2169-2174.
- Manzella JM, Blackshear PJ (1992) Specific protein-binding to a conserved region of the ornithine decarboxylase messenger-RNA 50-untranslated region. *J Biol Chem* 267:7077-7082.
- Marina M, Maiale SJ, Rossi FR, Romero MF, Rivas EI, Gárriz A, Ruiz OA, Pieckenstain FL (2008) Apoplastic polyamine oxidation plays different roles in local responses of tobacco to infection by the necrotrophic fungus *Sclerotinia sclerotiorum* and the biotrophic Bacterium *Pseudomonas viridiflava*. *Plant Physiol* 147:2164-2178.
- Martínez-Salas E, Piñeiro D, Fernández N (2012) Alternative Mechanisms to Initiate Translation in Eukaryotic mRNAs. *Comp Funct Genom* doi:10.1155/2012/391546.

- Martin-Tanguy J (2001) Metabolism and function of polyamines in plants: recent development (new approaches). *Plant Growth Regul* 34:135-148.
- Mirza JI, Bagni N (1991) Effects of exogenous polyamines and difluoromethylornithine on seed germination and root growth of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Growth Regul* 10:163-168.
- Moschou PN, Sanmartin M, Andriopoulou AH, Rojo E, Sanchez-Serrano JJ, Roubelakis-Angelakis KA (2008) Bridging the gap between plant and mammalian polyamine catabolism: A novel peroxisomal polyamine oxidase responsible for a full back-conversion pathway in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 147:1845-1857.
- Moschou PN, Wu J, Cona A, Tavladoraki P, Angelini R, Roubelakis-Angelakis KA (2012) The polyamines and their catabolic products are significant players in the turnover of nitrogenous molecules in plants. *J Exp Bot* 63:5003-5015.
- Muench DG, Zhang C, Dahodwala M (2012) Control of cytoplasmic translation in plants. *WIREs RNA* 3:178-194.
- Murakami Y, Matsufuji S, Kameji T, Hayashi S, Igarashi K, Tamura T, Tanaka K, Ichihara A (1992) Ornithine decarboxylase is degraded by the 26S-proteasome without ubiquitination. *Nature* 360:597-599.
- Muroi A, Ishihara A, Tanaka C, Ishizuka A, Takabayashi J, Miyoshi H, Nishioka T (2009) Accumulation of hydroxycinnamic acid amides induced by pathogen infection and identification of agmatine coumaroyltransferase in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 230:17-527.
- Ono Y, Kim DG, Watanabe K, Sasaki A, Niitsu M, Berberich T, Kusano T, Takahashi Y (2012) Constitutively and highly expressed *Oryza sativa* polyamine oxidases localize in peroxisomes and catalyze polyamine back conversion. *Amino Acids* 42:867-876.

- Pandolfi C, Pottosin I, Cui T, Mancuso S, Shabala S (2010) Specificity of polyamine effects on NaCl-induced ion flux kinetics and salt stress amelioration in plants. *Plant Cell Physiol* 51:422-434.
- Panicot M, Minguet EG, Ferrando A, Alcázar R, Blazquez MA, Carbonell J, Altabella T, Koncz C, Tiburcio AF (2002) A polyamine metabolon involving aminopropyl transferase complexes in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 14:2539-2551.
- Park MH, Nishimura K, Zanelli CF, Valentini SR (2010) Functional significance of eIF5A and its hypusine modification in eukaryotes. *Amino Acids* 38:491-500.
- Peremarti A, Bassie L, Zhou C, Christou P, Capell T (2010) Molecular characterization of the *Arginine decarboxylase* gene family in rice. *Transgenic Res* 19:785-797.
- Perez-Amador MA, Leon J, Green PJ, Carbonell J (2002) Induction of the arginine decarboxylase *ADC2* gene provides evidence for the involvement of polyamines in the wound response in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 130:1454-1463.
- Perez-Leal O, Merali S (2012) Regulation of polyamine metabolism by translational control. *Amino Acids* 42:611-617.
- Pestova TV, Borukhov SI, Hellen CUT (1998) Eukaryotic ribosomes require initiation factors 1 and 1A to locate initiation codons. *Nature* 394:854-859.
- Planas-Portell J, Gallart M, Tiburcio AF, Altabella T (2013) Copper-containing amine oxidases contribute to terminal polyamine oxidation in peroxisomes and apoplast of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Biol* 13:109.
- Pöyry TAA, Kaminski A, Jackson RJ (2004) What determines whether mammalian ribosomes resume scanning after translation of a short upstream open reading frame? *Genes Dev* 18:62-75.

- Primikiriou NI, Roubelakis-Angelakis KA (2001) Indications for post-translational regulation of *Vitis vinifera* L. arginine decarboxylase. *Plant Mol Biol* 45:669-678.
- Rahmani F, Hummel M, Schuurmans J, Wiese-Klinkenberg A, Smeekens S, Hanson J (2009) Sucrose control of translation mediated by an upstream open reading frame-encoded peptide. *Plant Physiol* 150:1356-1367.
- Raney A, Baron AC, Mize GJ, Law GL, Morris DR (2000) In vitro translation of the upstream open reading frame in the mammalian mRNA encoding S-adenosylmethionine decarboxylase. *J Biol Chem* 275:24444-24450.
- Rato C, Amirova SR, Bates DG, Stanfield I, Wallace HM (2011) Translational recoding as a feedback controller: systems approaches reveal polyamine-specific effects on the antizyme ribosomal frameshift. *Nucleic Acids Res* 39:4587-4597.
- Rider JE, Hacker A, Mackintosh CA, Pegg AE, Woster PM, Casero RA Jr (2007) Spermine and spermidine mediate protection against oxidative damage caused by hydrogen peroxide. *Amino Acids* 2:231-240.
- Rodríguez-Kessler M, Delgado-Sánchez P, Rodríguez-Kessler GT, Moriguchi T, Jiménez-Bremont JF (2010) Genomic organization of plant aminopropyl transferases. *Plant Physiol Biochem* 48:574-590.
- Rogers S, Wells R, Rechsteiner M (1986) Amino acid sequences common to rapidly degraded proteins: the PEST hypothesis. *Science* 234:364-368.
- Roy B, Vaughn JN, Kim BH, Zhou F, Gilchrist MA, Von Arnim AG (2010) The h subunit of eIF3 promotes reinitiation competence during translation of mRNAs harboring upstream open reading frames. *RNA* 16:748-761.
- Shantz LM, Hu RH, Pegg AE (1996) Regulation of ornithine decarboxylase in a transformed cell line that overexpresses translation initiation factor eIF-4E. *Cancer Res* 56:3265-3269.

- Shashikanth M, Krishna AR, Ramya G, Devi Geeta, Ulaganathan K (2008) Genome-wide comparative analysis of *Oryza sativa* (japonica) and *Arabidopsis thaliana* 5'-UTR sequences for translational regulatory signals. *Plant Biotech* 25:553-563.
- Sonenberg N, Hinnebusch AG (2009) Regulation of translation initiation in eukaryotes: mechanisms and biological targets. *Cell* 136:731-745.
- Suliaman S, Schulze J (2010) The efficiency of nitrogen fixation of the model legume *Medicago truncatula* (Jemalong A17) is low compared to *Medicago sativa*. *J Plant Physiol* 167:683-92.
- Tabor H, Tabor CW (1969) Formation of 1,4-diamino-butane and of spermidine by an omithine auxotroph of *Escherichia coli* grown on limiting omithine or arginine. *J Biol Chem* 244:2286-2292.
- Takahashi H, Takahashi A, Naito S, Onouchi H (2012) BAIUCAS: a novel BLAST-based algorithm for the identification of upstream open reading frames with conserved amino acid sequences, and its application to the *Arabidopsis thaliana* genome. *Bioinformatics Advance*
- Takahashi Y, Cong R, Sagor GHM, Niitsu M, Berberich T, Kusano T (2010) Characterization of five polyamine oxidase isoforms in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Rep* 29:955-965.
- Takano A, Kakehi J-I, Takahashi T (2012) Thermospermine is not a minor polyamine in the plant kingdom. *Plant Cell Physiol* 606-616.
- Tavladoraki P, Cona A, Federico R, Tempera G, Viceconte N, Saccoccio S, Battaglia V, Toninello A, Agostinelli E (2012) Polyamine catabolism: target for antiproliferative therapies in animals and stress tolerance strategies in plants. *Amino Acids* 42:411-426.
- Tavladoraki P, Rossi MN, Saccuti G, Perez-Amador MA, Polticelli F, Angelini R, Federico R (2006) Heterologous expression and biochemical

- characterization of a polyamine oxidase from *Arabidopsis* involved in polyamine back conversion. *Plant Physiol* 141:1519-1532.
- Tian A-G, Zhao J-Y, Zhang J-S, Gai J-Y, Chen S-Y (2004) Genomic characterization of the *S-adenosylmethionine decarboxylase* genes from soybean. *Theor Appl Genet* 108:842-850.
- Tiburcio AF, Altabella T, Borrell A, Masgrau C (1997) Polyamine metabolism and its regulation. *Physiol Plantarum* 100:664-674.
- Urano K, Hobo T, Shinozaki K (2005) *Arabidopsis* ADC genes involved in polyamine biosynthesis are essential for seed development. *FEBS Lett* 579:1557-1564.
- Urano K, Yoshiba Y, Nanjo T, Ito T, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (2004) *Arabidopsis* stress-inducible gene for arginine decarboxylase *AtADC2* is required for accumulation of putrescine in salt tolerance. *Biochem Biophys Res Commun* 313:369-375.
- Vaughn JN, Ellingson SR, Mignone F, von Arnim A (2012) Known and novel post-transcriptional regulatory sequences are conserved across plant families. *RNA* 18:368-384.
- Wallace HM, Fraser AV, Hughes A (2003) A perspective of polyamine metabolism. *Biochem J* 376:1-14.
- Walters D (2003) Resistance to plant pathogens: possible roles for free polyamines and polyamine catabolism. *New Phytol* 159:109-115.
- Wang Y, Devereux W, Stewart TM, Casero RA Jr (2001) Characterization of the interaction between the transcription factors human polyamine modulated factor (PMF-1) and NF-E2-related factor 2 (Nrf-2) in the transcriptional regulation of the *spermidine/spermine N1-acetyltransferase (SSAT)* gene. *Biochem J* 355:45-49.

- Wilkie GS, Dickson KS, Gray NK (2003) Regulation of mRNA translation by 5'- and 3'-UTR-binding factors. *Trends Biochem Sci* 28:182-188.
- Wimalasekera R, Villar C, Begum T, Scherer GFE (2011) *COPPER AMINE OXIDASE1 (CuAO1)* of *Arabidopsis thaliana* Contributes to Abscisic Acid- and Polyamine-Induced Nitric Oxide Biosynthesis and Abscisic Acid Signal Transduction. *Mol Plant* 1-16.
- Wu J, Shang Z, Wu J, Jiang X, Moschou PN, Sun W, Roubelakis-Angelakis KA, Zhang S (2010) Spermidine oxidase-derived H₂O₂ regulates pollen plasma membrane hyperpolarization-activated Ca²⁺-permeable channels and pollen tube growth. *Plant J* 63:1042-1053.
- Xu B, Sheehan MJ, Timko MP (2004) Differential induction of *ornithine decarboxylase (ODC)* gene family members in transgenic tobacco (*Nicotiana tabacum* L. cv. Bright Yellow 2) cell suspensions by methyl-jasmonate treatment. *Plant Growth Reg* 22:101-116.
- Yamakawa H, Kamada H, Satoh M, Ohashi Y (1998) Spermine is a salicylate-independent endogenous inducer for both tobacco acidic pathogenesis-related proteins and resistance against tobacco mosaic virus infection. *Plant Physiol* 118:1213-1222.
- Yerlikaya A, Stanley BA (2004) S-Adenosylmethionine decarboxylase degradation by the 26S proteasome is accelerated by substrate-mediated transamination. *J Biol Chem* 279:12469-12478.
- Yoshida I, Yamagata H, Hirasawa E (2002) Signal transduction controlling the blue-and red-light mediated gene expression of *S-adenosylmethionine decarboxylase* in *Pharbitis nil*. *J Exp Bot* 53:1525-1529.
- Zhang Z, Honda C, Kita M, Hu C, Nakamaya M, Moriguchi T (2003) Structure and expression of *spermidine synthase* genes in apple: two cDNAs are spatially and developmentally regulated through alternative splicing. *Mol Genet Genomics* 268:799-807.

Zhou F, Roy B, von Arnim AG (2010) Translation reinitiation and development are compromised in similar ways by mutations in translation initiation factor eIF3h and the ribosomal protein RPL24. *BMC Plant Biol* 10:193.

ANEXOS

1. MATERIALES Y MÉTODOS

Identificación de los genes ortólogos de las PAOs

Para identificar a los genes ortólogos a *AtPAO2*, *AtPAO3* y *AtPAO4* se analizaron 24 genomas de plantas, que incluyen 17 dicotiledóneas (*Aquilegia coerulea*, *Arabidopsis lyrata*, *A. thaliana*, *Capsella rubella*, *Citrus clementina*, *C. sinensis*, *Eucalyptus grandis*, *Glycine max*, *Manihot esculenta*, *Medicago truncatula*, *Mimulus guttatus*, *Phaseolus vulgaris*, *Populus trichocarpa*, *Prunus persica*, *Ricinus communis*, *Thellungiella halophila* y *Vitis vinifera*), 6 monocotiledóneas (*Brachypodium distachyon*, *Hordeum vulgare*, *Oryza sativa*, *Setaria italica*, *Sorghum bicolor* y *Zea mays*) y la Briofita *Physcomitrella patens*. La búsqueda de los ortólogos se llevó a cabo usando el programa BLASTP en las bases de datos, NCBI (National Center for Biotechnology Information, www.ncbi.nlm.nih.gov), Phytozome (www.phytozome.net), TAIR (The Arabidopsis Information Resource; www.arabidopsis.org), GRAMENE (GRAMENE, A Comparative Mapping Resource for Grains; www.gramene.org), MaizeGDB (Maize Genomics and Genetics Database; www.maizegdb.org/) y PlantGI (The Plant Gene Index; compbio.dfci.harvard.edu/tgi/plant.html). Solo aquellas secuencias con E-values $<10^{-5}$ y con al menos 65% de identidad fueron consideradas como los posibles ortólogos.

Identificación de los uORFs en los genes *PAO* y análisis *in silico* de las secuencias

La predicción de los uORFs se hizo utilizando el programa EditSeq (DNASTAR Lasergene, Madison, WI, USA). Se definió como un uORF aquella secuencia constituida por un codón de inicio (AUG) localizado en el 5'-UTR, por un codón de paro en el mismo marco de lectura que el AUG y por al menos un codón diferente

a los de paro. En los casos en que más de un uORF fue identificado, se definió como uORFs primarios a aquellas secuencias con mayor identidad en su secuencia de aminoácidos a los uORFs de las PAOs de *A. thaliana*. Los alineamientos múltiples de los posibles péptidos codificados por los uORFs fueron hechos utilizando el programa T-Coffee (version 6.18) con la matriz Blosum62 en la base de datos del EBI (European Bioinformatics Institute, Cambridge, UK; www.ebi.ac.uk). Los residuos de aminoácidos conservados fueron marcados utilizando el servidor BoxShade versión 3.21 (www.ch.embnet.org). Los alineamientos pareados entre las secuencias de los posibles péptidos codificados por los uORFs fueron realizados usando el programa Needle (Needleman-Wunsch global alignment algorithm) en la base de datos del EBI. Los análisis filogenéticos fueron realizados con el método de Parsimonia del software PHYLIP 3.67 (Felsenstein *et al.*, 1989). La predicción de los posibles sitios de modificaciones post-traduccionales en los péptidos codificados por los uORFs fue obtenida empleando el programa Motif Scan (myhits.isb-sib.ch/cgi-bin/motif_scan) en las bases de datos Scansite Motif Scanner (scansite.mit.edu/motifscan_seq.phtml) y Expsy Bioinformatics Resource Portal.

Generación de las construcciones

Para la transformación de *A. thaliana* fueron generadas las siguientes construcciones: AtPAO2prom-uORF::GUS, AtPAO2prom-no-uORF::GUS, 35S::GUS y 35S-UTR::GUS. La construcción AtPAO2prom-uORF::GUS consistió de 2442 pb, que incluyen 2000 pb de la región promotora más 442 pb de la región 5'-UTR del gen *AtPAO2* (Guerrero-González *et al.*, 2014; Fig. 4A). Este fragmento fue amplificado por PCR, utilizando como molde DNA genómico de *A. thaliana*, los oligonucleótidos PAO2-Fw 5'-TCAGAATCTATTTAGCAATAATTGAG-3' y PuORF-Rv 5'-GATTTTTTTTTCAATTGATCAAACGAT-3' y la DNA polimerasa Phusion (Thermo Scientific). El fragmento de 2442 pb fue clonado en el vector de entrada pCR[®]8/GW/TOPO (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) y posteriormente sub-clonado en el vector binario pKGWFS7.0 (Karimi *et al.*, 2002) río arriba del ORF de la β -

glucosidasa (GUS) utilizando el sistema de recombinación GATEWAY. Para generar la construcción AtPAO2prom-no-uORF::GUS (Guerrero-González *et al.*, 2014; Fig. 4B), la cual carece del uORF, se amplificó por medio de PCR un fragmento de 2264 pb (2000 pb del promotor del gen *AtPAO2* más 264 pb del 5'-UTR) utilizando los oligonucleótidos PAO2-Fw y PUTR-Rv 5'-GCGATTTTCTTCAGGATTTTAA-3'. El producto de PCR fue clonado río arriba del gen reportero *GUS*, siguiendo la metodología descrita anteriormente.

Para la obtención de la construcción 35S-UTR::GUS (Guerrero-González *et al.*, 2014; Fig. 4C) se empleó como molde el plásmido AtPAO2prom-uORF::GUS y los oligonucleótidos UTRPAO2-Fw 5'-CCAAAGCCTAAAAAATCCGACC-3' y GUS-stop 5'-TTATTGTTTGCCTCCCTGCTGCGG-3' los cuales amplifican un fragmento de 3010 pb que comprende el ORF del gen *GUS* y el 5'-UTR del gen *AtPAO2*. Dicho fragmento fue clonado en el vector binario pMDC32 (Curtis y Grossniklaus, 2003) río abajo del promotor constitutivo 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV). Como control se empleó el vector 35S::GUS que contiene el ORF del gen *GUS* bajo el control del promotor constitutivo 35S. El ORF del *GUS* fue amplificado utilizando los oligonucleótidos 5-GUS 5'-ATGTTACGTCCTGTAGAAACCCCAACC-3' y 3-GUS 5'-TTATTGTTTGCCTCCCTGCTGCGG-3'.

Generación de líneas reporteras de *A. thaliana* y condiciones de cultivo

Las células electrocompetentes de *Agrobacterium tumefaciens* GV2260 fueron transformadas de manera independiente con cada una de las construcciones: AtPAO2prom-uORF::GUS, AtPAO2prom-no-uORF::GUS, 35S-UTR::GUS y 35S::GUS. De las colonias de bacterias transformantes, se seleccionó una colonia para ser utilizada en la transformación de plantas de *A. thaliana* Col-0 de 3 semanas de edad, mediante el método de infiltración floral descrito por Clough y Bent (1998). Este método consiste en infiltrar primordios florales de *A. thaliana* con una suspensión celular de *A. tumefaciens*, el cual que porta el gen de interés que

será transferido. El medio de infiltración empleado contiene sales de Murashige and Skoog (MS) al 0.22%, sacarosa al 5% y el surfactante Silwet L-77 al 0.005%. Las semillas transformantes AtPAO2prom-uORF::GUS y AtPAO2prom-no-uORF::GUS fueron seleccionadas en medio sólido MS 0.5x conteniendo kanamicina 50 µg/ml o higromicina para la selección de las transformantes 35S-UTR::GUS y 35S::GUS. Las plantas transformantes fueron trasplantadas a suelo y mantenidas en cámara de crecimiento a $22 \pm 1^\circ\text{C}$ y un fotoperiodo de 16 h luz (13,000 lux)/8 h oscuridad hasta la obtención de semillas. La presencia de la construcción de interés en cada línea transformante fue confirmada por amplificación genómica por PCR. Las plantas transformantes, portadoras de la construcción AtPAO2prom-uORF::GUS fueron designadas como líneas uORF, mientras que aquellas portadoras de la construcción AtPAO2prom-no-uORF::GUS fueron designadas como líneas no-uORF.

De cada línea reportera fueron analizadas al menos 6 líneas independientes. De estas, las líneas 35S-UTR::GUSL1, -L2, y -L7; 35S::GUS; uORF-L4 y -L7; y no-uORF -L1 y -L2 fueron seleccionadas para los experimentos siguientes.

Transformación transitoria en monocapas de cebolla

Las células epidérmicas de cebolla (*Allium cepa* L.) fueron transformadas transitoriamente con las construcciones 35S-UTR::GUS o 35S::GUS de acuerdo al protocolo descrito por Feng y colaboradores (2009), con algunas modificaciones. Brevemente, las células de *A. tumefaciens* GV3101 previamente transformadas con las construcciones 35S-UTR::GUS o 35S::GUS fueron suspendidas en medio líquido MS 0.5x conteniendo MgCl_2 10 mM y acetosiringona 50 mM y llevadas a una OD_{600} de 1.0. Las monocapas de cebolla fueron inmersas en la suspensión bacteriana durante 2 h y mantenidas en oscuridad a $22 \pm 1^\circ\text{C}$. Después del cocultivo, las monocapas transitoriamente transformadas fueron transferidas a medio líquido MS 0.5x e incubadas en oscuridad por 12 h a $22 \pm 1^\circ\text{C}$. Al término del tiempo, las monocapas fueron sujetas a la tinción histoquímica de GUS como se

describe en la sección “*Análisis histoquímico y fluorométrico de la actividad de GUS*”.

Aplicación exógena de poliaminas y del inhibidor MGBG

Las semillas de cada línea transformante fueron esterilizadas superficialmente con una solución al 20% de NaClO durante 6 min. Después de 6 lavados con agua destilada estéril las semillas fueron sembradas en cajas de Petri con medio nutritivo MS conteniendo 1.5% (p/v) de sacarosa, 1% (p/v) de agar y kanamicina 50 µg/mL o higromicina. Para la estratificación de las semillas, las placas fueron mantenidas a 4°C durante 2 días y después incubadas en una cámara de crecimiento a 22 ± 1°C con un fotoperiodo de 16 h luz (13 000 lux)/8 h oscuridad durante 1 semana.

Treinta plántulas de 1 semana de edad de las líneas reporteras uORF y no-uORF fueron transferidos a medio sólido MS 0.5x suplementado con cada poliamina (Put, Spd y Spm) a 100 µM. Posteriormente se incubaron durante 3 días en cámara de crecimiento a 22 ± 1°C. El tratamiento con metilglioxal bis (guanilhidrazona) (MGBG), un inhibidor de la SAMDC, consistió en lo siguiente, germinados de 9 días de edad fueron transplantados a medio sólido MS 0.5x conteniendo MGBG 1, 2 y 4 mM y se incubaron en cámara de crecimiento a 22 ± 1°C por 2 días.

Plántulas de 1 semana de edad de las líneas reporteras 35S-UTR::GUS y 35S::GUS fueron transferidas a medio líquido MS 0.5x suplementado con cada poliamina (Put, Spd y Spm) 1 y 100 µM o con MGBG 2 mM y mantenidas en una cámara de crecimiento a 22 ± 1°C durante 1 día. Como control, en todos los tratamientos, se emplearon germinados de cada línea reportera crecidos en medio MS 0.5x sin poliaminas o MGBG. Al cabo de cada tratamiento, las plántulas fueron sometidas a la tinción histoquímica de la actividad de GUS de acuerdo al protocolo descrito posteriormente.

Análisis RT-PCR

Después de cada tratamiento, se extrajo el RNA total de las plántulas de las líneas uORF, no-uORF, 35S-UTR::GUS y 35S::GUS utilizando el reactivo Concert® (Invitrogen). En seguida, para eliminar el DNA contaminante el RNA total fue tratado con DNasa I (Invitrogen) y cuantificado en un espectrómetro NanoDrop ND-1000 UV-Vis (NanoDrop Technologies). La síntesis del cDNA fue hecha a partir de 1 µg de RNA total por muestra utilizando el kit SuperScript II^{MR} (Invitrogen). De cada muestra de cDNA se amplificó un fragmento de 141 pb del transcrito de *GUS* utilizando los oligonucleótidos Fw-GUS 5'-GAATACGGCGTGGATACGTTA-3' y Rv-GUS 5'-ATTCCATACCTGTTACCGAC-3'. Como control interno, se amplificaron simultáneamente 100 pb de los transcritos de la *Actina 2* (*ACT2*, At3g18780) y *Actina 8* (*ACT8*, At1g49240) de *A. thaliana*. Diez µL de cada producto de PCR fueron separados por electroforesis en un gel de agarosa al 1.2% (p/v), teñidos con bromuro de etidio y visualizados con el software Doc-It[®]LS.

Análisis histoquímico y fluorométrico de la actividad de GUS

La localización histoquímica de la actividad de GUS en las líneas reporteras de *A. thaliana* uORF, no-uORF, 35S-UTR::GUS y 35S::GUS, así como de las monocapas de cebolla transformadas con las construcciones 35S-UTR::GUS y 35S::GUS fue analizada de acuerdo al protocolo descrito por Jefferson (1987). Después de cada tratamiento, las plántulas o las monocapas de cebolla fueron incubadas a 37°C toda la noche con el buffer de reacción de GUS [X-Glu (5-bromo-4-cloro-3-indol β-D-glucuronido) 0.5 mg/ml, fosfato de sodio 100 mM, pH 7.0, ferricianuro de potasio 0.5 mM, ferrocianuro de potasio 0.5 mM, Triton X-100 0.1%, EDTA 10 mM]. Al término de la incubación las plantas fueron sometidas a un proceso de aclaración para remover la clorofila según el método descrito por Malamy y Benfey (1997). Las imágenes fueron generadas utilizando una cámara

Moticam 2500 de 5.0 M pixeles acoplada a un microscopio MOTIC modelo BA-300 y procesadas con el software MOTIC versión 2.0.

En los germinados de las líneas reporteras uORF y no-uORF se determinó la actividad de GUS de acuerdo al método fluorométrico descrito por Jefferson (1987). Después de cada tratamiento, los germinados de las líneas uORF y no-uORF fueron molidos y homogeneizados utilizando 500 μL de buffer de extracción de proteínas (NaPO_4 50 mM pH 7.0, DTT 10 mM, Na_2EDTA 10 mM, sarcosina 0.1%, Triton X-100 0.1%) y centrifugados a 13 000 rpm durante 10 min. La concentración de proteína total de cada muestra fue determinada por el método de Bradford (1976). Para la determinación de la actividad enzimática de GUS, 10 μL de cada extracto vegetal fueron incubados durante 1 h a 37°C en 90 μL de buffer de extracción conteniendo MUG (4-metilumbeliferil- β -D-glucuronido) 1 mM. Al término del tiempo, cada reacción fue finalizada con 1.9 mL de Na_2CO_3 0.2 M y la fluorescencia generada por el producto de la reacción, la 4-metilumbeliferona (4-MU), fue leída en un fluorómetro Hoefer DyNA Quant 200 con una longitud de excitación y emisión de 365 nm y 460 nm, respectivamente. Para cada muestra, la actividad enzimática fue medida por triplicado y expresada como $\text{pmol 4-MU min}^{-1}\text{mg}^{-1}$ proteína. Las diferencias estadísticas entre cada medición fue determinada por ANOVA de dos vías.