

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

POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

**“Caracterización funcional de una secuencia de degradación tipo PEST
de la espermina sintasa 1 de maíz (ZmSPMS1)”**

Tesis que presenta

Israel Maruri López

Para obtener el grado de

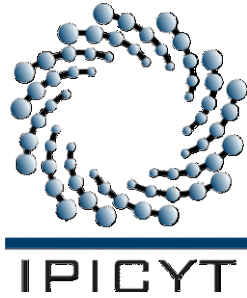
Maestro en Ciencias en Biología Molecular

Director de Tesis: Dr. Juan Francisco Jiménez Bremont

Sinodales: Dra. Margarita Rodríguez-Kessler

Dr. Alejandro De Las Peñas Nava

San Luis Potosí, S.L.P., Julio de 2012



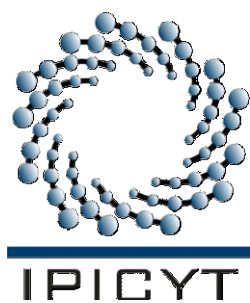
Constancia de aprobación de la tesis

La tesis “**Caracterización funcional de una secuencia de degradación tipo PEST de la espermina sintasa 1 de maíz (ZmSPMS1)**” presentada para obtener el Grado de Maestro en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por Israel Maruri López y aprobada el **05 de Julio de 2012** 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 tesis)

Dra. Margarita Rodríguez-Kessler
(Miembro del Comité Tutoral)

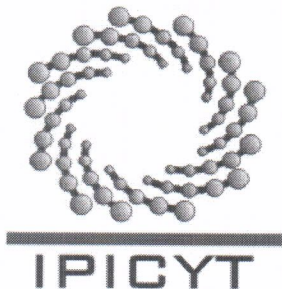
Dr. Alejandro De Las Peñas Nava
(Miembro del Comité Tutoral)



Créditos Institucionales

Esta tesis fue elaborada 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 el autor recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (375927)



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 097 del Libro Primero de Actas de Exámenes de Grado del Programa de Maestría en Ciencias en Biología Molecular está asentado lo siguiente:

En la ciudad de San Luis Potosí a los 5 días del mes de julio del año 2012, se reunió a las 09:30 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

Dra. Margarita Rodríguez y Domínguez Kessler	Presidente	UASLP
Dr. Alejandro De Las Peñas Nava	Secretario	IPICYT
Dr. Juan Francisco Jiménez Bremont	Sinodal	IPICYT

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

MAESTRO EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

sustentó el C.

Israel Maruri López

sobre la Tesis intitulada:

Caracterización funcional de una secuencia de degradación tipo PEST de la espermina sintasa 1 de maíz (ZmSPMS1)

que se desarrolló bajo la dirección de

Dr. Juan Francisco Jiménez Bremont

El Jurado, después de deliberar, determinó

APROBARLO

Dándose por terminado el acto a las 11:25 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fe el Secretario Académico del Instituto.

A petición del interesado y para los fines que al mismo convengan, se extiende el presente documento en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P., México, a los 5 días del mes de julio de 2012.


Mtra. Ivonne Lizette Cuevas Vélez
Jefa del Departamento del Posgrado


Dr. Marcial Bonilla Marín
Secretario Académico



Dedicatorias

para Natalia

Agradecimientos

Al Dr. Juan Francisco Jiménez Bremont, por darme la oportunidad de trabajar en su laboratorio y compartirme sus conocimientos.

A la Dra. Margarita Rodríguez y Domínguez Kessler, por su constante asesoría en la mejora de esta tesis.

A las sugerencias hechas por el Dr. Alejandro De Las Peñas Nava, que mejoraron esta tesis.

A mis amigos del laboratorio 7 Azucena, Luz, Pablo, Fátima, Silvia, Jorge, Itzell, Aida, Adriana.

A la M C. Alicia Becerra Flora, por el apoyo técnico.

CONTENIDO

Constancia de aprobación de la tesis	ii
Créditos Institucionales	iii
Acta de examen	iv
Dedicatorias	v
Agradecimientos	vi
LISTA DE TABLAS	viii
LISTA DE FIGURAS	ix
RESUMEN	x
ABSTRACT	xi
I. INTRODUCCIÓN	1
II. RESULTADOS	3
2.1 La secuencia PEST presente en la enzima ZmSPMS1 es una etiqueta de degradación proteolítica.	3
2.2 La secuencia PEST de la enzima ZmSPMS1 es una etiqueta para degradación vía proteosoma 26S.	9
2.3 Secuencias tipo PEST en aminopropil-transferasas de plantas.	9
III. DISCUSIÓN	16
IV. MATERIALES Y MÉTODOS	22
V. REFERENCIAS	28
VI. MATERIAL SUPLEMENTARIO	33

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Regiones PEST en SPDS's de plantas.	11
Tabla 2. Regiones PEST en SPMS's de plantas.	13
Tabla 3. Regiones PEST en tSPMS's de plantas.	15

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Construcción del vector pMDC32- <i>GUS</i> ::PEST.	5
Figura 2. Tinción de GUS en líneas transgénicas de <i>Arabidopsis thaliana</i> y en monocapas de cebolla.	6
Figura 3. Patrones de expresión de las construcciones pMDC32- <i>GUS</i> y pMDC32- <i>GUS</i> ::PEST.	8

RESUMEN

“Caracterización funcional de una secuencia de degradación tipo PEST de la espermina sintasa 1 de maíz (ZmSPMS1)”

Las poliaminas (PAs) son compuestos alifáticos de bajo peso molecular con carga positiva a pH fisiológico, las cuales están involucradas en diversos procesos bioquímicos, celulares y fisiológicos en todos los organismos. En las plantas, es conocido que los niveles intracelulares de dichas aminos fluctúan entre estadios del ciclo celular, en etapas fisiológicas y en respuesta al estrés. Por esto, los niveles intracelulares de PAs deben estar finamente regulados a través de su anabolismo, catabolismo, conjugación y transporte. Se ha reportado que los genes involucrados en su biosíntesis y catabolismo son regulados tanto a nivel transcripcional, traduccional y postraduccional. En este trabajo nos enfocamos al estudio de la regulación postraduccional de la espermina sintasa 1 de maíz (ZmSPMS1), involucrada en la síntesis de espermina, en la que se requiere una secuencia de degradación tipo PEST. Este mecanismo de regulación en enzimas de la síntesis de PAs ya ha sido ampliamente estudiado en mamíferos; sin embargo, no existen reportes en detalle sobre este mecanismo en ninguna enzima de la biosíntesis de PAs en plantas. Nosotros validamos esta posible secuencia PEST mediante una fusión con el gen reportero *GUS* y un fragmento que incluye la región PEST de la enzima ZmSPMS1. Esta fusión fue evaluada en líneas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* y en expresión transitoria en monocapas de cebolla. Nuestros resultados muestran que la secuencia PEST es una etiqueta para la degradación de la enzima ZmSPMS1 mediada por el proteosoma 26S. Mediante un análisis bioinformático encontramos que estas secuencias de degradación tipo PEST están presentes en diversas aminopropil transferasas de plantas como espermidina, espermina y termo espermina sintasas. Esto indica que dicho mecanismo de regulación postraduccional pudiera estar conservado en esta clase de enzimas.

Palabras clave: poliaminas, aminopropil transferasas, espermina sintasa, PEST, proteosoma 26S

ABSTRACT

"Functional characterization of degradation sequence type PEST of maize spermine synthase 1 (ZmSPMS1)"

Polyamines (PAs) are compounds aliphatic with low molecular weight positively charged at physiological pH, which are involved in various biochemical, cellular and physiological processes in all organisms. In plants, it is known that the intracellular levels of these amines vary between phases of the cell cycle, stages physiological and stress response. Therefore, the intracellular levels of PAs must be tightly regulated through its anabolism, catabolism, conjugation and transport. It has been reported that genes involved in PA biosynthesis and catabolism are regulated at transcriptional, translational and posttranslational levels. In this work we focused the study of posttranslational regulation of maize spermine synthase (ZmSPMS1), involved in the synthesis of spermine, which requires of a degradation sequence type PEST. This regulatory mechanism in the synthesis of PAs enzymes has been extensively studied in mammals; however, there are no reports in detail on this mechanism of any enzyme in PAs biosynthesis in plants. We validate this potential PEST sequence through a fusion of the *GUS* reporter gene with a fragment containing the PEST region of the enzyme ZmSPMS1. This fusion was evaluated in *Arabidopsis thaliana* transgenic lines and transient expression in onion monolayers. Our results show that the PEST sequence is a target for the degradation of the ZmSPMS1 enzyme mediated by 26S proteasome. Using a bioinformatic analysis we found that these PEST sequences are present in various plant aminopropyl transferases as spermidine, spermine and thermo spermine synthases. This indicates that the posttranslational regulatory mechanism may be conserved in this class of enzymes.

Keywords: polyamines, aminopropyl transferases, spermine synthase, PEST, 26S proteasome

I. INTRODUCCIÓN

La espermidina y espermina sintasa (SPDS y SPMS) pertenecen a la clase de las enzimas aminopropil transferasas, las cuales usan como sustrato a la S-adenosilmetionina descarboxilada (dcSAM) para transferir un grupo aminopropilo a una molécula diamina o triamina receptora produciendo las poliaminas (PAs) superiores espermidina (Spd) y espermina (Spm), respectivamente (Kusano et al. 2008; Shao et al. 2012). Debido a su carga positiva, las PAs pueden unirse a moléculas aniónicas como DNA, RNA, cromatina y proteínas, actuando como moléculas reguladoras en varios procesos celulares incluyendo división celular, síntesis de DNA y proteínas, expresión génica, estabilización de membranas y en el funcionamiento de ciertos canales iónicos (Igarashi and Kashiwagi 2000; Childs et al. 2003; Zepeda-Jazo et al. 2011).

Debido a estas múltiples funciones, la homeostasis de las PAs es crucial y se mantiene a través de la regulación de su biosíntesis, catabolismo, conjugación y transporte (Wallace et al. 2003). En particular, la síntesis de estas poliaminas está controlada a diversos niveles como el transcripcional, postranscripcional, traduccional y postraduccional (Carbonell y Blázquez 2009).

En ratón los niveles intracelulares de PAs se mantienen mediante la degradación de la primera enzima de síntesis la ornitina descarboxilasa (ODC), la cual forma putrescina (Put) (Pegg 2006). La degradación de la enzima ODC ocurre cuando ésta forma un complejo con una proteína conocida como “anti-enzima”, exponiendo su extremo C-terminal, en el cual se encuentra una región hidrofílica rica en aminoácidos como prolina, ácido glutámico, serina y treonina (PEST), esta secuencia es una etiqueta para la degradación específica de proteínas a través del proteosoma 26S (Rechsteiner y Rogers 1996).

Recientemente, nuestro grupo de investigación caracterizó una SPMS de maíz (ZmSPMS1), la cual es responsable de la producción de Spm. En un análisis *in silico* de la enzima ZmSPMS1, se identificó una potencial región PEST en el extremo C-terminal. En un análisis de complementación funcional, utilizando una cepa mutante de *Saccharomyces cerevisiae* incapaz de producir Spm (*spe4Δ*), encontramos que solo la versión trunca del extremo C-terminal de la ZmSPMS1 fue capaz de complementar y producir Spm (Rodríguez-Kessler et al. 2010). Proponemos que la ausencia de la secuencia PEST genera una versión funcional de la ZmSPMS1 en levadura.

En esta tesis, se validó funcionalmente la secuencia PEST de la proteína ZmSPMS1 *in planta*. Para lograr este objetivo, realizamos una fusión traduccional entre el gen reportero de la β -glucoronidasa (*GUS*) y las 123 pb del final del marco de lectura abierta del gen *ZmSPMS1*, que incluyen la secuencia PEST. Esta construcción *GUS::PEST* se evaluó mediante su expresión transitoria en monocapas de cebolla y en líneas transgénicas de *Arabidopsis thaliana*. Nuestros datos muestran que la secuencia PEST de la proteína ZmSPMS1 de maíz conduce a la degradación específica de la proteína reportera GUS. Además, observamos que la adición del inhibidor del proteosoma (MG132) bloquea la degradación de la fusión *GUS::PEST*, sugiriendo que este sitio PEST es reconocido por la ruta de degradación del proteosoma 26S. Este resultado es el primer reporte donde se caracteriza a nivel funcional una región PEST en enzimas de la biosíntesis de PAs en plantas. Además, se presenta un análisis bioinformático de posibles secuencias PEST en aminopropil transferasas de diversas especies de plantas. También se discute la ubicación de estas secuencias dentro de las proteínas analizadas entre especies mono y dicotiledóneas.

II. RESULTADOS

2.1 La secuencia PEST presente en la enzima ZmSPMS1 es una etiqueta de degradación proteolítica.

En un estudio realizado por Rodríguez-Kessler y colaboradores (2010) se identificó mediante un análisis *in silico* de la enzima ZmSPMS1 de maíz una posible secuencia PEST en su extremo C-terminal. Además, a través de un experimento de complementación funcional se observó que una versión trunca en el C-terminal de la enzima ZmSPMS1, que solo contenía 8 de los 17 a.a. que conforman la secuencia PEST, fue capaz de producir espermina en una cepa mutante de *Saccharomyces cerevisiae* (*spe4Δ*).

Posiblemente la ausencia de la secuencia PEST generó una versión funcional de la enzima ZmSPMS1 en levadura. Para validar esta hipótesis, fusionamos el gen reportero de la β -glucuronidasa (*GUS*) con 123 pb del marco de lectura abierta del gen *ZmSPMS1*, que codifican para los últimos 40 a.a. de dicha enzima, y que incluyen la secuencia PEST. Esta fusión traduccional se clonó en el vector de expresión pMDC32, el cual tiene el promotor 35S (Fig. 2). Como control positivo de expresión, el gen *GUS* se clonó en el vector pMDC32. Estas construcciones se evaluaron en un sistema de expresión transitoria en monocapas de cebolla y en líneas transgénicas de *Arabidopsis thaliana*. En ambos sistemas, la construcción pMDC32-*GUS*::PEST muestra un decremento en la actividad de GUS, el cual es reflejado en una drástica disminución de la coloración azul, resultado del procesamiento del sustrato 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-glucurónido (X-Gluc), en comparación con la construcción control pMDC32-*GUS*, en donde todas las células son azules (Fig. 2a, b).

Para verificar si la baja señal del reportero GUS en las plantas transgénicas de *A. thaliana* que expresan la fusión *GUS::PEST* se debe a un procesamiento a nivel postraduccional, y no a una regulación a nivel transcripcional, llevamos a cabo un análisis de expresión de la construcción pMDC32-*GUS::PEST* mediante RT-PCR semi-cuantitativo. En este experimento observamos que los niveles de expresión de las tres líneas transgénicas con pMDC32-*GUS::PEST* son constantes y similares a la línea control pMDC32-*GUS* (Fig. 3a). Por el contrario, cuando analizamos los niveles de la proteína GUS mediante Western Blot con un anticuerpo anti-GUS, observamos que los niveles de esta proteína disminuyen en las tres líneas transgénicas con pMDC32-*GUS::PEST* comparadas con las plantas que expresan la construcción control pMDC32-*GUS* (Fig. 3b). Estos resultados sugieren que la secuencia PEST de la enzima ZmSPMS1 de maíz es una etiqueta requerida para su degradación.

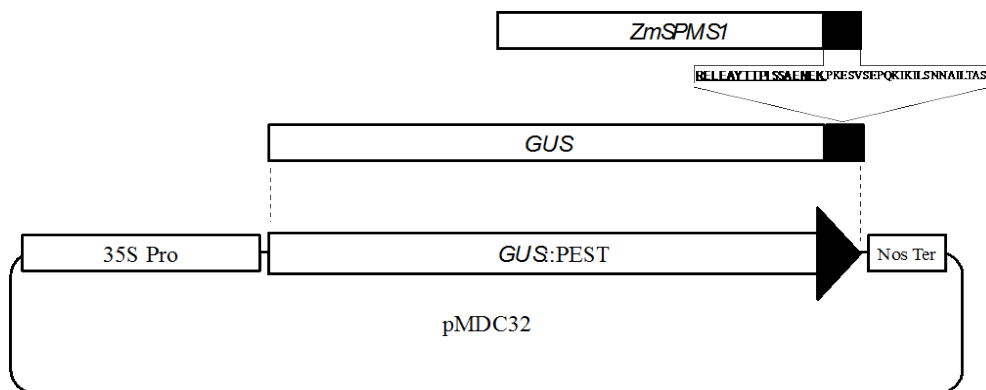


Figura 1. Construcción del vector pMDC32-*GUS*::PEST. Del gen *ZmSPMS1* se amplificaron 123 pb, que codifican una posible secuencia PEST localizada al final de la proteína. En el esquema el fragmento del gen *ZmSPMS1* fusionado a *GUS* se marca en negro. Esta fusión se clonó dentro del vector de expresión pMDC32 bajo el control del promotor 35S.

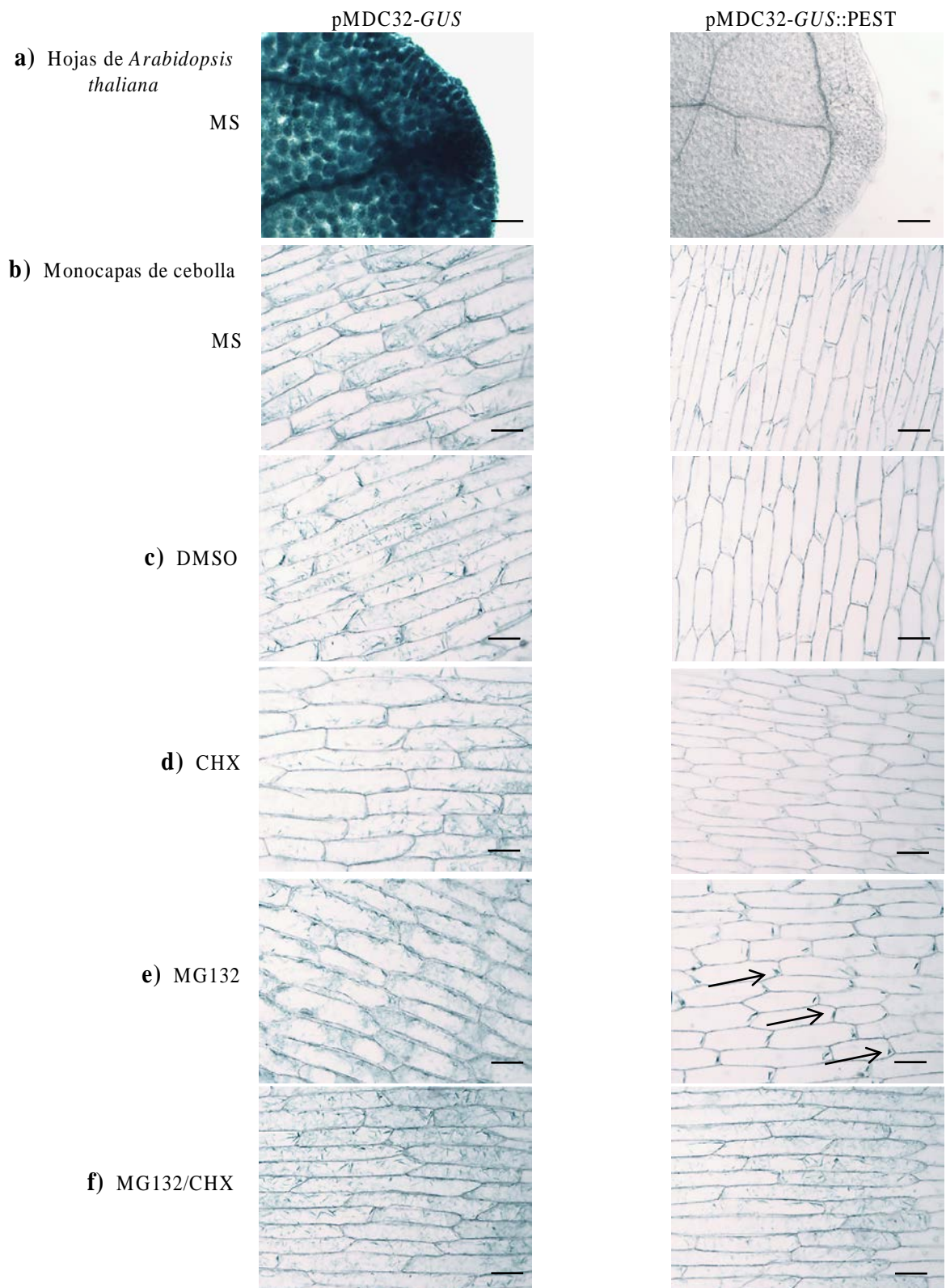


Figura 2. Tinción de GUS en líneas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* y en monocapas de cebolla. Las construcciones pMDC32-*GUS* y pMDC32-*GUS*::PEST se incubaron en medio MS (a, b) y en MS suplementado con dimetilsulfóxido (DMSO, c), cicloheximida (CHX, d), inhibidor del proteosoma MG132 (e) y con una mezcla de

MG132/CHX (f). Las flechas muestran la señal de GUS en la orilla de las células. En la figura se muestra una foto representativa de 50 plantas de *A. thaliana* sometidas a tinción de GUS, provenientes de la línea transgénica 1. La barra de escala corresponde a 100 μm .

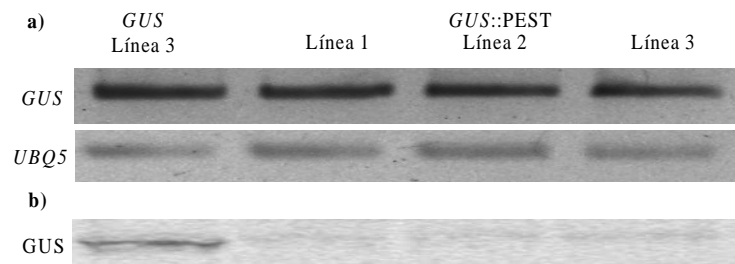


Figura 3. Patrones de expresión de las construcciones pMDC32-*GUS* y pMDC32-*GUS::PEST*. a) RT-PCR de líneas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* que expresan las construcciones pMDC32-*GUS* (control) línea 3 y pMDC32-*GUS::PEST* líneas 1, 2, y 3. Como control de carga se empleó el gen *UBQ5* de *A. thaliana*. b) Western Blot con anti-GUS en extractos de *A. thaliana* que expresan las construcciones pMDC32-*GUS* y pMDC32-*GUS::PEST*.

2.2 La secuencia PEST de la enzima ZmSPMS1 es una etiqueta para degradación vía proteosoma 26S.

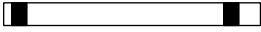
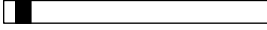
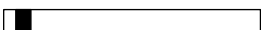
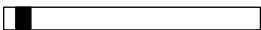
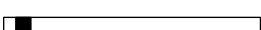



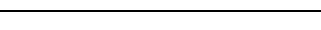
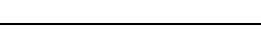

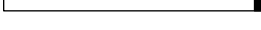

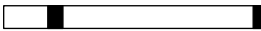
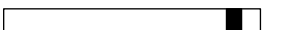


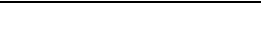
Para examinar si la proteína ZmSPMS1 es degradada vía el proteosoma 26S, analizamos la expresión de la construcción pMDC32-*GUS*::PEST en monocapas de cebolla en presencia de un inhibidor del proteosoma, MG132, y de cicloheximida (CHX), un inhibidor de la síntesis de proteínas. Debido a que el MG132 está disuelto en dimetilsulfóxido (DMSO), este último se incluyó como un tratamiento control. En este experimento observamos un incremento en la expresión de GUS en el tratamiento con ambos inhibidores (MG132/CHX) (Fig. 2f) en comparación con las monocapas de cebolla tratadas con MS, DMSO y CHX (Fig. 2b-d). El tratamiento con el inhibidor MG132 también incrementó la señal del reportero (Fig. 2e) aunque no es tan evidente como con la mezcla de ambos inhibidores. Estos resultados sugieren que el proteosoma 26S puede estar involucrado en la degradación de la proteína ZmSPMS1.

2.3 Secuencias tipo PEST en aminopropil transferasas de plantas.

Con base a nuestros resultados, analizamos secuencias de aminopropil transferasas de plantas para identificar potenciales secuencias PEST. Examinamos 111 secuencias de aminopropil transferasas, que incluyen 45 espermidina sintasas (SPDS's), 37 espermina sintasas (SPMS's) y 29 termo espermina sintasas (tSPMS's) de 38 especies de plantas (Tabla suplementaria 1). Mediante el programa PEST-FIND (<http://emboss.bioinformatics.nl/cgi-bin/emboss/pepfind>) observamos que 18 SPDS's presentan secuencias PEST con valores positivos; de estas 18 SPDS's, 13 muestran solo una secuencia PEST, mientras que en las otras cinco se identificaron dos secuencias

PEST, una en el extremo N-terminal y la otra en el extremo C-terminal, excepto por la SPDS1 de *Glycine max* en la que ambas regiones de degradación están ubicadas en el extremo C-terminal (Tabla 1). Como se puede observar en la Tabla 1, las secuencias PEST ubicadas en el extremo N-terminal presentan los valores más altos, que indican regiones con mayor probabilidad de ser blancos de degradación. En un alineamiento múltiple entre estas secuencias de SPDS's se observó que las secuencias PEST localizadas en el extremo N-terminal de las especies *Ricinus communis*, *Linum usitatissimum*, *Populus trichocarpa*, *G. max* y *Eucalyptus grandis*, se encuentran en una región que diferencia a las SPDS's de las SPMS's, descrita anteriormente por Rodríguez-Kessler y colaboradores (2010) (Fig. suplementaria 1).

Tabla 1. Regiones PEST en SPDS's de plantas.

Especie	Tipo de enzima Numero de acceso	PEST-FIND valor (+)	Posición PEST (N-terminal/C-terminal)	Posición PEST (Tamaño proteína)
<i>Manihot esculenta</i>	SPDS1 cassava4.1_011152m	8.55 2.65		18-47 299-312 (342)
<i>Ricinus communis</i>	SPDS 28610.m000070	3.42		21-72 (346)
<i>Linum usitatissimum</i>	SPDS Lus10029169	5.47		18-67 (343)
<i>Populus trichocarpa</i>	SPDS1 XP_002315806	4.71		16-60 (335)
<i>P. trichocarpa</i>	SPDS2 XP_002315859	4.57		16-60 (335)
<i>Phaseolus vulgaris</i>	SPDS2 Phvulv091031152m	5.57		20-37 (338)
<i>Glycine max</i>	SPDS2 Glyma02g03830.1	4.71		18-66 (340)
<i>G. max</i>	SPDS1 Glyma08g39810.1	0.62 0.46		188-215 291-303 (335)
<i>Malus domestica</i>	SPDS1 BAC20170	4.95 1.04		18-40 335-355 (430)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	SPDS1 NP173794	1.38		291-302 (334)
<i>Arabidopsis lyrata</i>	SPDS1 889925	1.38		335-346 (378)
<i>A. lyrata</i>	SPDS2 476155	4.36		295-308 (340)
<i>Capsella rubella</i>	SPDS1 Carubv10009456m	9.12 1.38		55-79 335-346 (378)
<i>Brassica rapa</i>	SPDS1 Bra024620	0.44		300-312 (344)
<i>Thellungiella halophila</i>	SPDS1 Thhalv10007822m	7.9 1.72		72-98 354-365 (397)
<i>Eucalyptus grandis</i>	SPDS1 Eucgr.H02622.1	0.61		18-65 (341)
<i>Physcomitrella patens</i>	SPDS1 EDQ82005	5.78		5-17 (341)
<i>Hyoscyamus niger</i>	SPDS1 BAA24533	1.99		270-283 (315)

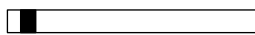
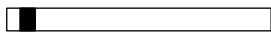
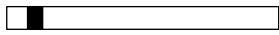
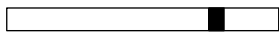
De las espermina sintasas (SPMS's), identificamos secuencias de degradación tipo PEST en 11 enzimas, de las cuales 9 presentan una sola secuencia PEST, con un patrón de localización en el extremo C-terminal, excepto por la SPMS2 de *Cucumis sativus* que se localiza en el extremo N-terminal y la SPMS2 de *Brachypodium distachyon* que la región PEST se presenta en la parte central de la proteína (Tabla 2). En un alineamiento múltiple entre las 11 SPMS's con secuencias PEST y la SPMS de *A. thaliana*, la cual no tiene secuencias PEST, observamos que las SPMS's de plantas monocotiledóneas son mas largas en el extremo C-terminal comparadas con las de dicotiledóneas y en esta extensión se encuentra una secuencia tipo PEST (Fig. suplementaria 2).

Tabla 2. Regiones PEST en SPMS´s de plantas.

Especie	Tipo de enzima Numero de acceso	PEST-FIND valor (+)	Posición PEST (N-terminal/C-terminal)	Posición PEST (Tamaño proteína)
<i>Cucumis sativus</i>	SPMS2 Cucsa.040600.2	0.31		37-48 (368)
<i>Citrus sinensis</i>	SPMS1 orange1.1g017607m	0.23		351-365 (369)
<i>C. sinensis</i>	SPMS2 orange1.1g016578m	0.23		369-383 (387)
<i>Citrus clementina</i>	SPMS clementine0.9_034330m	0.23		310-324 (328)
<i>Sorghum bicolor</i>	SPMS1 Sb10g020570.1	3.75		349-365 (388)
<i>Zea mays</i>	SPMS2 AC202893	4.74		351-374 (387)
<i>Z. mays</i>	SPMS1 AAW57523	3.65		350-366 (389)
<i>Setaria italica</i>	SPMS1 Si006628m	11.07		350-364 (364)
<i>S. italica</i>	SPMS2 Si020398m	8.30		361-373 (386)
<i>Oryza sativa</i>	SPMS2 BAD29687	8.65		372-384 (397)
<i>Brachypodium distachyon</i>	SPMS2 Bradi3g09540.1	0.9		209-236 (386)

De las 29 tSPMS's analizadas, encontramos que cuatro presentan una secuencia PEST, las de las especies *Manihot esculenta*, *Prunus persica* y *Sorghum bicolor* presentan la secuencia PEST en el extremo N-terminal con valores mas altos, en comparación a la del musgo *Physcomitrella patens*, la cual esta ubicada en el extremo C-terminal con un valor de +1.48 (Tabla 3). En un alineamiento de estas cuatro tSPMS's y la tSPMS de *A. thaliana* que no tiene secuencias PEST, se observó que la posición de dicha secuencia esta conservada entre las tSPMS's de *M. esculenta*, *S. bicolor* y *A. thaliana*, sin embargo, en *A. thaliana* la secuencia PEST no se detecta por el programa PEST-FIND, debido a cambios puntuales en su secuencia (Fig. suplementaria 3).

Tabla 3. Regiones PEST en tSPMS's de plantas.

Especie	Tipo de enzima Numero de acceso	PEST-FIND valor (+)	Posición PEST (N-terminal/C-terminal)	Posición PEST (Tamaño proteína)
<i>Manihot esculenta</i>	tSPMS cassava4.1_011466m	5.45		22-41 (334)
<i>Prunus persica</i>	tSPMS ppa1027209m	2.65		21-46 (354)
<i>Sorghum bicolor</i>	tSPMS Sb02g025980.1	6.93		34-55 (364)
<i>Physcomitrella patens</i>	tSPMSa XP_001760221	1.48		271-300 (355)

III. DISCUSIÓN

Las poliaminas (PAs) han sido asociadas con distintos procesos celulares fundamentales. En las plantas, estas poliaminas están involucradas en procesos fisiológicos como: embriogénesis, organogénesis, iniciación floral y desarrollo, senescencia, así como en la respuesta al estrés biótico y abiótico (revisado por Kusano et al 2008). Por ejemplo, se ha reportado que los contenidos intracelulares de PAs regulan importantes puntos de control dentro del ciclo celular, ya que durante las fases G1, S y G2 se ha observado un incremento de dichas aminos, seguida de una disminución en sus niveles al inicio de la fase M (Wallace et al. 2003). Además, el uso de inhibidores de la síntesis de PAs conduce al arresto del ciclo celular (Ray et al. 1999).

En plantas ha sido reportado que el nivel de PAs aumenta en respuesta al estrés biótico y abiótico (Ashraf y Harris 2004; Kasinathan y Wingler 2004; Jiménez-Bremont et al. 2007; Rodríguez-Kessler et al. 2008; Hernández-Lucero et al. 2008; Ortega-Amaro et al. 2012). Dicha acumulación de PAs en las células vegetales, activa la síntesis de moléculas de señalización como óxido nítrico, peróxido de hidrogeno y ácido abscísico, que son clave para el desarrollo y la respuesta al estrés (Tun et al. 2006; An et al. 2008; Neill et al. 2008).

Estos datos indican que los niveles de PAs deben ser finamente regulados. El contenido intracelular de estas aminos es controlado a través de su anabolismo, catabolismo, conjugación y transporte (revisado por Carbonell y Blázquez 2009). Por ejemplo, uno de los mecanismos que regula la producción de PAs superiores (Spd y Spm) es el control traduccional de las enzimas *S*-adenosilmetionina descarboxilasas (SAMDC), mediante la regulación en la traducción de pequeños marcos de lectura abierta (uORF's) ubicados en el 5'UTR de estos genes, los cuales regulan la traducción del ORF principal

en un proceso dependiente de la concentración intracelular de PAs (Ivanov et al. 2009). Sin embargo, la regulación postraduccional de estas enzimas ha sido poco explorada en plantas, la cual podría tener implicaciones importantes en los niveles de PAs en las células vegetales.

En mamíferos, a nivel postraduccional, uno de los mecanismos más estudiado es la degradación de la enzima ornitina descarboxilasa (ODC) de ratón, la cual es clave en la síntesis de PAs. La degradación de esta enzima ocurre cuando los niveles de Spd y Spm son elevados, y su extremo C-terminal es expuesto, el cual presenta una secuencia de degradación tipo PEST. Este proceso es mediado por el proteosoma 26S y no depende de ubiquitinación (Pegg 2006). La expresión heteróloga en tabaco de una versión trunca en el extremo C-terminal de la ODC de ratón (DeScenzo y Minocha 1993) y la transferencia de esta secuencia PEST a la ODC de *Trypanosoma*, la cual no contiene secuencias PEST (Li y Coffino 1993), demuestran que la degradación de la ODC se debe a esta etiqueta. En plantas este tipo de regulación por secuencias PEST en enzimas de la biosíntesis y catabolismo de PAs ha sido poco explorada. Recientemente se reportó que una secuencia tipo PEST participa en la degradación de la SAMDC1 de *Arabidopsis thaliana* (Zhang et al. 2011).

En esta tesis se caracterizó una secuencia de degradación tipo PEST de la espermina sintasa 1 de maíz (ZmSPMS1). Para ello se llevo acabo una fusión entre una región del extremo C-terminal que incluye la secuencia PEST de la enzima ZmSPMS1 con el gen reportero *GUS*. Esta fusión *GUS*::PEST conduce a la degradación de la proteína reportera *GUS* en líneas transgénicas de *A. thaliana* y en una transformación genética transitoria de monocapas de cebolla.

Estos resultados concuerdan con lo reportado por nuestro grupo de investigación (Rodríguez-Kessler et al. 2010), en donde se observó que una versión corta en el

extremo C-terminal de la ZmSPMS1, que tiene la secuencia PEST incompleta, fue capaz de producir Spm en la cepa mutante (*spe4Δ*) de *Saccharomyces cerevisiae*. En conjunto estos resultados demuestran que esta secuencia PEST es una etiqueta para la degradación de la enzima ZmSPMS1 de maíz.

Por otro lado, cuando las monocapas de cebolla transformadas con la fusión *GUS::PEST* son tratadas con un inhibidor del proteosoma 26S, MG132, se observan pequeñas señales de GUS localizadas en las orillas de las células de las monocapas de cebolla (Fig. 2e), en comparación a las monocapas no tratadas con dicho inhibidor, o solo tratadas con cicloheximida (CHX) y con dimetilsulfóxido (DMSO), en donde la señal de GUS es casi nula.

Este efecto, donde el MG132 no bloquea del todo la degradación de GUS, puede ser debido a que el efecto de este inhibidor es reversible, ya que presenta una alta tasa de disociación (Tsubuki et al. 1996); otra causa podría ser la reducida asimilación del inhibidor por las células vegetales. Sin embargo, cuando el tratamiento del inhibidor MG132 es suplementado con un inhibidor de la síntesis de proteínas como la CHX, se observa un mayor incremento de la señal del reportero GUS en comparación a la transformación de *GUS::PEST* solo tratada con MG132, logrando niveles cercanos a la construcción GUS (sin la secuencia PEST) tratadas con MG132 y CHX. Lo observado es resultado de la acción de la CHX, la cual disminuye la traducción *de novo* de proteínas, incluyendo los elementos del proteosoma, y del efecto del inhibidor MG132. Lo que nos lleva a concluir que el proteosoma 26S está involucrado en la degradación de la fusión *GUS::PEST*.

La degradación de proteínas vía la ruta ubiquitin/proteosoma 26S es de gran importancia en organismos eucariontes ya que está involucrada en distintos procesos fundamentales como, diferenciación y desarrollo, señalización hormonal, resistencia a

enfermedades, entre otros (Vierstra 2003). En años recientes, el estudio de esta ruta ha ganado gran importancia en plantas, mostrando que proteínas que regulan procesos celulares básicos como el ciclo celular (Planchais et al. 2004; Adachi et al. 2006), transcripción (Sakuma et al. 2006; Lu et al. 2010) y síntesis de PAs (Zhang et al. 2011) son degradadas mediante el reconocimiento de secuencias tipo PEST vía el proteosoma 26S.

Rechsteiner y Rogers (1996), reportaron que las secuencias PEST pueden estar distribuidas a lo largo de la proteína, sin embargo su posición es más conservada en el extremo C-terminal. El algoritmo diseñado para la predicción de estas secuencias inicialmente fue evaluado en proteínas de *S. cerevisiae* y mamíferos, en el cual se considera un rango que va desde -50 hasta +50, donde valores positivos mayores de cinco, son potenciales sitios de degradación. Sin embargo, valores mayores de cero podrían llegar a ser blanco de degradación. Por ello, es necesaria su demostración experimental.

Al igual que en la ODC de ratón (+5.16), la región PEST de la ZmSPMS1 se encuentra localizada en el extremo C-terminal. Recientemente nuestro grupo de investigación reportó que las SPMS's de especies monocotiledóneas presentaban un extremo C-terminal más largo en comparación a las SPMS's de especies dicotiledóneas. En este análisis se identificó que las SPMS's de maíz y arroz contenían en esa extensión del C-terminal secuencias tipo PEST. En particular, en maíz la ZmSPMS1 con un valor de +3.65 (la cual fue objeto de estudio en este trabajo), la ZmSPMS2 con un valor de +4.74 y en arroz la OsSPMS2 con un valor de +8.56 (Rodríguez-Kessler et al. 2010).

Con base en la demostración experimental de la secuencia PEST de la enzima ZmSPMS1 como una etiqueta de degradación y con lo reportado por Rodríguez-Kessler y colaboradores (2010), se llevo a cabo un estudio bioinformático para identificar

regiones PEST en aminopropil-transferasas (SPDS, SPMS y tSPMS) de plantas.

En este estudio identificamos 37 SPMS's, de las cuales el 30% presentan secuencias PEST con valores positivos. Se observó que las SPMS's de especies monocotiledóneas presentan estos sitios en el extremo C-terminal, con valores positivos altos, estas enzimas pertenecen a especies como *Setaria itálica*, *Oryza sativa*, *Sorghum bicolor* y *Zea mays*. De la misma manera encontramos que las SPMS's de árboles del genero *Citrus* presentan secuencias PEST en el extremo C-terminal, sin embargo los valores son bajos comparados con las SPMS's de especies monocotiledóneas. En conclusión las SPMS's de monocotiledóneas son mas largas en el extremo C-terminal y en esta extensión se encuentra codificada una etiqueta que regula a estas enzimas a nivel postraducciona

Sin embargo, ¿cómo estas etiquetas de degradación no son reconocidas en las SPMS's cuando la célula necesita sintetizar espermina? Uno de los mecanismo mas estudiados de degradación mediada por secuencias PEST es la ODC de mamíferos. Esta enzima forma un homodímero para ser catalíticamente activa, así que las secuencias PEST de cada monómero quedan ocultas impidiendo su degradación. La exposición de las secuencias PEST se lleva acabo cuando el dímero de ODC interactúa con una proteína conocida como "anti enzima", provocando la degradación de la enzima (Hayashi y Murakami 1995).

De acuerdo con lo anterior, ha sido reportado que diversas aminopropil transferasas forman homodímeros (Pegg y Michael 2010). Por ejemplo, el dímero de la HsSPDS de humano formado por la unión de sus extremos N y C-terminal (Wu et al. 2007), o la formación de oligómeros entre los dímeros de SPDS's y SPMS's en *A. thaliana* (Panicot et al. 2002). Zhang y colaboradores (2011) reportaron que la interacción de la

enzima SAMDC1 con una proteína viral evita la degradación de dicha enzima, facilitando la proliferación viral.

Es importante determinar si la enzima ZmSPM1 de maíz forma dímeros y/o si existen proteínas que se unan a su secuencia PEST. Para responder esta incógnita, se cuenta con una construcción de la AtSPMS de *A. thaliana* y la ZmSPMS1 de maíz en el sistema de dos híbridos (datos no mostrados).

En el análisis bioinformático de las SPDS's, se identificaron 18 de 45 SPDS's con secuencias PEST que presentan valores positivos, en donde la mayoría de estas secuencias de degradación se ubican en el extremo N-terminal. Rodríguez-Kessler y colaboradores (2010) describieron la organización genómica de las aminopropil-transferasas de plantas, en donde observaron que el segundo exón de las SPMS's estaba ausente en las SPDS's. Es interesante notar que la ubicación de la secuencia PEST en las SPDS's de *Ricinus communis*, *Linum usitatissimum*, *Populus trichocarpa*, *Glycine max* y *Eucalyptus grandis* se localizan en esta región que diferencia a las SPMS's de las SPDS's.

El análisis de las 29 secuencias tSPMS's, arrojó que el 14% presentan secuencias PEST con valores positivos ubicados en el extremo N-terminal como lo observado en las SPDS's.

Este trabajo abre una pauta para el estudio de la regulación postraduccional de aminopropil transferasas en plantas.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Material vegetal y condiciones de crecimiento

En este estudio se utilizaron semillas de *Arabidopsis thaliana* ecotipo Col-0. Estas fueron esterilizadas con cloro al 20% (v/v) por 5 minutos, posteriormente se lavaron tres veces con agua destilada estéril y fueron germinadas en placas de medio MS (Murashige and Skoog 1962), pH 5.7, suplementadas con sacarosa al 0.5% y agar al 1%. Las placas fueron incubadas en una cámara de crecimiento con un fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas oscuridad, con una temperatura de $22 \pm 2^\circ\text{C}$.

Para la obtención de monocapas cebolla fue usada una variedad comercial *Allium cepa*. Después de la transformación, las monocapas fueron recuperadas en oscuridad en medio líquido MS suplementado con sacarosa al 0.5% a una temperatura de $22 \pm 2^\circ\text{C}$.

4.2 Construcción de plásmidos

El marco de lectura abierta del gen reportero *GUS* fue amplificada por PCR, y clonado en el vector de entrada pCR®8/GW/TOPO (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), posteriormente fue subclonado en el vector de expresión pMDC32 por recombinación sitio específica usando la enzima LR Clonasa II (Sistema Gateway; Invitrogen, Carlsbad, CA), los oligonucleótidos usados fueron los siguientes: 5-*GUS* 5'atgttacgtcctgtagaaacccaacc 3' (sentido) y 5'tattgtttgcctcctgctgagg 3' (anti-sentido). Para la generación de la fusión traduccional *GUS::PEST* la secuencia del ORF del gen *GUS* fue amplificada sin el codón de paro mediante PCR. De la misma manera fue amplificada la secuencia nucleotídica que codifica para el supuesto sitio PEST que

consiste en 123 pb del extremo 3' del gen *ZmSPMS1*. Con el fin de fusionar el extremo 3' del gen reportero *GUS* a el extremo 5' de la región PEST, fueron introducidos sitios de restricción *KpnI* en la secuencia de los oligonucleotidos (bases subrayadas) como se describe: 5-*GUS* 5'atgttacgtcctgtagaaacccaacc 3' (sentido) y 5'ggggtaccctgtttgcctccctgctg 3' (anti-sentido) para el gen reportero *GUS*, y 5-PEST*ZmSPMS1* 5'ggggtaccagagaactggaagcatatgccgct 3' (sentido) y 3-PEST*ZmSPMS1* 5'ctaggaagctgtaagaatggc 3' (anti-sentido) para la secuencia PEST del gen *ZmSPMS1*.

Después de la amplificación por PCR, ambos productos fueron digeridos con la enzima *KpnI* (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) generando extremos cohesivos, los cuales posteriormente fueron ligados usando la DNA ligasa T4 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) siguiendo las indicaciones del fabricante. El producto ligado fue clonado en el vector de entrada pCR8/GW/TOPO y subclonado en el vector de expresión pMDC32 usando la tecnología Gateway.

Finalmente las construcciones pMDC132-*GUS* y pMDC32-*GUS*::PEST fueron usadas para la transformación mediada por *Agrobacterium tumefaciens* de plantas de *A. thaliana* y monocapas de cebolla.

4.3 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La reacción de PCR fue llevada a cabo de acuerdo a las especificaciones del kit "HotStar HiFidelity PCR" (QIAGEN®) en un volumen de 50 µL, de la cual, 34 µL de agua milliQ, 10 µL de Buffer 5x "HotStar HiFidelity PCR" (contiene dNTP's), 10 µL de solución Q 5x, 1 µL (1µM) de oligonucleótidos y 1 µL "HotStar HiFidelity PCR", las condiciones de los ciclos de PCR fueron siguiendo las recomendaciones del kit; siendo las siguientes: 2 min a 98°C; 35 ciclos de 15 s a 94°C, [30 s a 66°C (*GUS*) y 30 s

a 60 (PEST)] y 5 min a 72°C, seguido de un ciclo de 5 min a 72°C. El termociclador utilizado fue de la marca Applied Biosystems modelo 2720.

4.4 Transformación mediada por *A. tumefaciens*

Para la generación de líneas transgénicas de *A. thaliana* fueron transformadas plantas con la cepa GV2260 de *A. tumefaciens* conteniendo los vectores pMDC132-*GUS* y pMDC32-*GUS*::PEST usando el método “floral dip” (Zhang 2006). Las plantas transformadas fueron seleccionadas en medio MS suplementado con higromicina (50 mg/mL). Para este estudio fueron utilizadas plantas generación F2, de 7 días de edad.

Para la expresión transitoria las monocapas de cebolla fueron transformadas con la cepa GV3101 de *A. tumefaciens* de acuerdo con el protocolo de Feng y colaboradores (2008) con algunas modificaciones. Las monocapas fueron sumergidas en medio MS conteniendo: la cepa *A. tumefaciens* de transformada con el plásmido recombinante, 50 mM acetosiringona y 10 mM de MgCl₂, por 40 minutos, después las monocapas fueron recuperadas en medio líquido MS suplementado con sacarosa al 0.5% durante 12 hrs.

4.5 Extracción de RNA y síntesis de cDNA de plantas de *A. thaliana*

La extracción de RNA de plantas de *A. thaliana* fue llevada a cabo usando el reactivo Concert (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), de acuerdo a las indicaciones del fabricante y las muestras fueron guardadas a -70 °C hasta su uso. Para remover el DNA genómico del RNA, las muestras fueron tratadas con DNasa I (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).

La síntesis de cDNA fue realizada utilizando la enzima Super Script II (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. Hasta su uso las muestras fueron mantenidas a -20 °C.

4.6 RT-PCR semi-cuantitativo

Este análisis fue llevado a cabo en una reacción de 25 μL , conteniendo 1 μL de cDNA, 0.5 μL de cada oligonucleótido, 2.5 μL de Buffer 10X, 1.5 μL de 50mM MgCl_2 , 0.5 μL de 10mM dNTPs y 0.5 μL de Taq polimerasa recombinante (Invitrogen Carlsbad, CA, USA). El gen de la Ubiquitina 5 fue usado como control de carga. La reacción de PCR se llevo a cabo en un termociclador 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems).

Un fragmento de 400 pb del gen reportero *GUS* fue utilizado para evaluar la expresión de las construcciones pMDC32-*GUS* y pMDC32-*GUS*::PEST en las líneas transgénicas de *A. thaliana*. Los oligonucleótidos empleados fueron los siguientes: 5-*GUS* 5'atgttacgtcctgtagaaacccaacc 3' (sentido) y 5'cacaacgggtgatacgtacact 3' (anti-sentido).

Para el control de carga Ubiquitina 5 los oligonucleótidos usados fueron los siguientes: 5 FwUBQ5 5'tcgacgttcacatcctcctc 3' (sentido) y RvUBQ5 5g'gatctggaaggttcagcg 3' (anti-sentido).

Las condiciones de PCR fueron: 5 min a 94°C; 25 ciclos de 30 s a 94°C, 30 s a 60°C y 5 min a 72°C, seguido de un ciclo de 5 min a 72°C. El termociclador utilizado fue de la marca Applied Biosystems modelo 2720.

4.7 Western blot

Las plantas de *A. thaliana* fueron molidas e incubadas en PBS (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 4.3 mM Na_2HPO_4 , 1.4 mM KH_2PO_4 , pH 7.3) más 2% (p/v) de polivinilpirrolidona (PVPP) durante 10 min a 4 °C. Las muestras se centrifugaron 5 min a 13,200 rpm y los sobrenadantes se mezclaron con un volumen de solución de Laemmli 2X y se hirvieron por 5 minutos.

La proteína total fue corrida en un gel al 12% de acrilamida y transferida a una membrana de nitrocelulosa (Hybond-C Extra; Amersham Biosciences, Little Chalfont, Bucks, UK). La membrana se bloqueó por una hora a temperatura ambiente con leche en polvo al 5% diluida en TBST [30 mM Tris pH 8.0, 150 mM NaCl, 0.1% (v/v) Triton X-100] y posteriormente se incubó toda la noche a 4 °C con el anticuerpo primario anti-GUS (anti- β -glucuronidase, rabbit IgG fraction, Invitrogen) diluido 1:5000 en TBST. La membrana se lavó tres veces con TBST por 15 minutos y se incubó por una hora a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario [anti-Rabbit IgG (H&L) antibody alkaline phosphatase-linked, Cell Signaling] diluido 1:5000 en TBST. La membrana se volvió a lavar tres veces con TBST por 15 minutos y se reveló con los reactivos NBT y BCIP (Zymed Laboratories, Inc., San Francisco, CA, USA).

4.8 Inhibición del proteosoma 26S

Para los ensayos de inhibición del proteosoma 26S y síntesis de proteínas en monocapas de cebolla fue utilizado medio MS suplementado con 100 μ M de MG132 (Cayman Chemical) y CHX (Sigma) durante 6 hr. El tratamiento con MDSO fue llevado a cabo con volumen equivalente a la concentración de MG132.

4.9 Análisis histoquímico

Las plántulas de *A. thaliana* y las monocapas de cebolla fueron incubadas con el buffer de tinción (0.5 mg/mL de 5-bromo-4-cloro-3-indol-b-D- glucuronidasa en 100 mM de fosfato de sodio a pH 7.0) a 37°C por 12 hrs (Jefferson 1987).

Los tejidos de *A. thaliana* fueron blanqueados como describen Malamy y Benfey (1997). Las imágenes fueron generadas usando un microscopio MOTIC modelo BA-300 acoplado a una cámara de 5.0 megapíxeles y procesaron mediante el software MOTIC versión 2.0.

4. 10 Identificación de regiones PEST en aminopropil-transferasas

Las secuencias de aminopropil-transferasas (SPDS's, SPMS's y tSPMS's) de plantas fueron obtenidas de las bases datos del GenBank y phytozome (www.phytozome.net). La secuencia de a.a. de la enzima ZmSPMS1 de maíz fue empleada para la identificación de enzimas SPMS's y SPDS's (debido al alto porcentaje de identidad que existe entre estas enzimas), mediante un análisis tipo BLAST; en donde fueron identificadas 111 secuencias de aminopropil-transferasas (45 SPDS's y 37 SPMS's). Para la identificación de las tSPMS's fue utilizada la secuencia de a.a. de la enzima tSPMS de *A. thaliana*, mediante un análisis tipo BLAST; fueron encontradas 29 secuencias de tSPMS's. Para este estudio fueron consideradas secuencias con un porcentaje de identidad mayor de 65%. En total 38 especies de plantas fueron analizadas.

Para la identificación de las regiones PEST esta secuencias fueron analizadas en el programa PEST-FIND (<http://emboss.bioinformatics.nl/cgi-bin/emboss/epestfind>), y solo fueron considerados valores de score positivos.

El alineamiento de las secuencias de SPDS's, SPMS's y tSPMS's con regiones PEST fue realizado utilizando el programa ClustalW2 (www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/), sin modificaciones a los parámetros establecidos por dicho programa.

V. REFERENCIAS

Adachi S, Uchimiya H, Umeda M (2006) Expression of B2-type cyclin-dependent kinase is controlled by protein degradation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* 47:1683-1686

Adachi S, Uchimiya H, Umeda M (2006) Expression of B2-type cyclin-dependent kinase is controlled by protein degradation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* 47:1683-1686

Alcazar 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(6):1237-1249

An ZF, Jing W, Liu YL, Zhang WH (2008) Hydrogen peroxide generated by copper amine oxidase is involved in abscisic acid-induced stomatal closure in *Vicia faba*. *J Exp Bot* 59:815-825

Ashraf M, Harris PJC (2004) Potential biochemical indicators of salinity tolerance in plants. *Plant Science* 166:3-16

Carbonell J, Blázquez MA (2009) Regulatory mechanisms of polyamine biosynthesis in plants. *Gene & Genomics* 31(2):107-118

Childs AC, Mehta DJ, Gerner EW (2003) Polyamine-dependent gene expression. *Cell Mol Life Sci* 60:1394-1406

DeScenzo RA, Minocha SC (1993) Modulation of cellular polyamines in tobacco by transfer and expression of mouse ornithine decarboxylase cDNA. *Plant Mol. Biol.* 22:113-127

- Feng DR, Liu B, Li WY, He YM, Qi KB, Wang HB, Wang JF (2008) 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
- Hayashi S, Murakami Y (1995) Rapid and regulated degradation of ornithine decarboxylase. *Biochem. J.* 306:1:10
- Hernández-Lucero E, Ruiz OA, Jiménez-Bremont JF (2008) Effect of salt stress on polyamine metabolism in two bean cultivars. *Plant Stress* 2:96-102
- Igarashi K, Kashiwagi K (2000) Polyamines: mysterious modulators of cellular functions. *Biochem Biophys Res Commun* 271:559-564
- Ivanov IP, Atkins JF, Michael AJ (2009) A profusion of upstream open reading frame mechanisms in polyamine-responsive translational regulation. *Nucleic Acids Res* 38:353-359
- Jefferson RA, Kavanagh TA, Bevan MW (1987) GUS fusions: glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO Journal* 6:3901-07
- Jiménez-Bremont JF, Ruiz OA, Rodríguez-Kessler M (2007) Modulation of spermidine and spermine levels in maize seedlings subjected to long-term salt stress. *Plant Physiol Biochem* 45:812-821
- 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(1):101-107
- Kusano T, Berberich T, Tateda C, Takahashi Y (2008) Polyamines: essential factors for growth and survival. *Planta* 228:367-381
- Li X, Coffino P (1993) Distinct domains of antizyme required for binding and proteolysis of ornithine decarboxylase. *Mol. Cell. Biol.* 14:87-92
- Lu QS, Dela Paz J, Pathmanathan A, Chiu RS, Tsai AYL, Gazzarrini S (2010) The C-

terminal domain of FUSCA3 negatively regulates mRNA and protein levels, and mediates sensitivity to the hormones abscisic acid and gibberellic acid in Arabidopsis. *Plant J* 64:100-113

Malamy JE, PN Benfey (1997) A rapid system for assessing transgene expression in roots of Arabidopsis. *Plant J* 12:957-963

Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15:473-497

Neill S, Barros R, Bright J, Desikan R, Hancock J, Harrison J, Morris P, Ribeiro D, Wilson I (2008) Nitric oxide, stomatal closure, and abiotic stress. *J Exp Bot* 59:165-176

Ortega-Amaro MA, Rodríguez-Kessler M, Becerra-Flora A, Jiménez-Bremont JF (2012) Modulation of Arabidopsis CYCB1 expression patterns by polyamines and salt stress. *Act Phys Plant* 34(2):461-469

Panicot M, Minguet EG, Ferrando A, Alcázar R, Blázquez MA, Carbonell J, Altabella T, Koncz C, Tiburcio AF (2002) A polyamine metabolon involving aminopropyl transferase complexes in Arabidopsis. *Plant Cell* 14:2539-51

Pegg AE (2006) Regulation of ornithine decarboxylase. *J Biol Chem* 281(21):14529-32

Pegg AE, Michael A (2009) Spermine synthase. *Cell Mol Life Sci* 67:113-121

Planchais S, Samland AK, Murray JAH (2004) Differential stability of Arabidopsis D-type cyclins: CYCD3;1 is a highly unstable protein degraded by a proteasome-dependent mechanism. *Plant J.* 38:616-25

Ray RM, Zimmerman BJ, McCormack SA, Patel TB, Johnson LR (1999) Polyamine depletion arrests cell cycle and induces inhibitors p21(Waf1/Cip1), p27(Kip1), and p53 in IEC-6 cells. *Am. J. Physiol* 276:684-691

Rechsteiner, M, Rogers SW (1996) PEST sequences and regulation by proteolysis. *Trends Biochem Sci* 21(7):267-271

Rodríguez-Kessler M, Ruiz OA, Maiale S, Ruiz-Herrera J, Jiménez-Bremont JF (2008) Polyamine metabolism in maize tumors induced by *Ustilago maydis*. *Plant Physiol Biochem* 46:805-814

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(7):574-590

Sakuma Y, Maruyama K, Osakabe Y, Qin F, Seki M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2006) Functional analysis of an *Arabidopsis* transcription factor, DREB2A, involved in drought-responsive gene expression. *Plant Cell* 18:1292-1309

Shao L, Majumdar R, Minocha SC (2012) Profiling the aminopropyltransferases in plants: their structure, expression and manipulation. *Amino Acids* 42:813-830

Tsubuki S, Saito Y, Tomioka M, Ito H, Kawashima S (1996) Differential inhibition of calpain and proteasome activities by peptidyl aldehydes of di-leucine and tri-leucine. *J Biochem* 119:572-576

Tun NN, Santa-Catarina C, Begum T, Silveira V, Handro W, Floh EIS, Scherer GFE (2006) Polyamines induce rapid biosynthesis of nitric oxide (NO) in *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Plant Cell Physiol* 47:346-354

Vierstra RD (2003) The ubiquitin/26S proteasome pathway, the complex last chapter in the life of many plant proteins. *Trends Plant Sci* 8:135-42

Wallace HM, Fraser AV, Hughes A (2003) A perspective of polyamine metabolism. *Biochem. J.* 376:1-14

Wu H, Min J, Zeng H, McCloskey DE, Ikeguchi Y, Loppnau P, Michael AJ, Pegg AE, Plotnikov AN (2008) Crystal structure of human spermine synthase: implications of substrate binding and catalytic mechanism. *J Biol Chem* 283:16135-46

Zepeda-Jazo I, Velarde-Buendía AM, Enríquez-Figueroa R, Bose J, Shabala S, Muñiz-Murguía J, Pottosin II (2011) Polyamines interact with hydroxyl radicals in activating Ca(2+) and K(+) transport across the root epidermal plasma membranes. *Plant Physiol* 157(4):2167-80

Zhang X, Henriques R, Lin SS, Niu QW, Chua NH (2006) Agrobacterium-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* using the Floral dip method. *Nat Protoc* 1(2): 641-646

Zhang Z, Chen H, Huang X, Xia R, Zhao Q, Lai J, Teng K, Li Y, Liang L, Du Q, Zhou X, Guo H, Xiea Q (2011) BSCTV C2 Attenuates the degradation of SAMDC1 to suppress DNA methylation-mediated gene silencing in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 23: 273-288

VI. MATERIAL SUPLEMENTARIO

Tabla suplementaria 1. Lista de aminopropil-transferasas.

Especie	Numero de acceso	Tipo de enzima
<i>Manihot esculenta</i>	cassava4.1_011152m	SPDS1
<i>M. esculenta</i>	cassava4.1_011190m	SPDS2
<i>Ricinus communis</i>	28610.m000070	SPDS
<i>Linum usitatissimum</i>	Lus10029169	SPDS
<i>Populus trichocarpa</i>	XP_002315806	SPDS1
<i>P. trichocarpa</i>	XP_002315859	SPDS2
<i>Medicago trunculata</i>	Medtr5g035800.1	SPDS1
<i>Phaseolus vulgaris</i>	Phvulv091000994m	SPDS1
<i>P. vulgaris</i>	Phvulv091031152m	SPDS2
<i>Glycine max</i>	Glyma01g03830.1	SPDS2
<i>G. max</i>	Glyma08g39810.1	SPDS1
<i>Cucumis sativus</i>	AT66041	SPDS
<i>Prunus persica</i>	ppa008283m	SPDS
<i>Malus domestica</i>	BAC20170	SPDS1
<i>M. domestica</i>	BAC20171	SPDS2
<i>Arabidopsis thaliana</i>	NP173794	SPDS1
<i>A. thaliana</i>	NP177188	SPDS2
<i>Arabidopsis lyrata</i>	889925	SPDS1
<i>A. lyrata</i>	476155	SPDS2
<i>Capsella rubella</i>	Carubv10009456m	SPDS1
<i>C. rubella</i>	Carubv10020501m	SPDS2
<i>Brassica rapa</i>	Bra024620	SPDS1
<i>Thellungiella halophila</i>	Thhalv10007822m	SPDS1
<i>Citrus sinensis</i>	orange1.1g019187m	SPDS
<i>Citrus clementina</i>	clementine0.9_014687m	SPDS1
<i>Eucalyptus grandis</i>	Eucgr.H02622.1	SPDS1
<i>Vitis vinifera</i>	GSVIVT01020222001	SPDS2
<i>Mimulus guttatus</i>	mgv1a010658m	SPDS
<i>Sorghum bicolor</i>	Sb02g009730.1	SPDS1
<i>Zea mays</i>	AY103592	SPDS1
<i>Setaria italica</i>	Si030459m	SPDS1
<i>Oryza sativa</i>	NP912671	SPDS1
<i>Brachypodium distachyon</i>	Bradi1g52557.2	SPDS1
<i>Physcomitrella patens</i>	EDQ82005	SPDS1
<i>P. patens</i>	EDQ78063	SPDS2
<i>Coffea arabica</i>	BAA29033	SPDS1
<i>Ammopiptanthus mongolicus</i>	ABF66657	SPDS

<i>Pisum sativum</i>	AAD02232	SPDS2
<i>P. sativum</i>	AAD02231	SPDS1
<i>Hyoscyamus niger</i>	BAA24533	SPDS1
<i>H. niger</i>	BAA24534	SPDS2
<i>Solanum tuberosum</i>	CAC51027	SPDS
<i>Datura stramonium</i>	Q96557	SPDS2
	Q96556	SPDS1
<i>Petunia hybrida</i>	BAC55523	SPDS
<i>Manihot esculenta</i>	cassava4.1_010050m	SPMS1
<i>M. esculenta</i>	cassava4.1_030319m	SPMS2
<i>Ricinus communis</i>	30169.m006516	SPMS
<i>Linum usitatissimum</i>	Lus10019016	SPMS
<i>Populus trichocarpa</i>	XP_002333750	SPMS
<i>Medicago trunculata</i>	Medtr3g124370.1	SPMS
<i>Phaseolus vulgaris</i>	Phvulv091029283m	SPMS
<i>Glycine max</i>	Glyma06g13210.3	SPMS1
<i>G. max</i>	Glyma04g41600.1	SPMS2
<i>Cucumis sativus</i>	Cucsa.202060.1	SPMS1
<i>C. sativus</i>	Cucsa.040600.2	SPMS2
<i>Prunus persica</i>	ppa007399m	SPMS
<i>Malus domestica</i>	MDP0000788247	SPMS1
<i>M. domestica</i>	MDP0000294813	SPMS2
<i>Malus sylvestris</i>	BAE19758	SPMS
<i>Arabidopsis thaliana</i>	NP368785	SPMS
<i>Arabidopsis lyrata</i>	495379	SPMS
<i>Capsella rubella</i>	Carubv10026659m	SPMS
<i>Brassica rapa</i>	Bra022631	SPMS
<i>Thellungiella halophila</i>	Thhalv10013929m	SPMS
<i>Citrus sinensis</i>	orange1.1g017607m	SPMS1
<i>C. sinensis</i>	orange1.1g016578m	SPMS2
<i>Citrus clementina</i>	clementine0.9_034330m	SPMS
<i>Eucalyptus grandis</i>	Eucgr.A01487.1	SPMS1
<i>Vitis vinifera</i>	CAO69381	SPMS
<i>Mimulus guttatus</i>	mgv1a008990m	SPMS
<i>Aquilegia coerulea</i>	Aquca_013_00113.1	SPMS
<i>Sorghum bicolor</i>	Sb10g020570.1	SPMS1
<i>S. bicolor</i>	Sb04g009230.1	SPMS2
<i>Zea mays</i>	AC202893	SPMS2
<i>Z. mays</i>	AAW57523	SPMS1
<i>Setaria italica</i>	Si006628m	SPMS1
<i>S. italica</i>	Si020398m	SPMS2
<i>Oryza sativa</i>	BAD29687	SPMS2
<i>O. sativa</i>	BAC81142	SPMS1
<i>Brachypodium distachyon</i>	Bradi3g09540.1	SPMS2
<i>B. distachyon</i>	Bradi1g38687.1	SPMS1

<i>Manihot esculenta</i>	cassava4.1_011466m	tSPMS
<i>Ricinus communis</i>	29739.m003604	tSPMS
<i>Linum usitatissimum</i>	Lus10026457	tSPMS
<i>Populus trichocarpa</i>	XP_002308531	tSPMS
<i>Phaseolus vulgaris</i>	Phvulv091005177m	tSPMS
<i>Glycine max</i>	Glyma14g11320.1	tSPMS
<i>Cucumis sativus</i>	Cucsa.056040.1	tSPMS
<i>Prunus persica</i>	ppa1027209m	tSPMS
<i>Malus domestica</i>	MDP0000256936	tSPMS
<i>Malus sylvestris</i>	BAE19759	tSPMS
<i>Arabidopsis thaliana</i>	BAB83649	tSPMS
<i>Arabidopsis lyrata</i>	909990	tSPMS
<i>Capsella rubella</i>	Carubv10001364m	tSPMS
<i>Brassica rapa</i>	Bra020045	tSPMS
<i>Theilungiella halophila</i>	Thhalv10013833m	tSPMS
<i>Citrus clementina</i>	clementine0.9_027824m	tSPMS
<i>Eucalyptus grandis</i>	Eucgr.C03148.1	tSPMS
<i>Vitis vinifera</i>	CAO43870	tSPMS
<i>Mimulus guttatus</i>	mgv1a009135m	tSPMS
<i>Aquilegia coerulea</i>	Aquca_020_00530.1	tSPMS
<i>Sorghum bicolor</i>	Sb02g025980.1	tSPMS
<i>Setaria italica</i>	Si030369m	tSPMS
<i>Oryza sativa</i>	NP_001046395	tSPMS
<i>Brachypodium distachyon</i>	Bradi3g09110.1	tSPMS
<i>Selaginella moellendorffii</i>	74817	tSPMS
<i>Physcomitrella patens</i>	XP_001760221	tSPMSa
<i>P. patens</i>	XP_001780462	tSPMSb
<i>P. patens</i>	XP_001762338	tSPMSc
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	XP_001696651	tSPMS

Figura suplementaria 2. Alineamiento múltiple de las enzimas espermina sintasas (SPMS's) de distintas especies de plantas.

Las secuencias presentadas corresponden a las SPMS's de plantas que presentan sitios PEST. Las secciones marcadas en gris indican los a.a. que comprenden la región PEST de cada proteína. Las secuencias más largas hacia el extremo C-terminal, son las SPMS's de especies monocotiledóneas y de los árboles del genero *Citrus*. Los residuos idénticos entre las secuencias son marcados con asteriscos y la sustitución de a.a. son marcadas con puntos.

