Agència de Gestió d'Ajuts Universitaris i de Recerca
AGAUR

UNIÓ EUROPEA
Fons Social Europeu

Memòria justificativa de recerca de les beques predoctorals per a la formació de personal investigador (FI)

La memòria justificativa consta de les dues parts que venen a continuació:
1.- Dades bàsiques i resums
2.- Memòria del treball (informe científic)

Tots els camps són obligatoris

1.- Dades bàsiques i resums

Títol del projecte ha de sintetitzar la temàtica científica del vostre document.
POLIAMINES EN ESTRÈS ABIÒTIC I MECANISMES MOLECULARS

Dades de l'investigador (benficiari de l'ajut)

Nom
XAVIER
Cognoms
ZARZA CUBERO
Correu electrònic
xavierzarza@gmail.com

Dades del director del projecte

Nom
ANTONIO
Cognoms
FERNANDEZ TIBURCIO
Correu electrònic
afernandez@ub.edu

Dades de la universitat / centre al que s'està vinculat

Unitat de Fisiologia Vegetal. Facultat de Farmàcia
UNIVERSITAT DE BARCELONA

Número d'expedient
-

Paraules clau: cal que esmenteu cinc conceptes que defineixin el contingut de la vostra memòria.
Amino oxidases, Poliamines, estrès salí, estrès hídric, fosfolípids

Data de presentació de la justificació
13/10/2012

Nom i cognoms, i signatura del beneficiari/ària

Vist i plau del/de la director/a del projecte

Generalitat de Catalunya
Departament d'Economia i Coneixement

Resum en la llengua del projecte (màxim 300 paraules)

Les poliamines (PAs) putrescina (Put), espermidina (Spd) i espermina (Spm) són mol•lècules policatiòniques de baix pes molecular, presents en els microorganismes, animals i plantes. Les PAs han estat implicades en diversos processos cel•lulars importants, incloent la resposta de les plantes a l'estrès. No obstant això, el seu mode d'acció està es desconeix. En les plantes, es van acumulant evidències de que les PAs interactuen amb macromolècules i estructures cel•lulars, com ara proteïnes de membrana, i la seva possible participació en transducció de senyals s'ha convertit en una creixent i interessant àrea d'estudi. En aquesta tesi, la possible interacció entre les poliamines i les vies de senyalització de fosfolípids és investigada.

Resultats previs, han posat de manifest que alteracions en els nivells endògens de poliamines (PAs), per sobreexpressió gènica o pèrdua de funció de gens de biosíntesi, redueixen o milloren, respectivament, la capacitat de les plantes d'Arabidopsis per tolerar agressions per estrès abiòtic, produint en alguns casos notables alteracions en el desenvolupament. En aquestes plantes amb nivells alterats de PAs s'han detectat canvis importants en l'expressió gènica i s'ha trobat una connexió entre el contingut de PAs ii la biosíntesi / senyalització d'àcid abscísic (ABA). La hipòtesi actual de treball és que aquestes alteracions en l'expressió gènica poden estar mediades, si més no en part, pel catabolisme de PAs, i l'acció directa o indirecta de les espècies reactives d'oxigen (ROS) que se'n deriven.

Resum en anglès(màxim 300 paraules)
The polyamines (PAs) putrescine (PUT), spermidine (SPD) and spermine (SPM) are low-molecular-weight polycationic molecules present in microorganisms, animals and plants. PAs have been implicated in several important cellular processes, including plant responses to stress. However, their mode of action is still under study. In plants, evidence is accumulating that PAs interact with macromolecules and cellular structures, such as membrane proteins, and their possible involvement in signal transduction has become an interesting area of study. Here, the possible interaction between polyamines and phospholipid signalling pathways is investigated.
On the other hand, previous results obtained in our research group, revealed that alterations in the endogenous poliamine (PAs) levels by over-expressing or knocking-down biosynthetic genes, reduce or improve, respectively, the tolerance capacity of Arabidopsis plants in front of abiotic stresses, with consequences in some cases in plant development. In these plants with altered PAs levels, have been detected important changes in gene expression revealing a connection between PAs content and acid abscisic (ABA) signalling/biosynthesis.The current hypothesis is that this alterations in gene expression may be mediated, at least in part, by the catabolism of PAs, and de direct or indirect role of the derived reactive oxigen species (ROS).

2.- Memòria del treball (informe científic sense limitació de paraules). Pot incloure altres fitxers de qualsevol mena, no més grans de 10 MB cadascun d'ells.

1. AMINO OXIDASES I ESTRÈS ABIÒTIC

Les poliamines (PAs) són molècules alifàtiques de baix pes molecular i naturalesa policatiònica que estan presents en tots els organismes vius. Les PAs majoritàries són la diamina putrescina (Put), la triamina espermidina (Spd) i la tetraamina espermina (Spm). Aquests compostos s'han relacionat amb les rutes de senyalització de les plantes en resposta a estrès biòtic, però les alteracions més importants en el metabolisme de PAs es produeixen quan les plantes estan exposades a diferents tipus d'estrès abiòtic (Flores 1991, Bouchereau i col.1999). No obstant, la naturalesa del mecanisme i la significació d'aquestes alteracions no estan clares. S'han descrit diversos mecanismes d'acció de les poliamines incloent el *cross-talk* amb ABA, ROS (H_2O_2) i NO en la regulació dels estomes, les interaccions amb àcid jasmònic i la via de senyalització dels fosfolípids, i els efectes de les poliamines en els canals iònics i la homeostasi del Ca^{2+} s'han proposat només recentment (Alcázar et al. 2010).

Resultats previs, han posat de manifest que alteracions en els nivells endògens de poliamines (PAs), per sobreexpressió gènica o pèrdua de funció de gens de biosíntesi, redueixen o milloren, respectivament, la capacitat de les plantes d'Arabidopsis per tolerar agressions per estrès abiòtic, produint en alguns casos notables alteracions en el desenvolupament. En aquestes plantes amb nivells alterats de PAs s'han detectat canvis importants en l'expressió gènica i s'ha trobat una connexió entre el contingut de PAs ii la biosíntesi / senyalització d'àcid abscísic (ABA). La hipòtesi actual de treball és que aquestes alteracions en l'expressió gènica poden estar mediades, si més no en part, pel catabolisme de PAs, i l'acció directa o indirecta de les espècies reactives d'oxigen (ROS) que se'n deriven.

Les PAs són catabolitzades a través de l'activitat d'una o més diaminas oxidases (DAO) i PA oxidases (PAO). Les DAOs son enzims que contenen i que catalitzen l'oxidació de les diamines Put i Cad en els grups amino primaris. Els productes de degradació de la Put són el 4-aminobutanal (que espontàniament es cicla en D1pyrroline), H_2O_2 i amoni. Arabidopsis conté 12 gens putatius DAO, però només un d'ells (ATAO1) ha sigut caracteritzat (Moller et al., 1998). Les PAOs són enzims que porten unit no covalentment una molècula de FAD. Es classifiquen en famílies, que estan implicades en el catabolisme ja sigui terminal o de retroconversió de PAs. Els membres d'una tercera família de proteïnes relacionades també tenen dominis similars a PAO però no desaminan PAs (Moschou et al., 2008). El PAO de blat de moro (ZmPAO), l'enzim millor caracteritzat de la primera classe, catalitza el catabolisme terminal de Spd i Spm produint 4-aminobutanal o (3-aminopropil)-4-aminobutanal, juntament amb 1,3-diaminopropano (Dap) i H_2O_2 (Cona et al., 2006). El segon grup de PAOs de planta s'assemblen a l'Spm oxidasa de mamífers (SMO) que catalitza la retroconversió de Spm a Spd amb producció concomitant de 3- aminopropanal i H_2O_2 (Moschou et al., 2008). El genoma d'Arabidopsis conté 5 gens que codifiquen per PAOs putatives. PAO1 i PAO4 catalitzen la mateixa reacció que SMO (Tavladoraki et al., 2006; Kamada-Nobusada et al., 2008), mentre que PAO3 actua en la via de la retroconversió, convertint Spm en Spd i Spd en Put (Moschou et al., 2008). La tercera classe de proteïnes vegetals amb domini PAO estan relacionades amb la demetilasa específica de lisina humana que actua com una histona demetilasa (Huang et al., 2007).

1.1. Aïllament i caracterització dels mutants per pèrdua de funció *AtPAO* en Arabidopsis

AtPAO1 és el gen PAO que difereix més de la resta (figura 1) i que presenta un percentatge d'identitat de seqüencia aminoacídica més elevat respecte a una PAO altament estudiada com és *MPAO* (45%, en front a un 23% de la resta). *AtPAO2*, *AtPAO3* i *AtPAO4* constitueixen un cluster evolutiu i presenten una identitat de seqüencia d'amino àcids entre ells del 64-84%. A banda, per aquests 3 gens s'ha descrit una localització subcel·lular peroxisomal per contraposició a la predicció de localització citosòlica per *AtPAO1* i *AtPAO5*.

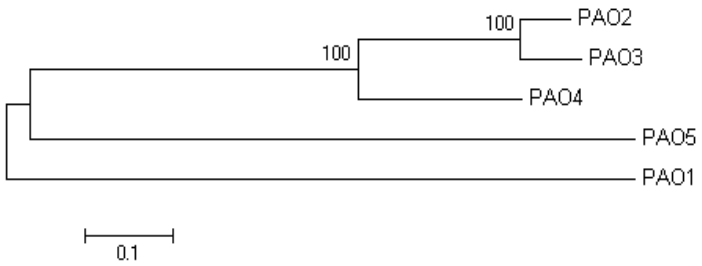


Fig. 1. Relacions evolutives dels 5 *AtPAO*. Anàlisi filogenètic dut a terme amb el software MEGA4, amb el mètode Neighbor-Joining i una inferència de 1000 rèpliques. Les distàncies evolutives s'expressen en unitats del nombre de substitucions d'amino àcids per lloc.

AtPAO5 és el gen menys caracteritzat de tots 5 en Arabidopsis. Poseeix una identitat de seqüencia del 81% respecte al seu ortòleg *BjPAO* (Lim et al., 2006) i un 97% respecte al seu ancestre, *Arabidopsis lyrata*. A diferència de *AtPAO1-4*, que presenten 9 exons i 8 introns, *AtPAO5* no té introns. Per *AtPAO1*, *AtPAO2*, *AtPAO3* i *AtPAO4* s'ha descrit una activitat poliamino oxidasa i a més, una activitat de retroconversió parcial en els casos de *AtPAO1* i *AtPAO4* (Spm → Spd) o complerta en *AtPAO2* i *AtPAO3* (Spm → Spd → Put). La impossibilitat per obtenir fins al moment proteïna *AtPAO5* recombinant ja sigui en sistemes homòlegs o heteròlegs, és una dificultat afegida per a l'esclariment de la seva funció (Takahashi et al., 2010).

Per tal d'estudiar la possible implicació de l'activitat amino oxidasa en la senyalització es estrès abiòtic, primerament es varen aïllar i caracteritzar línies mutants per pèrdua de funció per inserció de T-DNA en *Arabidopsis thaliana Col-0* pels 5 gens que codifiquen per poliamino oxidases en Arabidopsis: *AtPAO1*, *AtPAO2*, *AtPAO3*, *AtPAO4* i *AtPAO5* (col·lecció SALK). En diversos d'aquests casos es van obtenir 2 al·lels mutants (*pao1-1* i *pao1-2*, *pao2-1* i *pao2-2*, *pao5-1* i *pao5-2*).

1.2. Caracterització fenotípica dels mutants *AtPAO*

La determinació dels nivells de poliamines solubles lliures en les plantes mutants *AtPAO* de 14 dies d'edat va permetre observar que en els casos de les mutacions en els gens *AtPAO4* i *AtPAO5*, els nivells d'Spm en les plantes eren significativament superiors als de wt (entorn del 20% superiors), no així per a la Spd i Put. Aquesta constitueix doncs una prova indirecta de l'activitat amino oxidasa del gen *AtPAO5*. D'altra banda, tot i haver-hi present una clara redundància gènica per la funció *AtPAO*, no s'ha de descartar una possible alteració en els nivells de poliamines en teixits específics en el cas dels altres gens. L'expressió dels gens *AtPAO4* i *AtPAO5* és constitutiva en gran part dels teixits de la planta als 14 dies d'edat,

mentre que l'expressió de *AtPAO3* i sobretot *AtPAO2* i *AtPAO1* es limita més a teixit floral (Takahashi et al., 2010).
A nivell biomètric, el creixement de les plantes en terra a 22ºC en condicions de dia llarg (8h:16h), no confereix diferencies significatives per a biomassa, nombre i mida de fulles, i floració respecte al wt a les 4 setmanes d'edat en els casos dels mutants *pao1*, *pao2*, *pao3* i *pao4*. En el cas del mutant *pao5*, s'observa una menor biomassa de la part aèria (entorn a un 30% menys en pes sec) i acumulació d'antocianines en el revers de les fulles, iniciant-se en els cotiletons durant la primera setmana i extenent-se progressivament a les fulles primàries i secundaries amb el pas dels dies (figura 10). Aquest fet coincideix amb el patró d'expressió espai-temps observat per Takahashi et al. (2010) i Fincato et al., (2010) amb les línies transgèniques *pAtPAO5::GUS*. En aquestes s'observa una elevada expressió sobretot en cotiledons, teixit vascular de l'arrel i hipocotil, i en la base dels tricomes.

1.3. Efectes fenotípics del tractament salí en el mutant *pao5* d'Arabidopsis

Donat que els resultats més interessants en quant a literatura, fenotip i cribatge preliminar amb diversos estressos abiòtics duien cap a *AtPAO5* com a gen d'interès, es va prosseguir amb aquest per a estudis amb planta adulta del mutant *pao5-1* i *pao5-2*. D'aquesta manera es van realitzar experiments de supervivència en estrès salí i deshidratació en planta adulta de 4 setmanes d'edat crescuda en terra. Els protocols per a tractaments d'estrès es van obtenir de publicacions anteriors (sequera: Alcázar et al, 2006; salinitat: Gaxiola et al, 2001). En ambdós tractaments, *pao5* (ambós al·lels mutants; *pao5-1* i *pao5-2*) sembla mostrar una major resistència a condicions d'estrès respecte a wt.

Per a l'experiment de tractament salí les plantes cultivades individualment en sòl a 22ºC i dia llarg (16:8; hores de llum:hores de foscor), es van inundar a partir de la setmana 4 post-germinació (estadi de floració 6.00 segons Boyes et al., 2001) durant 4 h cada 4 dies amb un solució de reg MS 1/8 complementada amb NaCl. El contingut en NaCl de la solució nutritiva es va anar augmentant amb cada reg; d'aquesta manera, es van aplicar concentracions de NaCl successives cada 4 dies de 50, 100, 150, 200 i 250 mM. El mostreig de les fulles (n = 10) es va realitzar a 0h (abans de començar el tractament amb sal) i a 1h, 3 h, 8 h, 24 h, 48 h i 96 h després de cada tractament (50 mM, 100 mM i 150 mM). No va ser possible recollir cap mostra sotmesa a major concentració de sal (200 mM i 250 mM), ja que totes les plantes wt presentaven una clorosi foliar molt marcada. Les fulles recollides de la roseta es varen utilitzar per a totes les determinacions posteriors.

El mutant *pao5* (tant *pao5-1* com *pao5-2*) va mostrar més tolerància a l'efecte de la sal que el wt, fent-se més evident a concentracions iguals o superiors a 150mM moment en el qual la necrosi i clorosi de les fulles apareix en el wt (figura 2). Es van realitzar 3 experiments independents amb resultats similars (n = 150)

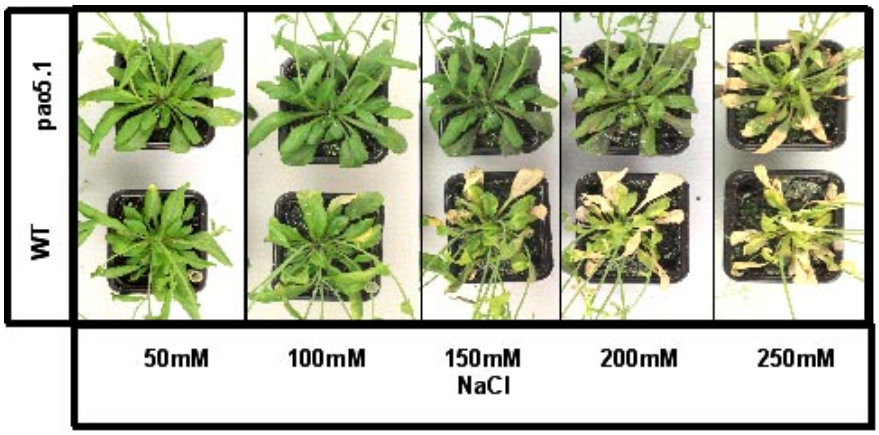


Fig. 2. Seguiment fotogràfic d'una planta aleatòria *pao5-1* i wt de 4 setmanes d'edat durant l'experiment de tractament amb concentracions creixents de NaCl. Els tractaments es van realitzar cada 4 dies, inundant les plantes durant 4 hores amb solució salina.

Un anàlisi més acurat dels paràmetres fisiològics com el contingut relatiu d'aigua en les fulles (RWC) o els continguts en clorofil·la, permet veure com a partir de les 48 h 150 mM hi ha un descens molt significatiu d'aquests valors en el cas del wt, menys acusat per a *pao5-1*. Els estudis de ionòmica mitjançant espectrometria d'absorció atòmica en 1 fulla de 7 plantes diferents, confirmen que a partir de les 48 h 150 mM, hi ha un desequilibri en el ratio Na/K en el cas del wt (figura 3) moment a partir del qual incrementa bruscament la proporció de Na^+ respecte la de K^+ en comparació amb *pao5-1*. Això permet dividir l'estrès en dues fases: una primera fase on el component osmòtic seria el predominant, i una segona a partir de les 48 h 150 mM, on s'hi afegiria el component iònic de l'estrès.

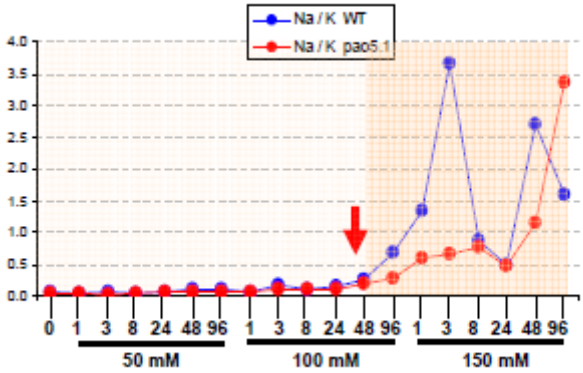


Fig. 3. Ratio Na/K en *pao5* i wt sotmeses a tractament salí. L'increment del ratio marca un desequilibri en la compensació del Na^+ per part del K^+ i és interpretat com un indicador de dany cel·lular. La part més clara de la gràfica correspon a la fase de l'estrès salí on predomina el component osmòtic. La part més fosca, on predomina el component iònic. Resultats referits a pes sec de la fulla de plantes de 4 setmanes. n = 7.

Confrontant els valors de concentració de Na^+ en fulla amb un paràmetre de tolerància a salinitat com pot ser el RWC, podem observar com la tolerància en el cas de pao5 es deuria en gran part a un increment d'exclusió de Na^+ més que no pas a un factor de tolerància osmòtica o de teixit.

Els valors hormonals obtinguts mitjançant LC-MS, confirmen com en el cas de l'àcid abscísic (ABA) i àcid jasmònic (JA), els nivells s'incrementen d'una forma més accentuada en el wt respecte a *pao5-1* a partir de les 48 h 150 mM. A nivell de reguladors del creixement, en el cas de les poliamines mesurades mitjançant HPLC, s'observa un increment més marcat pel que fa a Put en el wt a partir del punt d'inflexió de les 48 h 150 mM. El seguiment dels seus nivells, juntament amb els de l'ABA, se solen emprar com a indicadors de la progressió de l'estrès.

En col·laboració amb el laboratori del Dr Joachim Kopka (Institut Max Planck - Gölm, Alemanya), es va realitzar una anàlisi del perfil metabolòmic mitjançant GC-MS de la fase polar (Erban et al., 2007) de 1 fulla corresponent a 7 plantes crescudes individualment. Es van identificar 114 compostos, dels quals 71 van ser compostos coneguts.
Els resultats obtinguts, mostren uns nivells més elevats en el mutant pel que fa a compostos del metabolisme energètic (TCA, metabolisme del midó i sucres majoritaris) al llarg de tot l'estrès. D'igual manera, cal destacar els nivells de compostos osmoprotectors i segrestadors d'espècies reactives d'oxigen (ROS) com la prolina o els components del metabolisme del galactinol en el mutant pao5 al llarg de l'estrès, ja que podrien explicar, almenys en part, la major tolerància de *pao5* a l'estrès salí; La prolina es manté a nivells significativament més elevats en les primeres fases de l'estrès salí (entre 50 mm i 100 mm NaCl), probablement ajudant a protegir dels efectes deleteris primerencs de l'estrès. A concentracions més elevades de NaCl (150mm) els nivells són comparables als del wt. Diferent és el perfil del galactinol i dels seus derivats (figura 4), que en el mutant es manté a nivells significativament

més alts durant tot l'estrès, però és a majors concentracions (150mm NaCl) quan els nivells en el mutant arriben a ser el doble que el wt.

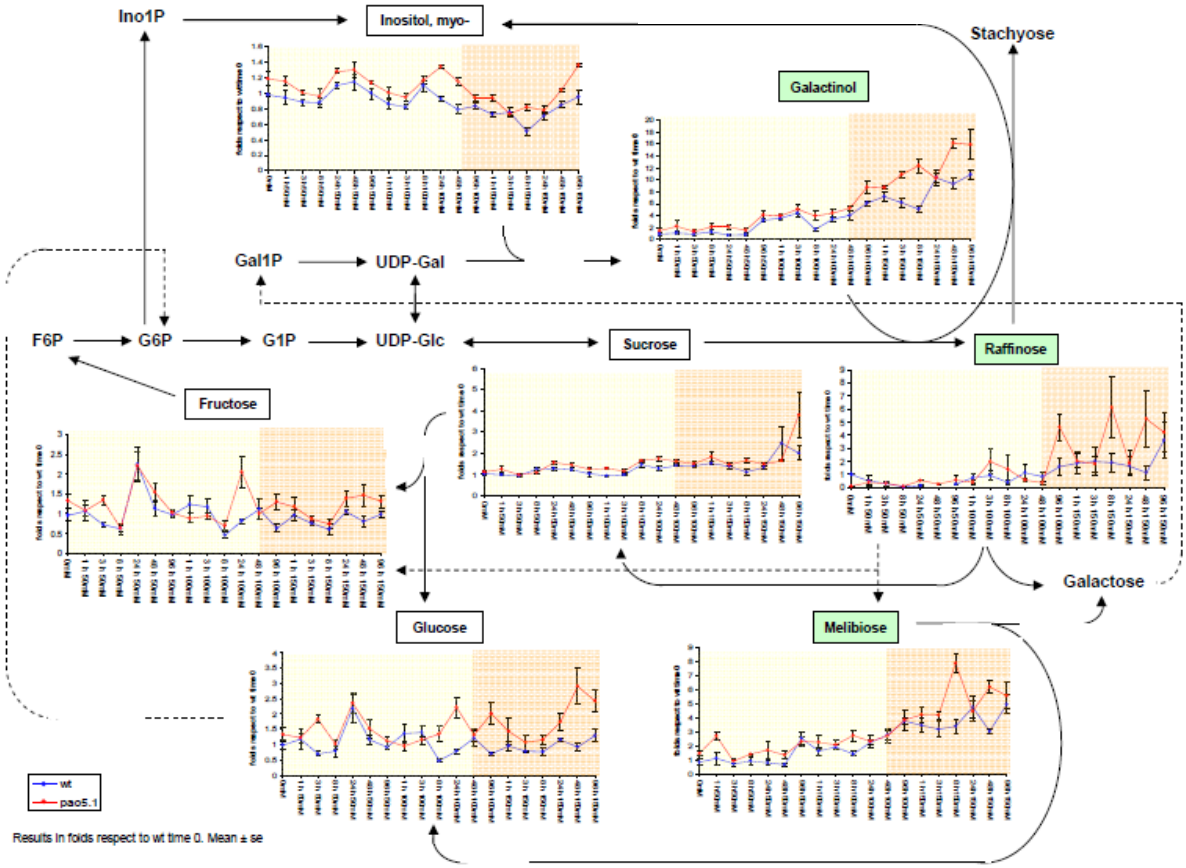


Fig. 4. Perfil metabolòmic obtingut amb GC-MS dels diferents components de la ruta metabòlica del galactinol en plantes wt i *pao5-1* de 4 setmanes sotmeses a tractament salí. Mostres a 0 h, 50 mM (1 h, 3 h, 8 h, 24 h, 48 h, 96 h), 100 mM (1 h, 3 h, 8 h, 24 h, 48 h, 96 h) i 150 mM (1 h, 3 h, 8 h, 24 h, 48 h, 96 h). En blau, wt. En vermell, *pao5-1*. Les mostres corresponen a 1 fulla provinent de 7 plantes diferents. La part més clara de la gràfica correspon a la fase de l'estrès salí on predomina el component osmòtic. La part més fosca, on predomina el component iònic. Resultats expressats com a increment respecte wt 0. Mitjana ± se. n = 7.

1.4. Efectes fenotípics del tractament de deshidratació en el mutant *pao5* d'Arabidopsis

Per determinar la resistència o sensibilitat del mutant *pao5* a estrès per sequera, les plantes de 4 setmanes d'edat (estadi de floració 6.00 segons Boyes et al., 2001) crescudes individualment en terra a 22ºC i dia llarg (16h/8h) van ser privades de reg durant 10 dies. La tolerància / sensibilitat a la sequera es va determinar com la capacitat de les plantes per recuperar el seu creixement després de 7 dies de rehidratació. Sota aquestes condicions, la línia mutant *pao5* va mostrar una major tolerància a la sequera respecte al wt (90% de supervivència respecte al 32% del wt. n = 100). Es van realitzar 3 experiments independents amb resultats similars (figura 5).

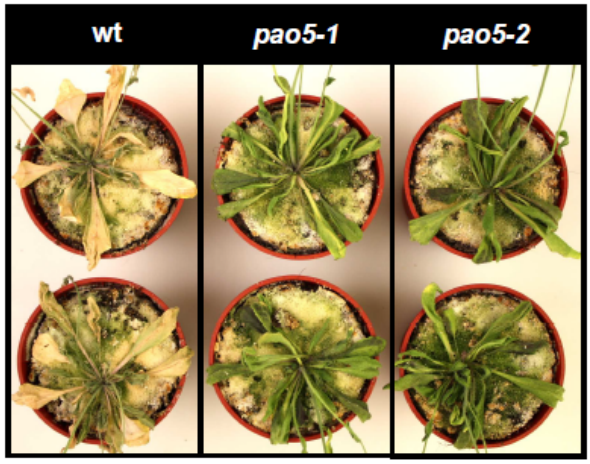


Fig. 5. Imatge de les plantes wt, *pao5-1* i *pao5-2* de 4 setmanes d'edat (estadi de floració) crescudes en test a 22ºC i dia llarg (16:8), després de 8 dies sense reg.

Per tal de simplificar el procés de mostreig i fer l'experiment més repetitiu, es va cercar un mètode de deshidratació més ràpid (80-86h) emprant l'ús de pastilles de torba (Jiffy®). Aquest mètode condueix als mateixos resultats pel que fa a contingut relatiu d'aigua a la fulla (RWC) i supervivència, que en l'experiment on s'usen testos. D'aquesta manera, s'observa com en el cas del mutant *pao5-1* els nivells de RWC i contingut d'aigua gravimètrica en el sòl (SGWC) són fins a un 60% superiors als nivells en wt en estadis avançats de l'estrès (72h).

El més alt contingut en aigua en *pao5* respecte a wt durant la deprivació de reg, suggereix que la tolerància a deshidratació és deguda a la menor transpiració de les fulles. Aquesta hipòtesi es va comprovar mitjançant una mesura del rati de transpiració de la fulla amb un intercanviador de gasos LI-COR, els resultats del qual indiquen que el mutant *pao5-1* ja en condicions control (sense estrès), presenta un rati de transpiració un 25% menor respecte al del wt.
Els principals factors que poden influir en la menor transpiració en les fulles, són el potencial osmòtic i l'obertura estomàtica. La mesura amb un crio-osmòmetre de les particules totals osmòticament actives (TOAP) i del potencial osmòtic de les cèlules de la fulla (LOP), mostraren com en estadis avançats de l'estrès (72h), els valors en el mutant *pao5-1* s'alteraven només lleugerament en comparació amb el gran increment en TOAP i disminució en LOP observats en wt. Descartada la hipòtesi d'una major acumulació d'osmolits compatibles a nivell foliar, l'explicació de la major tolerància de *pao5* a l'estrès hídric vindria donada en part, per els valors obtinguts en la mesura amb l'intercanviador de gasos LI-COR del rati de la conductància estomàtica de *pao5-1* en condicions control. Els resultats per a la conductància estomàtica obtinguts en *pao5-1*, van ser un 25% menors que els observats en wt.

Els valors de l'ABA (obtinguts mitjançant LC-MS) i de la Put (obtinguts mitjançant HPLC) s'incrementen d'una forma més accentuada en el wt respecte a *pao5-1* (entorn a un 65% més) en una fase avançada de l'estrès (72h).

L'anàlisi metabolòmic mitjançant GC-MS de la fase polar (Erban et al., 2007) de 7 fulles corresponents a 7 plantes crescudes individualment en pastilles de torba i sotmeses a deshidratació (mostres a 0h, 24h, 48h i 72h), va permetre identificar 179 compostos, dels quals 94 van ser compostos coneguts.
L'anàlisi en detall de les rutes metabòliques va permetre observar uns majors nivells dels metabòlits implicats en la fotorespiració (glicerat, glicina, serina), i de compostos clau del metabolisme energètic com ara el piruvat i metabòlits del cicle del TCA. Pel que fa a compostos osmoprotectors i segrestadors de ROS, destaca l'acumulació molt marcada a les 72h de galactinol i dels seus derivats rafinosa i melibiosa en el mutant pao5-1 respecte al wt

(figura 6), podent explicar en part la major tolerància del mutant a l'estrès per deshidratació davant del wt.

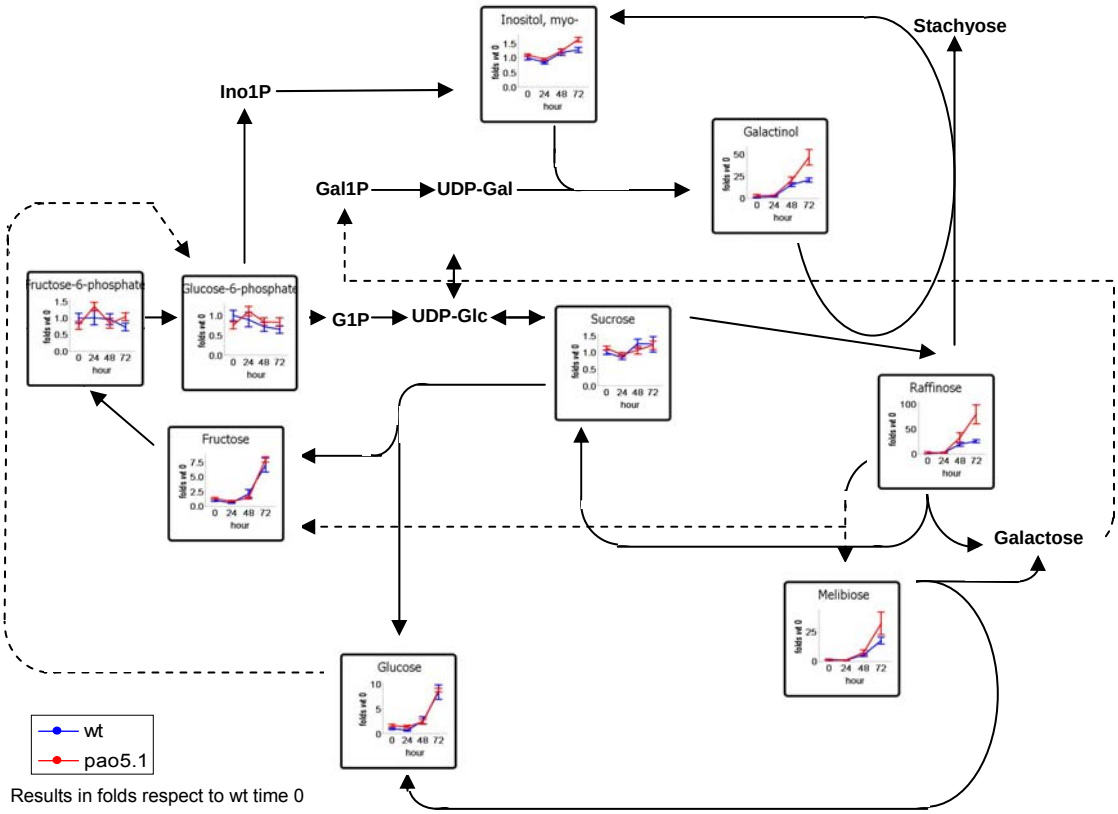


Fig. 6. Perfil metabolòmic obtingut amb GC-MS dels diferents components de la ruta metabòlica del galactinol per a un experiment de deshidratació de 86h realitzat amb wt i *pao5-1* crescudes durant 4 setmanes en pastilles de torba. Mostres a 0 h, 24 h, 48 h i 72 h. En blau, wt. En vermell, *pao5-1*. Les mostres corresponen a 1 fulla provinent de 7 plantes diferents. Resultats expressats com a increment respecte wt 0. Mitjana ± se.

1.5. La mutació en *AtPAO5* condueix a una resposta constitutiva a estrès

Les plantes *pao5* de 4 setmanes d'edat amb les que s'han realitzat els assajos d'estrès salí i hídric en sòl, presenten certes característiques que fan pensar en una expressió constitutiva de la via de resposta a estrés. Aquestes inclouen en un primer terme aspectes fisiològics tractats prèviament en el apartat 2.2., com són un fenotip de creixement més lent o una acumulació d'antoncianines preferentment en cotiledons i epidermis del revers foliar, específicament en les cèl·lules adjacents a les cèl·lules guarda (figura 7).

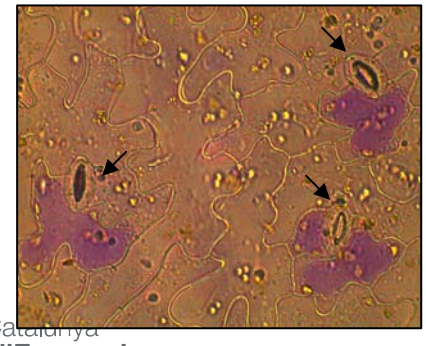


Fig. 7. Aspecte al microscopi òptic del revers de l'epidermis foliar d'una planta *pao5-1* de 4 setmanes d'edat, on s'hi pot veure, tot i la presència d'una certa plasmòlisi cel·lular, l'acumulació d'antocianines, específicament en les cèl·lules adjacents a les cèl·lules guarda (assenyalat amb una fletxa).

Els resultats obtinguts en *pao5* referents a menor conductància estomàtica i acumulació d'antocianines en les cèl·lules adjacents a les cèl·lules guada, condueixen a pensar que els estomes de les plantes de *pao5* estan constitutivament més tancats que els de wt. Aquesta hipòtesi queda corroborada mitjançant un experiment de mesura d'obertura estomàtica de cèl·lules de l'epidermis del revers foliar de plantes adultes amb aplicació de ABA com a control.

En segon terme, s'observa un ampli grup de metabòlits que en condicions control (0h) resulten augmentats en pao5.1 (figura 8). Entre aquests, els més destacables donat el seu conegut paper osmoprotector i segrestador de ROS en estrès osmòtic, són la etanolamina (precursor de pujol i glicina-betaïna), la prolina i el galactinol (juntament amb els seus derivats rafinosa i melibiosa).

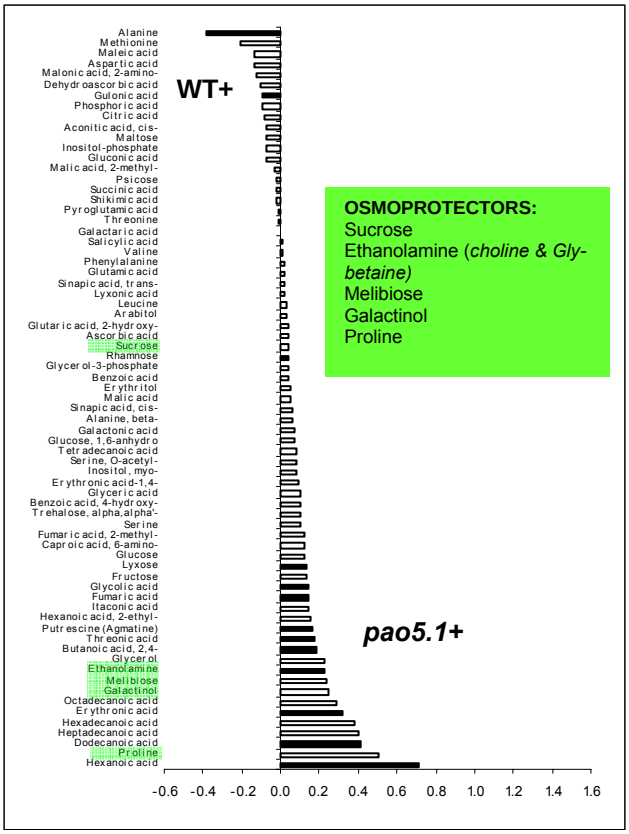


Fig. 8. Resultats mostrats en escala logarítmica de quocients de ratio de resposta relativa de la mitja per *pao5-1* sobre wt (n = 7). Els valors negatius representen un més baix i els valors positius un més alt contingut en metabolit en *pao5-1*. Les barres negres indiquen diferències significatives amb el test t-student ($p < 0.05$).

Atenent als resultats gobals de metabolòmica analitzats mitjançant el Array Viewer, s'observa com el mutant *pao5-1* respon d'una manera més complexa i més ràpida a l'estrès, sent capaç de variar de forma més marcada els nivells d'un major nombre de metabòlits a 1h i 3h 50mm NaCl. Aquests resultats estarien en concordança amb el que s'observa en l'anàlisi de transcriptòmica (AFFY-ATH1) per 0h i 3h 50 mM NaCl, segons el qual el mutant presenta una resposta més ràpida i complexa éssent capaç de mobilitzar un major nombre de gens (figura 9). Això podria ser degut a que el mecanisme de defensa ja estigui activat o preparat en el mutant, tal com indica el fet que ja tinguem induïts prèviament en *pao5-1* a 0 h gens de resposta a estrès, gens reguladors i gens implicats en la transducció de la senyal. En aquest sentit, gens que codifiquen per factors de transcripció, modificació i degradació de proteïnes, les quinases del receptor de JA o gens del metabolisme / senyalització dels fosfoinosítids, podrien ser bons candidats per ser explorats en el futur per tal de comprendre el mecanisme molecular (s) implicat en la tolerància a la sal del mutant *pao5*.

Nogensmenys, en condicions control els valors de ABA en el mutant *pao5* són aproximadament un 25% superiors als del wt, i els nivells d'expressió de gens de resposta a ABA com el *RD29B* són unes 3 vegades superiors als del wt, no éssent així per a gens de síntesi de ABA com el *NCED3*.

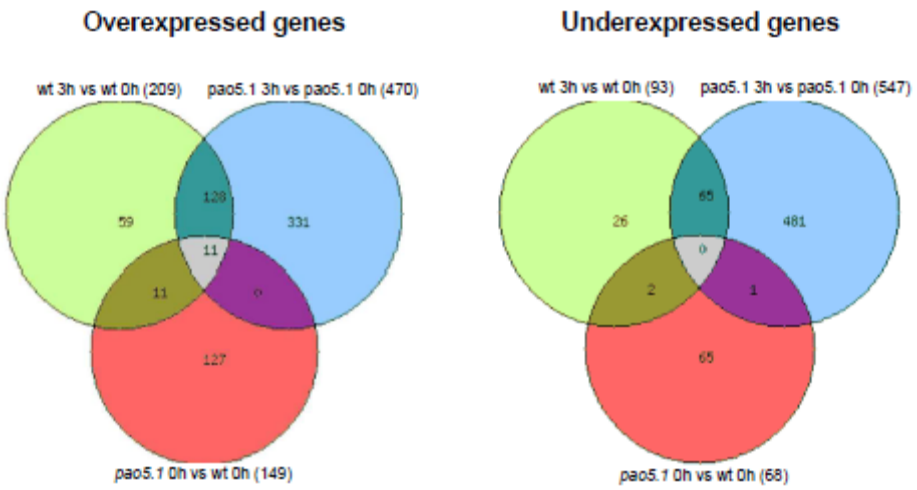


Fig. 9. Nombre de gens sobre- i subexpressats en *pao5* i wt a 0 h i després de 3h de tractament salí en plantes de 4 setmanes d'edat.

1.6. La tolerància a estrès adquirida en el mutant *pao5* és induïda pel cicle de llum.

En comparació amb les plantes mutants *pao5* (*pao5-1* i *pao5-2*) cultivades en un règim de dia llarg (16:8) a 22ºC durant 4 setmanes, les plantes crescudes a dia curt (8:16) a 22ºC durant 8 setmanes (mateixa acumulació d'hores de llum total) no presenten una acumulació d'antocianines en cotiledons i revers foliar (figura 10), ni tampoc una major tolerància als estressos salí i hídric en comparació amb el wt.

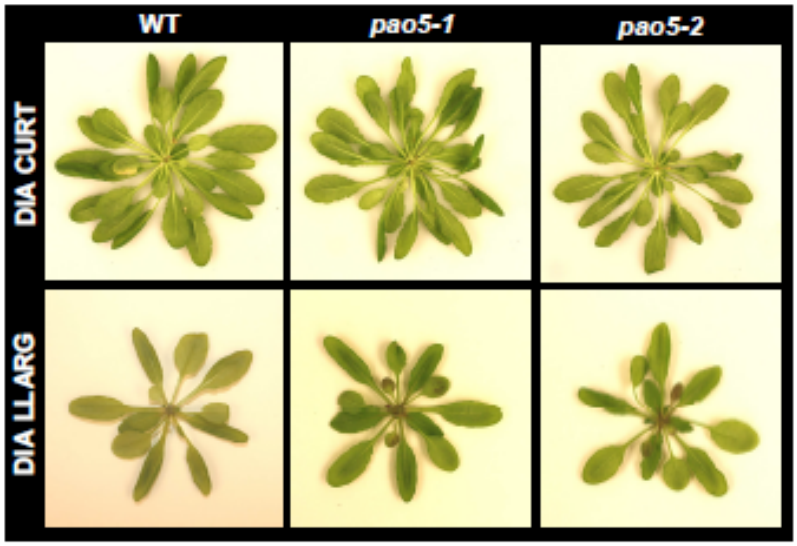


Fig. 10. Revers de la roseta foliar de plantes wt i *pao5* de 8 setmanes d'edat crescudes en règim de dia curt (8:16), i de plantes crescudes durant 4 setmanes en día llarg (16:8). Aquestes darreres presenten una clara acumulació d'antocianines en cotiledons durant els primers dies, que van apareixent progressivament en les fulles amb posterioritat.

Això, unit al fet que en plantes de 4 setmanes d'edat crescudes en dia llarg i en condicions control s'hi observa un major dany oxidatiu a nivell foliar en *pao5-1* (augment de MDA i òxid

nítric, NO, de l'entorn d'un 50% respecte a wt), podria indicar que la mutació en el gen *AtPAO5* produeix un desequilibri a nivell oxidatiu cel·lular que es fa pal·lès en condicions de dia llarg (possiblement degut a una hipersensibilitat s'acava causant un estrès fotoxidatiu), pero que no impedeix a la planta continuar el seu cicle vital, i que conduiria a una activació constitutiva de les vies de resposta a estrès fent possible una major tolerància a postreriors estressos (hídric i salí).

2. EFECTE DE LES POLIAMINES EN LA VIA DE SENYALITZACIÓ DE FOSFOLÍPIDS

Les poliamines (PAs) putrescina (Put), espermidina (Spd) i espermina (Spm) són mol·lècules policatiòniques de baix pes molecular, presents en els microorganismes, animals i plantes. Les PAs han estat implicades en diversos processos cel·lulars importants, incloent la resposta de les plantes a l'estrès. No obstant això, el seu mode d'acció està es desconeix. En les plantes, es van acumulant evidències de que les PAs interactuen amb macromolècules i estructures cel·lulars, com ara proteïnes de membrana, i la seva possible participació en transducció de senyals s'ha convertit en una creixent i interessant àrea d'estudi. En aquesta tesi, la possible interacció entre les poliamines i les vies de senyalització de fosfolípids és investigada. En animals, la via de senyalització de la fosfolipasa C (PLC) juga un paper clau en la generació de IP_3 per alliberar Ca^{2+} i diacilglicerol (DAG) per activar la proteïna quinasa C (PKC) a través de la hidròlisi dels fosfolípids minoritaris de membrana, fosfatidilinositol 4,5-bisfosfat (PIP_2). Les plantes, però, manquen d'homòlegs del receptor de IP_3 i PKC de manera que aquesta via ha de treballar de manera diferent. Mentrestant, l'evidència està emergint que els seus productes fosforilats, IP_6 i àcid fosfatídic (PA), són responsables de l'alliberament de Ca^{2+} des dels magatzems intracel·lulars i de l'activació de la proteïna quinasa, respectivament. A més, els polifosfoinosítidos com el PIP i el PIP_2 estan apareixent recentment com a segons missatgers per ells mateixos, involucrats en la regulació de proteïnes G petites i canals de K^+. El PA també pot ser generat a través de l'activació de la PLD que hidrolitza els fosfolípids estructurals, com ara la fosfatidilcolina (PC) i la fosfatidiletanolamina (PE).

2.1. Les poliamines disparen la resposta de àcid fosfatídic (PA) i fosfatidilinositol-4,5-bifosfat (PtdIns(4,5)P_2 o PIP_2) en plàntules d'*Arabidopsis thaliana*.

Els experiments que segueixen s'han realitzat en col·laboració amb el grup del Dr. Teun Munnik (University of Amsterdam, Holanda).

S'empra un protocol experimental de marcatge *in vivo* de plàntules d'*Arabidopsis thaliana* var. *Col-0* amb ^{32}P i posterior extracció lipídica i quantificació dels fosfolípids marcats.

Les plàntules d'Arabidopsis thaliana de 5 dies d'edat crescudes en plaques d'agar en posició vertical es transfereixen a un medi líquid (tampó MES/KCl pH 5.75) i es marquen O/N amb ortofosfat radiactiu, $[^{32}P]PO_4^{3-}$. Al dia següent s'estimulen les plàntules amb 60 µM de putrescina (Put), espermidina (Spm) i espermina (Spm) respectivament durant 30 min. La concentració emprada es troba dins el rang de concentració fisiològic d'aquestes molècules.
Passat aquest temps, l'estimulació s'atura mitjançant l'addició d'àcid perclòric 5% (PCA). Després de l'extracció dels lípids amb cloroform / metanol, les mostres es carreguen en una placa de cromatografia de capa fina (TLC) i es fan córrer en un tanc amb solvent alcalí per a la separació dels fosfolípids. Per a una millor separació i quantificació del PA, la TLC es fa córrer amb acetat d'etil (EtAc) com a fase mòbil. Finalment l'autoradiografía de la placa i el posterior escaneig de la mateixa en un escànner amb phosphosimaging, ens permet veure el perfil dels fosfolípids marcats amb ^{32}P, que són quantificats amb ImageJ.
L'experiment es fa per triplicat i cada mostra consta de 3 plàntules. Es realitzen 3 experiments independents per tal de confirmar els resultats.

Els resultats obtinguts (figura 1), mostren una inducció de PA i PIP_2 per part de l'Spd i Spm, més clara en el cas d'aquesta última per a una concentració de 60 µM. Concentracions de Spd de 240 µM mostrarien un grau d'inducció de PA i PIP_2 similar al que veiem per a la Spm 60 µM (dades no mostrades). Experiments realitzats amb discos foliars de plantes de 3 setmanes d'edat d'*Arabidopsis thaliana* indiquen que la inducció dels fosfolípids també es produeix en teixit foliar madur per part de la Spd i Spm.

D'altra banda la Put sembla no induir en cap cas ambdós fosfolípids, inclús a concentracions superiors (testat fins a 1mM Put).

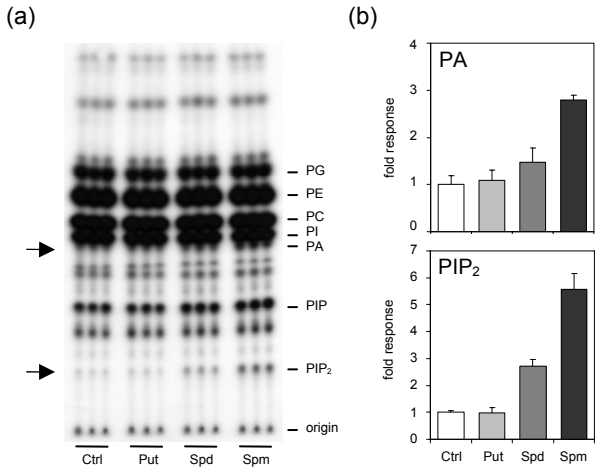


Fig. 1. Resposta de PA i PIP_2 a l'estímul amb poliamines exògenes. TLC alcalina que mostra els fosfolípids marcats amb ^{32}P després de l'aplicació exògena de 60 µM de poliamines (Put, Spd, Spm) durant 30 min en Arabidopsis thaliana Col-0 de 5 dies d'edat marcades O/N (a). Resultats de la quantificació de PA i PIP_2 marcats (b). n = 3. Els resultats són expressats com a increments respecte al control (Ctrl).

Donat que l'Spm mostra una major inducció dels fosfolípids a una menor concentració, es va optar per continuar els experiments únicament amb aquesta molècula.

2.2. Caracterització cinètica de la resposta de PA i PIP_2 a Spm.

Per tal de catacteritzar cinèticament la resposta dels fosfolípids a l'Spm, es va realitzar un experiment *time-course* amb plàntules d'Arabidopsis de 5 dies d'edat. Les plàntules, seguint el protocol descrit en l'apartat 2.1., es van marcar O/N amb ^{32}P i l'endemà es van estimular amb 60 µM Spm. La reacció es va aturar amb PCA 5% en els temps consecutius que s'indiquen a la figura 2. L'experiment fou realitzat per triplicat i els resultats van ser corroborats mitjançant 3 experiments independents.

Tal i com indiquen els resultats, la resposta de PA i PIP_2 té lloc en pocs minuts (diferències significatives a partir dels 15 min), mostrant així que la resposta és ràpida i dependent del temps. En el cas de la resposta de PIP_2 a Spm, aquesta sembla seguir una evolució sigmoidal amb una saturació entorn els 60 min. L'evolució en canvi del PA és en tot moment proporcional al temps i no s'observa saturació (observat fins els 90 min).

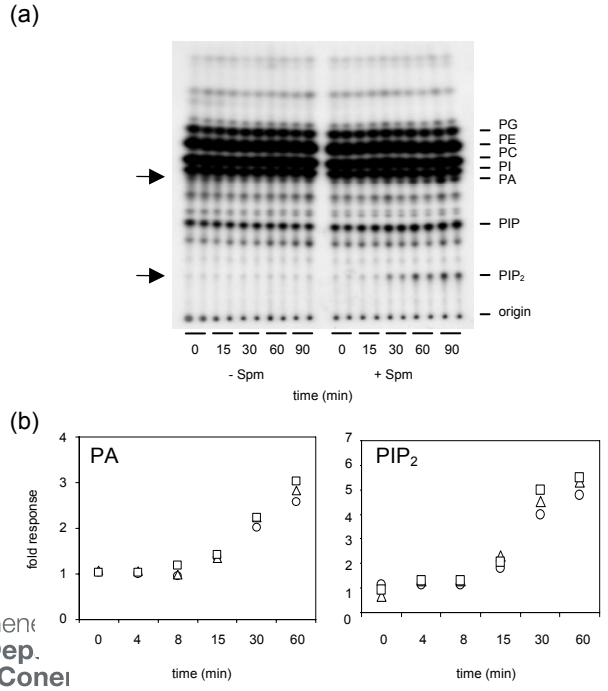


Fig. 2. La Spm dispara la resposta de PA I PIP_2 en pocs minuts. TLC alcalina per a un experiment de temps-resposta (n = 3) amb Spm 60 µM i temps creixents d'estímul (a). L'experiment fou realitzat amb plàntules de 5 dies d'edat d'Arabidopsis marcades O/N amb ^{32}P. Els resultats obtinguts de la quantificiació de la TLC de 3 experiments independents amb 3 rèpliques cadascun, mostren un clar increment en els nivells de PA i PIP_2 marcats a partir dels 15 min (b). Resultats normalitzats respecte al control (sense Spm) en cada punt i expressats com a increment respecte t = 0.

2.3. Caracterització dosi-resposta de la resposta de PA i PIP_2 a Spm.

Per a la caracterització de la resposta de PA i PIP_2 a concentracions creixents de Spm, es va emprar el mateix protocol experimental descrit en l'apartat 2.1., estimulant les plàntules durant 30 min amb un rang de concentracions d'Spm d'entre 15 µM i 960 µM (les concentracions es van duplicar progressivament). L'experiment, al igual que en els anteriors casos, fou realitzat per triplicat i els resultats obtinguts van ser corroborats mitjançant 3 experiments independents.

Els resultats (figura 3), indiquen un increment significatiu de PA i PIP_2 a concentracions relativament baixes (15 i 30 µM respectivament). Cal recordar que a la majoria de publicacions científiques el rang de concentració de Spm que se sol emprar en els experiments va de 200 µM fins a 1mM.
S'observa una evolució sigmoidal de la resposta amb una saturació a partir dels 120 µM Spm en el cas del PIP_2. Per al PA, la corva segueix un increment proporcional fins arribar a saturar-se entorn els 120 µM. A partir d'aquesta concentració, la resposta es manté dins un rang de 3 i 5 increments respecte al control (0 µM) per al PA i PIP_2 respectivament. Podem concloure doncs que la resposta de PA i PIP_2 a Spm és no només dependent del temps sinó també de la concentració.

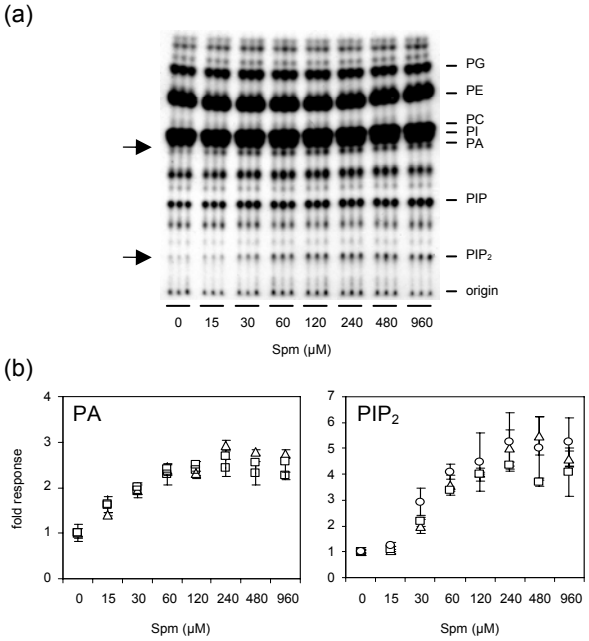


Fig. 3. L'increment de PA i PIP_2 per part de l'Spm té lloc d'una forma concentració-dependent. TLC alcalina per a un experiment de dosi-resposta (n = 3) de 30 min d'estimul amb concentracions creixents de Spm (a). L'experiment fou realitzat amb plàntules de 5 dies d'edat d'Arabidopsis marcades O/N amb ^{32}P. Els resultats obtinguts de la quantificiació de la TLC de 3 experiments independents amb 3 rèpliques cadascun, mostren un clar increment en els nivells de PA i PIP_2 marcats (b). Resultats expressats com a increment respecte 0 µM. Mitjana ± sd.

Cal assenyalar que es varen dur a terme experiments amb plàntules d'Arabidopsis mutants per pèrdua de funció del gen *AtSPMS* (Alcázar R et al., 2011), responsable de la síntesi d'Spm, i sobreexpressores del mateix (González ME et al., 2011). Es van analitzar els nivells de PA i PIP_2 respecte als del wt en condicions control i en estímul de Spm 60 µM 30 min. No es van trobar diferències significatives respecte als nivells mostrats en el wt, indicant així un possible paper determinant de la plasticitat cel·lular per a la regulació dels nivells subcel·lulars de les poliamines endògenes a través de la síntesi, degradació, conjugació, compartimentalització o transport de les mateixes, atenuant el possible efecte sobre el metabolisme dels fosfolípids.

2.4. La Spm té un efecte directe sobre els fosfolípids i no a través dels seus productes de degradació.

És ben conegut que algunes de les funcions atribuïdes a les poliamines provenen de l'efecte dels productes de la seva degradació per part de les amino oxidases, AO. Aquests productes del catabolisme són principalment en el cas de la Spm el 1,3-diaminopropà, Dap, i el peròxid d'hidrogen, H_2O_2. Per aquest motiu, i per què és sabut que el H_2O_2 és un inductor de l'activitat PLDδ i la consequent producció de PA (Zhang W et al., 2003), es va procedir a testar el possible efecte del Dap i el H_2O_2 en la resposta per part de l'Spm, aplicant exògenament aquestes molècules a concentracions relativament elevades (240 µM. Testat fins a 1 mM) durant 30 min seguint el protocol de marcatge descrit a l'apartat 1.1. Els resultats obtinguts (figura 4) indiquen que la influència del Dap i el H_2O_2 en el grau de resposta degut a la Spm es nul (PIP_2) o molt reduït (H_2O_2 en el cas del PA).

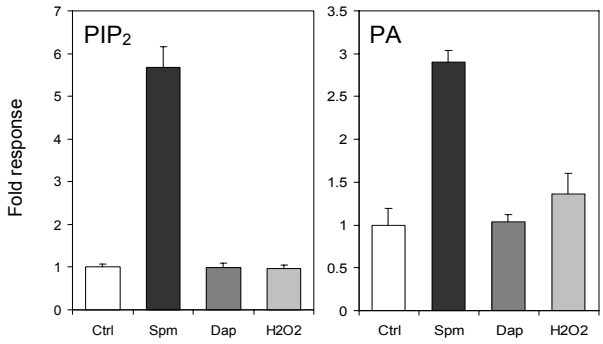


Fig 4. Els metabolits secundaris de l'Spm no són capaços de disparar la resposta de senyalització lipídica. Resultats de PIP_2 i PA en plàntules d'Arabidopsis de 5 dies marcades amb ^{32}P O/N, en resposta a Spm, Dap i H_2O_2 240 µM durant 30 min. Valors expressats com a increment respecte control (Ctrl). n = 3.

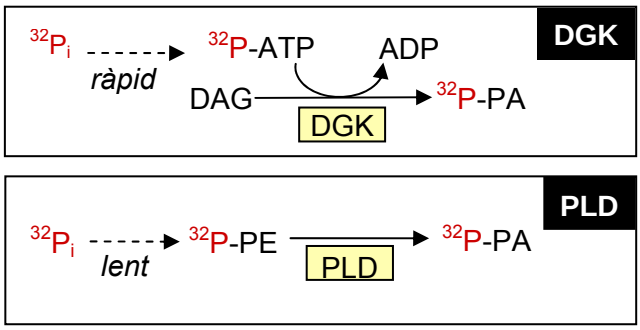
Els resultats obtinguts pel que fa a la influencia en la resposta dels productes catabòlics de la Spm sobre l'increment en PA i PIP_2, van ser confirmats mitjançant l'aplicació d'un inhibidor específic de l'activitat poliamina oxidasa (PAO), la guazatina (Tavladoraki P et al., 2006; Moschou P et al., 2008). Sobre les plàntules d'Arabidopsis marcades amb ^{32}P O/N, es va realitzar un pretractament de 30 min amb concentracions creixents de guazatina 5-20 µM i posteriorment es va aplicar Spm 60 µM durant 30 min. No es va observar cap efecte significatiu del inhibidor sobre els nivells de PA i PIP_2 induits per Spm.
A banda, es va aplicar el tractament amb Spm 60 µM durant 30 min sobre plàntules de mutants per pèrdua de funció *pao1*, *pao2*, *pao3*, *pao4* i *pao5* (inserció de TDNA, col·lecció SALK) i el corresponent wt, marcades amb ^{32}P O/N. Els resultats també descarten una variació significativa respecte als nivells de PA i PIP_2 marcats amb ^{32}P, presents en el wt abans i després de la inducció amb Spm.

2.5. La Spm activa l'activitat PLD

El PA pot ser generat principalment a través de dues vies de senyalització. La fosfolipasa C (PLC) pot hidrolitzar el fosfolípid fosfatidilinositol 4,5-bifosfat (PIP_2) en inositol 1,4,5-trifosfat i diacilglicerol (DAG). Aquest últim és llavors ràpidament fosforilat per la DAG quinasa (DGK) a PA (Munnik et al, 1998a;. Munnik, 2001). El 1,4,5-trifosfat és capaç d'alliberar Ca^{2+} a partir de dipòsits interns, i augmentar l'activitat d'una gamma d'enzims efectors com ara quinases de proteïna Ca^{2+}-dependents. En segon lloc, el PA és el producte directe de la fosfolipasa D (PLD), que hidrolitza els lípids estructurals, com ara la fosfatidilcolina (PC) o fosfatidiletanolamina (PE). Per atenuar els senyals del PA, les plantes converteixen el PA en DAG pirofosfat (DGPP) a través de PA quinasa (Munnik et al, 1996;. Meijer i Munnik, 2003).

Per tal de comprovar quina de les vies responsables de la síntesi de PA és activada per l'aplicació exògena de Spm (vies PLD i DGK o ambdúes), es va emprar una estratègia de marcatge diferencial (Munnik et al., 1998b, 2001). El mètode es basa en el principi que el ortofosfat radioactiu és lentament incorporat en els lípids estructurals, però molt més ràpid al

pool d'ATP. Degut a que la PLD hidrolitza un lípid estructural, el PA format per l'activitat de la PLD només és radioactiu quan el seu substrat és radioactiu, que és només després que les plàntules han estat marcades durant diverses hores. D'altra banda, el grup d'ATP que s'utilitza per fosforilar el DAG per part de la DGK, és radioactiu en tan sols uns minuts de marcatge. Per tant, un període curt marcatge amb ^{32}P ens mostra essencialment el PA generat per la via DGK.



A banda, el marcatge ràpid del *pool* d'ATP amb ^{32}P, permet veure d'altres fosfolípids generats en reaccions de fosforilació on hi intervingui l'ATP. D'aquesta manera, el marcatge diferencial ens permetrà seguir els nivells de PIP i PIP_2 generats a partir de la reacció de la PIK i PIPK respectivament.

Les plàntules d'Arabidopsis de 5 dies d'edat, es van marcar amb ortofosfat radiactiu durant 30 minuts, moment en el qual es va addicionar Spm 60 µM. La reacció es va aturar mitjançant PCA 5% en diferents temps.
Tal com s'indica en la figura 5, els resultats de la quantificació de PA i PIP_2 marcats amb ^{32}P a partir de la imatge obtinguda de la TLC, no mostren un increment en els nivells de PA indicant així que la inducció de la formació de PA per l'aplicació exògena d'Spm 60 µM durant 30 min, no es deu a una activació de l'activitat DGK sinó, molt probablement a una activació de l'activitat PLD i la conseqüent formació de PA a partir de lipids estructurals.
Per contra, els nivells de PIP_2 incrementen notablement després del marcatge breu amb ^{32}P, indicant així una possible activació de la via PIPK.

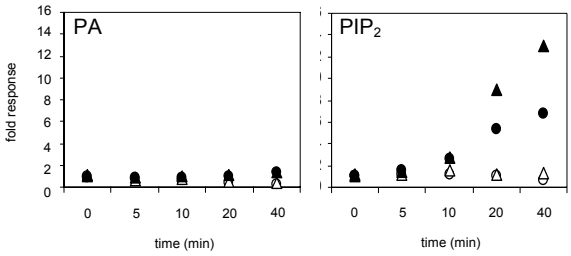


Fig. 5. Marcatge diferencial per trobar la via d'activació responsable de l'increment de PA; les vies DGK o PLD. Es mostren els resultats de la quantificació de PA i PIP_2 marcats, de plàntules d'Arabidopsis de 5 dies marcades amb ^{32}P durant 30 min i estímulades amb Spm 60 µM. Adició de PCA 5% en diferents temps. Resultats de 2 experiments independents (n = 1), normalitzats respecte PI i expressats com a increment respecte t = 0 del control (cercles oberts). Cercles tancats, Spm.

Per a confirmar que la inducció de PA per part de l'Spm es dóna a través de l'activació de la via PLD, es realitza l'experiment en presència de *n*-butanol per tal de mesurar l'activitat PLD. En presència d'alcohols primaris, la PLD és capaç de dur a terme una reacció de transfosfatidilació en lloc d'una hidròlisi, produïnt d'aquesta manera fosfatidil alcohols (en aquest cas fosfatidil butanol, PBut) en lloc de PA (Munnik et al., 1995). Aprofitant doncs aquesta propietat enzimàtica de la PLD es procedeix a marcar O/N les plàntules d'Arabidopsis en presència de *n*-butanol al 0.5% (v/v). Al dia següent es duen a terme experiments amb Spm de dosi-resposta i *time-course* (apartats 1.2. i 1.3.). Donat que el PBut és un lípid "no natural", no és metabolitzat i és acumulat, permetent així la seva extracció. Els resultats per a la quantificació de PA i PBut es mostren en la fugura 6.

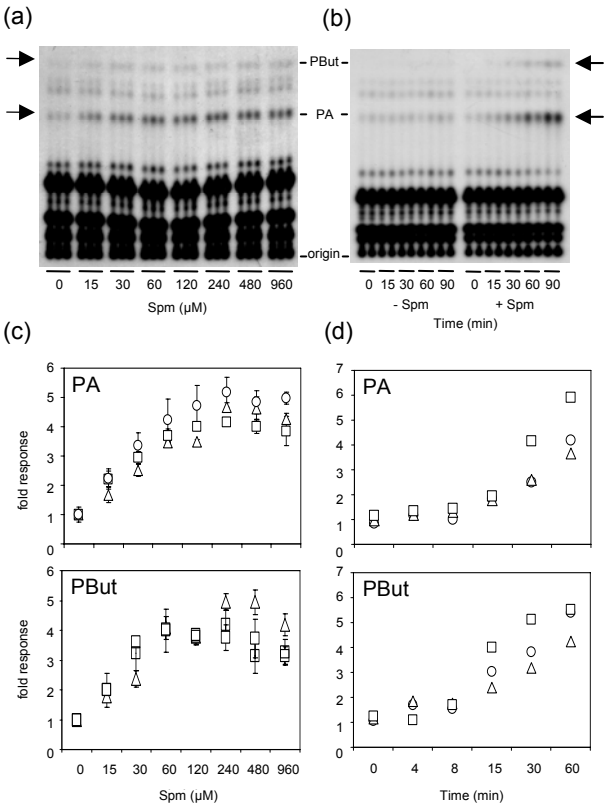
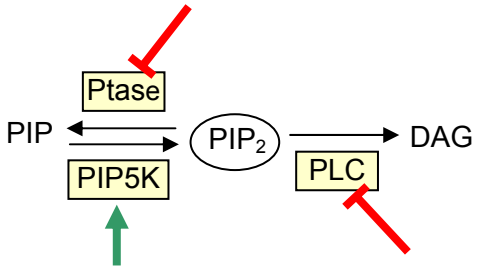


Fig. 6. Evidència de l'activació de la vía PLD per part de l'Spm, en experiments amb adició de *n*-butanol al medi i posterior formació de PBut per activitat PLD. La TLC correguda amb Acetat d'etil (EtAc) com a fase mòbil, permet una millor visualització i quantificació del PA i PBut. A la part superior, TLC EtAc on es mostra increment de PA i PBut en experiments de dosi-resposta (a) i temps-resposta (b) amb plàntules d'Arabidopsis de 5 dies d'edat marcades O/N amb ^{32}P en presència de 0.5% (v/v) *n*-butanol. A la part inferior, resultat de la quantificació (n = 3) de PA i PBut marcats, en experiments dosi-resposta (c) i temps-resposta (d). Es realitzen 3 experiments independents i els valors (mitja ± sd en l'experiment dosi-resposta i mitja Spm respecte mitja Ctrl en l'experiment temps-resposta), són expressats com increment respecte 0 µM i t = 0 respectivament.

Els resultats corroboren doncs una activació de l'activitat PLD per part de l'Spm, indicant el rol principal d'aquesta en l'increment de PA en aplicació de Spm. Els resultats d'activitat PLD, com es pot veure a la figura 6, es correlacionen amb els nivells de PA tant en l'experiment dosi-resposta com en el *time-course*.

2.6. La Spm activa l'activitat PIPK

Partint dels resultats ja obtinguts en el marcatge diferencial en l'apartat 1.5. i per tal d'acabar de confirmar l'activació de l'activitat PIPK per part de l'Spm aplicada exògenament, es procedeix a realitzar un experiment de marcatge diferencial aplicant fosfat "calent" (^{32}P) i seguidament fosfat "fred" (Pi o no radiactiu). Mitjançant aquest experiment el que es pretén és demostrar que l'increment en els nivells de PIP2 per Spm no són deguts a una inhibició de l'activitat fosfatasa i/o PLC, sinó a una activació de l'activitat PIPK.



El fonament d'aquest experiment està en que un marcatge de pocs minuts amb ortofosfat radiactiu, permet la incorporació ràpida del ^{32}P a l'ATP. D'aquesta manera el ^{32}P s'incorporarà a aquells productes resultants de reaccions de fosforilació, en aquest cas la catalitzada per la PIP5K, que dóna lloc al PtdIns(4,5)P_2 o PIP_2. En cas que l'aplicació exògena de Spm condueixi a un increment de PIP_2 a través de la inhibició o bloqueig de la PLC o la fosfatasa (Ptase), l'addició de fosfat inorgànic no radiactiu al medi a concentracions relativament elevades respecte al ortofosfat radiactiu afegit prèviament, hauria de mostrar-se poc efectiu a l'hora de desplaçar aquest últim en el *pool* de PIP_2, el qual presenta una taxa de renovació o *turnover* molt ràpid. Per contra, un increment de PIP_2 radiactiu degut a una activació de l'activitat PIPK, hauria de mostrar un desplaçament clar del PIP_2 marcat amb ^{32}P per part del Pi.

Així doncs, plàntules d'Arabidopsis de 5 dies d'edat es van estimular amb o sense Spm 60 µM durant 30 min i es van marcar posteriorment amb $[^{32}P]PO_4^{3-}$ durant 5 min. Passat aquest temps, es va addicionar tampó fosfat 1 mM (K_2HPO_4 / KH_2PO_4, pH 5.75) amb o sense Spm 60 µM i la reacció es va aturar amb PCA 5% en diferents temps. Els resultats obtinguts per a 2 experiments independents mostren, tal i com es pot apreciar a la figura 7, com existeix un increment en PIP_2 marcat radiactivament fins als 30 min, pero que disminueix ràpidament durant els següents minuts degut al desplaçament per part del PIP_2 format amb el fosfat no radiactiu afegit a la mostra.

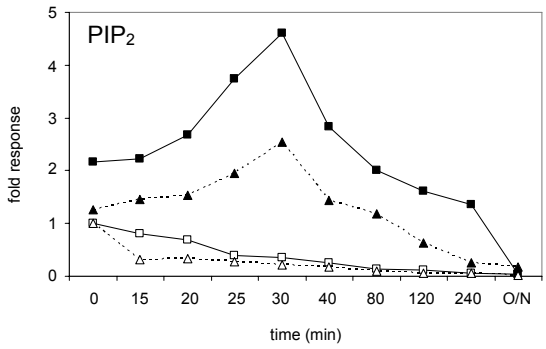


Fig. 7. Marcatge diferencial amb fosfat "calent" i "fred" per tal de identificar la ruta de síntesi de PIP_2 en resposta a l'aplicació exògena d'Spm. Les plàntules d'Arabidopsis de 5 dies d'edat s'estimulen amb +/- Spm 60 µM 30 min i es marquen amb ^{32}P durant 5 min. Posteriorment s'aplica tampó fosfat 1mM +/- Spm 60µM. L'experiment s'atura amb PCA 5% a diferents temps i es quantifiquen els fosfolípids marcats separats en la TLC Alcalina. Resultats de 2 experiments independents amb uns sola rèplica on el nivell de PIP_2 és normalitzat respecte el nivell de PI i és referit com increment de PIP_2 respecte t = 0 del control (cercles oberts). Cercles tancats, estímul amb Spm.

D'aquesta manera es demostra, juntament amb els resultats obtinguts en l'experiment de marcatge diferencial de l'apartat 1.5., que l'aplicació exògena de Spm activa l'activitat PIPK conduint així a un increment en els nivells de PIP_2.

2.7. Evidència de la implicació dels gens *AtPIP5K7*, *AtPIP5K9* i *AtPLDδ* en la resposta a Spm

Per a la identificació dels gens implicats en la resposta de PA i PIP_2 a Spm, es va realitzar un cribatge de la resposta fosfolipídica a l'Spm amb plàntules mutants d'Arabidopsis de pèrdua de funció per inserció de T-DNA.

Arabidopsis thaliana compta amb una familia de 11 gens (1-11) que codifiquen per l'enzim PIP5K, responsable de la fosforilació en la posició 5 del PtdIns-4-P per obtenir PtdIns(4,5)P_2. Es va analitzar la resposta de PIP_2 i PA a l'aplicació exògena de Spm 60 µM durant 30 min per a cadascun d'aquests mutants per pèrdua de funció (AtPIP5K1-11) marcats amb ^{32}P O/N. Els resultats, com es pot veure en la figura 8, mostren uns nivells de PIP_2 significativament menors en relació al wt (entorn a un 40% menys) per als mutants *pip5k7* i *pip5k9* (en aquest darrer mutant es disposa de 2 al·lels mutants diferents, a i c). Convertint d'aquesta manera aquests gens en candidats a la resposta a Spm pel que fa a activitat PIPK.

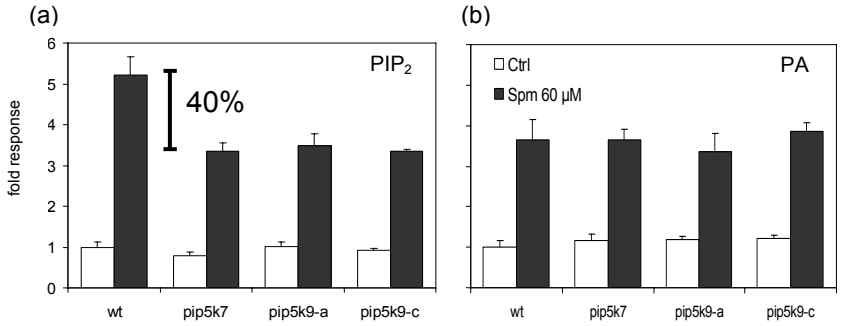


Fig. 8. Identificació dels gens candidats *AtPIP5K* implicats en la resposta a Spm. Quantificació dels nivells de PIP_2 (a) i PA (b) marcats amb ^{32}P, de les plàntules mutants d'Arabidopsis *pip5k7*, *pip5k9a* i *pip5k9c* de 5 dies d'edat marcades O/N amb ^{32}P I estimulades amb 60 µM Spm 30 min.

En aquests mutants per pèrdua de funció, els nivells però de PA romanen sense canvis significatius respecte al wt (fig. 8b), indicant que molt possiblement els increments de PIP_2 i PA es resposta a l'Spm, tenen lloc de forma independent.
D'altra banda, l'obtenció del doble mutant *pip5k7* x *pip5k9* en la que s'està treballant actualment, pretén cercar la inhibició de l'increment de PIP_2 en resposta a Spm per a posteriors estudis transcriptòmics i proteòmics de la possible cadena de senyalització que se'n derivi.

La família de gens que codifiquen per la PLD en Arabidopsis, consta de 12 gens (α (3), β (2), γ (3), δ, ε i ζ (2)). Al igual que en el cas dels gens de la familia PIP5K, es va realitzar un cribatge amb els mutants per pèrdua de funció en resposta a Spm. Es van analitzar tots els mutants dels gens que codifiquen per la PLD, excepte α2, β1, β2, γ1, γ2 i γ3. Els resultats obtinguts (figura 9), assenyalen al gen *AtPLDδ* com un dels gens candidats implicat en l'increment de PA en resposta a Spm (fins a un 40% menys de resposta en PA i activitat PLD respecte al wt).

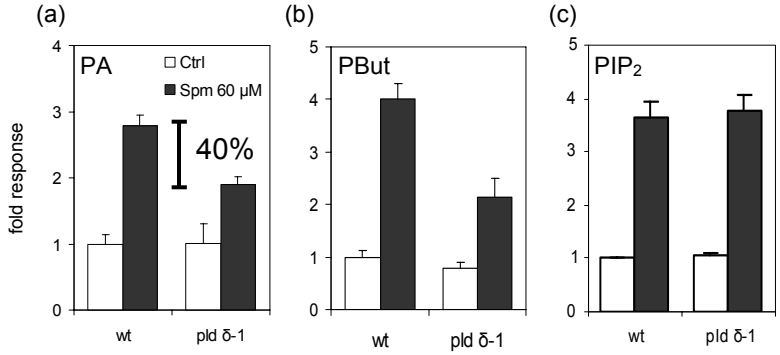


Fig. 9. Identificació dels gens candidats *AtPLDδ* implicats en la resposta a Spm. Quantificació dels nivells de PA (a), i PIP_2 (c) marcats amb ^{32}P, de plàntules mutants d'Arabidop-sis *pldδ* de 5 dies d'edat marcades O/N amb ^{32}P i estimulades amb 60 µM Spm 30 min. L'adició de n-butanol a la mostra permet mesurar la formació de Pbut catalitzada per la PLD (b).

El fet que els nivells de PIP_2 en resposta a Spm observats en el mutant *pldδ* no difereixin significativament d'aquells presents en el wt (figura 9c), indica i corrobora el fet indicat anteriorment de que els increments de PIP_2 i PA es resposta a l'Spm tenen lloc, molt probablement, de forma independent.

2.8. La Spm dispara la resposta de PA i PIP_2 a nivell d'arrel en plàntules d'Arabidopsis

Per tal d'estudiar la resposta dels fosfolípids a Spm a nivell histològic, les plàntules d'Arabidopsis de 5 dies d'edat marcades O/N amb ^{32}P i estimulades amb Spm 60 µM durant 30 min, es van seccionar en 6 parts un cop adicionat el PCA 5%. D'aquesta manera, l'arrel de les plàntules es va dividir en 4 seccions: la primera, corresponent als primers 5-7 mm de l'arrel i que comprèn la zona meristemàtica i la zona d'elongació (1). Les següents 3 seccions de l'arrel s'engloben dins la zona de maduració i comprenen la zona de maduració dels pels radiculars, corresponent als següents 5-7 mm (2), la zona madura dels següents 5-7 mm (3) i finalment, la resta de l'arrel, que conté els primers primordis de les arrels laterals (4). La part aèria de la plàntula es divideix en hipocotil (Hyp) i cotiledons (Cotyl).
Els resultats obtinguts per als nivells de PIP_2 i PA marcats, mostren com la resposta d'aquests a Spm es dóna únicament a nivell de l'arrel (figura 10).

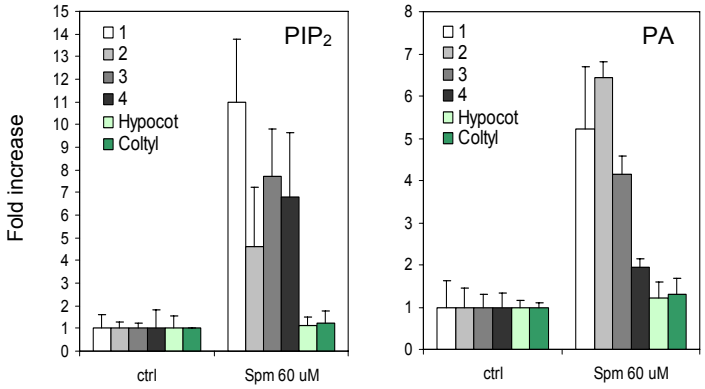


Fig. 10. Estudi de la resposta a Spm a nivell histològic. Els resultats expressen l'increment de PIP_2 i PA marcats de les diferents seccions de l'arrel (1-4) i part aèria (Hyp, Cotyl), en Arabidopsis de 5 dies d'edat, després de l'estímul amb Spm 60 µM durant 30 min. Els increments són expressats respecte als nivells en condicions control (sense Spm) de cada secció. Mitja ± sd. n = 3.

L'estudi de l'expressió gènica a nivell histològic dels gens *AtPIP5K7* i *AtPIP5K9* mitjançant les línies transgèniques d'Arabidopsis transformades amb les construccions *pPIP5K7::GUS* i *pPIP5K9::GUS*, mostra que ambdós gens s'expressen a nivell vascular i meristemàtic de l'arrel i, en el cas sobretot del gen *AtPIP5K7*, també fortament en el teixit vascular de cotiledons i hipocotil. D'aquesta manera, l'absència de resposta a Spm dels fosfolípids a nivell del teixit de la part aèria, no seria degut a una manca d'expressió dels gens implicats en la resposta sinó molt probablement a d'altres elements com podrien ser mecanismes de transport.

D'altra banda, aquestes línies transgèniques que contenen el gen reporter β-galactosidasa per als promotors dels gens *AtPIP5K7* i *AtPIP5K9*, al ser tractades amb Spm durant 1h, 3h i 8h, no mostren canvis significatius a nivell d'expressió en cap dels teixits observats. Indicant així que l'increment en les activitats PIP5K i molt probablement també PLD, no es deu a un increment de la transcripció i conseqüent increment en el nivell d'aquests enzims, sinó més probablement a una regulació post traduccional dels mateixos.

2.9. La Spm indueix l'acumulació de PIP_2 a nivell de nucli i membrana plasmàtica

Per tal de conèixer la localització a nivell subcel·lular del PIP_2 generat en resposta a Spm, s'empren línies d'*Arabidopsis thaliana Col-0* que expressen el biosensor *in vivo* de PIP_2, YFP-PHPLCδ1 (Van Leeuwen W et al., 2007). Aquestes línies transgèniques expressen constitutivament sota el domini 35S, una proteïna groga de fluorescència (YFP) fusionada al domini d'homologia de la plecstrina (PH) de la PLCδ1 humana, que té la propietat d'unir-se específicament al PtdIns(4,5)P_2. La visualització d'aquestes plàntules transgèniques expressores del biosensor sota el microscopi confocal, permet observar com el tractament amb Spm 120 μM condueix a una localització del PIP_2 a nivell de la membrana plasmàtica i nucli a partir dels 20 min d'estímul, fent-se més clara als 40 min (figura 11).

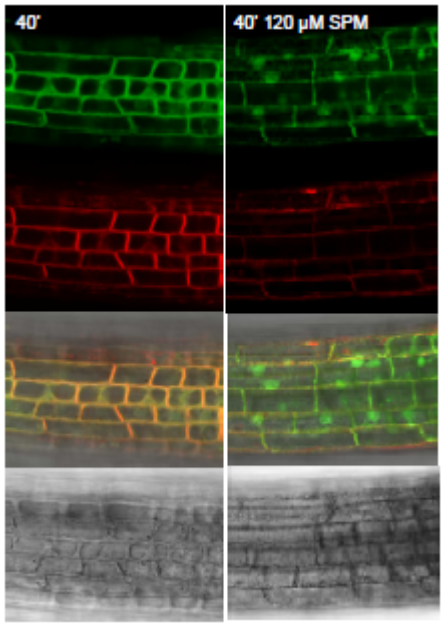


Fig. 11. Acumulació a nivell de nucli i membrana cel·lular, de PIP_2 a causa de l'estímul amb Spm. Imatge presa amb microscopi confocal de cèl·lules del parènquima de la zona d'elongació de l'arrel de plantes transgèniques d'Arabidopsis expressores del biosensor de PIP_2 (verd), sotmeses a estímul o no amb Spm 120 μM durant 40 min. Marcador de membrana FM4-64 (vermell). El Biosensor en condicions control (imatges de l'esquerra) es troba present a nivell de citoplasma ja que la quantitat de PIP_2 a nivell de membrana és tan baixa que no permet la seva detecció. L'estímul amb Spm fa que aquest biosensor de PIP_2 canvii la seva localització fins a posicionar-se a nivell de membrana cel·lular i nucli (imatges de la dreta).

Aquests resultats sorprenen ja que mai s'havia observat l'acumulació de PIP_2 a nivell de nucli sota cap estímul (en estrés salí s'acumula en punts ben delimitats a nivell de membrana cel·lular, i en estrès per calor ho fa a nivell de membrana nuclear). El biosensor de PIP_2 de fet conté una senyal de localització extranuclear. D'aquesta manera s'obre la porta a una possible via directa de regulació transcripcional en estímul a Spm a través dels fosfolípids, ja que l'acumulació de PIP_2 s'ha vist per exemple que, entre d'altres, té un paper a nivell de regulació epigenètica mitjançant la interacció amb histones deacetilases (Toska E et al., 2012).

REFERÈNCIES

Alcázar R, Marco F, Cuevas JC, Patron M, Ferrando A, Carrasco P, Tiburcio AF, Altabella T. *Review Involvement of polyamines in plant response to abiotic stress.* Biotechnol Lett. 2006 Dec;28(23):1867-76.

Alcázar R, Altabella T, Marco F, Bortolotti C, Reymond M, Koncz C, Carrasco P, Tiburcio AF. *Review Polyamines: molecules with regulatory functions in plant abiotic stress tolerance.* Planta. 2010 May;231(6):1237-49.

Alcázar R, Bitrián M, Bartels D, Koncz C, Altabella T, Tiburcio AF. *Polyamine metabolic canalization in response to drought stress in Arabidopsis and the resurrection plant Craterostigma plantagineum*. Plant Signal Behav. 2011 Feb;6(2):243-50.

Boyes DC, Zayed AM, Ascenzi R, McCaskill AJ, Hoffman NE, Davis KR, Görlach J. *Growth stage-based phenotypic analysis of Arabidopsis: a model for high throughput functional genomics in plants.* Plant Cell. 2001 Jul;13(7):1499-510.

Bouchereau A, Aziz A, Lahrer F, Martin-Tanguy J (1999) *Polyamines and environmental challenges: recent development*. Plant Sci 140:103-12

Cona A, Rea G, Angelini R, Federico R, Tavladoraki P. *Review Functions of amine oxidases in plant development and defence.* Trends Plant Sci. 2006 Feb;11(2):80-8.

Erban A, Schauer N, Fernie AR, Kopka J. *Nonsupervised construction and application of mass spectral and retention time index libraries from time-of-flight gas chromatography-mass spectrometry metabolite profiles.* Methods Mol Biol. 2007;358:19-38.

Fincato P, Moschou PN, Ahou A, Angelini R, Roubelakis-Angelakis KA, Federico R, Tavladoraki P. *The members of Arabidopsis thaliana PAO gene family exhibit distinct tissue- and organ-specific expression pattern during seedling growth and flower development.* Amino Acids. 2012 Feb;42(2-3):831-41. Epub 2011 Aug 4.

Flores, H.E. (1991) *Changes in Poliamine metabolism in response to abiotic stress. En: R.Slocum, H.E. Flores (Eds.)*. The biochemistry and Physiology of Polyamines in Plants. CRC press, Boca Raton, FL. Pp: 214-225

Gaxiola RA, Li J, Undurraga S, Dang LM, Allen GJ, Alper SL, Fink GR. *Drought- and salt-tolerant plants result from overexpression of the AVP1 H+-pump.* Proc Natl Acad Sci U S A. 2001 Sep 25;98(20):11444-9.

Gonzalez ME, Marco F, Minguet EG, Carrasco-Sorli P, Blázquez MA, Carbonell J, Ruiz OA, Pieckenstain FL. *Perturbation of spermine synthase gene expression and transcript profiling provide new insights on the role of the tetraamine spermine in Arabidopsis defense against Pseudomonas viridiflava*. Plant Physiol. 2011 Aug;156(4):2266-77.

Huang J, Sengupta R, Espejo AB, Lee MG, Dorsey JA, Richter M, Opravil S, Shiekhattar R, Bedford MT, Jenuwein T, Berger SL. *p53 is regulated by the lysine demethylase LSD1.* Nature. 2007 Sep 6;449(7158):105-8.

.

Kamada-Nobusada T, Hayashi M, Fukazawa M, Sakakibara H, Nishimura M. *A putative peroxisomal polyamine oxidase, AtPAO4, is involved in polyamine catabolism in Arabidopsis thaliana.* Plant Cell Physiol. 2008 Sep;49(9):1272-82.

Møller SG, McPherson MJ. *Developmental expression and biochemical analysis of the Arabidopsis atao1 gene encoding an H2O2-generating diamine oxidase*. Plant J. 1998 Mar;13(6):781-91.

Bridging the gap between plant and mammalian polyamine catabolism: a novel peroxisomal polyamine oxidase responsible for a full back-conversion pathway in Arabidopsis. Moschou PN, Sanmartin M, Andriopoulou AH, Rojo E, Sanchez-Serrano JJ, Roubelakis-Angelakis KA. Plant Physiol. 2008 Aug;147(4):1845-57.

Munnik T, Arisz SA, De Vrije T, Musgrave A. *G Protein Activation Stimulates Phospholipase D.* Signaling in Plants. Plant Cell. 1995 Dec; 7(12):2197-2210.

Munnik T, Irvine RF, Musgrave A. *Review Phospholipid signalling in plants*. Biochim Biophys Acta. 1998 Jan 23; 1389(3):222-72.

Munnik T. *Review Phosphatidic acid: an emerging plant lipid second messenger*. Trends Plant Sci. 2001 May; 6(5):227-33.

Munnik T, Vermeer JE. *Review Osmotic stress-induced phosphoinositide and inositol phosphate signalling in plants.* Plant Cell Environ. 2010 Apr;33(4):655-69.

Takahashi Y, Cong R, Sagor GH, Niitsu M, Berberich T, Kusano T. *Characterization of five polyamine oxidase isoforms in Arabidopsis thaliana.* Plant Cell Rep. 2010 Sep;29(9):955-65.

Tavladoraki P, Rossi MN, Saccuti G, Perez-Amador MA, Polticelli F, Angelini R, Federico R. *Heterologous expression and biochemical characterization of a polyamine oxidase from Arabidopsis involved in polyamine back conversion*. Plant Physiol. 2006 Aug;141(4):1519-32.

Toska E, Campbell HA, Shandilya J, Goodfellow SJ, Shore P, Medler KF, Roberts SG. *Repression of Transcription by WT1-BASP1 Requires the Myristoylation of BASP1 and the PIP_2-Dependent Recruitment of Histone Deacetylase*. Cell Rep. 2012 Sep 27;2(3):462-9.

Van Leeuwen W, Vermeer JE, Gadella TW Jr, Munnik T. *Visualization of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate in the plasma membrane of suspension-cultured tobacco BY-2 cells and whole Arabidopsis seedlings*. Plant J. 2007 Dec;52(6):1014-26.

W. Zhang, C. Wang, C. Qin, T. Wood, G. Olafsdottir, X. Wang. *Phospholipase Dδ and phosphatidic acid decrease H_2O_2-induced cell death in Arabidopsis*. Plant Cell 15 (2003) 2285– 2295.