



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

**POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOLOGIA MOLECULAR**

**“Generación de vectores para la caracterización de los  
uORFs presentes en las poliamina oxidasas de  
*Arabidopsis thaliana*”**

Tesis que presenta

**Kinberli Marcela Valles Méndez**

Para obtener el grado de  
**Maestra en Ciencias en Biología Molecular**

**Codirectores de la Tesis:  
Dr. Juan Francisco Jiménez Bremont  
Dra. María de la Luz Guerrero González**

San Luis Potosí, S.L.P., julio de 2023



## Constancia de aprobación de la tesis

La tesis “**Generación de vectores para la caracterización de los uORFs presentes en las poliamina oxidasas de *Arabidopsis thaliana***” presentada para obtener el Grado de Maestra en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por **Kinberli Marcela Valles Méndez** y aprobada el **21 de junio del 2023** 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**  
Codirector de la tesis

---

**Dra. María de la Luz Guerrero González**  
Codirectora de la tesis

---

**Dra. Ana Paulina Barba de la Rosa**  
Miembro del Comité Tutorial



## **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 codirección del Dr. Juan Francisco Jiménez Bremont y la Dra. María de la Luz Guerrero González.

Se agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Investigación Ciencia Básica CB-2015256574), por el apoyo otorgado para la realización de esta tesis.

Se agradece al Proyecto de Ciencia Básica titulado: “Caracterización de la proteína de unión a RNA AtGRDP2 de Arabidopsis bajo estrés por frío” (A1-S-25233), por el apoyo otorgado para la realización de esta tesis.

Durante la realización del trabajo el autor recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (No. De registro 868608) y del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C.

Página en Blanco que se va a utilizar para colocar la copia del acta de examen.

# Dedicatorias

A papá y mamá.

## Agradecimientos

Agradezco infinitamente a todas las personas que han sido parte de esta maravillosa y retadora experiencia. A veces se siente irreal darme cuenta de lo afortunada que soy al poder coincidir con personas tan espectaculares en mi vida. Agradezco a papá y mamá por haberme dado el privilegio de una educación tan integral durante toda mi vida, por darme su voto de confianza en todo momento.

Agradezco al Dr. Juan Francisco Jiménez Bremont y a la Dra. María de la Luz Guerrero González por la mentoría durante este último año y por haberme confiado un proyecto tan fascinante; es un verdadero honor poder aprender de ustedes.

Gracias a la Dra. Ana Paulina por sus atinadas sugerencias y valiosa aportación en el proyecto.

Agradezco a nuestra técnico Alicia Becerra Flora, por su paciencia y ayuda siempre oportuna.

Mil gracias al Dr. Enrique González por todo el apoyo, mentoría y camaradería que siempre me ha ofrecido.

Agradezco a los amiguitos del laboratorio (Itz, Ale, Gene, Bri, Ever, Joscett), por su ayuda, consejos y energía bonita en el día a día.

Un millón más de gracias infinitas al Dr. Nicolas Gómez Hernández y a la Dra. Karina Asyade Robledo Márquez, por el valiosísimo y cálido apoyo que me han brindado.

A Zel (la mejor roomie del siglo) por la contención emocional y su ayuda en todos los aspectos de la vida. A mis otros roomies y amigos cercanos (JJ, Joscett, Marinito) por existir y hacer que el camino sea tan ameno. Al grupo de comiditas por acompañarme a cruzar el semidesierto hacia la cafetería todos los días y ser seres tan maravillosos.

Les quiero mucho.

# 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
Abreviaturas	x
Resumen	xi
Abstract	xii
Introducción	1
Materiales y métodos	6
Resultados	10
Discusión	18
Referencias	22
Tabla suplementaria	26

## Lista de tablas

1. Construcciones generadas para la caracterización funcional de los uORF presentes en los transcritos *AtPAO* de *Arabidopsis thaliana*      Página 26

## Lista de figuras

1. Esquema de los transcritos <i>AtPAO</i>	Página 10
2. Secuencia de las versiones mutantes uORF-PAO2	Página 11
3. Mapa del vector uORF-PAO3 WT	Página 13
4. Secuencia nucleotídica en el vector de entrada uORF-PAO3 nAUG	Página 14
5. Mapa del vector uORF-PAO4 WT	Página 16
6. Representación esquemática de distintos genes quiméricos generados para caracterizar el efecto de los uORF de <i>AtPAO4</i> en el vector pMDC141	Página 17

## Abreviaturas

<b>5'UTR</b>	Untranslated región 5'
<b>µL</b>	Microlitros
<b>ADC</b>	Arginina descarboxilasa
<b>Ala</b>	Alanina
<b>ARNm</b>	Ácido ribonucleico mensajero
<b>At</b>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
<b>cDNA</b>	DNA complementario
<b>CuAO</b>	Amino oxidasa dependiente de cobre
<b>Gent</b>	Gentamicina
<b>GUS</b>	β-glucuronidasa
<b>Kan</b>	Kanamicina
<b>LB</b>	Medio de cultivo líquido Luria Bertani
<b>Leu</b>	Leucina
	<b>mORF</b> Marco de lectura abierto principal del transcrito
<b>MS</b>	Medio de cultivo Murashige and Skoog
<b>ng</b>	Nanogramo
<b>OD<sub>600</sub></b>	Densidad óptica a 600 nanómetros.
<b>ODC</b>	Ornitina descarboxilasa
<b>p/v</b>	Peso/volumen
<b>PAO</b>	Poliamina oxidasa
<b>PA</b>	Poliaminas
<b>s</b>	Segundo
<b>SAMDC</b>	S-adenosilmetionina descarboxilasa
<b>Ser</b>	Serina
<b>Sm</b>	Espectinomicina
<b>uORF</b>	Marco de lectura río arriba del mORF en el transcrito
<b>WT</b>	Wild type

# Resumen

## **Generación de vectores para la caracterización de los uORFs presentes en las poliamina oxidasas de *Arabidopsis thaliana***

Las poliaminas (PA) son policationes derivados de aminoácidos, esenciales para el desarrollo y crecimiento en los organismos vivos. Bajo condiciones de estrés, las células vegetales modulan los niveles de PA mediante la regulación de las enzimas encargadas de su biosíntesis y catabolismo, entre estas las poliamina oxidasas (PAOs). Las PAOs catalizan la desaminación oxidativa de las PA superiores espermidina y espermina. Nuestro grupo de investigación ha comenzado a caracterizar el marco de lectura abierto río arriba (uORF), presente en el 5'UTR de *AtPAO2*, el cual ejerce un efecto represor sobre la traducción del ORF principal (mORF). El extremo N-terminal del péptido uORF-*PAO2* muestra un alto grado de conservación, lo que sugiere que estos aminoácidos pudieran estar implicados en la función regulatoria. En esta tesis generamos diferentes vectores de expresión que incluyen mutaciones puntuales en aminoácidos conservados del péptido uORF-*PAO2* (Ser-14, Leu-21-22, Leu-48) para analizar si estos son clave en la represión traduccional. Además, con el objetivo de comenzar a elucidar la función de los uORFs de *AtPAO3* y *AtPAO4* se generaron vectores de entrada y/o destino con las versiones WT o mutantes de dichos uORFs. Para ello, la región WT y las versiones mutantes del 5'UTR de cada *AtPAO* se amplificó por PCR, se clonó en el vector de entrada pCR8/GW/TOPO, y algunas de ellas fueron recombinadas en el vector destino pMDC141. En las versiones mutantes, el codón de inicio de la traducción (ATG) del uORF fue sustituido por GCT, con el objetivo de determinar si la traducción del uORF es necesaria para que ejerza su efecto regulatorio. Las construcciones generadas en este trabajo de investigación se utilizarán para generar líneas reporteras de *Arabidopsis thaliana* en donde se determinará el efecto de los uORFs presentes en los ARNs mensajeros de las *AtPAOs* de acuerdo con los cambios en la expresión del gen reportero *GUS*.

**PALABRAS CLAVE.** Poliaminas, regulación traduccional, gen reportero.

## Abstract

### **Generation of vectors for the characterization of uORFs present in polyamine oxidases of *Arabidopsis thaliana***

Polyamines (PA) are polycationic compounds derived from amino acids, essential for growth and development in living organisms. Under stress conditions, plant cells modulate PA levels by regulating the enzymes involved in their biosynthesis and catabolism, including polyamine oxidases (PAOs). PAOs catalyze the oxidative deamination of higher PA such as spermidine and spermine. Our research group has started to characterize the upstream open reading frame (uORF) present in the 5'UTR of *AtPAO2*, which exerts a repressive effect on the translation of the main ORF (mORF). The N-terminal end of the uORF-PAO2 peptide shows a high degree of conservation, suggesting that these amino acids may be involved in the regulatory function. In this thesis, we generated different expression vectors that include point mutations in conserved amino acids of the uORF-PAO2 peptide (Ser-14, Leu-21-22, Leu-48) to analyze if they are key in translational repression. Additionally, to begin elucidating the function of uORFs in *AtPAO3* and *AtPAO4*, entry and/or destination vectors were generated with wild-type (WT) or mutant versions of these uORFs. For this purpose, the WT and mutant versions of the 5' UTR of each *AtPAO* were amplified by PCR, cloned into the pCR8/GW/TOPO entry vector, and some of them were recombined into the pMDC141 destination vector. In the mutant versions, the translation initiation codon (ATG) of the uORF was replaced by GCT, to determine if the translation of the uORF is necessary for it to exert its regulatory effect. The constructions generated in this research will be used to generate reporter lines of *Arabidopsis thaliana*, where the effect of uORFs present in the messenger RNAs of *AtPAOs* will be determined according to changes in the expression of the reporter gene GUS.

**KEY WORDS.** Polyamines, translational regulation, reporter gene.

# 1. Introducción

Las poliaminas (PA) son moléculas policatiónicas presentes en todos los reinos de la vida (Seiler, 1999). En las plantas, las fluctuaciones en los niveles de PA se han vinculado a procesos celulares esenciales como el crecimiento, el desarrollo, y la respuesta a estrés (Handa y Mattoo, 2010).

Estos cambios en la concentración de PA están mediados por enzimas encargadas de su biosíntesis, por ejemplo, la ornitina descarboxilasa (ODC; EC 4.1.1.17), arginina descarboxilasa (ADC; EC 1.13.12.11) y S-adenosilmetionina descarboxilasa (SAMDC; EC 4.1.1.50), además de enzimas responsables de su degradación tales como las amino oxidasas dependientes de cobre (CuAOs; EC 1.4.3.21) y poliamina oxidasas (PAOs; EC 1.5.3.13) (Wallace et al., 2003). Las PAOs son capaces de catalizar la desaminación oxidativa de las PA, generando como productos de la reacción peróxido de hidrógeno, 4-aminobutanal y 1,3-diaminopropano (Slocum y Flores, 1991). Los genes que codifican para las enzimas de biosíntesis y catabolismo de PA se encuentran altamente regulados a diversos niveles como el traduccional. Por ejemplo, se ha reportado que los transcritos *PAO* de plantas pueden contener pequeños marcos de lectura río arriba, (uORF por sus siglas en inglés), los cuales están presentes en la región 5'UTR de algunos otros ARN mensajeros (ARNm) (Von Arnim et al., 2014). En general, se ha descrito que los uORFs reprimen la traducción del marco de lectura abierto principal (mORF) (Wethmar, 2014).

Existen dos mecanismos descritos para explicar el efecto represivo de los uORFs en la traducción del mORF. El primer mecanismo es independiente de la secuencia del péptido codificado por el uORF y sugiere que la regulación ocurre *in cis*; en donde características como el inicio de la traducción del uORF, su contexto Kozak, la longitud del péptido uORF y la distancia entre la caperuza 5' del transcrito y el codón de inicio del uORF influyen sobre la eficiencia de traducción del mORF del transcrito (Wethmar, 2014). En el segundo mecanismo postula que el uORF opera en *trans* y el péptido *per se*, generado durante la traducción del uORF,

desempeña un papel activo en el efecto represivo sobre el mORF (Guerrero-González et al., 2016; Jorgensen y Dorantes-Acosta, 2012; Zhang et al., 2020).

Se ha reportado que además de los genes del catabolismo de PA, existen algunos genes involucrados en la biosíntesis de las PA que poseen uORFs en su región 5'UTR. Uno de los uORFs más estudiados es el de la SAMDC de mamíferos, que codifica el péptido MAGDIS (Ruan et al., 1996). Este uORF es ineficiente en la terminación de la traducción y provoca el estancamiento del ribosoma (Law et al., 2001). Se ha sugerido que el péptido nascente MAGDIS contribuye a inducir atasco ribosomal durante su traducción, incluso un aumento en los niveles de PA puede exacerbar el atasco en la traducción del uORF, interfiriendo con componentes ribosomales y/o factores de liberación involucrados en la terminación de la traducción, lo que podría evitar que el complejo ribosomal se re-ensamble en el mORF, y por lo tanto reprimir su traducción (Dever et al., 2020).

En plantas, el transcrito *SAMDC*, que participa en la biosíntesis de las PA superiores espermidina y espermina, posee dos uORFs sobrelapados en la región 5' de su ARNm (Hanfrey et al., 2002), uno mini que puede consistir en 2 o 3 codones (t-uORF) y uno pequeño (s-uORF) que oscila entre los 40 y los 65 codones. Hanfrey et al. (2002) determinaron que el s-uORF tiene un efecto represor sobre la traducción del mORF de la *SAMDC*. Luego el mismo grupo en 2005, usando líneas transgénicas de plantas y de levadura, demostraron que el t-uORF en ausencia del s-uORF no tiene efecto sobre la eficiencia traduccional; mientras que la ausencia del t-uORF permite que el s-uORF reprima la traducción del mORF de manera constitutiva. Los autores sugieren que el t-uORF no inhibe *per se*, pero se requiere para modular el grado de represión ejercido por el s-uORF al influenciar el reconocimiento ribosomal dependiendo de la concentración de PA (Hanfrey et al., 2005). Con estos datos se propuso un modelo de regulación traduccional de la *SAMDC*, en el que cuando bajan los niveles de PA el complejo de pre-iniciación ribosomal reconoce el codón de inicio del t-uORF, lo traduce y es capaz de reiniciar en el mORF sintetizando así la enzima *SAMDC*, lo que contribuiría al incremento de los niveles de PA superiores. Por el contrario, cuando existen altos niveles de PA, el complejo de pre-iniciación ribosomal pasa de largo el codón de inicio del t-uORF,

que posee un contexto Kozak débil, y reconoce el codón de inicio del s-uORF, sintetizando el péptido y esto resulta en la represión traduccional del mORF de la SAMDC que se encuentra río abajo (Hanfrey et al., 2005; Uchiyama-Kadokura et al., 2014). Se ha sugerido que el arresto ribosomal en el codón de paro del péptido codificado por el s-uORF podría detonar la degradación del ARNm mediado por mutación terminadora (NMD, por las siglas en inglés de nonsense mediated decay) (Uchiyama-Kadokura et al., 2014).

Por otro lado, el gen *ACL5* de *A. thaliana* codifica para una termoespermina sintasa involucrada en la síntesis de termoespermina en planta (Kakehi et al., 2008). La mutante *acl5* exhibe una proliferación excesiva del xilema vascular lo que provoca un problema en la elongación del tamaño y que las plantas sean enanas (Hanzawa et al., 1997). Se identificaron mutantes supresoras *acl5* (*sac*, por sus siglas en inglés), entre las que se encontró a *sac51-d* (Imai et al., 2006). Las plantas *sac51-d* tienen una mutación que genera un codón de paro prematuro en el uORF de un factor de transcripción (FT) tipo bHLH, que está implicado en la diferenciación del xilema del tallo vegetal. La interrupción de este uORF permite la traducción del mORF del FT bHLH, y reestablece el fenotipo WT; esto sugirió que en condiciones silvestres la termoespermina cancela el efecto inhibitorio del uORF sobre el mORF del FT bHLH. Resultados observados en líneas reporteras corroboraron que la termoespermina es capaz de disminuir el efecto represor del uORF presente en el transcrito del FT bHLH (Imai et al., 2006; Ishitsuka et al., 2019), por lo tanto, la presencia de termoespermina estimula la traducción del mORF del FT bHLH, mientras que bajos niveles de termoespermina resultan en una baja traducción del factor de transcripción. Este constituye un ejemplo en donde las PA son capaces de regular la traducción vía uORFs en otros transcritos, además de los que están involucrados en su metabolismo.

Guerrero-González et al. (2014) analizaron el papel del uORF presente en el transcrito de la poliamina oxidasa 2 de *Arabidopsis thaliana* (*AtPAO2*) usando líneas reporteras que expresan el gen de la  $\beta$ -glucuronidasa (GUS). Las líneas reporteras

que contenían el uORF *AtPAO2* mostraban actividad GUS reducida en comparación con las líneas reporteras control 35S::GUS, indicando que el uORF de *AtPAO2* ejerce un efecto represor (Guerrero-González et al., 2014). Al adicionar de manera exógena poliaminas a las líneas reporteras que poseían el uORF *AtPAO2*, las plantas mostraron una actividad GUS comparable a la de la línea reportera control, sugiriendo que el efecto represivo del uORF-*AtPAO2* es dependiente de PA.

Posteriormente, Guerrero-González et al. (2016) determinaron que el uORF *AtPAO2* ejerce su efecto represivo de manera secuencia dependiente. Para ello, generaron tres líneas reporteras con mutaciones puntuales en el uORF: la línea TTG (en la que fue mutado el codón de inicio), la TGA (en la que se introdujo un codón de paro prematuro) y la NP (a la que se le adicionó un nucleótido que provocó un desfase del marco de lectura de la secuencia uORF, dando lugar a un péptido con una nueva secuencia). A grandes rasgos, las líneas TTG y TGA mostraron una mayor actividad de GUS en comparación con las líneas que portaban el uORF nativo de *AtPAO2*, lo que significa que el uORF perdió su efecto represivo sobre la traducción del mORF. En la línea NP se adiciono una G entre la posición +7 y +8 del uORF; esto generó un desfase del marco de lectura, lo que da lugar a un péptido de 32 aminoácidos que comparte solo un 16% de identidad con el péptido WT y las secuencias conservadas están ausentes. Las plantas de la línea reportera NP aun ejercen efecto represor sobre el mORF, pero este es dos veces menor que la línea WT, remarcando la importancia de la secuencia peptídica. Estos resultados en conjunto muestran que la traducción del péptido uORF-*AtPAO2* es necesaria para que ejerza su efecto represor (Guerrero-González et al., 2016)

La planta modelo *A. thaliana* en su genoma tiene 5 genes que codifican para PAOs, de los cuales tres poseen uORF en su transcrito (*AtPAO2*, *AtPAO3* y *AtPAO4*) (Takahashi et al., 2010). A pesar de que nuestro grupo de investigación ha aportado evidencia sobre la función del uORF-*AtPAO2*, son necesarios más estudios del péptido uORF para caracterizar su mecanismo de regulación. Además, no existen datos acerca del papel que tienen los uORFs presentes en los genes *AtPAO3* y

*AtPAO4* de *A. thaliana*. Por lo que, el objetivo de la presente tesis fue generar plásmidos con las versiones silvestres y mutantes de los uORFs de *AtPAO2*, *AtPAO3* Y *AtPAO4* para determinar su potencial papel en la regulación traduccional. En particular, para el uORF-*AtPAO2* se generaron vectores de entrada con mutaciones puntuales, en donde algunos residuos conservados del péptido uORF-PAO2 (Ser-14, Leu-21-22, Leu-48) se sustituyeron por Ala. Estas mutantes puntuales del uORF-*AtPAO2* nos permitirán determinar si estos aminoácidos están involucrados en la función de represión traduccional del péptido. Adicionalmente, se lograron generar vectores de entrada y/o destino con las versiones WT o mutantes de los uORFs de *AtPAO3* y *AtPAO4*. En el futuro, se utilizarán estos vectores para generar líneas reporteras de *Arabidopsis thaliana*, con las cuales podremos descifrar el efecto de los uORFs presentes en los ARNm de las PAOs, de acuerdo con los cambios en la actividad del gen reportero *GUS*.

## 2. Materiales y métodos

### 2.1. Material vegetal y condiciones de crecimiento

Semillas de *A. thaliana* ecotipo Col-0 fueron esterilizadas con una solución de cloro al 20% (v/v) por 5 minutos, seguido de cinco lavados con agua destilada estéril. Las semillas fueron estratificadas por 2 días a 4°C y germinadas en placas de agar con medio 0.2x Murashige and Skoog (MS), con sacarosa al 0.5% (p/v) y agar al 1.2% (p/v) (Murashige and Skoog, 1962). Las placas se incubaron en una cámara de crecimiento a  $22 \pm 2^\circ\text{C}$  con un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 de oscuridad. Posteriormente, las plántulas fueron trasplantadas a macetas con una mezcla 3:1:1 del sustrato comercial Sunshine Mix #3, vermiculita y perlita.

### 2.2. Generación de plásmidos de entrada

Para la generación de versiones mutantes del uORF de *AtPAO2* se diseñaron fragmentos de ADN sintéticos (gBLOCKs) que fueron nombrados como Ser-14, Leu-21-22 y Leu-48. Estos gBLOCKs consisten en la región 5'UTR (442 pb) en el cual el codón TCG-14 (Ser), CTTCTC-21-22 (LeuLeu) o CTC-48 (Leu), respectivamente, fue remplazado por el codón GCT (Ala). Las diferentes versiones mutantes del 5'UTR fueron amplificadas individualmente empleando como molde 100 ng del gBLOCK correspondiente y los oligonucleótidos *AtPAO2-Fw* 5'-CCAAAGCCTAAAAAATCCGACC-3' y *AtPAO2-Rv* 5'-GATTTTTTTTTCAATTGATCAAACGAT-3'. Las condiciones de amplificación por PCR fueron 98°C 30s, 33 ciclos de 98°C 10 s, 57°C 30 s, 72°C 15 s y un PAo final de 72°C durante 10 min.

Para generar las construcciones de *AtPAO3*, la región 5'UTR de *AtPAO3* (336 pb) fue amplificada a partir de cDNA de plantas de *A. thaliana* de 4 semanas de edad,

se usaron los oligonucleótidos AtPAO3-Fw 5'-CCCGACTCCTGAGCCTCTC-3' y AtPAO3-Rv 5'-GATTCAACAATGAACGGAGTAATTAC-3', bajo las siguientes condiciones 98°C 30 s, 33 ciclos de 98°C 10 s, 64°C 30 s, 72°C 15 s y un PAo final de 72°C durante 10 min. Por otra parte, se diseñó un gBLOCK del 5'UTR de *AtPAO3* en el que el codón de inicio de la traducción del uORF (ATG) fue sustituido por el codón GCT, este fue amplificado por PCR con las condiciones previamente señaladas.

Para generar el vector de entrada, que incluye la región 5'UTR en la cual el uORF1 de *AtPAO4* fue eliminado, se diseñó un gBLOCK en el que el codón ATG del uORF1 se reemplazó por el codón GCT. Este fragmento fue utilizado como molde y amplificado por PCR empleando los oligonucleótidos AtPAO4-Fw 5'-GGTCACCAAACCCTTCATC-3' y AtPAO4-Rv 5'-TGAAGATTTTGTGGAAAGAAAC-3', las condiciones de corrida fueron 98°C 30 s, 33 ciclos de 98°C 10 s, 60°C 30s, 72°C 15s y un PAo final de 72°C durante 10 min. Los productos de PCR, 5'UTR WT y/o mutantes de *AtPAO2*, *AtPAO3* o *AtPAO4*, fueron separados por electroforesis en gel de agarosa al 0.8% y purificados empleando el kit Wizard® Genomic DNA Purification. Posteriormente, los productos de PCR purificados (0.1 µg) fueron clonados individualmente en el vector de entrada pCR8/GW/TOPO.

### **2.3. Generación de plásmidos destino que incluyen versiones WT o mutantes del 5'UTR de *AtPAO4***

Los vectores de entrada pCR8::PAO4-uORFWT, pCR8::PAO4u2 o pCR8::PAO4-u1u2 (generados previamente por nuestro grupo de trabajo) fueron recombinados individualmente con el vector de expresión pMDC141. Para ello, se emplearon 150 ng del vector de entrada que contiene el inserto de interés y 300 ng del vector destino pMDC141 que contiene el gen reportero de la  $\beta$ -glucuronidasa (*GUS*) y el promotor constitutivo *CaMV 35S*. Las reacciones de ligación Gateway (2.5 µL) se

transformaron en células electrocompetentes de *Escherichia coli* como se describe a continuación.

#### **2.4. Generación de clonas de *Escherichia coli* Top 10 con los vectores de entrada o vectores destino que contienen las construcciones *AtPAOs***

Se transformaron células electrocompetentes de *E. coli* Top 10 usando 2.5 µL de DNA plasmídico (pCR8/GW/TOPO o pMDC141) con un pulso de 2500 Volts. Se adicionaron 200 µL de caldo LB y se crecieron una hora a 37°C. Se plaquearon 100 µL del cultivo en medio LB+Sm 100 µg/mL (pCR8/GW/TOPO) o LB+Kan 50 µg/mL (pMDC141) para seleccionar a las clonas positivas. En cada plásmido, la presencia y orientación del inserto se comprobó por PCR y secuenciación empleando oligonucleótidos específicos. Posteriormente fueron recombinados en pMDC141 o bien transformados en *A. tumefaciens* GV3101.

#### **2.5. Generación de clonas de *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 con la construcción reportera uORF-PAO4 WT**

Se transformaron células electrocompetentes de *A. tumefaciens* GV3101 usando 2.5 µL de DNA plasmídico uORF-PAO4 WT . Las células se incubaron 3 días a 28°C en placas de LB +Gent 40 µg/mL +Kan 50 µg/mL. La presencia del plásmido uORF-PAO4 WT en las clonas seleccionadas se comprobó por PCR, para posteriormente transformar plantas de *A. thaliana*.

#### **2.6. Transformación de *A. thaliana* mediante floral dip con la clona de *Agrobacterium tumefaciens* que transfiere el vector uORF-PAO4 WT**

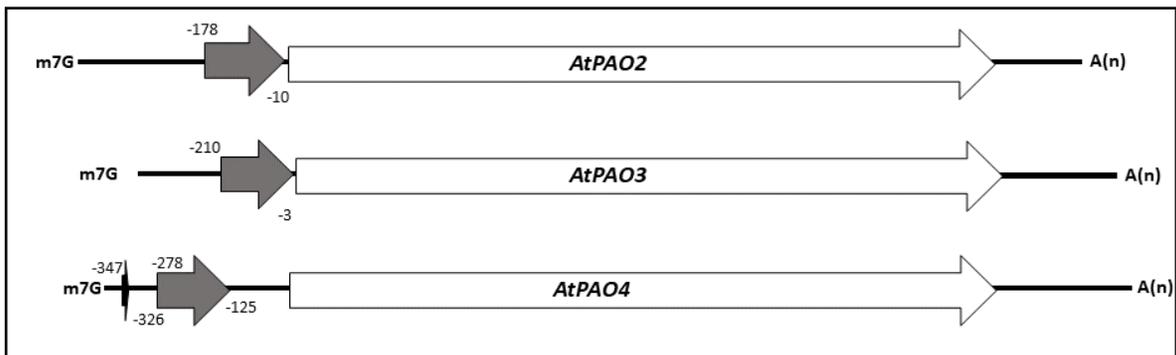
Para obtener líneas transformantes de *A. thaliana* que contengan las construcciones generadas en esta tesis, se usaron las clonas de *A. tumefaciens* transformadas con la construcción uORF-PAO4 WT (Tabla suplementaria I). La clona positiva se inoculó en 2 mL de LB+Gent 40 µg/mL +Kan 50 µg/mL y se incubó a 28°C toda la

noche. Al día siguiente, se usó 1 mL del cultivo inicial saturado para inocular 100 mL de LB con los antibióticos de selección y se incubó a 28°C toda la noche a 200 rpm. Posteriormente, este cultivo se centrifugó a 4000 rpm durante 15 minutos, se desechó el sobrenadante y las células se suspendieron en un volumen de 100 mL de sacarosa 5% recién hecha, hasta alcanzar una  $O.D_{600}=0.8$ . Se añadió Silwet L-77 a una concentración de 0.05% (500  $\mu$ L L-77 por cada litro de solución) y se mezcló bien. Los botones sin abrir de *A.thaliana* se sumergieron en la solución y se incubó en oscuridad durante 2 días. Las plantas infectadas se monitorearán hasta la obtención de semilla para seleccionar transformantes.

### 3. Resultados

#### 3.1. Los genes que codifican para las poliamina oxidasas de *Arabidopsis thaliana* tienen uORFs en su región 5'UTR

En el genoma de *A. thaliana* existen 5 genes que codifican para PAOs, tres de los cuales poseen al menos un uORF en su transcrito (*AtPAO2*, *AtPAO3* y *AtPAO4*) (Angelini et al., 2010; Fincato et al., 2011) (Figura 1). *AtPAO2* y *AtPAO3* poseen un solo uORF, que generarían péptidos de 55 aminoácidos y 68 aminoácidos, respectivamente. De manera interesante ambos péptidos poseen alto grado de conservación en la región N-terminal. En contraste, *AtPAO4* posee dos uORFs; el uORF1 codifica un péptido pequeño de 6 aminoácidos, mientras que el uORF2 es de 50 aminoácidos con alto grado de conservación en la región central. Los péptidos uORF-*AtPAO3* y uORF-*AtPAO2* comparten un 44% de identidad entre ellos, mientras que el uORF2-*AtPAO4* comparte solo un 17% de identidad con el uORF-*AtPAO2*, y 24% de identidad con el uORF-*AtPAO3* (Guerrero González et al., 2014).



**Figura 1. Esquema de los transcritos *AtPAO*.** Se marcan las posiciones nucleotídicas de inicio y fin de cada uORF con respecto del codón de inicio del ORF principal. *Línea sólida* UTRs; *flecha gris* uORF; *flecha blanca* mORF.

#### 3.2. Generación de vectores con versiones mutantes del uORF de *AtPAO2*

Guerrero-González et al. (2014) demostraron que el uORF presente en el transcrito de *AtPAO2* actúa como un elemento negativo sobre la traducción del mORF. Posteriormente, se demostró que la traducción del péptido derivado del uORF es necesaria para ejercer su efecto represivo, por lo que su mecanismo de acción dependería de la traducción del uORF. Con el objetivo de conocer cuales aminoácidos están involucrados en el efecto represor del uORF de *AtPAO2*, en la presente tesis se generaron tres diferentes vectores de entrada denominados Ser-14, Leu-21-22 y Leu-48 que corresponden a versiones mutadas del uORF, en donde se sustituyó por alanina a la serina 14, a las leucinas 21 y 22 y a la leucina 48, respectivamente (Figura 2).

**A) Ser-14 (442 pb)**

```

ccaaagcctaaaaaatccgaccttttttgttttctctctctagaagtctctctgttttcatctttctctctctctctctctagctcttc
ttcctcgtttctggcttttctgggaatthgatcctttggccccattgctcgcttgaattacgaatcagatatcgccgatcgtcgta
gatctgcttgatactgtccggctgagtaaacaggggtaacaaaaacaaaaacagagagggggtttaaaaatcctgaagaaaaatcgc
atgaatthgtttggaagcctgatttttcatctctgattgcttagccacttcacgacttgtcttctcatctttattcttcattttctc
cccagcttaatagtaataataataataataatagtaaatcgtaattccaataatctcgagagtaatcgtttgatcaattgaaaaaaaa
tc

```

**Ser-14** MNLFGSLIFSSSI**A**SHFTTCLLIFILHFSPQLNSNNNNNSNRNSNNLESNRLIN\*

**WT** MNLFGSLIFSSSI**S**SHFTTCLLIFILHFSPQLNSNNNNNSNRNSNNLESNRLIN\*

**B) Leu-21-22 (442 pb)**

```

ccaaagcctaaaaaatccgaccttttttgttttctctctctagaagtctctctgttttcatctttctctctctctctctctagctcttc
ttcctcgtttctggcttttctgggaatthgatcctttggccccattgctcgcttgaattacgaatcagatatcgccgatcgtcgta
gatctgcttgatactgtccggctgagtaaacaggggtaacaaaaacaaaaacagagagggggtttaaaaatcctgaagaaaaatcgc
atgaatthgtttggaagcctgatttttcatctctgatttcgagccacttcacgacttgtgctgctatctttattcttcattttctc
cccagcttaatagtaataataataataataatagtaaatcgtaattccaataatctcgagagtaatcgtttgatcaattgaaaaaaaa
tc

```

**Leu-21-22** MNLFGSLIFSSSISSSHFTTCAAIFILHFSPQLNSNNNNNSNRNSNNLESNRLIN\*

**WT** MNLFGSLIFSSSISSSHFTTCLLIFILHFSPQLNSNNNNNSNRNSNNLESNRLIN\*

**C) Leu-48 (442 pb)**

```

ccaaagcctaaaaaatccgaccttttttgttttctctctctagaagtctctctgttttcatctttctctctctctctctctagctcttc
ttcctcgtttctggcttttctgggaatthgatcctttggccccattgctcgcttgaattacgaatcagatatcgccgatcgtcgta
gatctgcttgatactgtccggctgagtaaacaggggtaacaaaaacaaaaacagagagggggtttaaaaatcctgaagaaaaatcgc
atgaatthgtttggaagcctgatttttcatctctgatttcgagccacttcacgacttgtcttctcatctttattcttcattttctc
cccagcttaatagtaataataataataataatagtaaatcgtaattccaataatgctgagagtaatcgtttgatcaattgaaaaaaaa
tc

```

**Leu-48** MNLFGSLIFSSSISSSHFTTCLLIFILHFSPQLNSNNNNNSNRNSNN**A**ESNRLIN\*

**WT** MNLFGSLIFSSSISSSHFTTCLLIFILHFSPQLNSNNNNNSNRNSNN**L**ESNRLIN\*

**Figura 2. Secuencia de las versiones mutantes de *AtPAO2*.** La secuencia del uORF se presenta en nucleótidos y aminoácidos. A) 5'UTR de *AtPAO2* con la mutación en la serina 14; B) en las leucinas 21 y 22; y C) en la leucina 48. En rojo se marcan las mutaciones y se resalta en gris la secuencia del uORF. La secuencia en aminoácidos de cada mutante esta comparada con la versión WT.

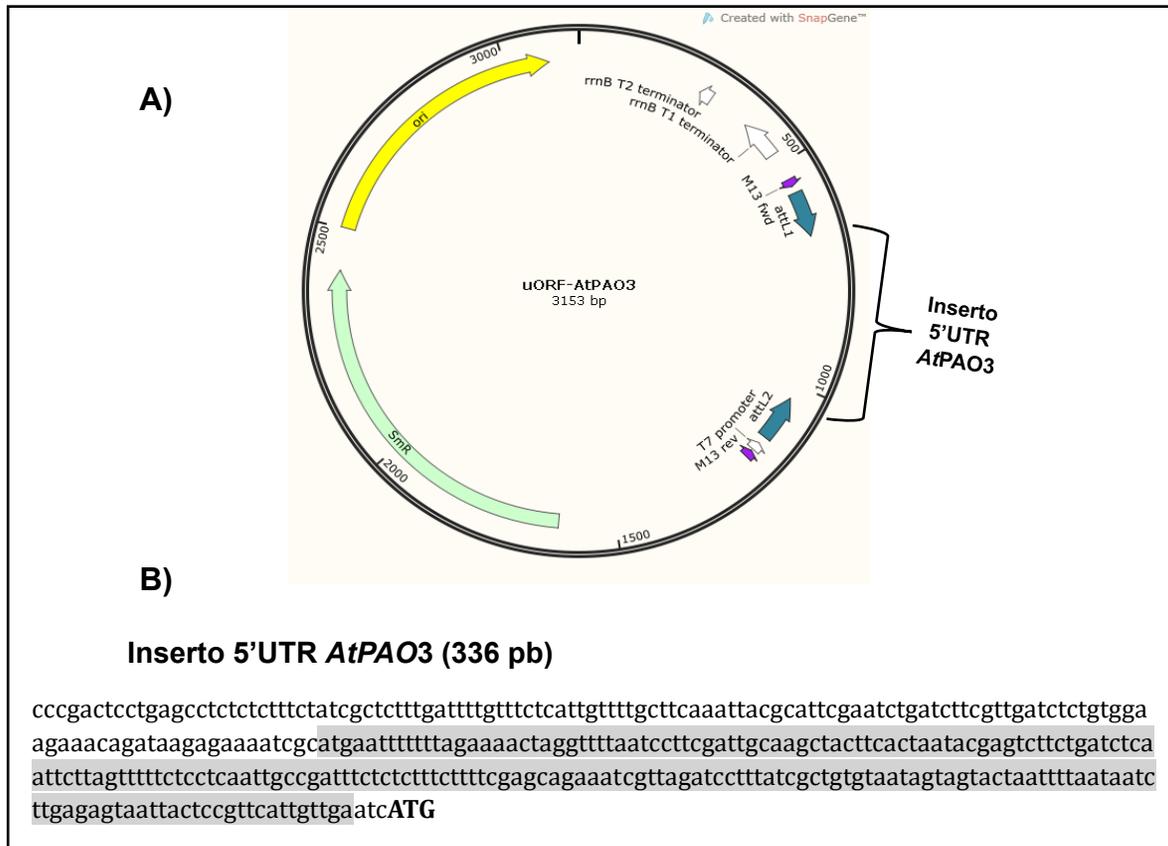
Para la generación de los vectores con versiones mutantes de los uORFs se sintetizaron fragmentos de ADN sintético (gBLOCKs). Estos fragmentos fueron amplificados por PCR, ligados de manera independiente en el vector pCR8/GW/TOPO y verificadas por secuenciación con oligonucleótidos específicos. Se plantea introducir estas versiones con mutaciones puntuales del uORF-PAO2 (Ser-14, Leu-21-22 y Leu-48) por recombinación Gateway en el plásmido pMDC141, para posteriormente transformarlas en planta, y de esta manera generar líneas reporteras GUS con cada construcción. Estas líneas nos permitirán determinar si estos aminoácidos desempeñan una función específica en el mecanismo regulatorio del uORF-*AtPAO2*.

### **3.3. Generación de vectores de entrada que contengan el uORF WT o mutante sin el codón de inicio del uORF de *AtPAO3***

En el transcrito de *AtPAO3* se ha identificado un uORF en su región 5'UTR, pero hasta la fecha no ha sido determinada su función y mecanismos de regulación. El uORF-*AtPAO3*, de manera similar al de *AtPAO2*, está altamente conservado hacia la región N-terminal mostrando un 65% de identidad en aminoácidos y una conservación en promedio de 42% (Guerrero-González et al., 2014).

El uORF-*AtPAO3* tiene una longitud de 207 nucleótidos (68 aminoácidos) y su codón de paro se encuentra a 3 nucleótidos del codón de inicio del mORF de la *AtPAO3* (Figura 1), por lo que este uORF podría constituir un elemento de regulación similar al uORF de la *AtPAO2*. Para determinar si este uORF ejerce un efecto regulatorio sobre su mORF se amplificó la región 5'UTR del transcrito *AtPAO3* a partir de cDNA de *A. thaliana* Col-0 y se clonó en el plásmido de entrada

pCR8/GW/TOPO obteniendo así el plásmido uORF-*AtPAO3* WT (Figura 3, Tabla suplementaria I).



**Figura 3. Mapa del vector uORF-*AtPAO3* WT.** A) El plásmido contiene el 5'UTR de 336 pb de *AtPAO3* entre los bordes de recombinación. *attL1* y *attL2*: bordes de recombinación. *T7 promoter*: promotor constitutivo viral. *Ori*: origen de replicación bacteriano. *SmR*: gen de resistencia a espectinomicina para selección en bacteria. B) La secuencia nucleotídica del inserto 5'UTR *AtPAO3*, el uORF está resaltado en gris. El codón de inicio del mORF esta resaltado en mayúsculas y negritas.

Además, ya que nosotros estamos interesados en determinar si la traducción de este uORF, es esencial para ejercer su efecto represivo al mORF del transcrito de la *AtPAO3*, se generó el vector de entrada uORF-PAO3 nAUG. Este vector contiene una versión mutante del 5'UTR, en el que el codón de inicio de la traducción ATG del uORF fue sustituido por un codón GCT (Figura 4). Ambos vectores se recombinarán en el vector destino pMDC141, y se utilizarán para generar líneas

reporteras GUS de *A. thaliana*, las cuales nos darán información sobre el efecto de este uORF sobre la traducción del mORF de la *AtPAO3*.

**Inserto 5'UTR *AtPAO3* nAUG**

```
cccgactcctgagcctctctctttctatcgctctttgattttgtttctcattgtttgcttcaaattacgcattcgaatctgatcttcggtgatctctgtggaa
gaaacagataagagaaaatcgcgctaatttttagaaaactaggtttaatccttcgattgcaagctacttcaatacagagtcttctgatctcaat
tcttagttttctcctcaattgccgatttctctctttctttcgagcagaaatcgtagatcctttatcgctgtgtaatagtagtactaatttaataatctt
gagagtaattactccgttcattgttgaatcATG
```

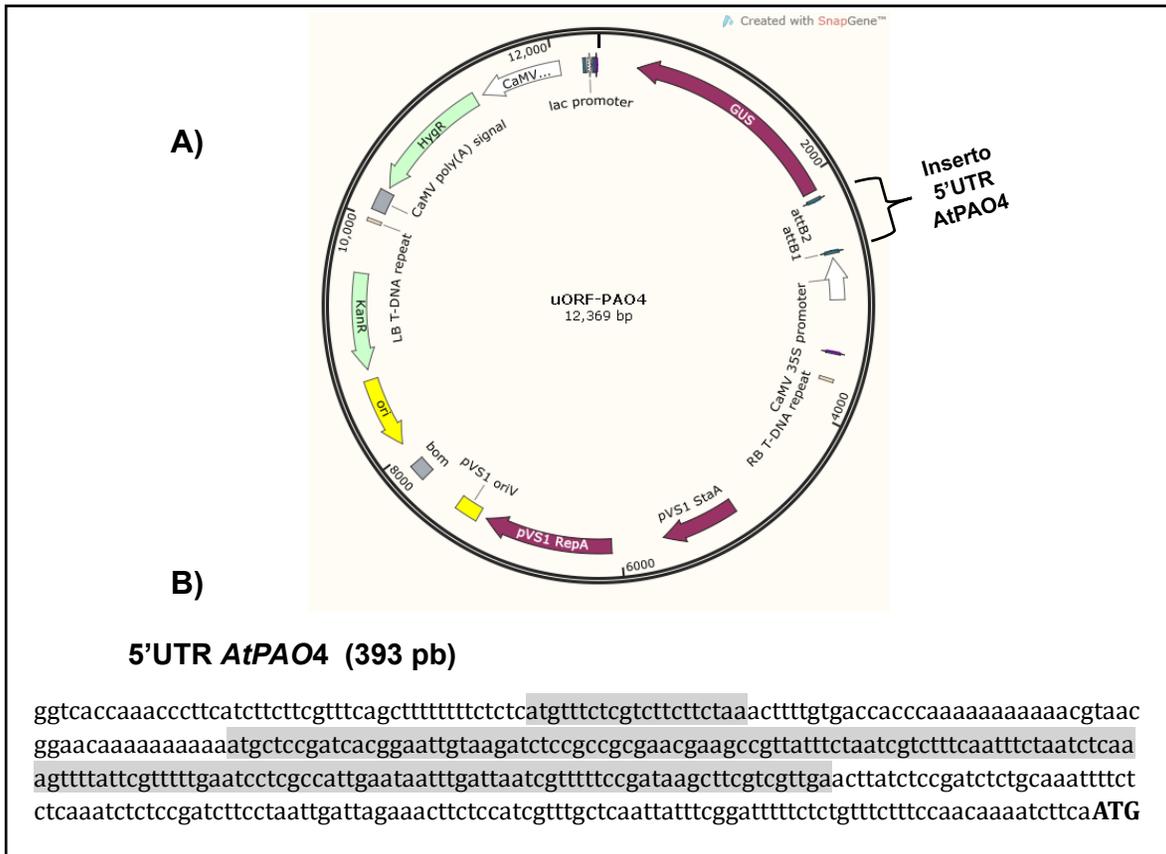
**Figura 4. Región de *AtPAO3* en el vector de entrada uORF-PAO3 nAUG.** Se muestra la secuencia 5'UTR de *AtPAO3*. En rojo se marca la mutación y se resalta en gris la secuencia del uORF

### 3.4. Generación de vectores con versiones WT o mutantes del 5'UTR de *AtPAO4*

El transcrito de *AtPAO4* de *A. thaliana* posee dos uORFs (Figura 1), una característica que coincide con el transcrito de *AtSAMDC*. Cabe señalar que, en general, los ortólogos de *AtPAO4* presentan dos uORFs y en la mayoría de los casos estos uORFs se encuentran sobrelapados entre ellos; sin embargo, también existen algunos ortólogos de *AtPAO4* que contienen un solo uORF (Guerrero-González et al., 2014).

El uORF1 del transcrito *AtPAO4* tiene una longitud de 21 nucleótidos (que codifica para un péptido predicho de 6 aminoácidos), el uORF2 consta de 153 nucleótidos (que podría generar un péptido de 50 aminoácidos) con una distancia de 48 nucleótidos entre el codón de paro del uORF1 y el codón de inicio del uORF2 y una distancia de 125 nucleótidos entre el codón de paro del uORF2 y el codón de inicio (ATG) del mORF de la *AtPAO4* (Figura 1). El uORF2 (50 aminoácidos) comparte 17% de identidad con el uORF-*AtPAO2* (55 aminoácidos) y 24% con el uORF-*AtPAO3* (68 aminoácidos); mientras que el uORF *AtPAO2* y el uORF-*AtPAO3* comparten un 44% de identidad (Guerrero-González et al., 2014). A diferencia de sus parálogos, el péptido del uORF2-*AtPAO4* y sus ortólogos se encuentran más conservados en la región central.

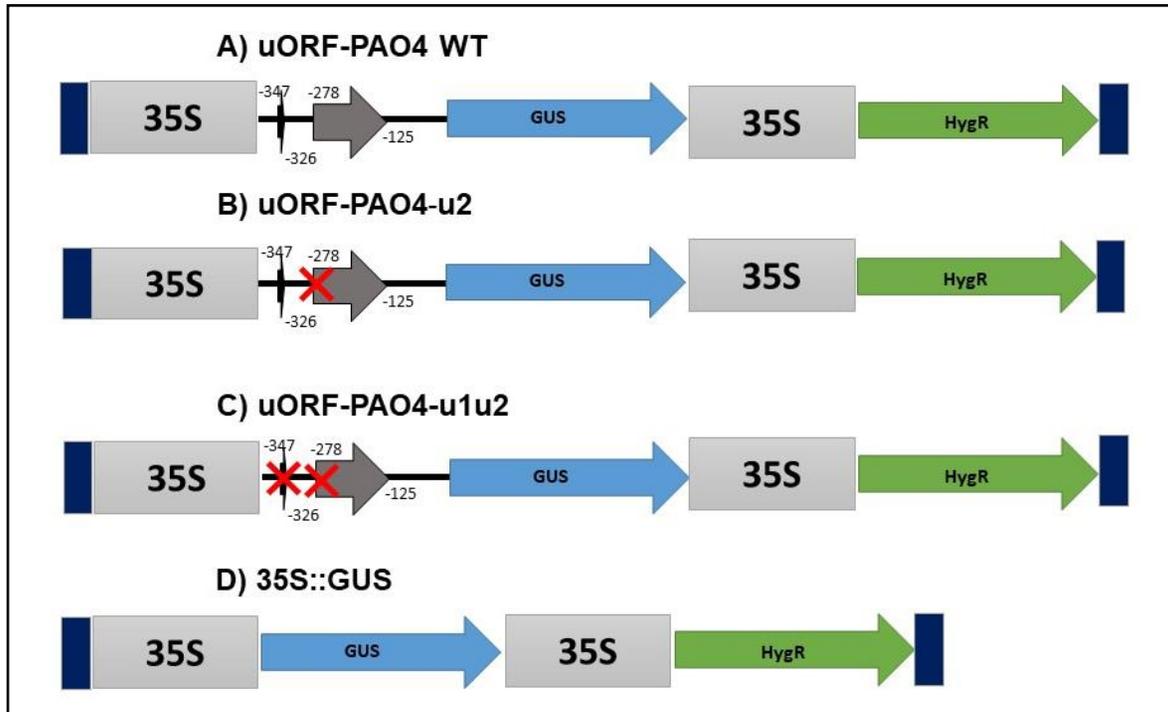
A la fecha tampoco existen reportes acerca de la función de estos uORFs ni de su mecanismo de acción por lo que en esta tesis nos dimos a la tarea de generar vectores de expresión que incluyen la versión WT o versiones mutantes del 5'UTR los cuales contribuirán en la caracterización de ambos uORFs. Para ello, en el caso de la versión WT (uORF-PAO4 WT), la región 5'UTR de *AtPAO4* se amplificó a partir de cDNA de *A. thaliana*. Para la generación de los vectores con versiones mutantes de los uORFs, se usaron gBLOCKs en donde los codones de inicio de cada uORF fueron reemplazados por el codón GCT que da origen a una alanina (uORF-PAO4-u1 y uORF-PAO4-u2). Además, se generó una tercera versión mutante del 5'UTR en la cual de manera simultánea el codón de inicio de la traducción ATG de cada uORF fue reemplazado por el codón GCT (uORF-PAO4-u1u2). Estos cambios permitirán analizar el efecto de cada uORF de *AtPAO4* en la regulación traduccional del mORF. Las diferentes versiones (WT y mutantes) del 5'UTR de *AtPAO4* fueron clonadas en el vector de entrada pCR8/GW/TOPO y verificadas por secuenciación. Posteriormente, estos plásmidos de entrada se recombinaron de manera individual con el plásmido de expresión pMDC141. En este vector, el inserto (5'UTR WT o mutante) se encuentra entre el promotor *CaMV 35S* viral y el ORF del gen reportero *GUS* que codifica para la  $\beta$ -glucuronidasa (Figura 5).



**Figura 5. Mapa del vector uORF-PAO4 WT.** El plásmido contiene el 5'UTR de *AtPAO4* de 393 pb entre los bordes de recombinación. A) Mapa del vector uORF-PAO4 WT. *attB1* y *attB2*: bordes de recombinación. *CaMV 35S promoter*: promotor constitutivo viral. *HygR*: gen de resistencia a higromicina para selección de transformantes en planta. *LB T-DNA repeat* y *RB T-DNA repeat*: bordes de recombinación. *Ori*: origen de replicación bacteriano. *KanR*: gen de resistencia a kanamicina para selección en bacteria. B) La secuencia nucleotídica del inserto 5'UTR *AtPAO4*. Los uORFs están marcados en gris.

En la Figura 6, se muestra una representación esquemática del brazo del T-DNA de los plásmidos con las diferentes versiones del 5'UTR de *AtPAO4*, las cuales fueron nombradas de acuerdo con el uORF que fue eliminado. Estas construcciones se utilizaron para transformar *A. tumefaciens* GV3101 y actualmente contamos con clones que contienen el plásmido y serán utilizadas para transformar plantas Col-0 de *A. thaliana*, en donde podremos analizar el efecto de la región 5'UTR del

transcrito *AtPAO4* en condiciones silvestres (Figura 6A), el efecto que tiene la eliminación de un uORF (Figura 6B) y ambos uORF (Figura 6C) en la traducción del mORF. Como control, utilizaremos líneas reporteras 35S::GUS (Figura 6D) de *A. thaliana*, las cuales expresan de manera constitutiva la señal GUS.



**Figura 6. Representación esquemática de distintos genes quiméricos generados para caracterizar el efecto de los uORF de *AtPAO4* en el vector pMDC141.** A) construcción uORF-PAO4 WT. B) Construcción uORF-PAO4-u2. C) Construcción uORF-PAO4-u1u2. D) Construcción control 35S::GUS *Rectángulo azul* T-DNA; *Caja gris* promotor 35S; *flecha negra* uORF1; *flecha gris* uORF2; *flecha azul* gen reportero GUS; *flecha verde* gen de resistencia a higromicina. Se tacho en rojo el uORF que contiene la mutación del codón de inicio ATG→GCT.

## 4. Discusión

Cada vez existen más reportes sobre la importancia que juegan los marcos de lectura abiertos ubicados en el 5'UTR (uORF) de algunos ARNm, los cuales funcionan como elementos regulatorios de la traducción del ORF principal del gen. Mediante estudios bioinformáticos, se ha calculado que aproximadamente del 20% al 50% de los ARNm eucarióticos tienen al menos un uORF en su región 5'UTR (Ingolia, 2014; Liu et al., 2013; Matsui et al., 2007). Con respecto a los transcriptomas de vegetales los porcentajes reportados varían, en el caso de *Arabidopsis* se ha estimado que un 37% de los transcritos contienen uORFs (Liu et al., 2013), mientras que para arroz se estima un 24% de transcritos con uORF (Jorgensen y Dorantes-Acosta, 2012). La presencia de estos elementos regulatorios se ha identificado en por lo menos la mitad del transcriptoma poliA. Lo anterior sugiere que los uORF podrían constituir un mecanismo basal para la regulación traduccional, causando principalmente la disminución de la traducción del ORF principal promoviendo la degradación del ARNm mediada por mutación terminadora, (NMD por las siglas en ingles de “Nonsense Mediated Decay”), o bien a través de la función en trans del péptido derivado del uORF (Alatorre-Cobos et al., 2012; David-Assael et al., 2005; Guerrero-González et al., 2016, 2014; Hummel et al., 2009; Laing et al., 2015; Pajerowska-Mukhtar et al., 2012; Tanaka et al., 2016).

Las PA son policationes que son indispensables para los organismos, ya que están involucrados en diversos procesos como el ciclo celular, crecimiento y desarrollo (Ortega-Amaro et al., 2012; Wallace et al., 2003). Por lo anterior, los niveles de PA se regulan por diversos mecanismos que median su regulación a nivel transcripcional, traduccional y post-traduccional. Entre los mecanismos de regulación traduccional se incluyen diversos uORFs identificados y caracterizados en genes de biosíntesis y catabolismo de dichas aminos (Guerrero-González et al., 2016, 2014; Hanfrey et al., 2005, 2002; Imai et al., 2006; Ivanov et al., 2018, 2009; Law et al., 2001).

Nuestro grupo de investigación ha contribuido a la caracterización del uORF de la PAO2 de *Arabidopsis thaliana*, se reportó que el uORF de 55 aminoácidos reprime la traducción del ORF principal, y que dicha regulación depende del péptido derivado del uORF (Guerrero-González et al., 2014, 2016). Estos resultados fueron obtenidos a través de la generación de líneas de *A. thaliana* en las que el 5'UTR de *AtPAO2* se clonó entre el promotor 35S y el ORF del gen reportero *GUS*. Por lo que, las variaciones en la actividad de *GUS* fueron consideradas como una medida del efecto represor del uORF sobre la traducción de *GUS*. La presencia del uORF disminuyó la actividad *GUS* en las líneas reporteras, siendo más evidente esta disminución en las hojas, indicando que el uORF funciona como un elemento que reprime la traducción del mORF. De manera interesante, al adicionar PA de manera exógena a una concentración de 100  $\mu\text{M}$ , se observó una mayor señal de *GUS* en las líneas reporteras que portaban construcciones con uORF (Guerrero-González et al., 2014), revelando que la actividad de este uORF dependería de la concentración celular de PA, como se reportó para la *AtSAMDC*. Además, a través de mutaciones nucleotídicas, se determinó que la actividad de este uORF es dependiente de su secuencia peptídica; por lo que la traducción del uORF es necesaria para que lleve a cabo su efecto represor.

Plantas de las líneas reporteras denominadas TTG y TGA, debido a que se eliminó el codón de inicio de la traducción o se introdujo un codón de paro prematuro respectivamente, mostraron un aumento considerable en la señal de *GUS*. La eliminación del codón de inicio (línea TTG) o la inserción de un codón de paro prematuro (línea TGA) resultaron en una drástica disminución del efecto represor del uORF de la *AtPAO2*. Lo anterior, apunta a que el péptido derivado del uORF *per se* estaría formando parte de la represión traduccional. Esta hipótesis es también apoyada por el hecho de que en la línea reportera en la que se generó un nuevo péptido (línea NP), a través de la inserción de un nucleótido en la secuencia del uORF-*AtPAO2*, se observó una menor actividad represora del uORF en comparación con las líneas reporteras que portan la versión WT del uORF (Guerrero-González et al., 2016).

Sin embargo, aún se desconoce cuál o cuáles aminoácidos del péptido derivado del uORF están implicados en la función represora. Por ello, en esta tesis de Maestría, nos propusimos continuar con la caracterización funcional del uORF de la *AtPAO2*, mediante la construcción de vectores que contienen mutaciones puntuales en el uORF. Para lograr este objetivo se seleccionaron los aminoácidos Ser-14, Leu-21-22 y Leu-48 localizados en el extremo N-terminal del uORF ya que se encuentran altamente conservados en especies mono- y dicotiledóneas (Guerrero-González et al., 2014). La mutación en la serina-14 es un blanco atractivo, además de su grado de conservación, también debido a que es un aminoácido susceptible a fosforilación; se ha reportado que el péptido codificado por un uORF (uPEP2) (con efecto represor), localizado en el transcrito de una proteína quinasa C (PKC- $\eta$ ), posee actividad inhibitoria sobre la actividad quinasa de PKC- $\eta$ . Este uPEP2 contiene en su secuencia un motivo de pseudosustrato PKC; en estudios computacionales se observó que la secuencia N-terminal de uPEP2 (residuos 1 a 9) encaja dentro del bolsillo de unión al sustrato del dominio quinasa de PKC- $\eta$ . Y una mutación de sustitución de alanina por serina o treonina transformó al uPEP2 de inhibidor a un sustrato favorable para PKC- $\eta$ , denotando el potencial funcional de los residuos fosforilables en la actividad uORF (Jayaram et al., 2021). Por otro lado, las leucinas altamente conservadas en las posiciones 21, 22 y 48 también podrían ser esenciales para la función del uORF, ya que se ha visto que este aminoácido es capaz de regular positivamente el complejo mTORC1, un regulador maestro de crecimiento celular y metabolismo (Averous et al., 2014) además de que podrían ser un sitio de interacción con otras proteínas (Kobe y Deisenhofer, 1994). En conjunto, estas mutaciones podrían ayudar a caracterizar las funciones del uORF *AtPAO2* y por homología dar pistas sobre los uORFs presentes en los transcritos de las PAOs, *AtPAO3* y *AtPAO4*.

Para comenzar a elucidar la función de los uORF de *AtPAO3* y *AtPAO4* se generaron los vectores de entrada y/o destino con las versiones WT o mutantes del 5'UTR en las cuales el uORF fue eliminado a través de la sustitución del codón de

inicio (ATG→GCT). En el caso particular de *AtPAO3*, se generaron los vectores de entrada uORF-PAO3 WT y uORF-PAO3 nAUG (Tabla suplementaria I), mientras que para *AtPAO4* se generaron el vector de entrada uORF-PAO4-u1 y los vectores de expresión uORF-PAO4 WT, uORF-PAO4-u1u2 y uORF-PAO4-u2 (Tabla suplementaria I). El uso de líneas reporteras para caracterizar la función de los uORFs ha sido una estrategia exitosa y el enfoque mutacional (versiones sin ATG y codón de paro prematuro) ha proporcionado información para determinar que la traducción del péptido *in cis*, incluso *in trans* (versiones nuevo péptido uORF), son claves para su mecanismo de acción (Guerrero-González et al., 2016, 2014; Hanfrey et al., 2005; Jayaram et al., 2021; Lin et al., 2019). Una vez que los vectores de expresión se encuentren en planta, nos ayudarán a determinar el efecto de cada uORF sobre su mORF.

El uORF de *AtPAO2* que funciona como elemento represor de la traducción (Guerrero-González et al., 2014) se localiza a 52 nucleótidos de la caperuza 5' y su codón de paro está a solo 10 nucleótidos del codón de inicio del mORF; estas características se han asociado con una baja eficiencia de reiniciación del ribosoma durante la traducción y por lo tanto una menor traducción del mORF (Iacono et al., 2005; Kochetov et al., 2002; Zhang et al., 2019, 2020). Por su parte *AtPAO3* también posee un solo uORF y el codón de paro de este se encuentra a 3 nucleótidos del codón de inicio del mORF, mientras que el transcrito de *AtPAO4* posee 2 uORF uno de 21 nucleótidos a 16 nucleótidos de la caperuza 5' y otro de 153 nucleótidos cuyo codón de paro está a 125 nucleótidos del mORF (Figura 1), estas características nos hacen pensar que el uORF presente en el *AtPAO3* juega un papel como elemento represor; mientras que los uORFs presentes en *AtPAO4* podrían estar fungiendo funciones más complejas en la regulación de la traducción.

La generación de líneas reporteras de *Arabidopsis thaliana*, que contengan las construcciones producidas en esta tesis, permitirán determinar el efecto regulatorio de los uORFs presentes en los ARNm de las *AtPAOs* de acuerdo con las variaciones en la expresión del gen reportero *GUS*.

## 5. Referencias

- Alatorre-Cobos, F., Cruz-Ramírez, A., Hayden, C.A., Pérez-Torres, C.A., Chauvin, A.L., Ibarra-Laclette, E., Alva-Cortés, E., Jorgensen, R.A., Herrera-Estrella, L., 2012. Translational regulation of *Arabidopsis* XIPTL1 is modulated by phosphocholine levels via the phylogenetically conserved upstream open reading frame 30. *Journal of Experimental Botany* 63. <https://doi.org/10.1093/jxb/ers180>
- Angelini, R., Cona, A., Federico, R., Fincato, P., Tavladoraki, P., Tisi, A., 2010. Plant amine oxidases “on the move”: An update. *Plant Physiology and Biochemistry* 48. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2010.02.001>
- Averous, J., Lambert-Langlais, S., Carraro, V., Gourbeyre, O., Parry, L., B'Chir, W., Muranishi, Y., Jousse, C., Bruhat, A., Maurin, A.C., Proud, C.G., Fafournoux, P., 2014. Requirement for expresión localization of Mtor for its activation differs between leucine and other amino acids. *Cell Signal* 26. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2014.04.019>
- David-Assael, O., Saul, H., Saul, V., Mizrachy-Dagri, T., Berezin, I., Brook, E., Shaul, O., 2005. Expression of AtMHX, an *Arabidopsis* vacuolar metal transporter, is repressed by the 5' untranslated region of its gene. *Journal of Experimental Botany* 56. <https://doi.org/10.1093/jxb/eri097>
- Dever, T.E., Ivanov, I.P., Sachs, M.S., 2020. Conserved Upstream Open Reading Frame Nascent Peptides That Control Translation. *Annual Review of Genetics*. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-112618-043822>
- Fincato, P., Moschou, P.N., Spedaletti, V., Tavazza, R., Angelini, R., Federico, R., Roubelakis-Angelakis, K.A., Tavladoraki, P., 2011. Functional diversity inside the *Arabidopsis* polyamine oxidase gene family. *Journal of Experimental Botany* 62. <https://doi.org/10.1093/jxb/erq341>
- Guerrero-González, M. de la L., Ortega-Amaro, M.A., Juárez-Montiel, M., Jiménez-Bremont, J.F., 2016. *Arabidopsis* Polyamine oxidase-2 uORF is required for downstream translational regulation. *Plant Physiology and Biochemistry* 108. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2016.08.006>
- Guerrero-González, M.L., Rodríguez-Kessler, M., Jiménez-Bremont, J.F., 2014. UORF, a regulatory mechanism of the *Arabidopsis* polyamine oxidase 2. *Molecular Biology Reports* 41. <https://doi.org/10.1007/s11033-014-3098-5>
- Handa, A.K., Mattoo, A.K., 2010. Differential and functional interactions emphasize the multiple roles of polyamines in plants. *Plant Physiology and Biochemistry* 48. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2010.02.009>

- Hanfrey, C., Elliott, K.A., Franceschetti, M., Mayer, M.J., Illingworth, C., Michael, A.J., 2005. A dual upstream open reading frame-based autoregulatory circuit controlling polyamine-responsive translation. *Journal of Biological Chemistry* 280. <https://doi.org/10.1074/jbc.M509340200>
- Hanfrey, C., Franceschetti, M., Mayer, M.J., Illingworth, C., Michael, A.J., 2002. Abrogation of upstream open reading frame-mediated translational control of a plant S-adenosylmethionine decarboxylase results in polyamine disruption and growth perturbations. *Journal of Biological Chemistry* 277. <https://doi.org/10.1074/jbc.M206161200>
- Hanzawa, Y., Takahashi, T., Komeda, Y., 1997. ACL5: An Arabidopsis gene required for internodal elongation after flowering. *Plant Journal* 12. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.1997.12040863.x>
- Hummel, M., Rahmani, F., Smeeckens, S., Hanson, J., 2009. Sucrose-mediated translational control. *Annals of Botany*. <https://doi.org/10.1093/aob/mcp086>
- Iacono, M., Mignone, F., Pesole, G., 2005. Uaug and uORFs in human and rodent 5'untranslated mRNAs. *Gene* 349. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2004.11.041>
- Imai, A., Hanzawa, Y., Komura, M., Yamamoto, K.T., Komeda, Y., Takahashi, T., 2006. The dwarf phenotype of the Arabidopsis ac15 mutant is suppressed by a mutation in an upstream ORF of a Bhlh gene. *Development* 133. <https://doi.org/10.1242/dev.02535>
- Ingolia, N.T., 2014. Ribosome profiling: New views of translation, from single codons to genome scale. *Nature Review Genetics*. <https://doi.org/10.1038/nrg3645>
- Ishitsuka, S., Yamamoto, M., Miyamoto, M., Kuwashiro, Y., Imai, A., Motose, H., Takahashi, T., 2019. Complexity and conservation of thermospermine-responsive uorfs of Sac51 family genes in angiosperms. *Frontiers in Plant Science* 10. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00564>
- Ivanov, I.P., Atkins, J.F., Michael, A.J., 2009. A profusion of upstream open reading frame mechanisms in polyamine-responsive translational regulation. *Nucleic Acids Res* 38. <https://doi.org/10.1093/nar/gkp1037>
- Ivanov, I.P., Shin, B.S., Loughran, G., Tzani, I., Young-Baird, S.K., Cao, C., Atkins, J.F., Dever, T.E., 2018. Polyamine Control of Translation Elongation Regulates Start Site Selection on Antizyme Inhibitor mRNA via Ribosome Queuing. *Molecular Cell* 70. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.03.015>
- Jayaram, D.R., Frost, S., Argov, C., Liju, V.B., Anto, N.P., Muraleedharan, A., Ben-Ari, A., Sinay, R., Smoly, I., Novoplansky, O., Isakov, N., Toiber, D., Keasar, C., Elkabets, M., Yeger-Lotem, E., Livneh, E., 2021. Unraveling the hidden role of a uORF-encoded peptide as a kinase inhibitor of PKCs. *Proceedings of National*

Academy of Sciences of the United States of America 118.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.2018899118>

Jorgensen, R.A., Dorantes-Acosta, A.E., 2012. Conserved peptide upstream open reading frames are associated with regulatory genes in angiosperms. *Frontiers in Plant Science* 3. <https://doi.org/10.3389/fpls.2012.00191>

Takehi, J.I., Kuwashiro, Y., Niitsu, M., Takahashi, T., 2008. Thermospermine is Required for Stem Elongation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* 49. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcn109>

Kobe, B., Deisenhofer, J., 1994. The leucine-rich repeat: a versatile binding motif. *Trends in Biochemical Sciences*. [https://doi.org/10.1016/0968-0004\(94\)90090-6](https://doi.org/10.1016/0968-0004(94)90090-6)

Kochetov, A. V., Sirnik, O.A., Rogosin, I.B., Glazko, G. V., Komarova, M.L., Shumny, V.K., 2002. Contextual features of higher plant mRNA 5'-untranslated regions. *Molecular Biology* 36. <https://doi.org/10.1023/A:1019852427093>

Laing, W.A., Martínez-Sánchez, M., Wright, M.A., Bulley, S.M., Brewster, D., Dare, A.P., Rassam, M., Wang, D., Storey, R., Macknight, R.C., Hellens, R.P., 2015. An upstream open reading frame is essential for feedback regulation of ascorbate biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 27. <https://doi.org/10.1105/tpc.114.133777>

Law, G.L., Raney, A., Heusner, C., Morris, D.R., 2001. Polyamine Regulation of Ribosome Pausing at the Upstream Open Reading Frame of S-Adenosylmethionine Decarboxylase. *Journal of Biological Chemistry* 276. <https://doi.org/10.1074/jbc.m105944200>

Lin, Y., May, G.E., Kready, H., Nazzaro, L., Mao, M., Spealman, P., Creeger, Y., Joel McManus, C., 2019. Impacts of uORF codon identity and position on translation regulation. *Nucleic Acids Research* 47. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz681>

Liu, M.J., Wu, Szu Hsien, Wu, J.F., Lin, W.D., Wu, Y.C., Tsai, T.Y., Tsai, H.L., Wu, Shu Hsing, 2013. Translational landscape of photomorphogenic *Arabidopsis*. *Plant Cell* 25. <https://doi.org/10.1105/tpc.113.114769>

Matsui, M., Yachie, N., Okada, Y., Saito, R., Tomita, M., 2007. Bioinformatic analysis of post-transcriptional regulation by uORF in human and mouse. *FEBS Letters* 581. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2007.07.057>

Ortega-Amaro, M.A., Rodríguez-Kessler, M., Becerra-Flora, A., Jiménez-Bremont, J.F., 2012. Modulation of *Arabidopsis* CYCB1 expression patterns by polyamines and salt stress. *Acta Physiologiae Plantarum* 34, 461–469. <https://doi.org/10.1007/s11738-011-0842-5>

Pajerowska-Mukhtar, K.M., Wang, W., Tada, Y., Oka, N., Tucker, C.L., Fonseca, J.P., Dong, X., 2012. The HSF-like transcription factor TBF1 is a major molecular switch

for plant growth-to-defense transition. *Current Biology* 22. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2011.12.015>

Ruan, H., Shantz, L.M., Pegg, A.E., Morris, D.R., 1996. The upstream open reading frame of the mRNA encoding S-adenosylmethionine decarboxylase is a polyamine-responsive translational control element. *Journal of Biological Chemistry* 271. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.47.29576>

Seiler, N., 1999. A Guide to the Polyamines. Seymour S. Cohen. *The Quarterly Review of Biology* 74. <https://doi.org/10.1086/393192>

Slocum, R.D., Flores, H.E., 1991. *Biochemistry and Physiology of Polyamines in Plants*. Undefined.

Takahashi, Y., Cong, R., Sagor, G.H.M., Niitsu, M., Berberich, T., Kusano, T., 2010. Characterization of five polyamine oxidase isoforms in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Reports* 29. <https://doi.org/10.1007/s00299-010-0881-1>

Tanaka, M., Sotta, N., Yamazumi, Y., Yamashita, Y., Miwa, K., Murota, K., Chiba, Y., Hirai, M.Y., Akiyama, T., Onouchi, H., Naito, S., Fujiwara, T., 2016. The minimum open reading frame, AUG-stop, induces boron-dependent ribosome stalling and mRNA degradation. *Plant Cell* 28. <https://doi.org/10.1105/tpc.16.00481>

Uchiyama-Kadokura, N., Murakami, K., Takemoto, M., Koyanagi, N., Murota, K., Naito, S., Onouchi, H., 2014. Polyamine-responsive ribosomal arrest at the stop codon of an upstream open reading frame of the AdoMetDC1 gene triggers nonsense-mediated mRNA decay in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiology* 55. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcu086>

Von Arnim, A.G., Jia, Q., Vaughn, J.N., 2014. Regulation of plant translation by upstream open reading frames. *Plant Science*. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2013.09.006>

Wallace, H.M., Fraser, A. V., Hughes, A., 2003. A perspective of polyamine metabolism. *Biochemical Journal*. <https://doi.org/10.1042/BJ20031327>

Wethmar, K., 2014. The regulatory potential of upstream open reading frames in eukaryotic gene expression. *Wiley Interdisciplinary Reviews RNA*. <https://doi.org/10.1002/wrna.1245>

Zhang, H., Wang, Y., Lu, J., 2019. Function and Evolution of Upstream ORFs in Eukaryotes. *Trends in Biochemical Sciences*. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2019.03.002>

Zhang, T., Wu, A., Yue, Y., Zhao, Y., 2020. uORFs: Important cis-regulatory elements in plants. *International Journal of Molecular Science*. <https://doi.org/10.3390/ijms21176238>

## 6. Tabla suplementaria

**Tabla suplementaria I.** Construcciones generadas para la caracterización funcional de los uORF presentes en los transcritos *AtPAO* de *Arabidopsis thaliana*.

Nombre	Vector	Descripción
<b>Ser-14</b>	pCR8/GW/TOPO	Contiene el 5'UTR de 442 pb de <i>AtPAO2</i> con una mutación de sustitución del codón 14-TCG- (Serina) por el codón GCT-Alanina, flanqueado por los sitios de recombinación <i>attL</i> .
<b>Leu-21-22</b>	pCR8/GW/TOPO	Contiene el 5'UTR de 442 pb de <i>AtPAO2</i> con una mutación de sustitución de los codones 21-CTT- (Serina) y 22-CTC(Serina) por el codón GCT-Alanina, flanqueado por los sitios de recombinación <i>attL</i> .
<b>Leu-48</b>	pCR8/GW/TOPO	Contiene el 5'UTR de 442 pb de <i>AtPAO2</i> con una mutación de sustitución del codón 48-CTC(Serina) por el codón GCT-Alanina, flanqueado por los sitios de recombinación <i>attL</i> .
<b>uORF-PAO3 WT</b>	pCR8/GW/TOPO	Contiene el 5'UTR de 336 pb de <i>AtPAO3</i> , flanqueado por sitios de recombinación <i>attL</i> .
<b>uORF-PAO3 nAUG</b>	pCR8/GW/TOPO	Contiene el 5'UTR de 336 pb de <i>AtPAO3</i> con una mutación de sustitución del codón de inicio del uORF ATG por el codón GCT-Alanina, flanqueado por sitios de recombinación <i>attL</i> .
<b>uORF-PAO4 WT</b>	pMDC141	Contiene el promotor viral <i>CaMV 35S</i> , el 5'UTR de 393 pb de <i>AtPAO4</i> y el ORF de la $\beta$ -glucuronidasa ( <i>GUS</i> ).

<b>uORF-PAO4-u1u2</b>	pMDC141	Contiene el promotor viral <i>CaMV 35S</i> , el 5'UTR de 393 pb de <i>AtPAO4</i> con una mutación de sustitución del codón de inicio ATG del uORF1 y del uORF2 por el codón GCT-Ala, y el ORF de la $\beta$ -glucuronidasa ( <i>GUS</i> ).
<b>uORF-PAO4-u1</b>	pCR8/GW/TOPO	Contiene el 5'UTR de 393 pb de <i>AtPAO4</i> con una mutación de sustitución del codón de inicio ATG del uORF1 por el codón GCT-Ala, flanqueado por sitios de recombinación <i>attL</i> .
<b>uORF-PAO4-u2</b>	pMDC141	Contiene el promotor viral <i>CaMV 35S</i> , el 5'UTR de 393 pb de <i>AtPAO4</i> con una mutación de sustitución del codón de inicio ATG del uORF2 por el codón GCT-Alanina y el ORF de la $\beta$ -glucuronidasa ( <i>GUS</i> ).