

**Centro de Investigación Científica y de Educación  
Superior de Ensenada, Baja California**



---

**Maestría en Ciencias  
en Ciencias de la Vida con orientación en Microbiología**

---

**El papel de la ornitina descarboxilasa en el desarrollo del  
hongo filamentoso *Neurospora crassa***

Tesis  
para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de  
Maestro en Ciencias

Presenta:

**Marco Antonio Figueroa Venavides**

Ensenada, Baja California, México  
2017

Tesis defendida por  
**Marco Antonio Figueroa Venavides**

y aprobada por el siguiente Comité

---

**Dra. Ernestina Castro Longoria**  
Director de tesis

Miembros del comité  
**Dr. Rafael Vázquez Duhalt**

**Dra. Rocío del Carmen Navarro Olmos**

**Dr. Israel Rocha Mendoza**



---

**Dra. Clara Elizabeth Galindo Sánchez**  
Coordinador del Posgrado en Ciencias de la Vida

---

**Dra. Rufina Hernández Martínez**  
Directora de Estudios de Posgrado

Resumen de la tesis que presenta **Marco Antonio Figueroa Venavides** como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Ciencias de la Vida con orientación en Microbiología.

### **El papel de la ornitina descarboxilasa en el desarrollo del hongo filamentoso *Neurospora crassa***

Resumen aprobado por:

---

Dra. Ernestina Castro Longoria  
**Director de tesis**

Las poliaminas son un grupo de compuestos nitrogenados, las cuales son producto del metabolismo en todas las especies existentes, las principales poliaminas son: la putrescina, espermidina y espermina. Su carácter policatiónico les permite interactuar con proteínas y ácidos nucleicos, por lo cual ejercen un papel determinante en procesos asociados al crecimiento, desarrollo y la proliferación celular. En el hongo filamentoso *Neurospora crassa*, la única ruta de síntesis de poliaminas que se ha descrito es a través de la enzima ornitina descarboxilasa (ODC), que produce putrescina a partir del aminoácido ornitina. A pesar de que en décadas pasadas se ha estudiado a la ODC y la producción de poliaminas en *N. crassa*, poco se conoce acerca de su intervención en los procesos encargados de mantener su característico crecimiento polarizado. Por lo anterior, el objetivo de este trabajo es analizar el papel que tiene dicha enzima en el desarrollo del hongo *N. crassa* y determinar los efectos que causa la deficiencia de la ODC en la morfogénesis celular. Para esto se generó la mutante nula  $\Delta odc$ , revelando que la delección del gen produce letalidad para el hongo. Por lo tanto, se realizó la caracterización fenotípica de la mutante heterocarión, se encontró un fenotipo bastante afectado: con un crecimiento polarizado irregular, más lento, con baja producción de conidios y biomasa, e hifas híper-ramificadas. El fenotipo de la colonia fue restablecido mediante la adición de putrescina exógena, lo cual indica deficiencia de poliaminas en la cepa generada. Por otro lado, se sabe que las Rho GTPasas CDC-42 y RAC juegan un papel primordial en el mantenimiento de la polaridad celular de *N. crassa*, ya que se encargan de la organización del citoesqueleto de actina. Para investigar si la disminución de los niveles de poliaminas causa algún efecto en la dinámica y función de las GTPasas y la F-actina, se utilizó el DFMO, un inhibidor irreversible específico de la ODC, en cepas con CDC-42, RAC y actina etiquetadas con proteínas fluorescentes. Se encontró que al inhibirse la ODC, tanto las Rho GTPasas como la F-actina muestran alteraciones en sus dinámicas que repercuten en el crecimiento polarizado de las hifas. Si bien es necesario determinar la relación que pudiera existir entre las poliaminas y las Rho GTPasas, los resultados indican que la deficiencia de poliaminas altera la organización y dinámica de estos componentes, los cuales son los responsables de mantener el crecimiento polarizado en *N. crassa*.

**Palabras clave:** *Neurospora*, ornitina descarboxilasa, poliaminas, ornitina, crecimiento.

Abstract of the thesis presented by **Marco Antonio Figueroa Venavides** as a partial requirement to obtain the Master of Science degree in Life Sciences with orientation in Microbiology

**Role of ornithine decarboxylase in the development of the filamentous fungus *Neurospora crassa***

Abstract approved by:

---

Ph.D. Ernestina Castro Longoria  
**Thesis Director**

Polyamines are a group of nitrogen compounds, which are product of the metabolism in all existing species, the main polyamines are: putrescine, spermidine and spermine. Their polycationic nature allows them to interact with proteins and nucleic acids, playing a critical role in biological processes associated with growth, development and cell proliferation. In the filamentous fungus *Neurospora crassa*, the only synthesis pathway described is through the ornithine decarboxylase (ODC), which produces putrescine from ornithine. Although ODC and the production of polyamines in *N. crassa* have been studied in recent decades, little is known about their involvement in processes that maintain its distinctive polarized growth. Therefore, the objective of this work is to analyze the role of this enzyme in the development of the fungus *N. crassa* and to determine the effects caused by the deficiency of ODC in cellular morphogenesis. For this, the null mutant  $\Delta odc$  was generated, revealing that the gen deletion produces lethality. Therefore, the phenotypic characterization was performed using the heterokaryon strain. It was found an affected phenotype; with an irregular polarized growth, slower hyphal growth, poor production of conidia, low biomass, and hyperbranched hyphae. The addition of exogenous putrescine restored normal colonial phenotype, this was indicative of a polyamine deficiency strain. On the other hand, the Rho GTPases CDC-42 and RAC play a key role in the maintenance of cell polarity of *N. crassa*, as they are responsible for the organization of the actin cytoskeleton. To investigate if the deficiency in polyamines has any effect on the dynamics and function of the GTPases and F-actin, the DFMO (an irreversible specific inhibitor of ODC) was used in CDC-42, RAC and actin GFP-labeled strains. It was found that ODC inhibition, provoke alterations in the dynamics of both Rho GTPases and F-actin, showing affected polarized growth. Although it is necessary to determine the possible relationship between the polyamines and the Rho GTPases, the results show that a deficiency in polyamines modify the organization and dynamics of these components, which are important to maintain polarized growth in *N. crassa*.

**Keywords:** *Neurospora*, ornithine decarboxylase, polyamines, ornithine, growth.

## Dedicatorias

Este trabajo de tesis está dedicado en primer lugar a mis padres. Por darme la vida, la educación y los valores que me han hecho posible alcanzar mis metas.

A mis hermanos, por siempre creer en mis capacidades.

A Frida y Amanda Monserrat, a quienes considero mis hermanas, por apoyarme en mi idea de ingresar a un posgrado y también por sus valiosos consejos a lo largo del mismo.

A mi amada inmortal, dondequiera que se encuentre, quien me dio la inspiración siempre que lo necesitaba.

Aunque las palabras no son suficientes, a todos los mencionados anteriormente les doy las más sinceras gracias por formar parte de mi vida, por su apoyo y compañía. Sepan que en este trabajo queda una parte de ustedes.

¡Gracias...!

## Agradecimientos

La realización de este trabajo de tesis no habría sido posible sin la cooperación de las siguiente personas e instituciones.

Le agradezco al CONACYT por la beca no. 340052 otorgada durante estos dos años.

Al Departamento de microbiología experimental del CICESE por haberme facilitado los equipos y laboratorios necesarios para la realización del presente trabajo.

Este proyecto fue posible gracias al financiamiento del proyecto de ciencia básica SEP-CONACYT CB2011/169154.

Al Centro de Nanociencias y Nanotecnología de la UNAM (CNyN) por haberme permitido el uso del equipo necesario para los análisis cromatográficos.

A mi tutora, la Dra. Ernestina Castro Longoria por haberme aceptado en su equipo de trabajo, por su apoyo, sus enseñanzas y sus recomendaciones.

A mis compañeros de laboratorio; Héctor, Leobardo y Rocío, por aceptar ayudarme cuando lo necesitaba y por cada comentario dicho para mejorar mis presentaciones y experimentos.

A la Dra. Olga Alicia Callejas Negrete, también por ayudarme en cada duda que me surgía.

A mi comité de tesis por sus comentarios y sugerencias a lo largo de todo el trabajo realizado.

## Tabla de contenido

	Página
Resumen en español.....	ii
Resumen en inglés.....	iii
Dedicatorias.....	iv
Agradecimientos.....	v
Lista de figuras.....	ix
Lista de tablas.....	xi
<b>Capítulo 1. Introducción</b>	
1.1. Antecedentes.....	1
1.1.1 Los hongos como modelo de estudio.....	1
1.1.2 El caso de <i>Neurospora crassa</i> .....	2
1.1.3 La ornitina descarboxilasa (ODC).....	4
1.1.4 Las poliaminas.....	8
1.1.5 Transporte de poliaminas.....	11
1.1.6 Relación de las poliaminas con el citoesqueleto de actina y las Rho GTPasas CDC-42 y RAC.....	12
1.2 Justificación.....	14
1.3 Hipótesis.....	14
1.4 Objetivo.....	15
1.4.1 Objetivos particulares.....	15
<b>Capítulo 2. Metodología</b>	
2.1 Cepas empleadas y condiciones de crecimiento.....	16
2.2 Análisis de ODC (secuencia nucleotídica y peptídica).....	17
2.3 Construcción de cepas de <i>N. crassa</i> .....	17
2.3.1 Generación de cepa mutante para ornitina descarboxilasa ( $\Delta odc$ ).....	17
2.3.2 Extracción de DNA genómico y PCR de comprobación de la cepa $\Delta odc$ .....	19
2.4 Obtención de mutante $\Delta odc$ homocarión.....	20

2.5	Análisis fenotípico de mutantes de <i>N. crassa</i> ( $\Delta odc$ het).....	20
2.5.1	Tasa de crecimiento.....	21
2.5.2	Tasa de esporulación.....	21
2.5.3	Producción de biomasa.....	21
2.5.4	Generación de hifas aéreas.....	22
2.5.5	Índice de ramificación.....	22
2.5.6	Recuperación del fenotipo en la cepa $\Delta odc$ het.....	22
2.6	Extracción y purificación de poliaminas.....	23
2.7	Cuantificación de poliaminas mediante cromatografía de gases.....	23
2.8	Análisis microscópico de cepas transformantes de <i>N. crassa</i> (YFP-CDC-42, YFP-RAC y Lifeact-GFP) tratadas con DFMO.....	24

### Capítulo 3. Resultados

3.1	Análisis de ODC (secuencia nucleotídica y peptídica).....	25
3.2	La cepa mutante $\Delta odc$ homocarión es inviable.....	28
3.3	PCR de comprobación de la cepa $\Delta odc$ heterocarión.....	29
3.4	Caracterización fenotípica de la cepa mutante $\Delta odc$ heterocarión.....	30
3.4.1	Tasa de crecimiento.....	30
3.4.2	Tasa de esporulación.....	31
3.4.3	Producción de biomasa.....	32
3.4.4	Generación de hifas aéreas.....	33
3.4.5	Índice de ramificación.....	33
3.5	Análisis de fenotipos mutantes recuperados con putrescina.....	34
3.6	Análisis bajo microscopia confocal.....	37
3.6.1	Tinción de la cepa silvestre y la cepa $\Delta odc$ het con FM4-64.....	37
3.6.2	Localización intracelular de CDC-42, RAC y F-actina.....	37
3.7	Cuantificación de poliaminas.....	44



**Capítulo 4. Discusión**

4.1 Discusión..... 46

**Capítulo 5. Conclusiones**

5.1 Conclusiones..... 50

**Literatura citada..... 51**

**Anexos..... 58**

## Lista de figuras

Figura		Página
1	Ciclo de vida de <i>N. crassa</i> .....	3
2	Modelo tridimensional de la ornitina descarboxilasa humana.....	4
3	Síntesis de putrescina a partir de L-ornitina.....	5
4	Ruta de degradación de la ornitina descarboxilasa por su antizima (AZ).....	5
5	Localización de ODC en fibroblastos de rata mediante inmunofluorescencia.....	8
6	Localización de ODC en células de riñón transfectadas con ODC-GFP.....	8
7	Principales poliaminas y su síntesis.....	9
8	Ciclo de regulación de las Rho GTPasas.....	13
9	Modelo de double-joint PCR.....	18
10	Secuencia del gen <i>odc</i> .....	25
11	Secuencia peptídica de ODC.....	25
12	Dominios presentes en la secuencia peptídica de ODC.....	26
13	Alineamiento de secuencias de ODC.....	27
14	Cruzas entre las cepas N150 y $\Delta odc$ het.....	28
15	Ensayos con micelio proveniente de ascosporas recuperadas.....	29
16	PCR de comprobación.....	30
17	Tasa de crecimiento.....	31
18	Producción de conidios.....	32
19	Producción de biomasa en 50mL de cultivo líquido.....	30
20	Generación de hifas aéreas.....	33
21	Índice de ramificación.....	34
22	Tratamiento con putrescina.....	35
23	Comparación de cepas.....	36

24	Tratamiento con putrescina en ascosporas $\Delta odc$ .....	36
25	Cepas de <i>N. crassa</i> teñidas con FM4-64.....	37
26	Cepas silvestres de <i>N. crassa</i> teñidas con FM4-64.....	38
27	Cepas silvestres de <i>N. crassa</i> teñidas con FM4-64 y tratadas con DFMO 4mM.....	38
28	Localización de las Rho GTPasas CDC-42 y RAC marcadas con la proteína fluorescente YFP.....	39
29	Microscopía confocal de la cepa YFP-CDC-42 tratada con DFMO 4mM.....	39
30	Tinción con FM4-64 en la cepa YFP-CDC-42 tratada con DFMO 4mM.....	40
31	Localización de CDC-42 en presencia de DFMO.....	40
32	Microscopía confocal de la cepa YFP-RAC tratada con DFMO 4mM.....	41
33	Localización de RAC en presencia de DFMO.....	41
34	Tinción con FM4-64 en la cepa YFP-RAC tratada con DFMO 4mM.....	42
35	Cúmulos fluorescentes en la cepa YFP-CDC-42 en presencia de DFMO 4mM.....	42
36	Cúmulos fluorescentes en la cepa YFP-RAC en presencia de DFMO 4mM.....	43
37	Localización de la F-actina.....	44
38	Localización de la F-actina en la cepa Lifeact-GFP tratada con DFMO 4mM.....	44
39	Concentración de putrescina y espermidina en la cepa silvestre y en la cepa mutante $\Delta odc$ het.....	45

## Lista de tablas

Tabla		Página
1	Localización de la proteína ODC en <i>N. crassa</i> .....	7
2	Cepas de <i>N. crassa</i> que se utilizaron en este estudio.....	16
3	Oligonucleótidos usados en el double-joint PCR.....	18
4	Concentración de poliaminas en la cepa silvestre y en la cepa mutante $\Delta$ odc het.....	45

# Capítulo 1. Introducción

---

## 1.1 Antecedentes

### 1.1.1 Los hongos como modelos de estudio

Los hongos están clasificados dentro del dominio Eukarya, al igual que las plantas y los animales, ya que sus células poseen un núcleo verdadero y un sistema de organelos membranosos. Son organismos cosmopolitas que forman parte esencial de las redes tróficas, siendo esenciales en los procesos de descomposición de materia orgánica (Chapin *et al.*, 2002). Muchos de los procesos celulares presentes en los hongos se encuentran altamente conservados en el resto de los eucariontes, siendo algunos de ellos más complejos, como por ejemplo el apareamiento (compatibilidad sexual) (Kronstad y Staben, 1997) y las transiciones en sus estadios de crecimiento de acuerdo a estímulos externos (Inderlied, 1980).

Existen muchas especies, no solo de hongos, que pueden ser usadas como organismos modelo, pero solo unas pocas cumplen con los requisitos para ser catalogadas como tales. Para que un organismo sea considerado “modelo” es recomendable que su genoma haya sido secuenciado, además de tener un ciclo de vida rápido, ser de fácil manejo, debe formar cultivos estables bajo condiciones mínimas, y los resultados de sus estudios pueden extrapolarse a otros organismos independientemente de su cercanía filogenética (p.ej. entre animales, ratón al humano; o, levaduras a células animales); también, un organismo modelo debe generar cierto interés entre la comunidad científica que garantice un empleo frecuente del mismo (Taylor *et al.*, 1993). Esta última condición se cumple en los hongos, dado que hay variedad de especies fúngicas que son patógenas para el ser humano, para plantas y animales, y estudios en sus contrapartes inocuas permiten reducir los riesgos de su manejo y obtener resultados para su tratamiento.

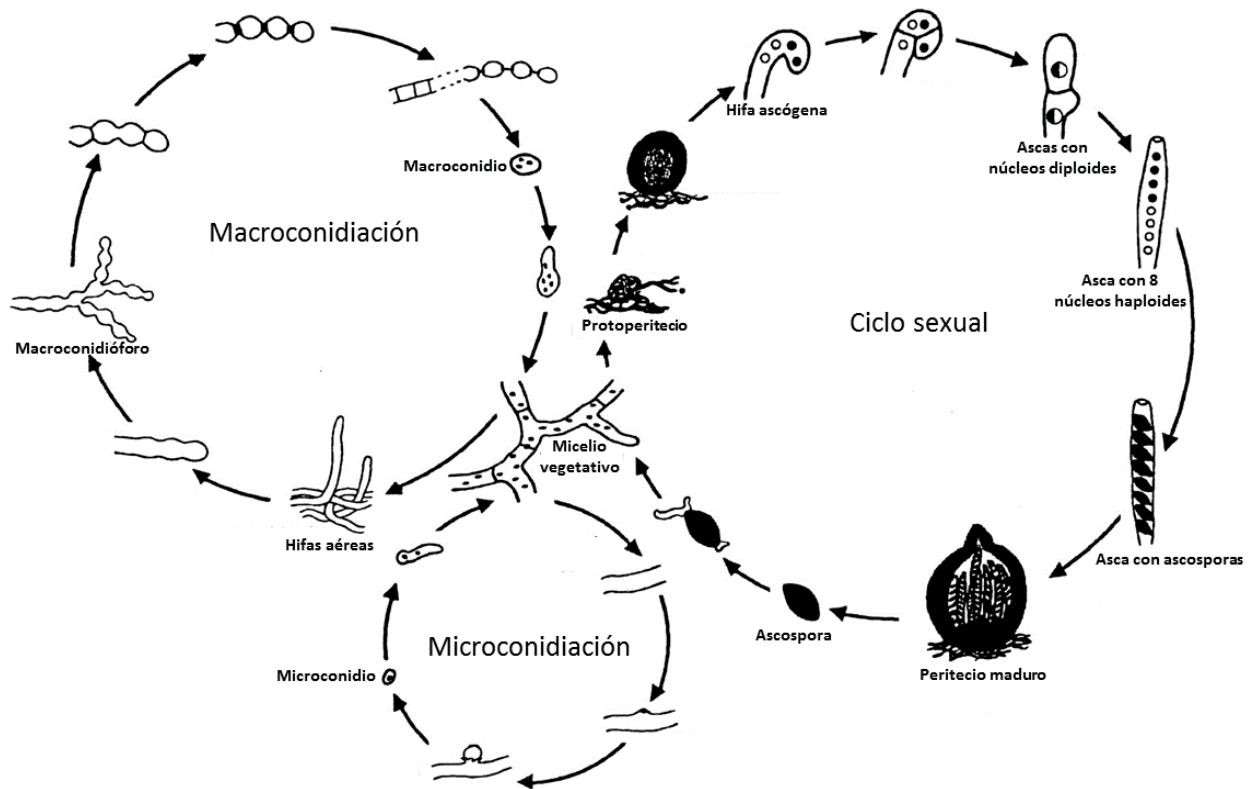
Otra ventaja que ofrecen los hongos es la relativa facilidad con que pueden ser aislados, cultivados y examinados, además que permiten la obtención de resultados con un costo y tiempo menor si se les compara con otros modelos eucariontes (Van der Klei y Veenhuis, 2006) como es el caso de los mamíferos, los cuales generalmente son utilizados con propósitos más específicos, por ejemplo, en estudios de patologías y el desarrollo de nuevos fármacos.

### 1.1.2 El caso de *Neurospora crassa*

Uno de los modelos fúngicos ampliamente reconocido es el hongo filamentoso *Neurospora crassa*; ya que, debido a su morfología, rápido crecimiento, su fácil manejo y por ser un organismo inofensivo, carente de riesgo biológico lo vuelven un organismo “ideal” para pruebas en laboratorio (Perkins y Davis, 2000). *N. crassa* ha sido usado como un modelo de estudio importante desde 1920, cuando se le clasificó dentro del género *Neurospora*, y fue uno de los organismos pioneros en estudios genéticos, determinando la segregación de los genes en proporción 4:4 en las ascas (Davis, 2000). En 1941, Beadle y Tatum lo usaron en su trabajo para establecer la hipótesis “un gen-una enzima”, a partir de este estudio comenzó a adoptarse como modelo de investigación genética. Actualmente su genoma se encuentra secuenciado en su totalidad, teniendo una extensión de 43 millones de pares de bases y alrededor de 10,000 genes codificantes, el doble de *Saccharomyces cerevisiae* (4,800 apróx.) y casi tanto como *Drosophila melanogaster* (14,300) (Galagan *et al.*, 2003). A diferencia de *S. cerevisiae*, otro modelo y también miembro de los hongos ascomicetos, *N. crassa* comparte con los mamíferos el complejo I en la cadena respiratoria, muestra un marcado ritmo circadiano, área de estudio donde ha probado ser ideal para análisis genéticos y fenotípicos, que se manifiestan en el hongo a modo de un patrón de bandas de conidios que alternan con el crecimiento vegetativo (Pittendrigh *et al.*, 1959; Sargent *et al.*, 1967). Además, posee un mecanismo de metilación asociado al sistema RIP en el silenciamiento de genes (Selker, 1990).

*N. crassa* posee un ciclo de vida asexual y sexual (Figura 1). En el ciclo asexual, las esporas, también llamados macroconidios germinan para formar un micelio vegetativo, este micelio crecerá indefinidamente mientras existan nutrientes disponibles. La reproducción asexual se da por la fragmentación del mismo micelio y por la formación de hifas aéreas, que son las encargadas de producir los macroconidios, que una vez que se dispersan y germinan, dan lugar a un micelio genéticamente idéntico al parental. Una etapa alterna de esporulación es la microconidiación, en donde una hifa vegetativa produce, a partir de una estructura llamada fiálide, un microconidio, que puede germinar y formar un micelio o actuar en la fertilización durante el ciclo sexual. Cuando *N. crassa* entra en su ciclo sexual, las hifas vegetativas forman protoperitecios, que cumplen la función de las estructuras reproductivas femeninas, éstos protoperitecios son fertilizados por los conidios de otro micelio, con la condición de que ambos sean compatibles en su tipo de apareamiento (mat A o mat a). Una vez fertilizados pasan a ser llamados peritecios, los cuales contienen en su interior hifas ascógenas tetranucleadas, los núcleos sufren divisiones meióticas, dando lugar a ocho núcleos haploides. Finalmente, cada núcleo dará origen a una ascospora, cuando los peritecios maduran, expulsan a las

ascosporas. Una cualidad de estas ascosporas es que requieren de un estímulo dado por calor para poder germinar y dar origen a un micelio nuevo. (Davis, 2000).



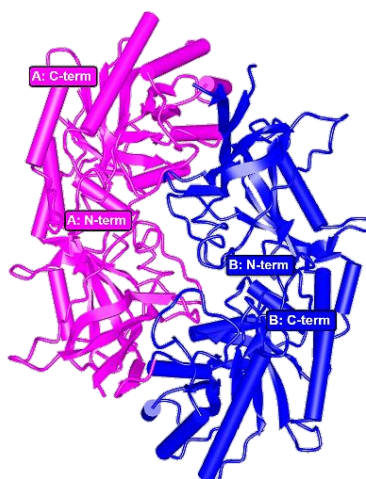
**Figura 1.** Ciclo de vida del hongo filamentoso *N. crassa*. En el ciclo asexual (izquierda) está la formación de macroconidios y microconidios. En el ciclo sexual (derecha) se observa la formación del protoperitecio y en su interior, la generación de ocho ascosporas por asca (Modificado de Borkovich *et al.*, 2004).

*N. crassa*, al igual que el resto de los hongos filamentosos, presenta un crecimiento polarizado, esto quiere decir que sus hifas se desarrollan desde sus ápices. Este tipo particular de crecimiento no es exclusivo de los hongos, pudiéndose encontrar en células de otros organismos, por ejemplo, en los tubos polínicos de las plantas y en las células nerviosas de los vertebrados (Palanivelu y Preuss, 2000). *N. crassa* brinda la facilidad de poder estudiar los mecanismos que están conservados en el crecimiento polarizado, como son el tráfico vesicular, la biosíntesis de pared celular (Riquelme *et al.*, 2011), rutas de transducción de señales y modificaciones en el citoesqueleto.

### 1.1.3 La ornitina descarboxilasa (ODC)

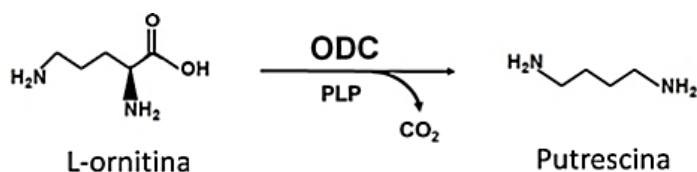
La enzima ornitina descarboxilasa (ODC) es una enzima clave que cataliza el inicio de la biosíntesis de las poliaminas y el factor limitante de la ruta (McDougall *et al.*, 1977), ya que produce putrescina, precursora en la síntesis de espermidina y espermina (como se verá más adelante en el apartado 1.1.4, figura 8), que son las poliaminas mayoritarias. La ODC se agrupa dentro de las enzimas dependientes de fosfato de piridoxal que intervienen en el metabolismo de aminoácidos y está presente en todos los eucariontes y en algunos órdenes de bacterias y arqueas (Kidron *et al.*, 2006).

Como su nombre lo indica, la función de la ODC es catalizar la disociación del grupo carboxilo del aminoácido ornitina para ser convertido en putrescina. Para que la enzima ODC sea catalíticamente activa debe formar un homodímero, en donde cada monómero se compone de dos dominios estructurales; uno compuesto de hojas- $\beta$  y hélices- $\alpha$ , y otro formado de hojas- $\beta$  dispuestas hacia el extremo carboxilo terminal (Almrud *et al.*, 2000) (Figura 2). Ambos monómeros se unen de manera antiparalela por las interacciones que hay entre sus residuos de aminoácidos. En la interface formada por ambos monómeros se sitúa el sitio activo (Tobias y Kahana, 1993) que contiene una molécula de fosfato de piridoxal (PLP) como cofactor (Martell, 1982), el PLP forma una *base de Schiff* con la ornitina, retirando el carboxilo y desplazando el grupo amino hacia el extremo libre (Poulin *et al.*, 1992), liberando dióxido de carbono y una molécula de 1,4-diaminobutano, mejor conocida como la poliamina putrescina (Figura 3). Se ha encontrado que residuos de arginina, lisina y tirosina son lo que promueven la dimerización del complejo y activan el sitio catalítico (Tobias y Kahana, 1993. Kern *et al.*, 1999. Almrud *et al.*, 2000).



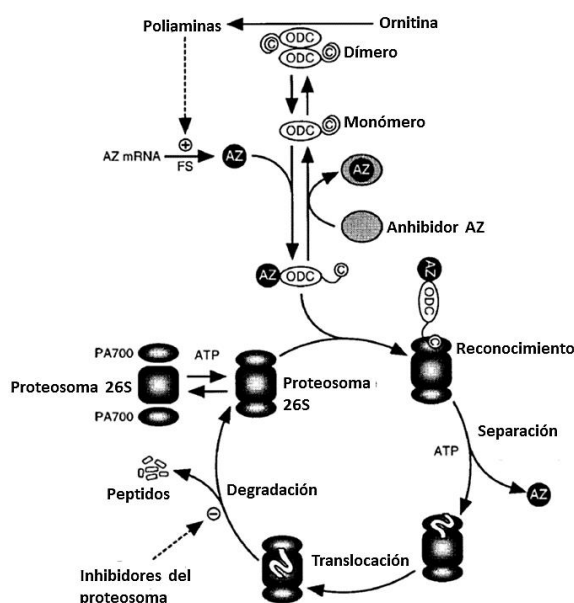
**Figura 2.** Modelo tridimensional de la ornitina descarboxilasa humana. Cada monómero se muestra en un color distinto. Las etiquetas en los extremos amino terminal y carboxilo terminal muestran más claramente la unión antiparalela de ambos (Tomada de Almrud *et al.*, 2000).





**Figura 3.** Síntesis de putrescina a partir de L-ornitina. Reacción catalizada por la ornitina descarboxilasa (ODC) y su cofactor, fosfato de piridoxal (PLP) (Modificado de Tapas *et al.*, 2012).

Una característica muy importante de la ODC es que está altamente regulada por varios mecanismos, tanto a nivel transcripcional como traduccional (Heby y Persson, 1990), en ambos casos las mismas poliaminas juegan un papel importante en la regulación (Davis *et al.*, 1985). Otro mecanismo de inhibición de la ODC se da por la acción de una antizima (AZ) (Fong *et al.*, 1976) (Figura 4), que en presencia de altas concentraciones de poliaminas, producen un desplazamiento del marco de lectura de su RNAm, para traducir una antizima funcional, esta se une a cada monómero de ODC, induciendo un cambio conformacional en toda la estructura, inactivándola y dejando expuesto su carboxilo terminal. Esta región expuesta actúa como señal de reconocimiento para el proteosoma 26S, degradándola en sus componentes peptídicos en un proceso dependiente de ATP, pero independiente de una señal de ubiquitinación (Murakami *et al.*, 2000), a diferencia de como generalmente ocurre en las degradaciones por proteosoma. Finalmente, la antizima también es regulada por inhibidor de antizima, permitiendo así que las proteínas ODC que son traducidas restablezcan la síntesis de poliaminas.



**Figura 4.** Ruta de degradación de la ODC por su antizima (AZ). Una vez unida la AZ a ODC, se expone su carboxilo terminal, el proteosoma se ensambla y reconoce este motivo de la ODC, iniciando la degradación del monómero. Una vez finalizada, los componentes del proteosoma se separan (Modificado de Murakami *et al.*, 2000).

Este ciclo de inhibición-degradación es inusual por la forma que actúan sus componentes, pero se correlaciona con lo vital que es mantener regulada la actividad de ODC y la producción de poliaminas. Las antizimas se han descrito en eucariontes y bacterias (Morera-Oliveros, 2001), la mayoría pertenecen a vertebrados, en *N. crassa* también se tiene reportado un gen codificante para antizima en el locus NCU07155 (Galagan *et al.*, 2003).

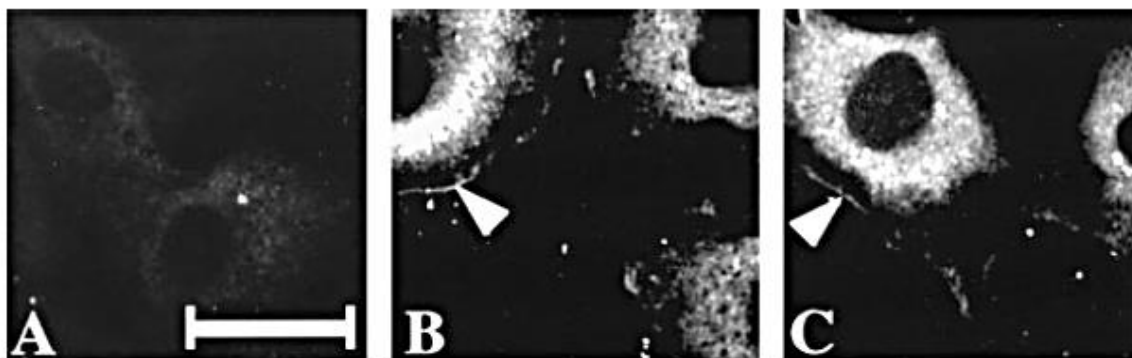
Existen, además, otras formas de inhibir la actividad de la ODC, esto es mediante compuestos sintéticos, como la diaminobutanona (DAB) y la  $\alpha$ -difluorometilornitina (DFMO). La DAB es un inhibidor competitivo (Ceriani, 1997), que se une a la enzima impidiendo la catálisis de la ornitina a menos que los niveles de esta última aumenten, contrarrestando los efectos del inhibidor. En el caso de la DFMO, es un inhibidor irreversible (Bey *et al.*, 1978) que mimetiza al sustrato y al unirse a la enzima, inactiva permanentemente su actividad catalítica. Estos inhibidores han resultado ser de gran utilidad en estudios sobre el desarrollo del cáncer, debido a que las células cancerosas presentan altas tasas de actividad ODC, con el consecuente incremento en sus niveles de poliaminas, que son indispensables para su rápida proliferación. Lo anterior justifica las propuestas de su uso como tratamiento alternativo a las terapias con radiaciones y a las quimioterapias convencionales (Medina-Enriquez, 2009).

Se ha reportado que la ODC es una enzima que se encuentra soluble en el citosol. En *N. crassa*, su localización fue determinada por centrifugación diferencial (Weiss y Davis, 1973) (Tabla 1).

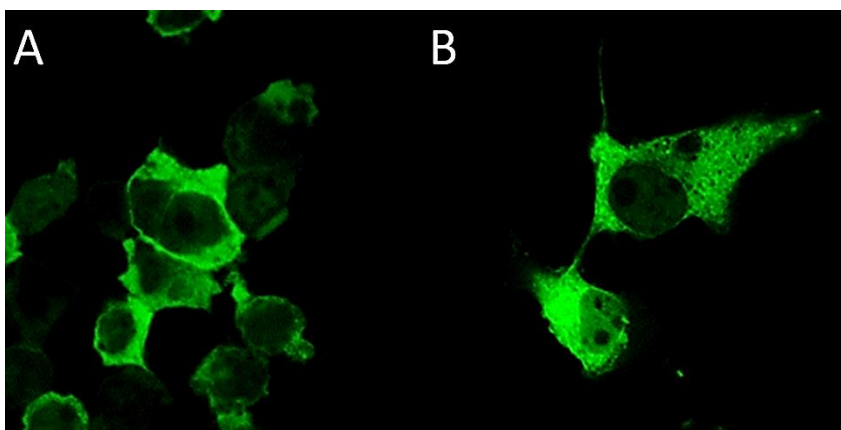
**Tabla 1.** Localización de la proteína ODC en *N. crassa*. Su presencia mayormente citosólica se determinó por centrifugación diferencial. <sup>a</sup> Medida en miligramos. <sup>b</sup> No determinado. Modificado de Weiss y Davis, 1973.

Enzima	Unidades	Citosol	Sobrenadante	Material	Microsomas
	totales	%		particulado	
	µmoles/min				
Proteína	240 <sup>a</sup>	66	3	17	8
Ornitina descarboxilasa	0.013	104	<1	<1	<1
Carbamil-P sintasa A	0.0018	19	n. d. <sup>b</sup>	85	n. d. <sup>b</sup>
Ornitina acetiltransferasa	5.6	4	<1	84	<1
Ornitina carbamiltransferasa	65.3	13	2	87	<1
Argininosuccinato sintetasa	0.92	105	2	<1	<1
Argininosuccinato liasa	2.7	95	2	3	2
Arginasa	262	90	<1	<1	<1
Ornitina aminotransferasa	3.6	100	<1	<1	<1
Succinato deshidrogenasa	16.3	<1	<1	98	<1

En células animales esto se confirmó por inmunofluorescencia en fibroblastos de rata usando anticuerpos anti-ODC e isotiocianato de fluoresceína (Heiskala *et al.*, 1999) (Figura 5A). Además, se ha visto que la ODC puede cambiar su localización hacia el núcleo (Bitonti y Couri, 1981) o la membrana plasmática, aunque esto llega a ocurrir cuando las células son estimuladas con compuestos como el tetradecanoilforbol acetato (TPA) o isobutilmetilxantina (IBMX) (Heiskala *et al.*, 1999) (Figuras 5B y 5C). También se ha identificado mediante etiquetas de proteína verde fluorescente (GFP) en tejido renal humano y de mono (López-Contreras, 2008) (Figuras 6A y 6B). En condiciones normales, las observaciones realizadas muestran a la ODC formando una estructura similar a una red en todo el espacio intracelular a excepción del núcleo.



**Figura 5.** Localización de ODC en fibroblastos de rata mediante inmunofluorescencia. Se observa la proteína ODC predominantemente en el citoplasma (A) y en pequeñas regiones de la membrana plasmática (flechas, B y C) luego de ser expuestas a TPA. Barra de escala 25mm (Tomado de Heiskala *et al.*, 1999).



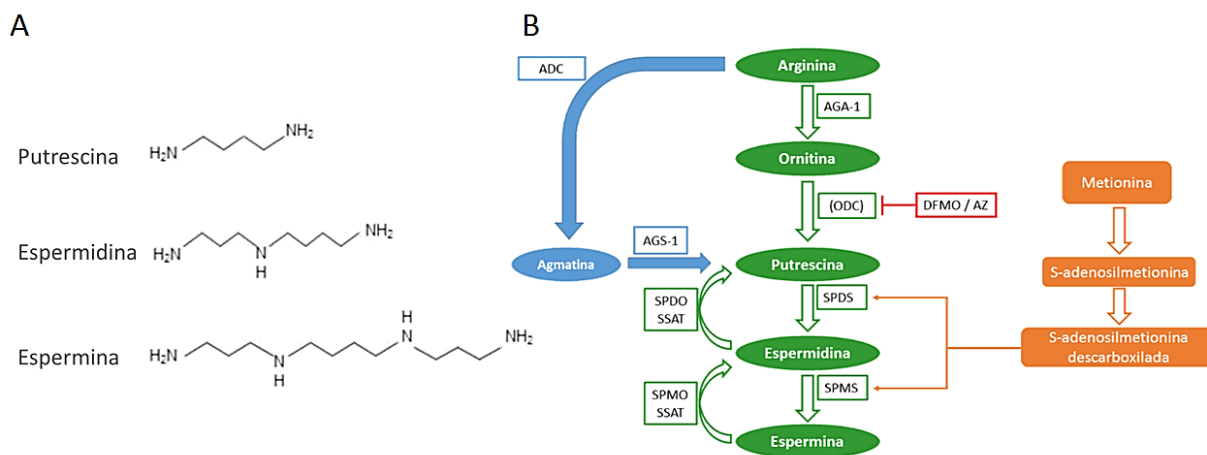
**Figura 6.** Localización de ODC en células de riñón humanas (A) y de mono (B) transfectadas con ODC-GFP. Al igual que la figura anterior, la enzima se distribuye de manera uniforme en el citoplasma (Tomado de López-Contreras, 2008).

#### 1.1.4 Las poliaminas

Las poliaminas fueron descubiertas en 1678 por Antoine Van Leeuwenhoek, pero no fue sino a finales del siglo XIX que comenzaron a estudiarse. Las poliaminas son un grupo de compuestos nitrogenados que se encuentran presentes en todos los seres vivos. Su nombre se debe a los grupos amino que poseen, dándoles un carácter policatiónico. Al ser moléculas de bajo peso molecular con cargas positivas, tienen la capacidad de interactuar con variedad de macromoléculas (Tabor y Tabor, 1985). Existe un gran

número de poliaminas, siendo las de mayor importancia la putrescina, espermidina y espermina (Figura 7A) (Paulus *et al.*, 1982), por encontrarse en mayores cantidades y por ser las precursoras del resto. También, estas tres poliaminas tienen una estrecha relación con numerosos procesos celulares involucrados con el crecimiento, desarrollo y la diferenciación celular (Tabor y Tabor, 1985)

Las poliaminas son producto del metabolismo de los aminoácidos L-arginina, L-lisina y L-metionina (Algranati *et al.*, 1977) (Figura 7B). La ruta constitutiva en la biosíntesis de poliaminas usa a la L-arginina para formar ornitina mediante la enzima arginasa (AGA-1). Posteriormente la ornitina es descarboxilada por la ornitina descarboxilasa (ODC), produciendo putrescina, la cual servirá como precursor para la síntesis de espermidina y espermina, las enzimas encargadas de esto son la espermidina sintasa (SPDS) y la espermina sintasa (SPMS), que adiciona un grupo aminopropil procedente de la S-adenosilmetionina descarboxilada. La síntesis de poliaminas puede revertirse, con la acción de las poliamina oxidasas (SPDO/PDMO) y de la espermidina/espermina N-acetiltransferasa (SSAT). Adicionalmente, existe una segunda ruta de síntesis, en la cual la L-arginina es descarboxilada por acción de la enzima arginina descarboxilasa (ADC), produciendo la poliamina agmatina, de la cual se sintetiza putrescina por la acción de la enzima agmatinasa (AGS-1) (Tabor y Tabor, 1985. Roa-Cordero y Rosas-Quijano, 2013). Esta ruta alternativa únicamente se ha descrito en bacterias, plantas y en células de mamíferos (Uribe *et al.*, 2007).



**Figura 7.** Principales poliaminas y su síntesis. Estructura química de las poliaminas putrescina, espermidina y espermina (A). Síntesis de poliaminas (B): Ruta constitutiva en *N. crassa* (verde) dada por la ornitina descarboxilasa (ODC), ruta alternativa (azul) por la agmatinasa (AGS-1). Los grupos aminopropil provienen del metabolismo de la metionina (anaranjado) (Modificado de Gao *et al.*, 2013).

En *N. crassa* se ha reportado que la síntesis de poliaminas se lleva a cabo a través de una única ruta, dada por la enzima ODC (McDougall *et al.*, 1977). En otros organismos se han descrito dos rutas alternativas, determinadas por la arginina descarboxilasa, presente en plantas, bacterias y algunas especies de hongos fitopatógenos y por la agmatinasa (Roa-Cordero y Rosas-Quijano, 2013).

Las poliaminas son esenciales para el crecimiento, proliferación y la diferenciación celular. En general se ha descrito que las poliaminas, debido a su carácter policatiónico, interactúan con una gran diversidad de moléculas con carga negativa (Cohen, 1998; Miyamoto *et al.*, 1993; Watanabe *et al.*, 1991). Se ha documentado que son capaces de unirse a los ácidos nucleicos, estabilizando las cadenas de DNA y modulando la estructura de los cromosomas, afectando los procesos de replicación, transcripción y traducción, y en bacterias termófilas, protegen el material genético de su desnaturalización (Terui *et al.*, 2005). Del mismo modo que pueden interactuar con los ácidos nucleicos gracias a sus cargas positivas, también lo pueden hacer con proteínas, modificando sus estructuras (Cohen, 1998).

La espermina en particular puede actuar sobre canales iónicos de K<sup>+</sup> y Ca<sup>+</sup>, uniéndose al poro de los canales, modulando su actividad (Williams, 1997). Su facilidad de interacción con proteínas llega a intervenir en un gran número de cascadas de señalización, siendo una de ellas la estimulación de la ruta apoptótica de las caspasas y de proliferación a través de TGFβ (Gao *et al.*, 2013).

Los trabajos realizados acerca del papel de las poliaminas en los hongos son vastos, especialmente aquellos que relacionan la actividad de la ODC, los niveles de poliaminas y las etapas de desarrollo del hongo. En algunos hongos se ha reportado que las poliaminas son necesarias para las transiciones entre fase levaduriforme o filamentosa, mostrando picos de actividad de ODC durante alguna de las etapas de desarrollo de estos organismos. Tal es el caso de *Mucor racemosus*, que muestra un aumento de actividad de la ODC de hasta 40 veces cuando las condiciones propician su transición a forma micelial (Inderlied *et al.*, 1980). Otro ejemplo es *Paracoccidiosis brasiliensis*, que presenta un comportamiento similar, pero en sentido inverso, presentándose una mayor actividad de la ODC en su fase levaduriforme, incrementando durante la gemación (San-Blas *et al.*, 1996). En la levadura *S. cerevisiae*, las mutantes deficientes en la síntesis de poliaminas muestran poco crecimiento y una escasa colonización de los medios de cultivo, pudiendo recuperarse si se les añaden poliaminas exógenas (Whitney y Morris, 1978; Cohn *et al.*, 1980). En *Candida albicans*, las poliaminas juegan un papel determinante en la transición de crecimiento levaduriforme a su forma filamentosa. Las mutantes del gen *ODC* crecen únicamente como levaduras en concentraciones bajas de poliaminas, llegando a restaurar su crecimiento filamentoso con una concentración de putrescina de 10 mM (Herrero *et al.*, 1999). Esta dependencia de poliaminas en las

fases de crecimiento también se ha reportado en otra especie, *Ustilago maydis*, en donde se ha visto también que las mutantes auxótrofas a poliaminas son incapaces de cambiar a su forma filamentosa, recuperándose con la adición de altas concentraciones de 0.1 mM de espermidina, además de tener una alta sensibilidad ante estrés osmótico, iónico y oxidativo (Valdés-Santiago et al., 2012). Los experimentos con poliaminas exógenas llevados a cabo en mutantes de *N. crassa* han arrojado resultados similares, teniendo buenos resultados con concentraciones de 0.2 a 1 mM (Davis et al., 1970; Paulus et al., 1982).

En los últimos años, se ha propuesto a la ODC como un blanco en tratamientos contra el cáncer, ya que varias de las rutas que promueven la proliferación de los tumores son potenciadas por las poliaminas, siendo incluso considerado al gen de la enzima como un protooncogen (Morera-Oliveros, 2001). También es un blanco para el tratamiento de varias enfermedades parasitarias, como la malaria (Müller et al., 2000). Entre los posibles tratamientos que se han planteado está el uso de inhibidores sintéticos de la enzima, siendo el más empleado la  $\alpha$ -difluorometilornitina (DFMO), que ha mostrado buenos resultados, aunque se siguen investigando sus efectos secundarios (Medina-Enríquez, 2009).

### 1.1.5 Transporte de poliaminas

Además de ser sintetizadas por las células, las poliaminas exógenas pueden ser internalizadas mediante proteínas transmembranales. Dichas proteínas son específicas para cada poliamina, sin embargo, también se han descrito otras que no tienen especificidad, permitiendo la internalización de la putrescina, la espermina y la espermidina. Estas proteínas transmembranales se encuentran presentes en todos los seres vivos, desde arqueas hasta los eucariontes superiores (Jack et al., 2000), aunque están mejor caracterizadas en *E. coli* (Kashiwagi et al., 1991).

En *N. crassa*, los canales de transporte de poliaminas extracelulares forman un sistema saturable, con un valor  $K_m$  de 0.6 mM de putrescina y 0.24 mM de espermidina, y un sistema no saturable, el cual no se ha descrito por completo, pero se cree que las poliaminas putrescina y espermidina se internalizan por difusión pasiva debido a la baja afinidad que dicho sistema tiene por las poliaminas (Davis y Ristow, 1988). El valor de  $K_m$  es la constante de Michaelis-Menten, que expresa la concentración de sustrato cuando la tasa de transporte está en la mitad de su máximo (Lodish et al., 2008). Se ha reportado que las proteínas transportadoras disminuyen su actividad por iones de  $Ca^{2+}$  y cationes monovalentes, además

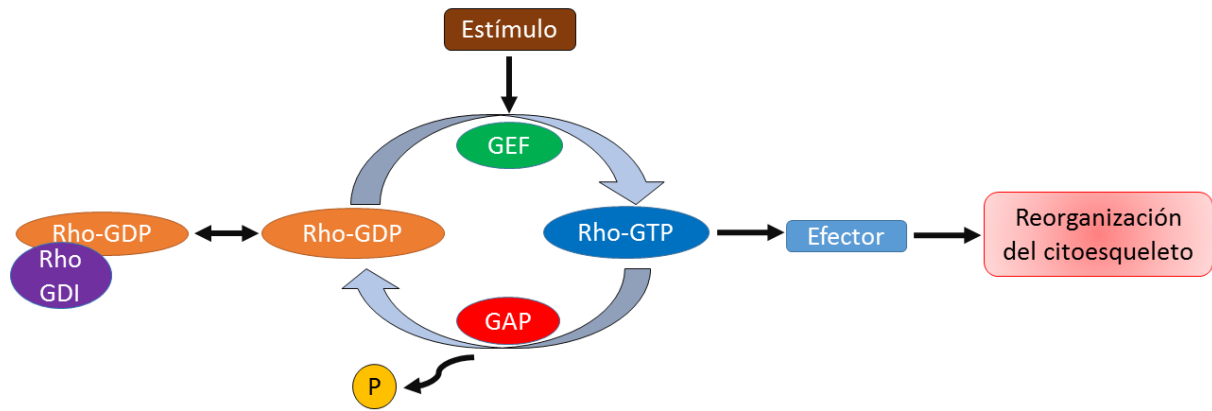
se ha observado que dicha inhibición se minimiza al reemplazar las sales de sodio por sales de potasio (Davis y Ristow, 1988).

### **1.1.6 Relación de las poliaminas con el citoesqueleto de actina y las Rho GTPasas CDC-42 y RAC**

La polimerización del citoesqueleto de actina se da en respuesta a rutas de señalización que involucran a las proteínas Rho GTPasas CDC-42 y RAC. En mamíferos, estas son las responsables de la organización de la actina para formar lamelipodios y filopodios, los cuales permiten la movilidad de las células durante su migración (Nobes y Hall, 1995).

Las Rho GTPasas son miembros de la superfamilia de las RAS GTPasas, son una familia de proteínas pequeñas (en promedio de 170 aminoácidos) que tienen capacidad de alternar entre una forma activa e inactiva, dependiendo si se encuentran unidas a una molécula de guanosil trifosfato (GTP) o guanosil difosfato (GDP), respectivamente. Esto les permite actuar como interruptores moleculares. La unión a GTP o GDP se puede presentar de forma espontánea, para controlar su actividad, las Rho GTPasas necesitan de proteínas que actúan como factores para el intercambio de nucleótido de guanina (o GEF, por sus siglas en inglés), estos GEF favorecen el intercambio de GDP por GTP, acelerando su activación (Lodish *et al.*, 2008). Del mismo modo, la desactivación requiere de proteínas activadoras de la actividad de GTPasa (GAP, por sus siglas en inglés) para hidrolizar el GTP unido a las proteínas Rho y regresarlas a su estado inactivo previo al estímulo, unido a GDP y a un inhibidor de la disociación de GDP (o GDI, por sus siglas en inglés) (Figura 8).





**Figura 8.** Ciclo de regulación de las Rho GTPasas. Las Rho GTPasas requieren de dos proteínas reguladoras; GEF y GAP, para completar su ciclo de actividad, cuando las GEF son activadas por un estímulo provocan el intercambio de GDP por GTP activando así a la proteína Rho, que actúan sobre una molécula efectora, provocando una respuesta en el organismo, en este caso, la reorganización del citoesqueleto de actina, mientras que las GAP disocian la unión de GTP, regresando a la proteína Rho a un estado inactivo unido a GDI (Modificado de Sahai y Marshall, 2002).

Las Rho GTPasas son esenciales para la migración celular y en el caso de los hongos filamentosos, juegan un papel crucial para que se dé un correcto crecimiento polarizado. En estudios *in vitro* se ha observado que las poliaminas estimulan la rápida polimerización de los monómeros de G-actina para la formación de los microfilamentos de F-actina (Vaidya *et al.*, 2004). La falta de poliaminas por inhibición de la ODC provoca alteraciones en el citoesqueleto, principalmente en la polimerización de la F-actina (McCormack *et al.*, 1999). En el caso particular de células epiteliales del tracto gastrointestinal de mamíferos, la deficiencia de poliaminas reduce su migración en los procesos de recuperación posteriores a una lesión (Vaidya *et al.*, 2004). Los mismos efectos se han observado en células de tejido endotelial, las cuales presentan una disminución en la migración y en la formación de nuevos vasos sanguíneos (angiogénesis) (Kucharzewska *et al.*, 2010).

Otros efectos que provoca la ausencia de poliaminas, son los cambios en la localización de la Rho GTPasa RAC, cambiando su localización a la región perinuclear, previniendo su activación y limitando en gran medida la homeostasis del citoesqueleto de actina en epitelio intestinal de rata (Vaidya *et al.*, 2004). En células endoteliales tratadas con DFMO se ha visto como las anomalías en la actina son muy similares a las observadas cuando CDC-42 se encuentra un estado activo permanente (Kucharzewska *et al.*, 2010), indicando una posible relación entre las poliaminas y las GTPasas involucradas en los procesos de polimerización y reorganización de los filamentos de actina.

Para *S. cerevisiae*, las Rho GTPasas son elementos clave en los eventos de gemación y fisión durante la división celular (Chen *et al.*, 1997; Lee *et al.*, 2013). En *N. crassa*, las Rho GTPasas RAC y CDC-42 son esenciales para el crecimiento polarizado y para mantener un eje constante de la polaridad mediante la organización del citoesqueleto de actina. Se ha visto que en ausencia de una de estas Rho GTPasas las células presentan alteraciones en el crecimiento y en la extensión de sus hifas, como por ejemplo micelios con menor crecimiento radial e híper-ramificaciones sub-apicales (Araujo-Palomares *et al.*, 2011).

## 1.2 Justificación

En *N. crassa* se conoce la importancia que tiene la ODC y las poliaminas para su desarrollo, sin embargo, no se ha descrito completamente el fenotipo de las cepas mutantes deficientes de actividad ODC. De igual modo, tampoco hay información acerca de los efectos que tenga la delección del gen *odc* en la localización y dinámica de las Rho GTPasas CDC-42 y RAC, responsables de mantener el crecimiento polarizado del hongo.

Por otro lado, en *N. crassa* solamente se encuentra reportada la ruta de la ODC como la fuente de poliaminas, sin embargo, reportes recientes en el grupo de trabajo de la Dra. Ernestina Castro-Longoria sugieren la existencia de otra ruta biosintética, dada por la enzima agmatinasa (AGS-1). Es por ello que para un mejor entendimiento del papel que tienen estas dos enzimas en la morfogénesis del hongo, es necesario estudiar con mayor detalle que defectos morfo-fisiológicos provoca la deficiencia de la ODC y así realizar un análisis comparativo para determinar si ambas enzimas actúan en vías paralelas o si participan en diferentes procesos celulares.

## 1.3 Hipótesis

Si la enzima ornitina descarboxilasa (ODC) limita la síntesis de poliaminas en *N. crassa*, la delección de su gen provocará una menor producción de poliaminas y, por lo tanto, defectos en el crecimiento de las hifas.

## 1.4 Objetivo

Analizar el papel de la ornitina descarboxilasa en la morfogénesis del hongo filamentoso *N. crassa*.

### 1.4.1 Objetivos particulares

- Analizar los efectos que causa la delección del gen *odc* en el desarrollo de *N. crassa*.
- Determinar si la adición de poliaminas exógenas recuperan el fenotipo de la mutante del gen *odc*.
- Determinar los niveles de poliaminas en la cepa silvestre y en la cepa mutante  $\Delta odc$ .
- Describir la dinámica de CDC-42 y RAC en presencia de un inhibidor específico de la ODC.

## Capítulo 2. Metodología

### 2.1 Cepas empleadas y condiciones de crecimiento

Para garantizar el máximo porcentaje de germinación de esporas de las cepas utilizadas, se realizaron cultivos para recuperar conidios frescos. Aunque en el cepario del laboratorio ya se tenían conidios almacenados a  $-20^{\circ}\text{C}$ , se recomienda usar conidios recién recuperados para una mayor eficacia en todos los experimentos. Las cepas de *N. crassa* empleadas en este estudio se muestran en la Tabla 2.

**Tabla 2.** Cepas de *N. crassa* que se utilizaron en este estudio.

Cepa	Genotipo	Referencia
Cepa silvestre (WT, 4200)	<i>N. crassa</i> mat a	FGSC #4200
Cepa silvestre (WT, N150)	OR74A mat A	FGSC #9013
mus-51 mat a	$\Delta$ mus-51::bar+ mat a	FGSC #9718
$\Delta$ odc het	$\Delta$ odc::hph <sup>R</sup> mat a	Este estudio
YFP-CDC-42	<i>pgpd-yfp-cdc-42::his-3; <math>\Delta</math>cdc-42::hph<sup>R</sup></i>	Araujo-Palomares <i>et al.</i> , 2011
YFP-RAC	<i>pgpd-yfp-rac::his-3; <math>\Delta</math>rac::hph<sup>R</sup></i>	Araujo-Palomares <i>et al.</i> , 2011
Lifect-gfp	<i>pccg-1-lifect::egfp::his-3 + ; <math>\Delta</math>ags-1::hph<sup>R</sup> mat A</i>	Delgado-Álvarez <i>et al.</i> , 2010.

Para recuperar los conidios, fragmentos de micelio de las cepas silvestres (WT: *wild type*, por sus siglas en inglés) FGSC #4200 y FGSC #9013, y de la cepa FGSC #9718 se cultivaron en matraces de 500 mL con 100 mL de Medio Mínimo de Vogel (MMV) con 1.5% de Agar (Anexo A) a una temperatura de  $30^{\circ}\text{C}$  durante dos días en oscuridad y tres días en luz para obtener una mayor producción de conidios. Pasado el tiempo de incubación, a los matraces se le añadieron 40 mL de agua destilada estéril fría, se sometieron a agitación en vórtex, el contenido se decantó en tubos Falcon de 50 mL usando embudos estériles con filtros de tela Magitel<sup>®</sup>, también estéril, esto con el fin de eliminar el micelio y coleccionar únicamente los conidios. La suspensión filtrada se centrifugó a 6,000 rpm a  $4^{\circ}\text{C}$  durante 10 minutos. Después se le retiró el agua y los conidios precipitados se resuspendieron en 1 mL de agua estéril. Una vez recuperados, los conidios se contaron con una cámara de Neubauer.

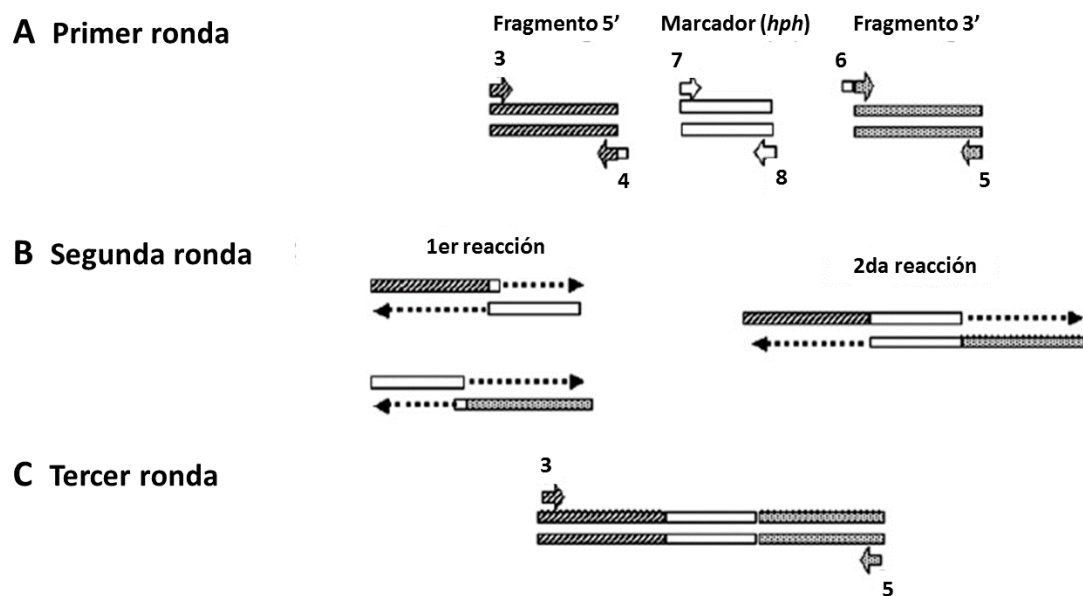
## 2.2 Análisis de ODC (secuencia nucleotídica y peptídica)

La secuencia nucleotídica del gen de ODC (*odc*) se obtuvo de la base de datos del Broad Institute, en el cual se encuentra anotado como *spe-1*. Se usaron las herramientas bioinformáticas disponibles en el sitio web del “National Center for Biotechnology Information” (NCBI). Se realizó una serie de alineamientos de las secuencias nucleotídica y peptídica de ODCs reportadas en otros organismos como *Homo sapiens* y *Mus musculus*, y en hongos como *Aspergillus nidulans*, *Magnaporthe oryzae*, *S. cerevisiae* y *Sordaria macrospora*, esto con el fin obtener los porcentajes de identidad de las secuencias analizadas.

## 2.3 Construcción de cepas de *N. crassa*

### 2.3.1 Generación de cepa mutante para ornitina descarboxilasa ( $\Delta odc$ )

La cepa mutante se obtuvo mediante electroporación con el fragmento recombinante que contenía un cassette de resistencia a la higromicina B (*hph*). Para generar el fragmento recombinante se empleó el método de *double-joint* PCR (Yu *et al.*, 2004. Figura 9), que consiste en utilizar tres pares de *primers* u oligonucleótidos con el fin de reemplazar el gen *odc* por un cassette de resistencia que pueda recombinarse de manera homóloga con el genoma de *N. crassa*. La técnica se conforma de tres pasos de PCR, cada paso requirió del uso de oligonucleótidos específicos para cada fragmento (Tabla 3): En el primer paso, se amplificaron los componentes de la construcción [regiones no traducidas (UTR) adyacentes a los extremos 5' y 3' del gen *odc*, y el cassette *hph*], con los pares de oligonucleótidos F5 *spe-1*, 5Reverse *spe-1 hph*; R3 *spe-1*, 3Forward *spe-1 hph* y HphF-pCN44, HphR-pCN44. En el segundo y tercer paso se da la fusión de las UTR en los extremos del cassette *hph* para finalmente amplificar el producto de la fusión (fragmento recombinante) con el par de oligonucleótidos 1 y 2. El PCR para amplificar los fragmentos 5' y 3' se realizó con el reactivo PCR SuperMix High Fidelity de la compañía Invitrogen®, con una temperatura de alineamiento de 55°C. El cassette de resistencia a higromicina se amplificó con los reactivos de iProof™ High-Fidelity PCR Kit de la compañía Bio-rad® con una temperatura de alineamiento de 54°C. El fragmento recombinante se obtuvo usando la enzima Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase de New England BioLabs® a una temperatura de alineamiento de 53°C con 90ng/μL de DNA de los fragmentos amplificados.



**Figura 9.** Modelo de double-joint PCR. Esta técnica se empleó en la generación del fragmento recombinante con el gen de resistencia para el antibiótico higromicina (*hph*). En la primera ronda se amplificaron los fragmentos UTR 5', 3' y el cassette *hph*, en la segunda se generó el fragmento recombinante, en la tercera ronda se amplificó toda la construcción. Las flechas numeradas indican el oligonucleótido que se usó (Tomado de Yu *et al.*, 2004).

**Tabla 3.** Oligonucleótidos usados en el double-joint PCR. Los valores de Tm (temperatura de alineamiento) indican la temperatura a la cual los oligonucleótidos logran unirse a su secuencia blanco.

Nombre	Secuencia de oligonucleótidos	Tm (°C)
F5 spe-1 (3)	5'-GCGGTCGGCATCTCGTAATCA-3'	60.1
5Reverse spe-1 hph (4)	5'-CCACTTAACGTTACTGAAATCATCCCAAGATTTGACTGGGG-3'	66.0
3Forward spe-1 hph (6)	5'-CAATATCATCTTCTGTCGGTGACGTGCAGCTTTGTACTTG-3'	65.5
R3 spe-1 (5)	5'-GCGGTCATGGATGGAAAAGGACC-3'	60.4
Nested F spe-1 (1)	5'-CTGTCACAACACTACACACGTAGCCC-3'	59.4
Nested R spe-1 (2)	5'-CGGGTTCGTGTTGTTACACGGAAG-3'	61.8
HphF-pCN44 (7)	5'-GATTCAGTAACGTTAAGTGG-3'	49.0
HphR-pCN44 (8)	5'-GACAGAAGATGATATTGAAGG-3'	48.1
Hph-P5F2 (9)	5'-ACAGCGTCTCCGACCTGATGCA-3'	62.9

El producto del PCR de fusión (fragmento recombinante) se insertó en la cepa de *N. crassa* FCSC #9718 mediante el método de transformación por electroporación. El protocolo de transformación fue el

siguiente: Se utilizaron 125 millones de conidios, los cuales se lavaron con 500  $\mu$ L de sorbitol 1 M, se centrifugaron a 6,000 rpm durante 1 minuto y se desechó el sobrenadante, este procedimiento se repitió tres veces. Una vez lavados los conidios, se añadió 18  $\mu$ g del producto de PCR de fusión (fragmento recombinante) y fueron incubados en hielo por 5 minutos. Se transfirieron 40  $\mu$ L a una cubeta de electroporación de 0.2 cm y se electroporaron bajo las siguientes condiciones: 1.5 kv, 600  $\Omega$  y 25  $\mu$ F en un electroporador Gene PulserXCell de Bio-Rad. Inmediatamente se añadieron 500 $\mu$ L de solución de recuperación (2% de sales de Vogel) a la celda, se mezcló por pipeteo, el contenido se transfirió a un tubo Falcon con 15 mL de solución de recuperación, se añadieron nuevamente 500  $\mu$ L de solución de recuperación a la celda con el fin de recuperar todos los conidios posibles. Los conidios se incubaron a una temperatura de 30°C a 150 rpm por 2 horas. Posteriormente, la solución se mezcló con un volumen igual de medio para aislamiento de colonia (FGS) y se vació en una caja Petri de 150 x 15 mm con 30 mL de medio FGS adicionado con 200  $\mu$ g/mL de higromicina B.

Una vez transcurridas 48 horas, las colonias aisladas que crecieron en la caja se recuperaron en tubos de vidrio con medio MMV inclinado adicionado con 200  $\mu$ g/mL de higromicina y se incubaron a 30°C por dos días. Se recuperó un total de 20 colonias, de las cuales solamente crecieron 16. Estas fueron las mutantes heterocarión ( $\Delta odc$  het), es decir, las colonias obtenidas contienen poblaciones de núcleos silvestres y núcleos mutados. En base a su fenotipo se eligieron tres de ellas. Con el propósito de confirmar si la mutación fue exitosa, se inoculó una muestra de sus micelios en matraces con medio MMV líquido para extraerles DNA genómico y realizarles pruebas de PCR. Al mismo tiempo, se inocularon muestras de micelio en matraces con 100 mL de MMV sólido para recuperar conidios y posteriormente cruzarlos con la cepa compatible de *N. crassa* para obtener la mutante  $\Delta odc$  homocarión.

### **2.3.2 Extracción de DNA genómico y PCR de comprobación de la cepa $\Delta odc$**

Para la extracción de DNA genómico, primero se retiró el micelio del matraz usando unas pinzas, procurando recuperar todo el micelio del medio líquido, éste se secó haciendo presión con hojas de papel secante estéril, habiendo retirado la humedad, el micelio se pasó a un tubo Falcon de 15 mL y se introdujo en nitrógeno líquido durante 5 minutos. El micelio congelado se trituró en un mortero, añadiendo constantemente nitrógeno líquido para facilitar su pulverización, dejando un polvo fino que se colectó en tubos Eppendorf de 1.5 mL, la cantidad recomendada de micelio para la extracción fue de

100 mg, el DNA se extrajo usando el kit ZR Fungal/Bacterial DNA Miniprep™ de la compañía Zymo Research. Finalmente, al DNA extraído se le realizó una reacción de PCR con la enzima GoTaq® Flexi DNA Polymerase de Promega usando los oligonucleótidos 1 y 9 con una temperatura de alineamiento de 55°C, con el propósito de amplificar parte del cassette de hph y la región UTR del extremo 5' del genoma de la cepa mutante. El producto de PCR fue analizado mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1%.

#### **2.4 Obtención de mutante *Δodc* homocarión**

Para obtener una mutante homocarión se cruzó la mutante heterocarión (Mat A) con la cepa silvestre N150 (FGSC #9013) (Mat a). Se prepararon cajas de Petri de 60 x 15 mm con medio para la inducción del ciclo sexual, en el centro de la caja se inocularon 200 μL de conidios de la cepa N150 y se dejaron incubar a temperatura ambiente durante 8 días hasta que se observó la presencia de protoperitecios. Posteriormente se inoculó un volumen igual de conidios de la cepa *Δodc* het, distribuyéndolos en gotas en toda la superficie del medio y se dejó incubar durante 15 días a temperatura ambiente. Transcurrido el periodo de incubación se generaron peritecios, una semana después las ascosporas expulsadas se lograron observar dentro de las gotas de agua condensadas en la superficie interna de la tapa de la caja. Dichas ascosporas se recuperaron añadiendo 300 μL de agua estéril y con la punta de la pipeta usada se raspó la superficie de la tapa para despegar las ascosporas, finalmente se recuperó el agua con las ascosporas en un tubo Eppendorf de 1.5 mL.

Se tomó una muestra de ascosporas en un volumen de 20 μL y se activaron por calor a una temperatura de 60°C por 30 minutos, posteriormente fueron sembradas en dos cajas de Petri con medio FGS adicionado con higromicina B, para asegurar únicamente el crecimiento de las esporas que contengan el gen de resistencia. Las cajas se incubaron a 30°C durante 4 días, monitoreando su germinación cada 12 horas.

#### **2.5 Análisis fenotípico de mutantes de *N. crassa* (*Δodc* het)**

Los experimentos para el análisis fenotípico consistieron en obtener las siguientes características: tasa de crecimiento, tasa de esporulación, producción de biomasa, generación de hifas aéreas e índice de



ramificación. Todos los experimentos se realizaron tres veces por triplicado, en cada uno se usaron 200,000 conidios de la cepa mutante *Δodc* het y su cepa silvestre parental (FGSC #9718).

Finalmente, ambas cepas se observaron con microscopia confocal usando el colorante FM4-64, con el propósito de analizar la integridad del Spk en la cepa mutante.

### **2.5.1 Tasa de crecimiento**

Se inocularon conidios concentrados en volúmenes de 2  $\mu$ L en un extremo de cajas de Petri de 150 x 15 mm con MMV sólido con 1% de agar y se incubaron a 30°C. Se midió el crecimiento por periodos de 3 horas a partir de las 12 horas posteriores al inóculo. Se hicieron ocho mediciones. Para coleccionar los datos se hicieron 10 transectos a cada caja desde el punto de inóculo hasta los bordes de la colonia. Los resultados de las mediciones fueron promediados y se calculó la desviación estándar.

### **2.5.2 Tasa de esporulación**

Los conidios se inocularon en tubos de ensayo con 5 mL de medio MMV sólido. Se mantuvieron en incubación a 30°C durante tres días en oscuridad y dos en luz. Los conidios producidos se recuperaron y coleccionaron en tubos Eppendorf con 1 mL de agua estéril para después contarlos con una cámara de Neubauer. Los valores obtenidos se promediaron y se calculó su desviación estándar.

### **2.5.3 Producción de biomasa**

Los conidios se inocularon en matraces Erlenmeyer de 250 mL con 50 mL de MMV líquido y se incubaron a una temperatura de 30°C durante 4 días. Para evitar la esporulación, los matraces se cubrieron por completo con papel aluminio. Posteriormente los micelios se secaron, se colocaron en tubos Falcon de 15 mL para liofilizarlos durante 48 horas y finalmente ser pesados.

#### **2.5.4 Generación de hifas aéreas**

Para este experimento se siguió el mismo protocolo que se usó para obtener la tasa de esporulación, excepto que los tubos se incubaron en oscuridad por cuatro días y se omitió la incubación en luz para disminuir la formación de conidios que pudieran afectar las observaciones. Las mediciones se hicieron desde la superficie del medio hasta la altura que alcanzaran las hifas. Los valores se promediaron y también se calcularon sus desviaciones estándar.

#### **2.5.5 Índice de ramificación**

Se inocularon conidios en cajas de Petri con MMV sólido y se incubaron a 30°C durante 24 horas. La ramificación se obtuvo observando y contando el número de ramas laterales que aparecían a los 500  $\mu\text{m}$  desde el ápice de las hifas parentales. En cada cepa se contaron las ramas de 35 hifas. Las observaciones fueron hechas con un microscopio estereoscópico Olympus® SZX12-100. Los datos que se obtuvieron se graficaron y se calculó la moda para ambas cepas.

#### **2.5.6. Recuperación del fenotipo silvestre en la cepa $\Delta odc$ het**

Para recuperar el fenotipo de la cepa  $\Delta odc$  het se adicionó putrescina en concentraciones de 0.2 a 1.0 mM una vez que el medio hubiera solidificado en las cajas al medio de cultivo, el medio que se usó fue medio FGS. Las cajas se incubaron a 30°C durante 26 horas. Se hicieron conteos de ramificación, que se compararon con los controles silvestre y mutante (FGSC #9718 y  $\Delta odc$  het). A los datos se les calculó la moda, tanto para los controles como en los tratamientos con putrescina, y se graficaron.

También se probó la putrescina en las ascosporas  $\Delta odc$  para observar su comportamiento, con base en lo visto en la mutante heterocarión, se utilizaron concentraciones desde 0.8 mM a 2 mM. Las ascosporas se sembraron en medio FGS y se monitorearon cada 12 horas durante 4 días, midiendo la longitud y registrando el tiempo en cada tratamiento.

## 2.6 Extracción y purificación de poliaminas

Las poliaminas se extrajeron y purificaron por el método de extracción con metanol, con un protocolo modificado de Aldesuquy *et al.*, (2000), mientras que para la cuantificación se empleó cromatografía de gases, ya que esta última mostró mejores resultados en experimentos anteriores (Pérez-Mozqueda, 2015).

Se inocularon 200,000 conidios de la cepa silvestre parental (FGSC #9718) y de la cepa mutante ( $\Delta$ odc het) durante tres días en MMV líquido, posteriormente se extrajo el micelio y se liofilizó durante 48 horas. Pasado el tiempo marcado, los micelios fueron triturados hasta dejar un polvo fino y se colectaron en tubos Falcon de 50 mL; se agregó un 1 mL de metanol por cada 100 mg de muestra se agitaron con vórtex durante 30 segundos seguido de una centrifugación a 10,000 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante fue transferido a un tubo nuevo, se lavó con 0.5 mL de hexano por cada mililitro de metanol utilizado, la mezcla se agitó con vórtex previo a ser centrifugada durante un minuto a 8,000 rpm. Se desechó la fase con el hexano, este paso se repitió dos veces. Las poliaminas purificadas se secaron bajo flujo de nitrógeno. Una vez secas, se disolvieron en 0.5 mL de acetonitrilo y se procedió a su derivatización con 0.5 mL de BSA (N, O-Bis-trimetilsilil-acetamida) con incubación a 75°C durante 15 minutos, posteriormente fueron analizadas por cromatografía de gases. En caso de tener partículas en suspensión, se centrifugó cada tubo a 10,000 rpm durante un minuto para recuperar el sobrenadante antes de adicionar el BSA.

## 2.7 Cuantificación de poliaminas mediante cromatografía de gases

Para la cuantificación, se realizó una curva de concentración con los estándares para cada poliamina (putrescina, espermidina y espermina). Se utilizaron cuatro diferentes concentraciones para cada poliamina (10, 20, 30 y 40  $\mu$ moles disueltos en 1 mL), una vez que se prepararon las diluciones se procedió a realizar el análisis por cromatografía de gases, inyectando 2  $\mu$ l de cada dilución en el cromatógrafo Agilent Technologies 7820 A, equipado con un detector de ionización de flama (FID) y con una columna no polar Agilent (Ultra 1 de 25 m x 320  $\mu$ m x 0.52  $\mu$ m). El programa de corrida inició con 150 °C por dos minutos, con incrementos de temperatura de 14°C/min hasta que alcanzara 320°C, manteniéndose por 5 minutos. Este mismo programa se utilizó para las muestras de poliaminas extraídas tanto de la cepa silvestre como de la cepa mutante, con dos réplicas de cada extracción. La identificación

de las poliaminas se realizó comparando los tiempos de retención con estándares auténticos de cada una de ellas. La cuantificación se realizó determinando el área bajo la curva de cada pico y comparado con una curva estándar, obteniendo valores de concentración en  $\mu\text{moles/mL}$ .

## **2.8 Análisis microscópico de cepas transformantes de *N. crassa* (YFP-CDC-42, YFP-RAC y Lifeact-GFP) tratadas con DFMO**

Las cepas YFP-CDC-42, YFP-RAC y Lifeact-GFP fueron observadas con un microscopio confocal de barrido láser Olympus Fluoview FV-1000 usando una longitud de onda de excitación de 488 nm para YFP y GFP, obteniendo emisión en la región verde del espectro visible (525 nm). De los cultivos en existencia se tomaron muestras de micelio para inocular en cajas Petri de MMV con agar al 3% y se dejaron incubar a 30°C por 26 horas. Antes de observarlas, se cortaron bloques de agar con un bisturí y se montaron en portaobjetos con el micelio en contacto con el vidrio. El DFMO fue añadido en volúmenes de 10  $\mu\text{L}$  sobre el portaobjetos antes de colocar el bloque de agar. Se esperaron de 5 a 10 minutos antes de observar al microscopio para evitar encontrar hifas estresadas por el montaje. Para la captura de imágenes y la grabación de secuencias en video se utilizó el software FV-10 ASW 4.0.2.9.

Para complementar el análisis, se realizaron observaciones de cepas silvestres y mutantes usando el colorante vital FM4-64, que tiñe las membranas y permite visualizar el Spitzenkörper (Spk) y monitorear el crecimiento apical de las hifas. El FM4-64 fue añadido a las cepas del mismo modo que el DFMO. Para este colorante se empleó una longitud de onda de excitación de 543 nm, obteniendo emisión en la región roja del espectro visible (660 nm).

## Capítulo 3. Resultados

### 3.1 Análisis de ODC (secuencia nucleotídica y peptídica)

La secuencia del gen *odc* en *N. crassa* se compone de 1525pb (pares de bases) (Figura 10), que codifica para la proteína ODC, compuesta de 484 aminoácidos (Figura 11).

```

* 10 * 20 * 30 * 40 * 50 * 60
1  ATG GTTATGCCGACTGTTGTCTCCGACCGCATGGGCACTATCGATTTCATCGATTATACAAACA
65  ATCATGTCTTTTCAAAGTGTCAAACCGACAGCTTGAACACCGTCAACAATGGCTCCTTGAAGCA
129 CGATGATTACCTCCACGGCCTTGCCAAACGGCAAGTTGGTCGCCAAACAATGATTGGTGATGCC
193 CTCCGCCAGCGTGTGGAGAGCATCGACTCCGAGTTCTGCGAGCCCGCGATGAGGACACATTCT
257 TTGTGCTGACCTCGGGCAGGTCTACCGCCAGCACCTCCGCTGGAAGCTGAACCTTCTTCGCGT
321 CAAGCCGTCTATGGTGAGTTATCCCAATTACTATGCGCTTCGTATCGAGGATTCAGTTTGCTG
385 ACTTGGATGTTTGTTCATCAGCCGTCAGTCCATCCCGACGAAAGGCTCTTGCAGCTCCTGGCC
449 GCTCTCGGTACCGGCTTCGACTGTGCTCCAAGCCGAGATCGAGCAAGTCTCCGCAITGGGCG
513 TCGACCCCTCCCGCATTATCTATGCACAGCCGTGCAAGACCAATTCTACTTGCCTATGTGCG
577 CCAGCAGGCGTGCGCCAGATGACCTTCGATAATGCCAGCAGCTGCGCAAGATTGCGCGCCTG
641 TATCCCGACGCCGAGCTTTTCCCTCCGCATCCTTACCGACGATTCTTCGTCCCTTTGCCGTTTCA
705 GCATGAAGTTCGGCGCTTCCCTCGACTCGACTGATGGTCTCTTGGGCCTTGCCCGCCAGCTGGG
769 CCTCAACGTTGGTGGCGTCAGCTTCCACGTTGGCTCGGGCGCCTCCGATCCTACTGCTTTCTTG
833 AAGGCTGTTCAGGACGCTCATGTGCTTCCAGCAGGCCGCTGCTTATGGTTACAGCCTGAAGA
897 CCCTCGAGTTGGTGGAGGTTTCTGCAGCAGCAGTCTTTGCAACAGATGGCTAACGTCTTCCG
961 TGCTGCCCTCGATGAGTACTTCCCGCCCATACCGGTGTCAACCTTATCGCTGAGCCCGGTGCG
1025 TACTACGCTTCTCGGCATTCAACCTTGCCTGCAACATCATTGCTCGCCGCATATCCAGGACG
1089 GCTCTGCTGTCTCGGTCTCCGATTCTCTTCTATGAGCGAGATGGATCGGTGAACAACGGCGA
1153 TGCTAGATATATGGTCTACGTCAACGATGGTCTGTACGGAACTTACGAGCATCATGTTTCGAT
1217 CATCAGCACCTGTGGCCAAGATCCTCCGTGCTGGCGCCGCACCAITGTACAACCTGTGTGCTG
1281 CCCACGAGTCTTCTCGGGAGGACGCCATTGAGTATAGCATCTGGGGTCTACTTGCAGCGGAT
1345 TGATCGCATCACCGAGAGCATCCGCTTCCGCGAGATTCTTGATGTTGGCGACTGGCTGTACTTC
1409 GAGGACATGGGTGCCTACACCAAGTGTTCGGCCACCACCTTCAACGGCTTCTTAACGAGCATG
1473 AIGTCATCTACGTCTGCAGCGAGCCTGGTGTATGGCGCTCTTGGGATTG

```

**Figura 10.** Secuencia del gen *odc*, señalando el marco abierto de lectura (ORF) los extremos 5' y 3' en verde rojo, respectivamente.

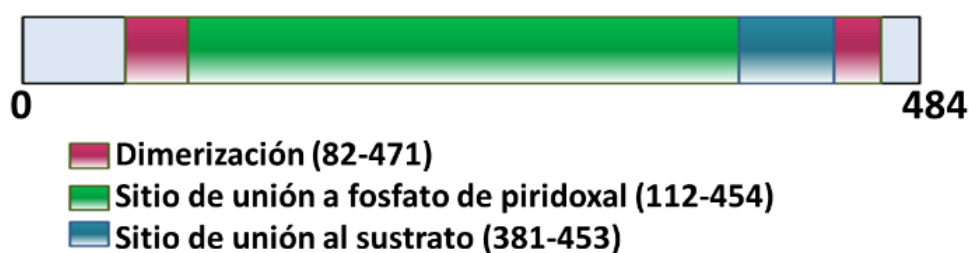
```

1  mvmpvtvvsdr  mgtidfidyt  nnhvfskqqt  dslntvnngs  lkhddylhgl  angklvakqm
61  igdalrqrve  sidsefcepq  dedtffvadl  gevyrqhlrw  klnlprvkpf  yavkchpder
121 llqlaalgt  gfdcaskaei  eqvlrmgvdp  sriiyaqpck  tnsylryvaq  qgvrqmtfdn
181 adelrkialr  ypdaelflri  ltddssslcr  fsmkfgasld  stdgllglar  qlglnvvgvs
241 fhvgsqasdp  tafllkavqda  hvvfqqaay  gyslktldvg  gdfcsddsfe  qmanvlraal
301 deyfahtgv  nliaepgryy  assaftlacn  iarrtiqdg  savsvsdsss  msddgsvnng
361 darymvvnd  glygnfssim  fdhqhpvaki  lraggrtmy  svaahessae  daieysiwwp
421 tcdgidrite  sirfreildv  gdwlyfedmg  aytkcsattf  ngfsnehdvi  yvcsepgama
481 llgl

```

**Figura 11.** Secuencia peptídica de ODC, con un tamaño de 484 aminoácidos.

La búsqueda de dominios de la secuencia peptídica arrojó tres resultados: Un dominio de dimerización, un sitio de unión a fosfato de piridoxal (PLP) y un sitio de unión al sustrato (Figura 12). Para cada dominio, solamente unos aminoácidos son los responsables de la cualidad funcional o estructural del mismo, de los cuales algunos se comparten entre un dominio y otro (Figura 13). Los dominios de unión a sustrato y a PLP comparten los aminoácidos cisteína 422, tirosina 452 y el ácido aspártico 381, el dominio de dimerización y unión a PLP comparten el aminoácido lisina 114, y los dominios de unión a sustrato y dimerización comparte los aminoácidos fenilalanina 381, ácido aspártico 423 y fenilalanina 460. El resto de los aminoácidos importantes no se comparte.



**Figura 12.** Dominios presentes en la secuencia peptídica de ODC. Las bandas en color representan el inicio y fin de cada dominio (correspondiente a un monómero), los números en paréntesis indican los aminoácidos que comprenden, en la figura 13 se resaltan los residuos importantes.

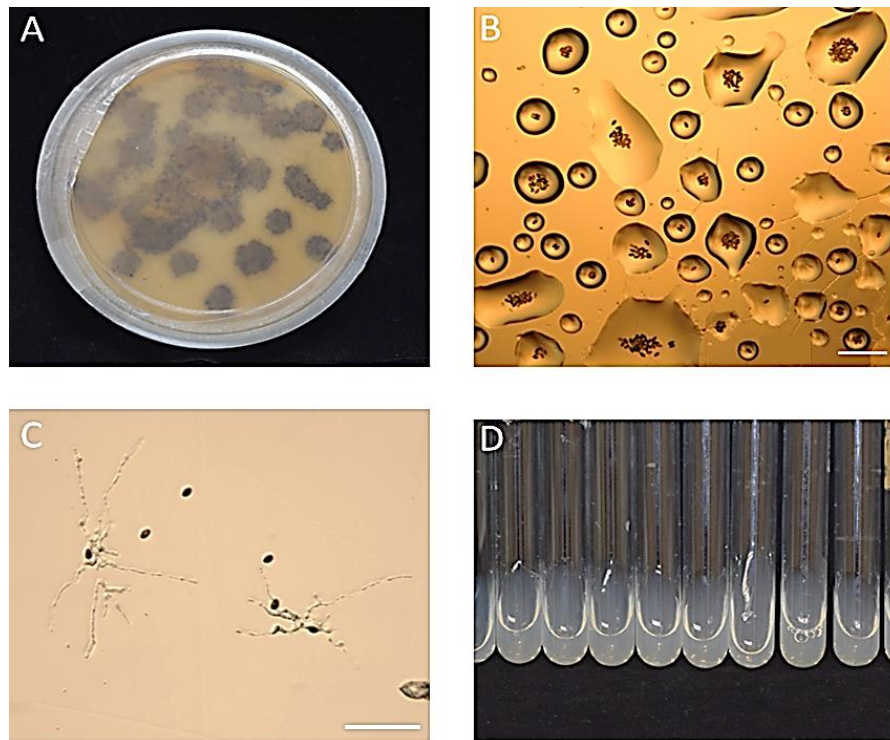
El alineamiento de la secuencia de aminoácidos mostró que la proteína ODC de *S. macrospora* contiene 485 aminoácidos, 459 en *M. oryzae*, 434 en *A. nidulans*, 466 en *S. cerevisiae* 466, y 461 aminoácidos para *M. musculus* y *H. sapiens*. La identidad de cada una comparada con la secuencia de *N crassa* fue de 93% para *S. macrospora*, 70% en *M. oryzae*, 61% en *A. nidulans*, 45% en *S. cerevisiae*, y 48% para *H. sapiens* y *M. musculus* (Figura 13).

N. CRASSA	1	MVMPTVWSD-RMGTIDFIDYTNHVF	SKCQTDLSLNTVWNG---SLKHDD[4]	LANGKLVAKQIMGDALRQRVESIDSEFC	77
S. MACROS	1	MVMPTVWSD-RMGTIDFIDYTNHVF	SKCQTDLSLNIKNG---SLKHDD[4]	LANGKLVAKQLIGDALRQRVESIDYEF	77
M. ORYZAE	1	MVMATALD-RITPVDF-----	NHLNLKKTTP-----G---FLDHHH	--NGELVSKAMIGGALRHRVESIDPEFC	59
A. NIDULA	1	--MPKLYDK-P-----DF--YVNN-	-----IQHFSNH--GADD--	LSQSRLAAKDLVLNVLKRAAEVDTDR	53
S. CEREBI	1	MSSTQVGNALSSSTTTVLVDLSNSTVTQ	KKQYKQDGETLHNLGLKNNQ[4]	LPHSEQ--AHPKIFQALKARIGRINNETC	79
M. MUSCULU	1	M-----S-SFTKDEF-----	-----DCH--ILDEGF	-----TAKDI---LDQKINEVSSS--	34
H. SAPIENS	1	M-----N-NFGNEEF-----	-----DCH--FLDEGF	-----TAKDI---LDQKINEVSSS--	34
N. CRASSA	78	EPGDDETFVADLGEVYRQHLRWKLNLR	PRVKPFYAVKCHPDERLLQLLAALGTG	FDCAASKAEIEQVLRMGVDPSPRIIYAQ	157
S. MACROS	78	EPGDDETFVADLGEVYRQHLRWKLNLR	PRVKPFYAVKCHPDDRLLRLLAALGTG	FDCAASKAEIEQVLRMGVDPSPRIIYAQ	157
M. ORYZAE	60	DAGDEDTFFVADLGHVYRQHLRWKLNLR	PRVKPFYAVKCNPDPKVLRLLAELGNG	FDCAASKTEIKQVLDMGVDPSPRIIYAQ	139
A. NIDULA	54	APGEEDAFYVADMGVYRQHLRWKLNLR	SRVPPFYAVKCNPDPEVLRMLAKLNG	FDCAASKAIEDMALSTGVDPSPRIIYAQ	133
S. CEREBI	80	DPGEENSFFICDLGEVKRLFNHWKELP	RIKPFYAVKCNPDTKVLSLAEGLVNF	DCASKVEIDRVLSPNHSIDPRIIYAN	159
M. MUSCULU	35	--DDKDAFYVADLGDILKKHLRWKAL	PRVTPFYAVKCNDSRAIVSTLAAIGTG	FDCAASKTEIQVLQGLVPAERVIYAN	112
H. SAPIENS	35	--DDKDAFYVADLGDILKKHLRWKAL	PRVTPFYAVKCNDSKAIKVTLAATGTG	FDCAASKTEIQVLQGLVPPERIYAN	112
N. CRASSA	158	PCKTNSYLRYVAQQGVRQMTFDNADEL	RKIARLYPDAELFLRILTDSSSLCRFS	MKFGASLDSTDGLGLARQLGLNVV	237
S. MACROS	158	PCKTNSYVRYVAQQGVRQMTFDNADEL	RKIARLYPDAELFLRILTDSSSLCRLS	LKFGASLDSTDGLGLARQLGLSVV	237
M. ORYZAE	140	PCKTNSYVRYVAAGVVRQMTFDNADEL	YKIARLYPDAELFLRILTDSSSLCRLS	LKFGASLDATDGLGLARQLGLNVV	219
A. NIDULA	134	PCKTKSYLRHAAKVGVKQMTFDNADEL	YKIARLYPDAELFLRILTDSSSLCQFS	MKFGASLDVAVQLLELAHQLELKIV	213
S. CEREBI	160	PCKVASFIKYAASKNVMKSTFDNVEL	HKIKKIFHPESQLLRIATDOSTAQCR	LSKYGCMEINVDVLRKAIKELGLNL	239
M. MUSCULU	113	PCKQVSQIKYAASNGVQMTFDSEIEM	KVARAHPKAKLVLRRIATDOSKAVCR	LSVKFGATLRTSRLLELRAKELNIDVI	192
H. SAPIENS	113	PCKQVSQIKYAANINGVQMTFDSEVEL	MKVARAHPKAKLVLRRIATDOSKAVCR	LSVKFGATLRTSRLLELRAKELNIDV	192
N. CRASSA	238	GVSFHVSGASDPTAFKAVQDAHVVFQQA	A-AYGYS-LKTLDVGGGFCSDDS	FEQMANVLRALDEYFPAHTGVNL	312
S. MACROS	238	GVSFHVSGASDPTAFKAVQDAHVVFQQA	A-AYGYN-LKTLDVGGGFCSDDT	FEQMASVLRALDEYFPAHTGVNL	312
M. ORYZAE	220	GVSFHVSGASDPLAFLKAVRDANFVFEQA	A-AHGFD-MKTLDVGGGFCSDDT	FEAMAGVLRDALDEYFPPHRGVSL	294
A. NIDULA	214	GVSFHVSGAEDPKAFKAVQDARLVFDQA	A-EIGHE-LHTLDVGGGFCSDDT	FEKFAAVLDSALETYFPPN--IRI	285
S. CEREBI	240	GVSFHVSGASDFTSLYKAVRDARTVFDKA	ASEYGLPPLKILDVGGGFCSDDT	FKESTAVLRALDEYFPPVCGVDI	315
M. MUSCULU	193	GVSFHVSGGCTDPETFVQAVSDARCVFDM	AT-EVGF-S-MHLLDIGGGFPGSED[4]	FEEITSVINPALDKYFSPDSGVRI	271
H. SAPIENS	193	GVSFHVSGGCTDPETFVQAVSDARCVFDM	AT-EVGF-S-MYLLDIGGGFPGSED[4]	FEEITGVINPALDKYFSPDSGVRI	271
N. CRASSA	313	IAEPGRYYASSAFTLACNI	IARRTIQDGSVAVSVDSSS[9]	GDARYMYVNDGLYGNFSSIMFDHQHP	VAKILRAGGRT 397
S. MACROS	313	IAEPGRYYASSAFTLACNI	IARRTIQDGSVAVSVDSSS[10]	GDASYMYVNDGLYGNFSSIMFDHQHP	VAKILRAGGRT 398
M. ORYZAE	295	IAEPGRYFVSAAFIACNV	IARRTVEDPNG-SVNGSLA	AAPSYMYVNDGLYGNFSSIMFDHQHP	VAVLRSSGNF 369
A. NIDULA	286	IAEPGRYYYGGAFTLAANI	IARRGVQDPE---NPSKD	---AYMIYVNDGLYGNFSSIMFDHQHP	PEARILSCASEI 354
S. CEREBI	316	IAEPGRYFVATAFTLASHV	IARRKRL-----	SENEAMIYVNDGLYGNFSSIMFDHQHP	PHPTLYHNLDF 378
M. MUSCULU	272	IAEPGRYYVASAFTLAVNI	IAKKTWKEQPGSDDEDES	NEQTFMYVNDGLYGNFSSIMFDHQHP	HAHVKALLQK---- 342
H. SAPIENS	272	IAEPGRYYVASAFTLAVNI	IAKKIVLKEQPGSDDEDES	SEQTFMYVNDGLYGNFSSIMFDHQHP	HAHVKALLQK---- 342
N. CRASSA	398	MYNS	VAAHE-SSAEDAIEYSINGPTCDGIDR	ITESIRFREILDVGDWLYFEDMGAYTKCS	ATTFNGFSNEHDVIYVC 473
S. MACROS	399	MYDS	VAAHE-SASEDAIEYSINGPTCDGIDR	ITESIRFREILDVGDWLYFEDMGAYTKCS	ATTFNGFSNEHDVIYVC 474
M. ORYZAE	370	FYNT	TDADSPESPEGEIYSINGPTCDGIDR	ISESVRFSTIDVGDWLYFEDMGAYTKCS	ATTFNGFSDAHDVIYVC 446
A. NIDULA	355	NGRP	VSEDV-----TYSINGPTCDGIDR	IVISQSVLPGLLDVGDWLYFEDMGAYTRCS	ATRFNGFSNDHEVIYIS 423
S. CEREBI	379	HYND[7]	LDSINKTRSEYYPYKVSINGPTCDGLD	CIAKEYMKHDVIVGDWLYFEDMGAYTSSA	ATTFNGFEQTADIVYID 462
M. MUSCULU	343	----	----RPKPDEKYSSSINGPTCDGLD	RIVERCNLPE-MHVGDWMLFENMGAYTVA	AATTFNGFQRPNIIYVMS 410
H. SAPIENS	343	----	----RPKPDEKYSSSINGPTCDGLD	RIVERCNLPE-MHVGDWMLFENMGAYTVA	AATTFNGFQRPTIIYVMS 410
N. CRASSA	474	S	EPGAMALLGL--		484
S. MACROS	475	S	EPGALALMEL--		485
M. ORYZAE	447	S	EPAARAMLNLYI		459
A. NIDULA	424	S	EAGASALLEY--		434
S. CEREBI	463	S	-----ELD-		466
M. MUSCULU	411	R[38]	HAAACASARINV		461
H. SAPIENS	411	G[38]	HRAACASASINV		461

**Figura 13.** Alineamiento de secuencias de ODC. Resaltando los aminoácidos del dominio para dimerización (rojo), de unión al sustrato (azul) y de unión a fosfato de piridoxal (PLP) (verde) (Marchler-Bauer *et al.*, 2015). Los dominios de unión a sustrato y PLP comparten los aminoácidos C422, Y452 (mostrados en azul) y D381 (rojo), el dominio de dimerización y unión a PLP comparten el aminoácido K114 (rojo), los dominios de unión a sustrato y dimerización comparte los aminoácidos F381, D423 (rojo) y F460. Los espacios marcados con guiones se insertaron automáticamente para alinear las zonas que son iguales o idénticas, los números entre corchetes representan los aminoácidos que se omitieron en el alineamiento.

### 3.2 La cepa mutante $\Delta odc$ homocarión es inviable

De las ascosporas colectadas de la cruce N150 x  $\Delta odc$  het (Figuras 14A y 14B) se recuperaron 44 que llegaron a germinaron luego de sembrarlas en medio FGS con higromicina (Figura 14C). Las ascosporas se transfirieron a tubos de vidrio con MMV sólido adicionado con higromicina (Figura 14D). Las ascosporas que germinaron a las 24 horas produjeron tubos germinales de aproximadamente 250 micrómetros, después no hubo mayor desarrollo, indicando que la ausencia del gen *odc* genera letalidad, volviendo inviables los intentos de obtener homocariónes. Esto sugiere que el gen *odc* es esencial para el crecimiento de *N. crassa*.

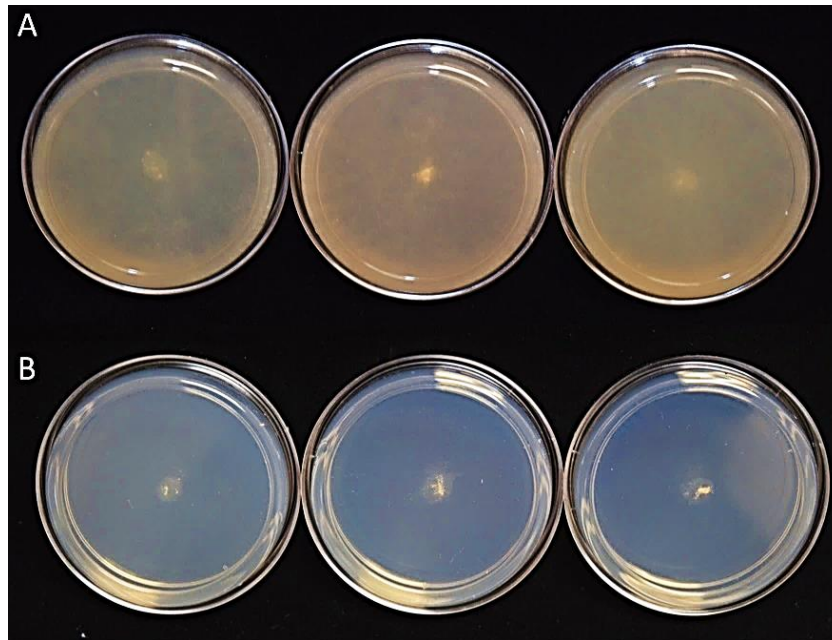


**Figura 14.** Cruza ente las cepas N150 y  $\Delta odc$  het: Las zonas negras son los peritecios generados (A). Ascosporas colectadas (B). Ascosporas germinando a las 24 horas en medio FGS-higromicina (C). Ascosporas transferidas luego de 24 horas en tubos con MMV-higromicina (D). Barras de escala 200 $\mu$ m.

Se realizaron pruebas adicionales para confirmar la resistencia de las ascosporas que fueron recuperadas: 1) Se sembraron ascosporas en cajas de Petri con medio FGS sin higromicina, las que germinaron se colectaron en tubos con MMV sólido con higromicina, el resultado fue el mismo que el



anterior; no hubo mayor crecimiento. 2) Se sembraron y colectaron en medio sin higromicina, en este ensayo si hubo crecimiento de colonias en los tubos, se tomó una muestra de micelio de cada colonia y se inocularon en cajas de Petri con y sin higromicina; en las cajas sin higromicina hubo crecimiento (Figura 15A), mientras que en las cajas con higromicina se observó el mismo resultado visto en ensayos anteriores, ausencia de crecimiento (Figura 15B), ambos resultados se debieron a que los medios sin higromicina propiciaron la germinación de esporas con genotipo silvestre, muriendo después ser inoculadas en medios con higromicina.

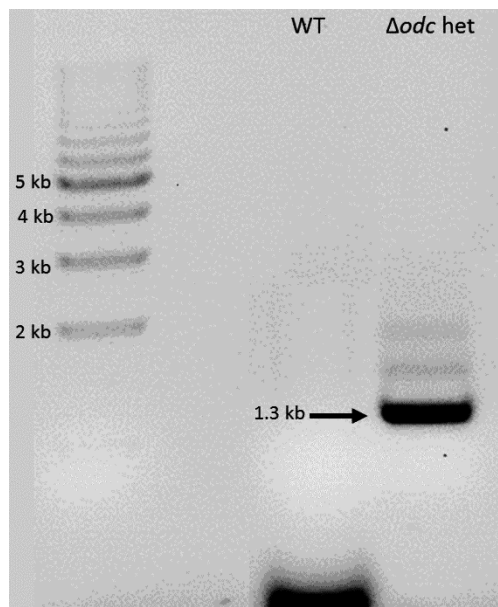


**Figura 15.** Ensayos con micelio proveniente de ascosporas  $\Delta odc$  germinadas en medio sin higromicina. En las cajas sin higromicina (A), el micelio creció hasta cubrir la superficie del medio; en las cajas con higromicina (B), el micelio inoculado no se desarrolló.

### 3.3 PCR de comprobación de la cepa mutante $\Delta odc$ heterocarión

Mediante la reacción de PCR realizada a la cepa  $\Delta odc$  heterocarión, se obtuvo el fragmento de la amplificación que tuvo una longitud de 1388 pares de bases ( $\approx 1.3\text{kb}$ ) (Figura 16). En la electroforesis se observa la amplificación exitosa del fragmento en la mutante más no en la silvestre, debido a que esta última no posee el gen de resistencia a la higromicina. Además, en el PCR de la cepa mutante se pudieron observar dos bandas de mayor tamaño, de aproximadamente 1.5 y 1.9kb, debido a una

amplificación inespecífica atribuida al oligonucleótido 9, que pudo haberse unido y amplificado en regiones del genoma de *N. crassa* complementarias a su secuencia.



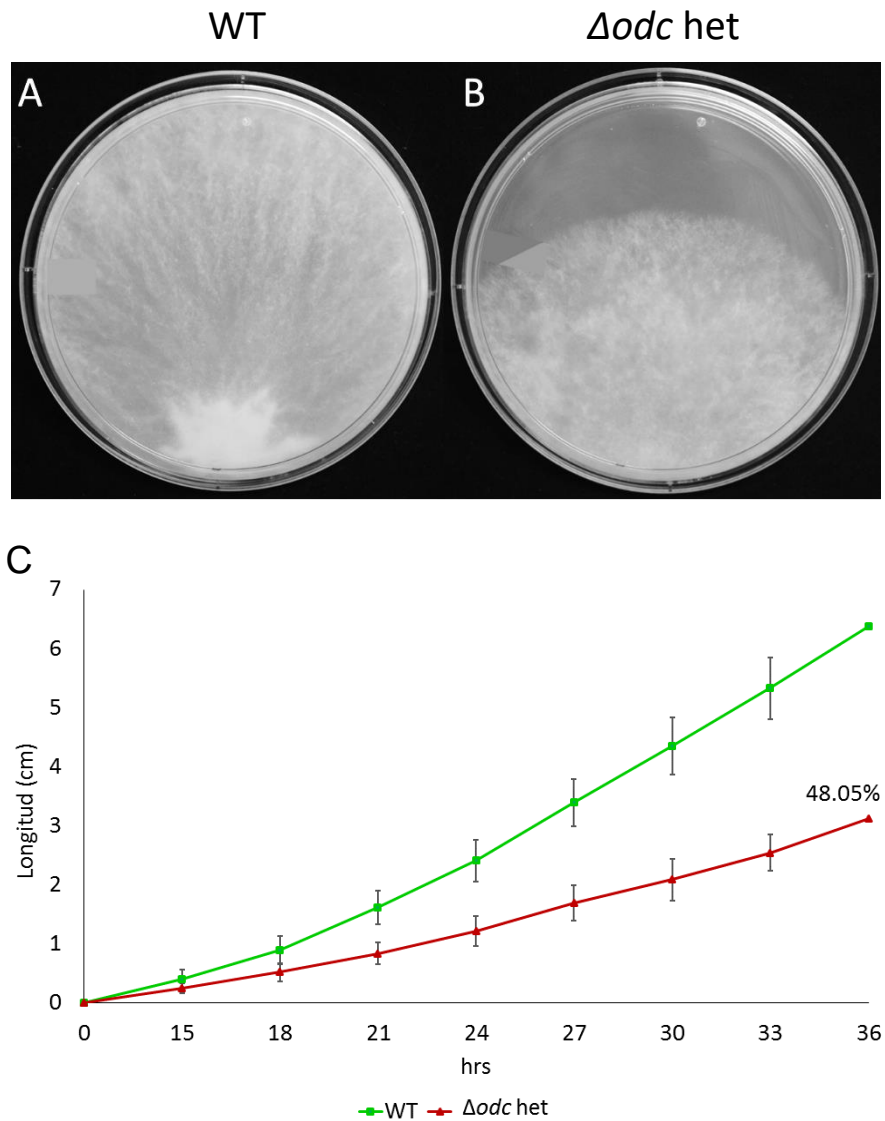
**Figura 16.** PCR de comprobación. Realizado con el par de oligonucleótidos 1 y 9. La banda de 1.3kb (1kb= 1000pb) observada corresponde fragmento *hph*, confirmando a la cepa mutante como la mutante  $\Delta odc$  heterocarión.

### 3.4 Caracterización fenotípica de la cepa mutante $\Delta odc$ heterocarión

Debido a que los resultados del punto anterior indican que el gen *odc* es esencial para el crecimiento de *N. crassa* y la obtención de una mutante homocarión no es posible, se procedió a caracterizar su fenotipo usando la mutante  $\Delta odc$  heterocarión y comparó con la silvestre parental (WT, FGSC#9718), los datos numéricos se incluyen en el anexo B.

#### 3.4.1 Tasa de crecimiento

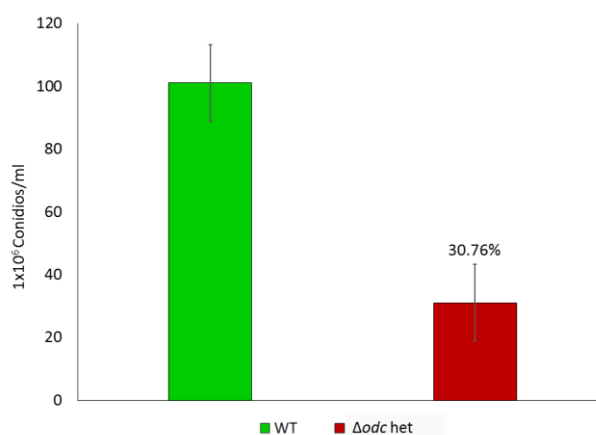
Se midió la tasa de crecimiento de ambas cepas en 8 periodos de 3 horas a partir de las 12 horas posteriores al inculo, dando un total de 36 horas. Se calcularon los promedios de cada medición, así como sus desviaciones estándar y la diferencia entre ambas. Se encontró que la cepa  $\Delta odc$  heterocarión creció un 48.05% menos que cepa la silvestre (Figura 17).



**Figura 17.** Tasa de crecimiento. Se midió durante 36 horas el crecimiento de la cepa silvestre parental (WT) (A) y la cepa  $\Delta odc$  het (B). Gráfica de la tasa de elongación de ambas cepas (C). Las barras representan la desviación estándar para cada medición.

### 3.4.2 Tasa de esporulación

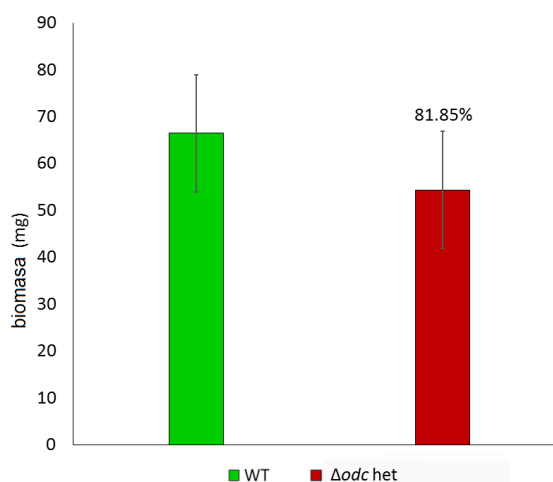
La producción de conidios en la cepa silvestre parental (WT) fue de  $101.11 \times 10^6$  conidios/mL, mientras que la cepa  $\Delta odc$  heterocarión produjo  $31.11 \times 10^6$  conidios/mL, este valor correspondió al 30.76% con respecto a la cepa silvestre (Figura 18).



**Figura 18.** Producción de conidios. La cepa  $\Delta odc$  het produjo  $31.11 \times 10^6$  conidios/mL, un 30.76% comparado con la cepa silvestre. Las barras de error representan la desviación estándar.

### 3.4.3 Producción de biomasa

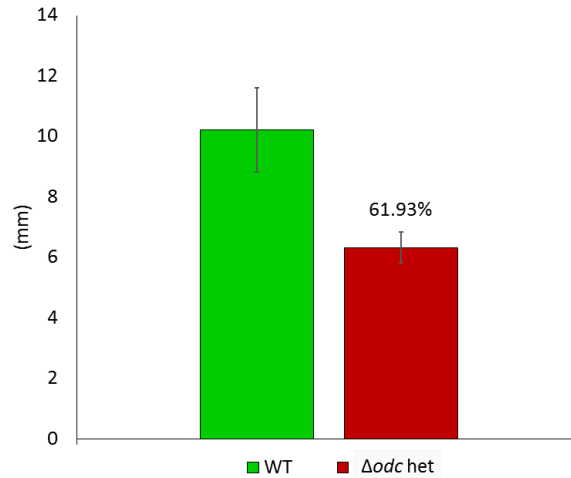
Se encontró que la cepa  $\Delta odc$  heterocarión produjo menos biomasa, un 81.85% en comparación con la biomasa de la cepa silvestre, sin embargo, la prueba t de Student determinó no hay diferencias significativas en cuando a la biomasa que produjeron ambas cepas. Los cálculos mostraron valores altos en sus desviaciones estándar, siendo más evidente al momento de graficar los datos obtenidos (Figura 19).



**Figura 19** Producción de biomasa en 50ml de cultivo líquido. Las diferencias son mínimas y no son estadísticamente significativas ( $p \geq 0.05$ ), además de tener desviaciones estándar (barras de error) con valores altos.

### 3.4.4 Generación de hifas aéreas

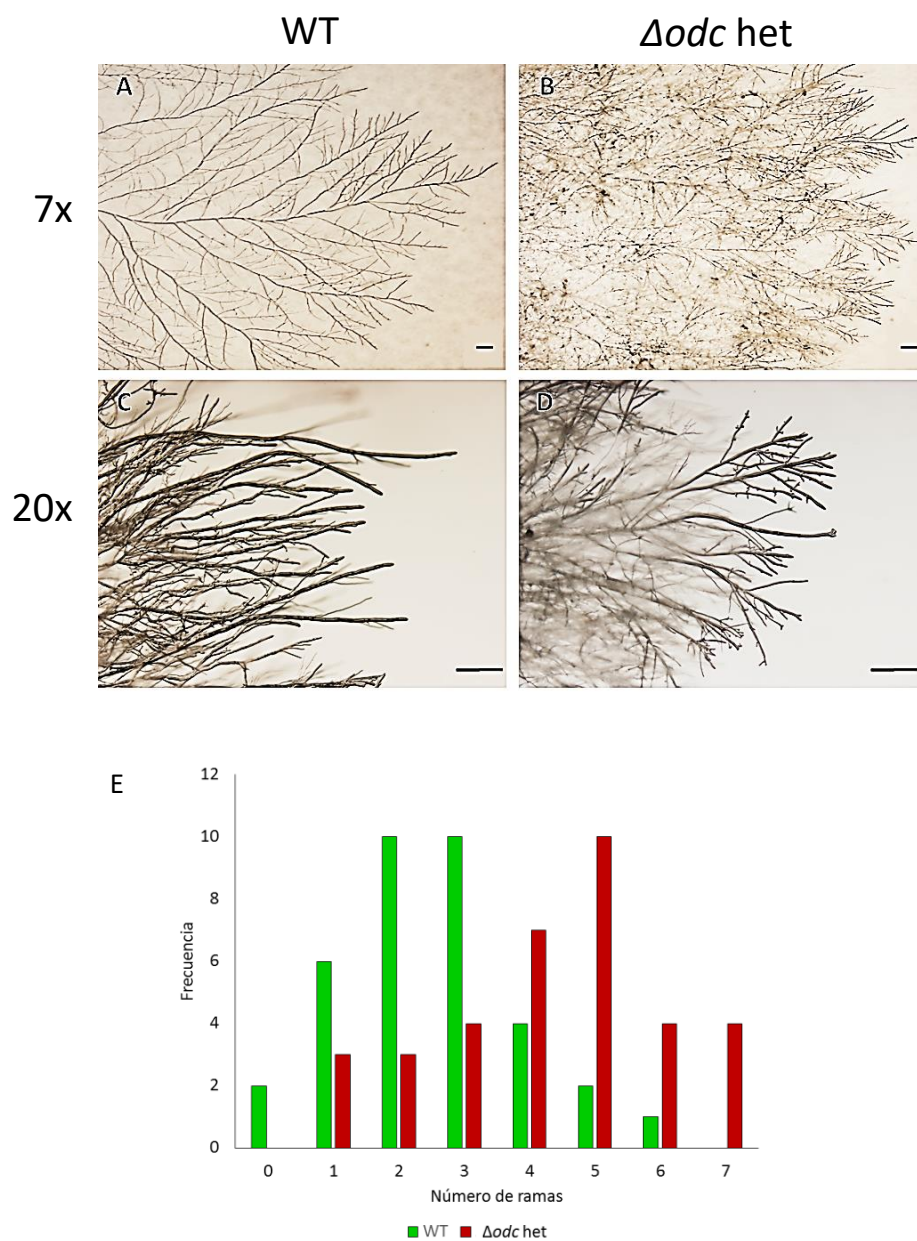
A pesar de observar que en la cepa  $\Delta odc$  heterocarión se comenzaban a generar hifas aéreas antes que la cepa silvestre, la cantidad y la altura que estas alcanzaban fue menor. Las mediciones mostraron en las hifas aéreas de la cepa mutante tuvieron un 61.93% de altura con respecto a la cepa silvestre (Figura 20).



**Figura 20.** Generación de hifas aéreas. La cepa  $\Delta odc$  het generó menos hifas aéreas, las cuales alcanzaron una altura menor. Las barras de error representan la desviación estándar.

### 3.4.5 Índice de ramificación

Las observaciones bajo el microscopio estereoscópico mostraron que, en comparación con la cepa silvestre (Figuras 21A y 21C), la cepa  $\Delta odc$  heterocarión crecía de manera irregular, formando un micelio más denso (Figura 21B) con mayor ramificación en sus hifas (Figura 21D). Los datos de ramificación se graficaron en un histograma (Figura 21E), encontrando una moda de 2 a 3 ramas por hifa en la cepa silvestre, mientras que la cepa  $\Delta odc$  heterocarión tuvo una moda de 5 ramas por hifa.

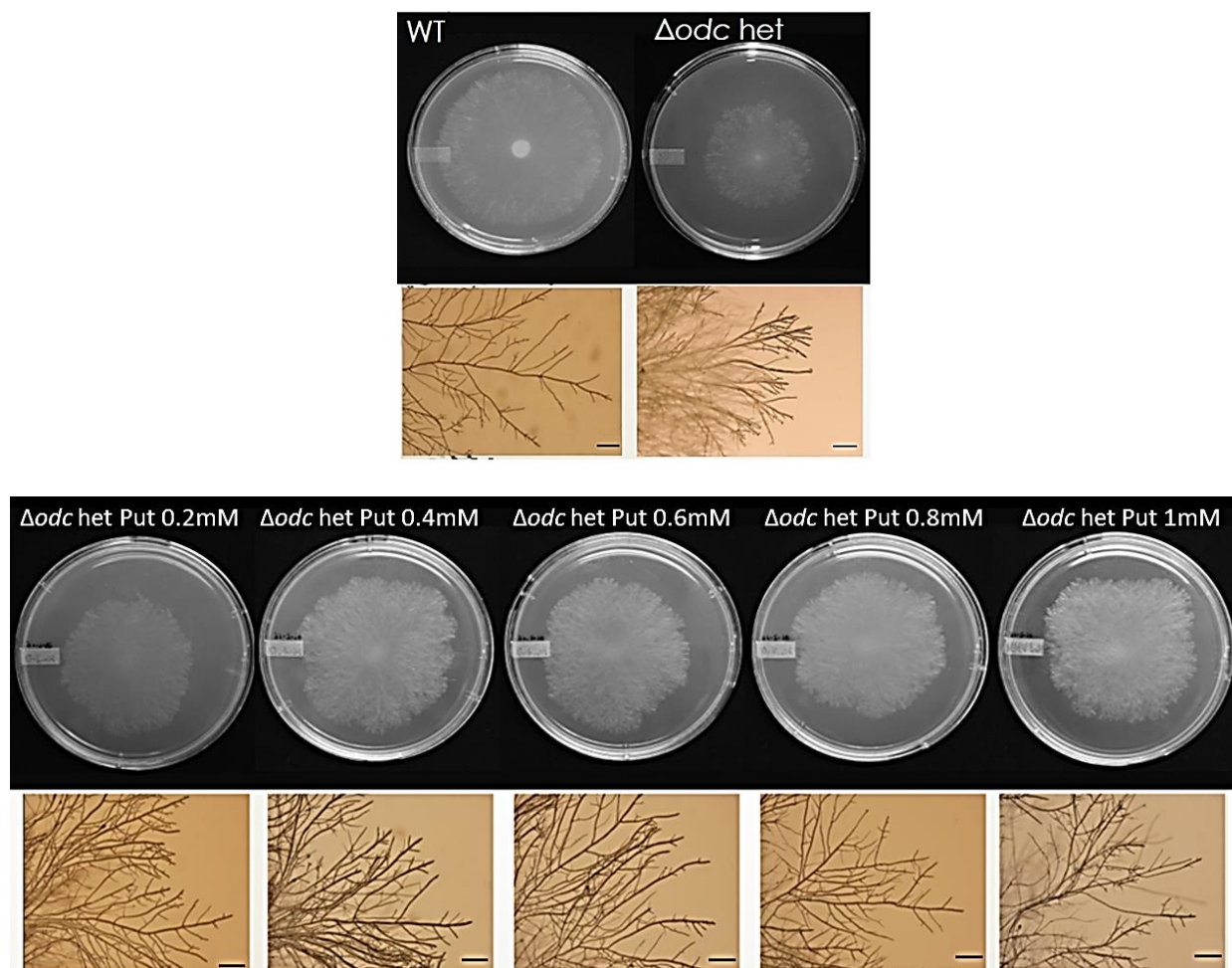


**Figura 21.** Índice de ramificación. Observaciones bajo estereoscopio con aumento 7x (A-B) y 20x (C-D). Se puede ver como la cepa  $\Delta odc$  het crece irregularmente y genera mayor ramificación, formando un micelio más denso (B y D). La gráfica (E) muestra la frecuencia en el número de ramas, las barras con los valores más altos son las modas para ambas cepas. Barras de escala 500  $\mu$ m.

### 3.5 Análisis de fenotipos mutantes recuperados con putrescina

En todos los trabajos acerca de las poliaminas y los defectos que causa la inhibición de su síntesis, se usaron poliaminas exógenas con el fin de que las células recuperaran su fenotipo silvestre, en la mayoría

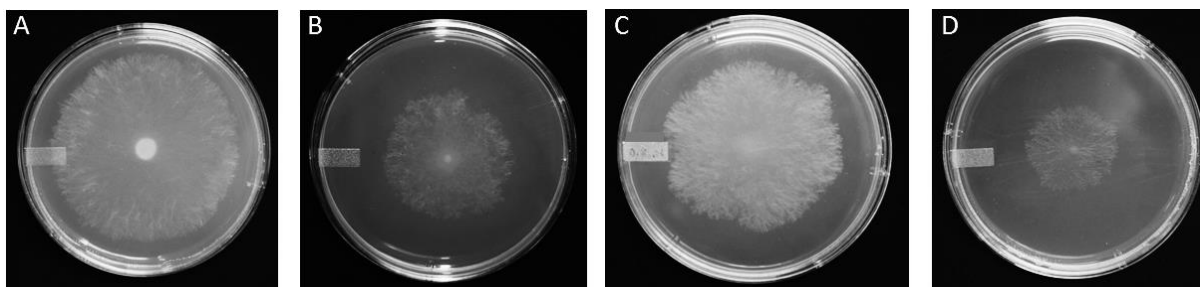
utilizó putrescina, con el fin de reanudar la producción de espermidina y espermina. En las pruebas que se realizaron para recuperar el fenotipo silvestre en la mutante  $\Delta odc$  heterocarión se adicionó el medio con putrescina. Se hizo un gradiente de concentración de 0.2 a 1.0 mM, de acuerdo a los resultados de Davis y Ristow (1991). Se encontró que desde 0.2 mM de putrescina el crecimiento de la mutante aumentaba, pero la híper-ramificación requirió un mínimo de 0.8 mM (Figura 22) para restablecerse a un fenotipo semejante a la silvestre.



**Figura 22.** Tratamiento con putrescina: Panel superior, cepas control (silvestre y mutante  $\Delta odc$  het). Panel inferior, cepa  $\Delta odc$  het bajo cinco concentraciones de putrescina. Barras de escala 500  $\mu\text{m}$ .

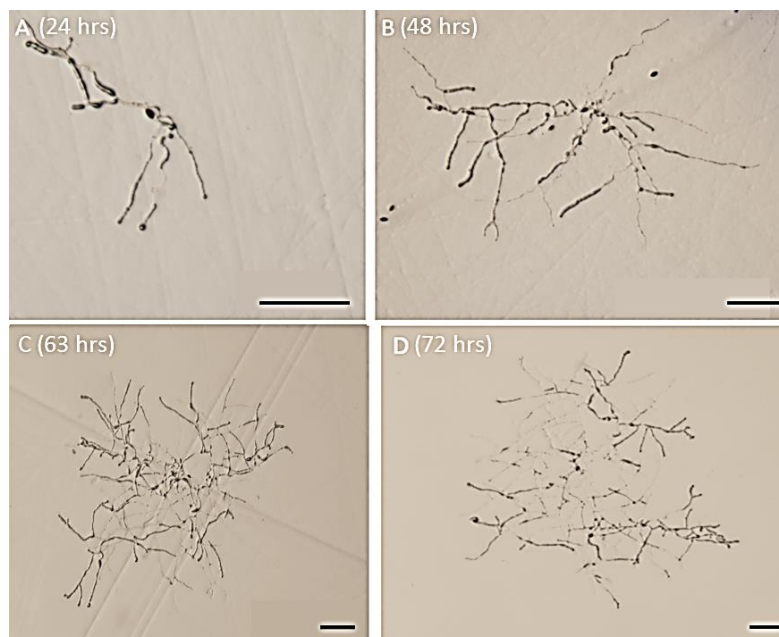
Se sabe que las poliaminas llegan a ser tóxicas a altas concentraciones (Davis y Ristow, 1991; Pegg, 2013). Para el caso de la cepa  $\Delta odc$  heterocarión, la concentración mínima tóxica de putrescina es de 2.0 mM (Figura 23D), provocando un fenotipo aún más afectado que la mutante control (Figura 23B).





**Figura 23.** Comparación de cepas. Control (cepa silvestre) (A), control mutante ( $\Delta odc$  het) (B), cepa  $\Delta odc$  het con 0.8 mM de putrescina (C),  $\Delta odc$  het con 2.0 mM de putrescina (D). Nótese como a 2.0 mM de putrescina el fenotipo se ve más afectado que la mutante control.

En las ascosporas  $\Delta odc$  crecidas en medio adicionado con putrescina se encontró que la germinación incrementó, sin embargo, en los cuatro tratamientos las ascosporas alcanzaron una longitud máxima en diferentes tiempos antes de detener su germinación totalmente. Las ascosporas sembradas medio con putrescina al 0.8 y 1 mM tuvieron un crecimiento de 500  $\mu\text{m}$ , alcanzando dicha longitud a las 40 y 48 horas respectivamente (Figura 24B), con 1.5mM de putrescina, el crecimiento llegó a 800  $\mu\text{m}$  en 63 horas (Figura 24C), y las ascosporas sembradas en presencia de 2 mM de putrescina alcanzaron una longitud de 1 mm en 72 horas (Figura 24D).



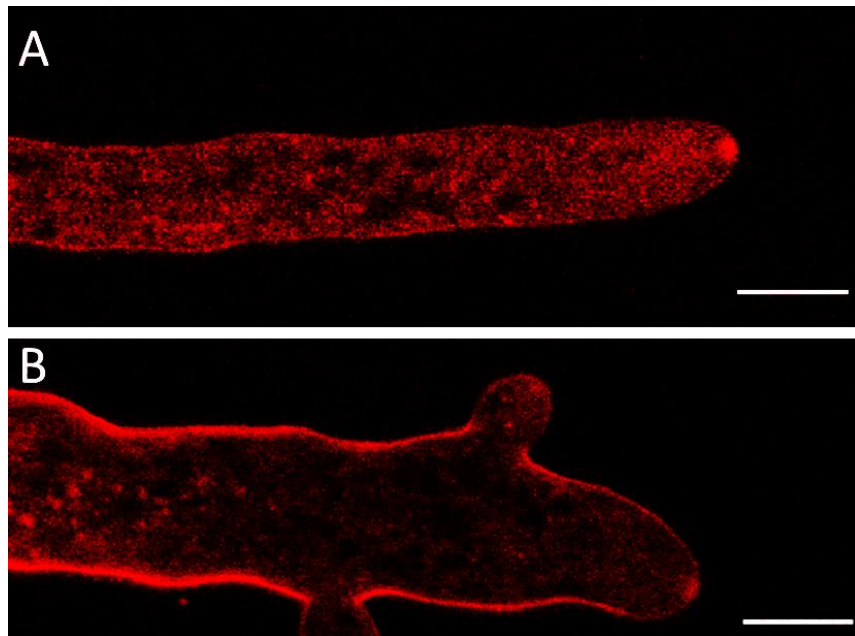
**Figura 24.** Adición de putrescina en ascosporas  $\Delta odc$ . Control (A), putrescina 1.0 mM (B), putrescina 1.5 mM (C) y 2.0 mM (D). La germinación aumentó en proporción de la cantidad de putrescina. Barras de escala 200  $\mu\text{m}$ .



### 3.6 Análisis bajo de microscopia confocal

#### 3.6.1 Tinción de la cepa silvestre y la cepa $\Delta odc$ het con FM4-64

Mediante la tinción con FM4-64 se pudo evidenciar la diferencia en cuanto a la organización y el tamaño del Spk. La cepa silvestre presentó su típico crecimiento rectilíneo y el Spk se encuentra de forma normal en el ápice celular (Figura 25A). Por otro lado, en la cepa mutante se pudo apreciar como el Spk presentó un tamaño menor que en la cepa silvestre, al parecer se encontraba parcialmente desensamblado (Figura 25B). Así mismo se puede observar como la cepa mutante heterocarión presentó deformidades en la hifa y ramificaciones cerca de la zona apical, lo cual en una cepa silvestre por lo regular no sucede (Figura 25A).

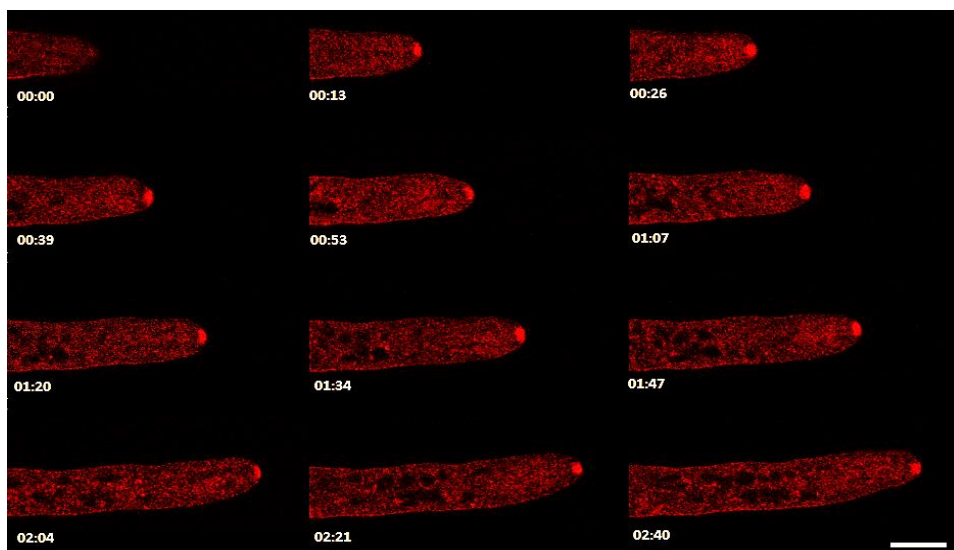


**Figura 25.** Cepas de *N. crassa* teñidas con FM4-64. En la cepa silvestre (A) se puede observar un crecimiento rectilíneo y un Spk definido. En la cepa mutante  $\Delta odc$  het (B) se observa una hifa con forma irregular y con un Spk de menor tamaño. Barras de escala 10  $\mu$ m.

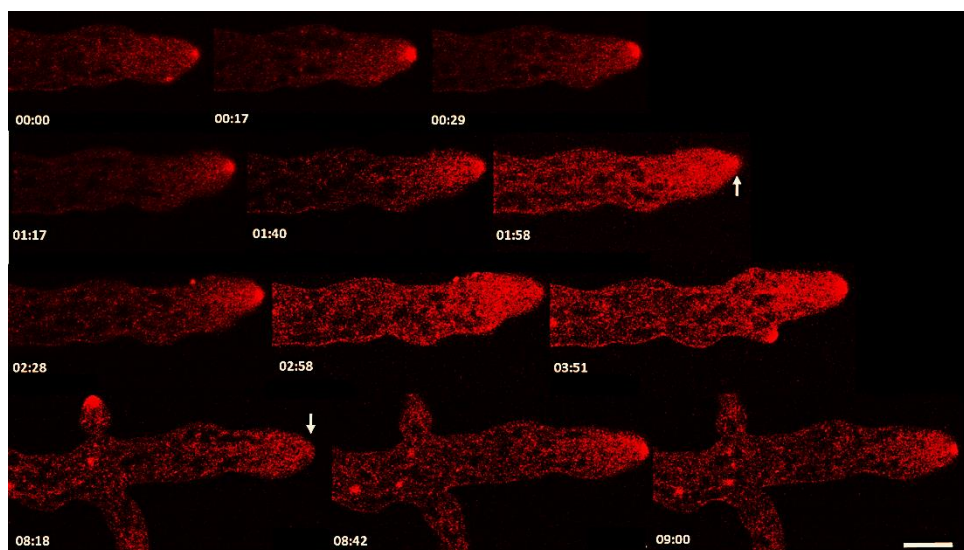
#### 3.6.2 Localización intracelular de CDC-42, RAC y F-actina

Previo a las observaciones de las Rho GTPasas, la cepa silvestre se teñió con el colorante FM4-64 con y sin DFMO, a fin de tener un control de la dinámica del Spitzenkörper (Spk) y del crecimiento en ambas condiciones, se usaron concentraciones de 4 mM de DFMO, de acuerdo a los datos de Davis *et al.*, 1994.

Al teñir las hifas con FM4-64, se pudo observar como el Spk era visible en todo momento, permitiendo su seguimiento a lo largo del crecimiento de la hifa (Figura 26). Sin embargo, cuando fueron tratadas con DFMO 4 mM, las hifas crecieron de manera irregular, es decir, no mantuvieron un crecimiento semi rectilíneo; también el Spk mostró signos de afectación, cambiando de posición constantemente e incluso llegando a desvanecerse momentáneamente (Figura 27).

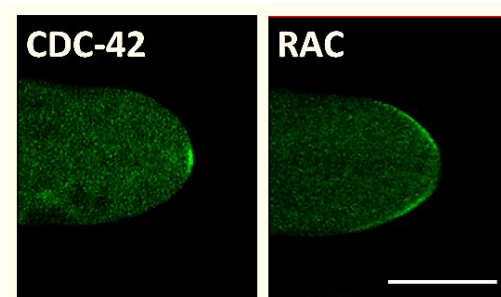


**Figura 26.** Cepas silvestres de *N. crassa* teñidas con FM4-64. La presencia del Spk fue constante en todas las observaciones. Barra de escala 10  $\mu$ m.



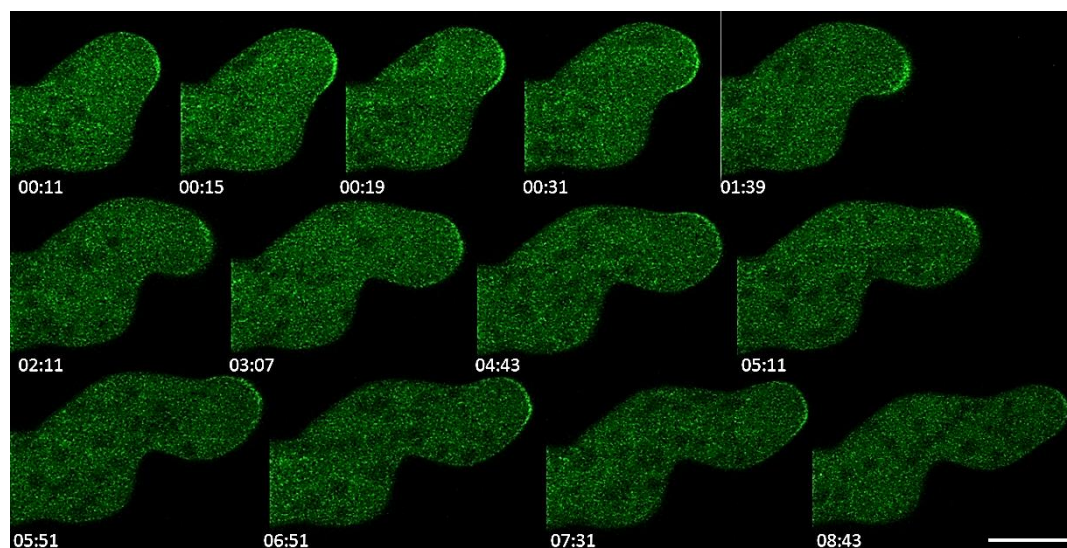
**Figura 27.** Cepas silvestres de *N. crassa* teñidas con FM4-64 y tratadas con DFMO 4 mM. El Spk llegó a desvanecerse hasta desaparecer (flecha) y regenerarse segundos después. Barra de escala 10  $\mu$ m.

En las imágenes de microscopía confocal se observó que, en condiciones normales, CDC-42 se localiza en el ápice de la hifa en crecimiento, mientras que RAC se ubica a los extremos (Figura 28), confirmando las observaciones de Araujo-Palomares (2011). Ambas proteínas mantuvieron una localización constante durante las observaciones.



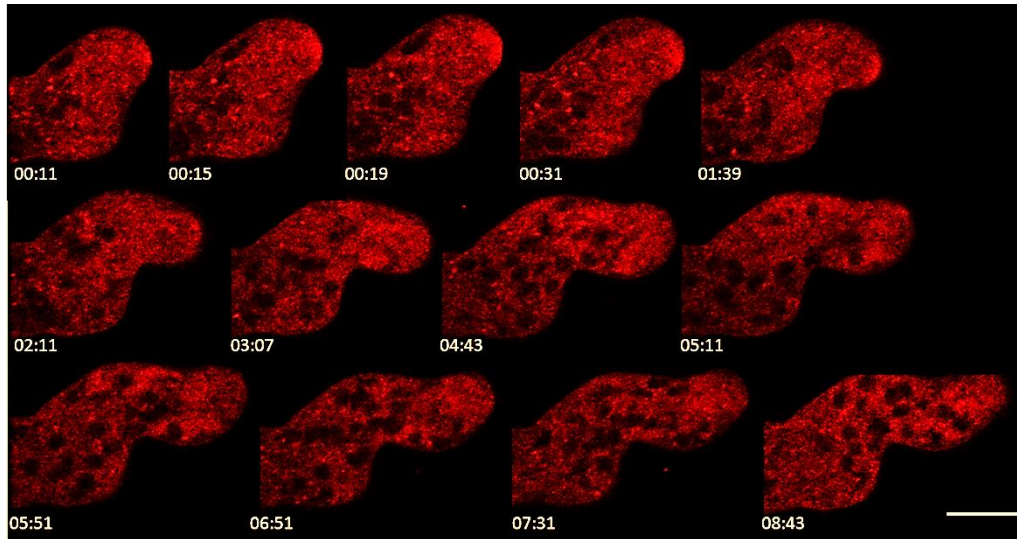
**Figura 28.** Localización de las Rho GTPasas CDC-42 y RAC marcadas con la proteína fluorescente YFP. CDC-42 se observa en el ápice y RAC a los extremos sin colocalización entre ambas. Barra de escala 10  $\mu$ m.

Al ser tratadas con DFMO 4 mM, las Rho GTPasas presentaron una dinámica distinta. CDC-42 continuó localizándose en la punta de la hifa de manera intermitente, llegándose a extender su localización por toda la zona del domo apical (Figura 29).

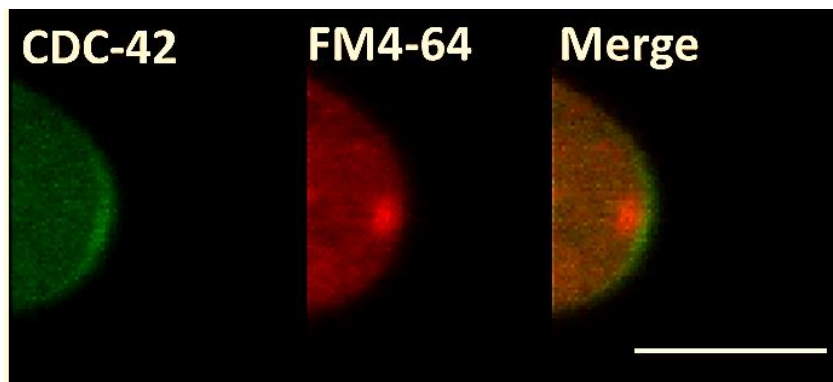


**Figura 29.** Microscopía confocal de la cepa YFP-CDC-42 tratada con DFMO 4 mM. La localización de CDC-42 pasó de su posición normal a abarcar parte del domo apical. Barra de escala 10  $\mu$ m.

Al observar las hifas de la cepa YFP-CDC-42 tratadas con DFMO y mediante la tinción de FM4-64, se encontraron defectos en la organización y dinámica del Spk, se puede observar cómo el Spk no se mantiene en una sola posición hasta que se desensambla completamente (Figura 30). La localización de CDC-42 cambiaba constantemente sin llegar a colocalizar con el Spk (Figura 31).



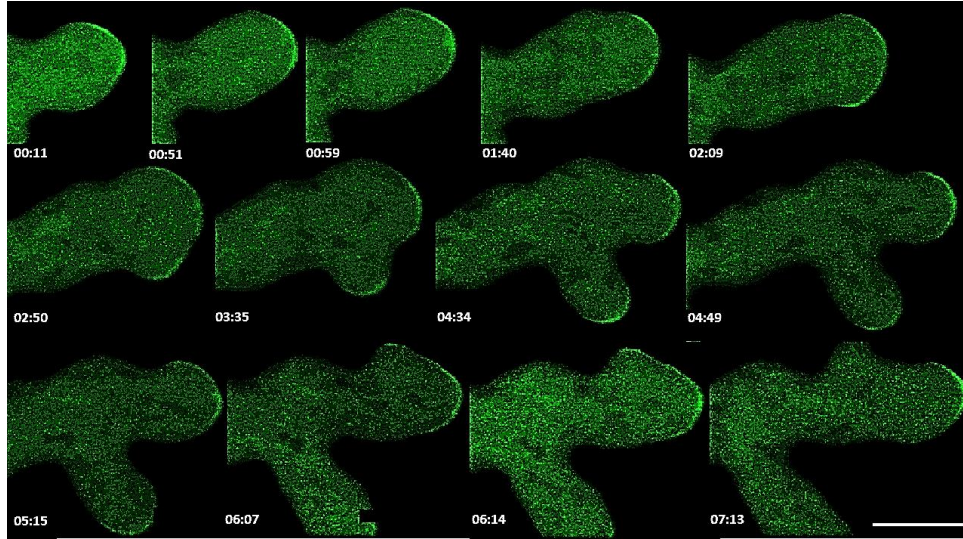
**Figura 30.** Tinción con FM4-64 en la cepa YFP-CDC-42 tratada con DFMO 4 mM. El Spk tuvo un comportamiento atípico, cambiando de posición y desvaneciéndose constantemente. Barra de escala 10  $\mu$ m.



**Figura 31.** Localización de CDC-42 en presencia de DFMO 4 mM. CDC-42 (verde), el Spk (rojo), imagen combinada (merge). No se observó colocalización. Barra de escala 10  $\mu$ m.

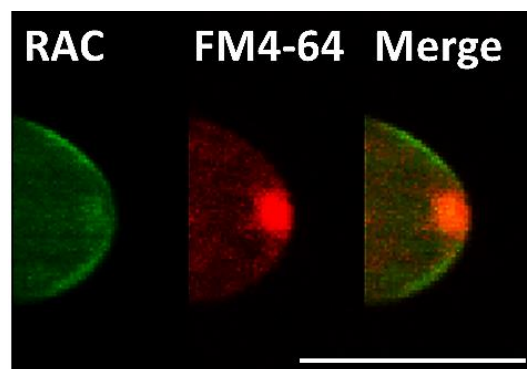


Respecto a la localización y dinámica de la proteína RAC en presencia de DFMO, su localización pasó de ubicarse a los extremos del domo apical a cubrir completamente el ápice de las hifas, alternando constantemente en ambas zonas (Figura 32).

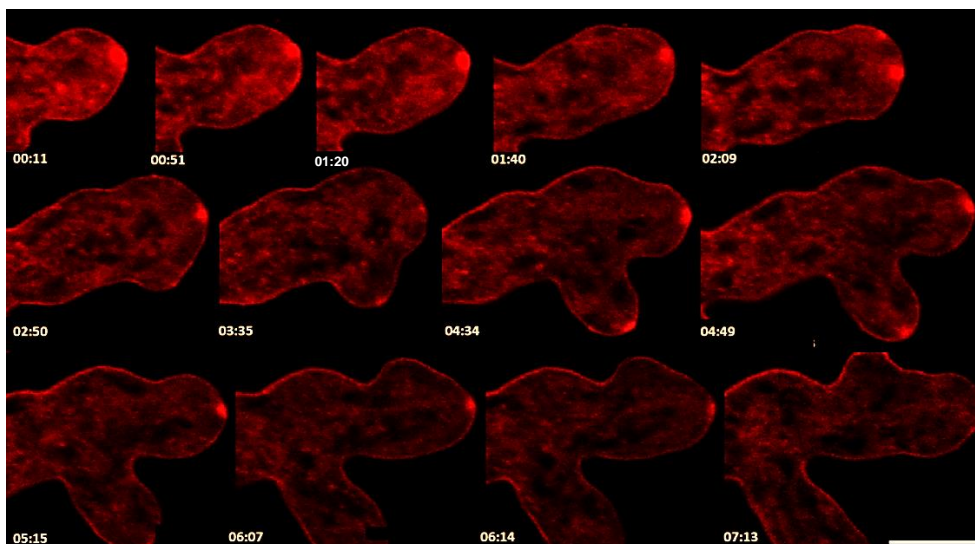


**Figura 32.** Microscopia confocal de la cepa YFP-RAC tratada con DFMO 4 mM. RAC cambió su localización típica, abarcando el domo apical. Barra de escala 10  $\mu$ m.

También se llegó a ver cerca de la punta una acumulación de fluorescencia que llegó a colocalizar con el Spk (Figura 33), sin embargo, esto fue breve, pero se presentó en varias ocasiones. Mediante la tinción con FM4-64 se pudo observar como el Spk mostró alteraciones en su dinámica, llegando a formarse dos Spk en la zona apical, que finalmente dieron lugar a ramificaciones apicales, las cuales no son típicas en una cepa silvestre (Figura 34)

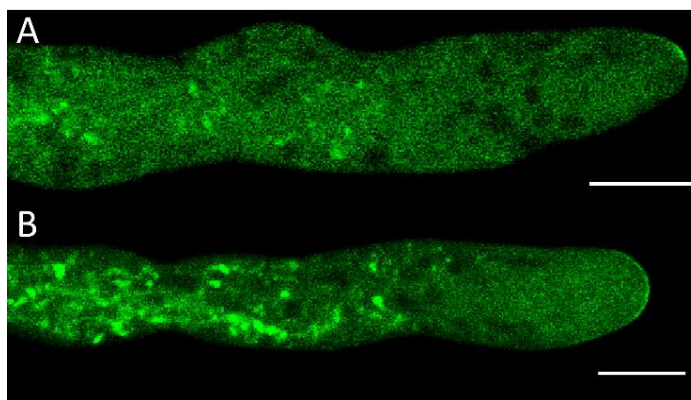


**Figura 33.** Localización de RAC en presencia de DFMO 4mM. RAC (verde), el Spk (rojo), imagen combinada (merge), la colocalización se observa en naranja. Barra de escala 10  $\mu$ m.

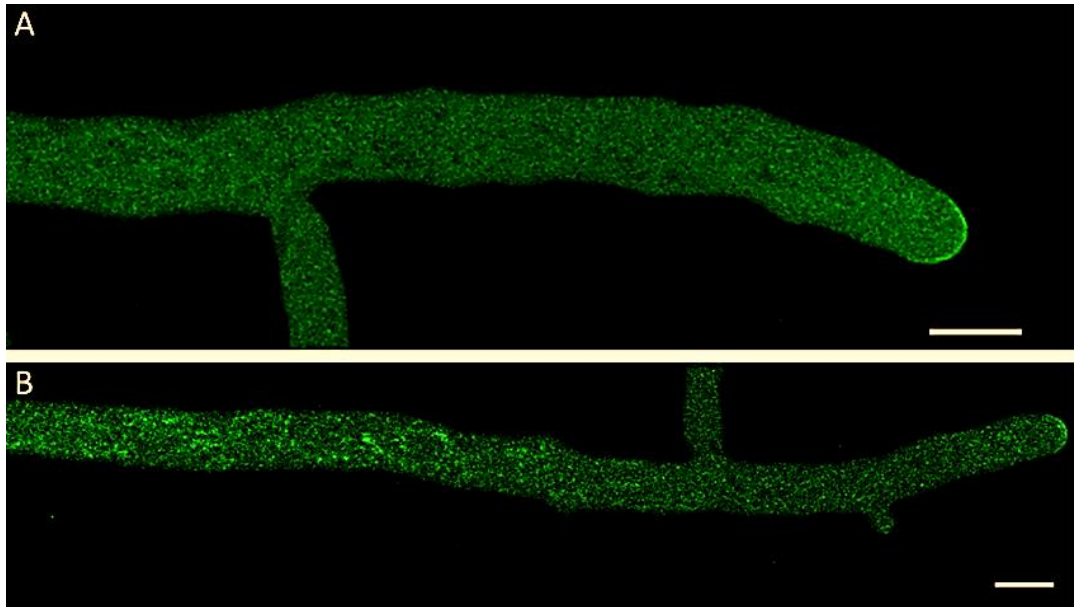


**Figura 34.** Tinción con FM4-64 en la cepa YFP-RAC tratada con DFMO 4 mM. El Spk tuvo una dinámica atípica, generándose hasta dos Spk por hifa. Barra de escala 10  $\mu$ m.

Otra observación notoria fue que en la cepa YFP-CDC-42 se llegaron a ver cúmulos de fluorescencia en las regiones distales de las hifas, siendo más numerosos en presencia de DFMO (Figura 35 A y B). Estas acumulaciones no se observaron en la cepa control YFP-RAC, sin embargo, si se presentaron al ser tratadas con DFMO, aunque no fueron tan notorias (Figura 36 A y B).



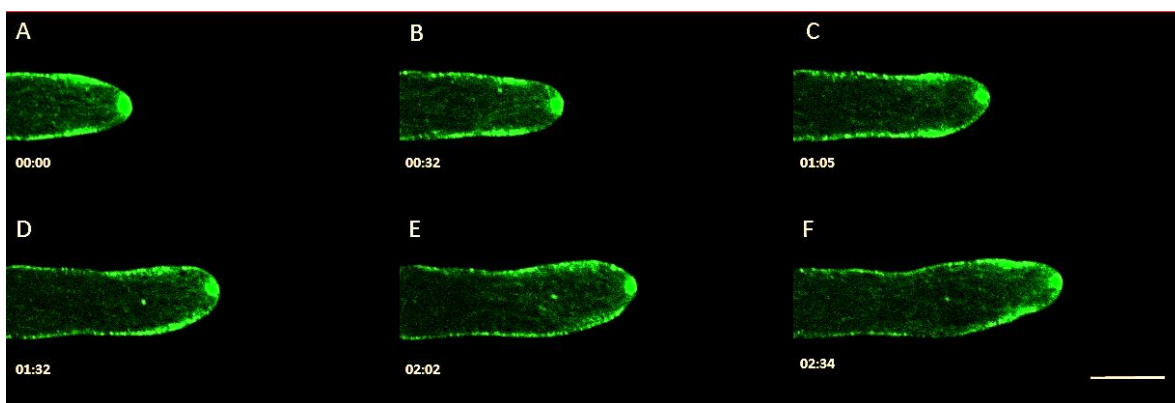
**Figura 35.** Cúmulos fluorescentes en la cepa YFP-CDC-42. Éstos se observaron en el control (A) y en presencia de DFMO 4 mM (B), siendo mayor su número luego del tratamiento con el inhibidor. Barras de escala 10  $\mu$ m.



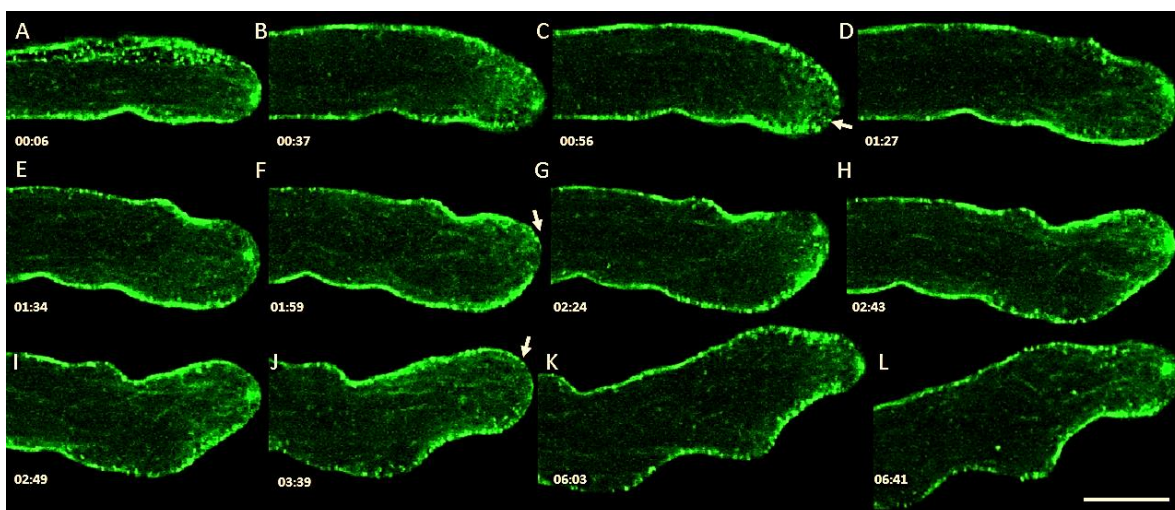
**Figura 36.** Cúmulos fluorescentes en la cepa YFP-RAC. Control (A) y en presencia de DFMO 4 mM (B). A diferencia de la cepa YFP-CDC-42, aquí solo llegaron a observar en la cepa tratada con DFMO. Barras de escala 10  $\mu$ m.

En cuanto a la F-actina, esta se pudo observar con el uso del péptido de unión a actina Lifeact-GFP. Datos recabados en trabajos previos mostraron que, en las hifas, la F-actina colocaliza con el Spk y también en la membrana, específicamente en la región subapical (Figura 37 A-F).

Cuando la cepa Lifeact-GFP fue tratada con DFMO 4mM, la actina mostró una dinámica distinta a la vista en la cepa control. Además de ver como las hifas crecían irregularmente, la actina localizada en la punta llegó a desaparecer momentáneamente a lo largo de las observaciones (Figura 38 C, F y J). Cuando esto ocurría, las hifas detenían su crecimiento e inmediatamente después, la actina comenzó a acumularse de nuevo en la zona apical (Figura 38 D, E, G, H, I, K y L). Este estado fue transitorio, ya que finalmente volvía a localizarse en la punta, reanudando el crecimiento de la hifa.



**Figura 37.** Localización de la F-actina. En la cepa control Lifest-GFP se pudo observar una localización constante de la F-actina en la punta y en los parches de la zona subapical. Barra de escala 10  $\mu$ m.



**Figura 38.** Localización de la F-actina en presencia de DFMO 4 mM. Se distinguen los eventos donde la actina de la zona apical se desvanece (flechas), afectando momentáneamente el crecimiento de la hifa (C, F y J) hasta que su localización apical vuelve a ser observada (D, E, G, y K). Barra de escala 10  $\mu$ m.

### 3.7 Cuantificación de poliaminas

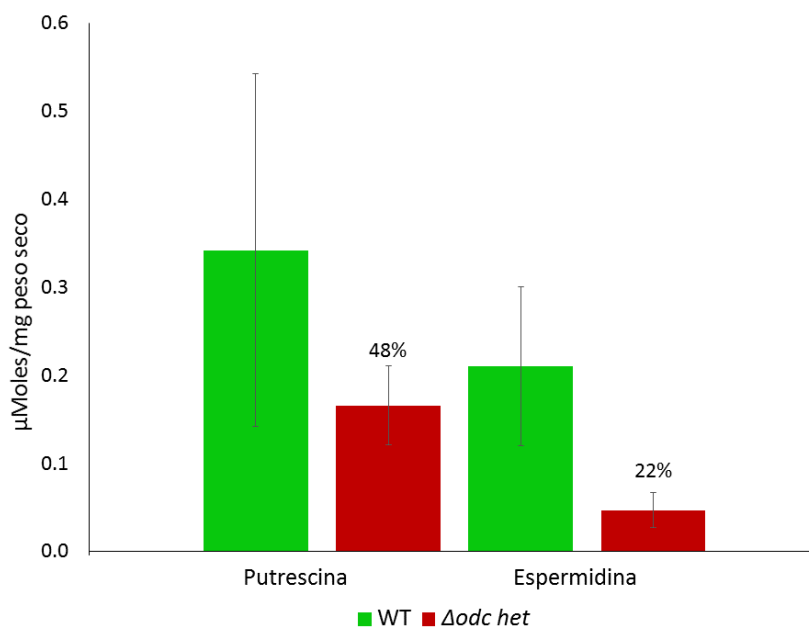
La cantidad de poliaminas se calculó a partir del análisis de las muestras de putrescina, espermidina y espermina en concentraciones de 20, 40, 60 y 80 mM, de donde se obtuvo una curva de concentración que se usó para determinar la cantidad de poliaminas extraídas de la cepa silvestre y de la mutante.



Únicamente se llegaron a cuantificar la putrescina y la espermidina, ya que la espermina no se pudo detectar (Anexo C). Los valores de concentración se promediaron (Tabla 4). En la cepa mutante se observó una disminución de la putrescina y la espermina (Figura 39), de acuerdo a lo esperado.

**Tabla 4.** Concentración de poliaminas en la cepa silvestre y en la cepa mutante  $\Delta odc$  het.

	Putrescina ( $\mu\text{moles/mg}$ )	Espermidina ( $\mu\text{moles/mg}$ )
WT	$0.34 \pm 0.2$	$0.21 \pm 0.05$
$\Delta odc$ het	$0.17 \pm 0.09$	$0.047 \pm 0.02$



**Figura 39.** Concentración de putrescina y espermidina en la cepa silvestre y en la cepa mutante  $\Delta odc$  het. Las barras de error representan la desviación estándar.

## Capítulo 4. Discusión

---

La cepa mutante homocarión de ODC resultó ser inviable, tal como lo documentaron McDougall *et al.*, 1977; Davis *et al.*, 1987, indicándonos que la enzima ornitina descarboxilasa es fundamental para el desarrollo de *N. crassa*. Por lo anterior, se optó por trabajar con la cepa heterocarión, los datos obtenidos de su caracterización dieron buenos puntos para comparar el grado de perturbación en diferentes estadios de su desarrollo. Para la tasa de crecimiento, producción de conidios y de micelio aéreo los valores fueron menores, de acuerdo a la hipótesis que se planteó. Sin embargo, los resultados de la producción de biomasa no siguieron la misma tendencia, ya que, si bien hubo una disminución, no fue estadísticamente significativa; la razón de esto se atribuye a que la cepa  $\Delta odc$  heterocarión genera una mayor cantidad de ramas por hifa, y, en consecuencia, aumentando la masa total del micelio, amortiguando la deficiencia en el crecimiento, resultando que los valores de la producción de biomasa tuvieran solo un 18% de diferencia con la cepa silvestre. Lo anterior podría confirmarse con un mayor número de muestras (n) de las que se cuantificaron.

El aumento en la ramificación de la cepa  $\Delta odc$  resultó similar, aunque no en la misma proporción, a lo descrito en las cepas mutantes  $\Delta cdc-42$  y  $\Delta rac$ , que poseen un fenotipo con hiperamificaciones, un crecimiento inhibido además de una pérdida en la polaridad (Araujo-Palomares *et al.*, 2011). Observaciones adicionales muestran como la mutante  $\Delta odc$  crece de una manera considerablemente irregular y con micelio más denso que la silvestre (Figura 22 y 23B), correlacionándose también con lo observado por Araujo-Palomares (2011).

Las diferencias arriba mencionadas en la cepa  $\Delta odc$  heterocarión son atribuidas a la existencia de poliaminas que siguen siendo sintetizadas. Al adicionar putrescina en concentraciones tolerables (0.2-1 mM), le estaría permitiendo a la cepa mutante aumentar la síntesis de espermidina y espermina, y recuperar su fenotipo silvestre, viéndose aún más afectada cuando se adiciona la putrescina en dosis tóxicas (2 mM). Respecto a las ascosporas homocariones, al carecer por completo de la proteína ODC, no tienen una fuente endógena de poliaminas que sustente su crecimiento, y, por lo tanto, requieren mayores cantidades que la heterocarión, llegando a tolerar los 2 mM de putrescina sin verse afectadas.

Con respecto a la adición de concentraciones altas de poliaminas, hay dos factores a contemplar y que pueden estar repercutiendo; uno es, que las poliaminas a concentraciones altas, en especial la putrescina, estarían influyendo directamente de manera negativa sobre la actividad de la ODC inhibiéndola, según lo reportado por Davis *et al.*, (1985). Por esta razón al añadir concentraciones altas

de putrescina a la cepa heterocarión, presentó un crecimiento más afectado, también debido a que las poliaminas pueden ser catabolizadas en compuestos dañinos como la acroleína, amoníaco y especies reactivas de oxígeno (Pegg, 2013). El otro factor a considerar es el ingreso de la putrescina a través de proteínas transmembranales, estas proteínas transportadoras tienen niveles de saturación, con un valor  $K_m$  de 0.6mM para putrescina (Davis y Ristow, 1988), aunque también existe un sistema no saturable, pero de baja afinidad a poliaminas. Es posible que, mientras el sistema saturable alcanzó su valor máximo de transporte en los experimentos, el sistema no saturable continuó ingresando putrescina por difusión hasta alcanzar un punto de equilibrio, contribuyendo a un crecimiento continuo a través del tiempo. Sin embargo, al añadir concentraciones altas de putrescina, la cepa disminuyó en crecimiento, indicando los valores tóxicos para el hongo.

En cuanto a las ascosporas, éstas dejaron de crecer de acuerdo a la concentración de putrescina exógena añadida. A la menor concentración dejaron de crecer al cabo de 24 horas y a la mayor concentración a las 96 horas. Esto sugiere que es necesaria una mayor cantidad de poliaminas en la cepa homocarión; sin embargo, a un mayor tiempo de incubación ya no respondieron al estímulo, probablemente por el hecho de que las proteínas de los canales de transporte son sensibles a las concentraciones de iones monovalentes. Especialmente a los iones de calcio ( $Ca^{2+}$ ), abundantes en el medio mínimo de Vogel y en el medio para aislamiento de colonia. Esto, sin dejar de mencionar la vasta cantidad de defectos fisiológicos originados por la delección del gen *odc*.

Por otra parte, cabe mencionar que las ascosporas de la mutante nula de la agmatinasa ( $\Delta ags-1$ ), las cuales son incapaces de sintetizar poliaminas mediante la ruta alterna, no reaccionan ante el estímulo de la putrescina exógena (Pérez-Mozqueda, 2015). Estas observaciones sugieren que, aunque la ODC y la AGS-1 intervienen en la síntesis de poliaminas es muy posible que sus productos participen en procesos celulares distintos, siempre teniendo a la ruta constitutiva con una mayor participación en la síntesis de poliaminas tal como se ha descrito desde décadas atrás y la ruta alterna puede estar implicada en eventos de importancia en el crecimiento y desarrollo.

Los resultados de la cuantificación de las poliaminas fueron de acuerdo a lo esperado, confirmando que, al eliminar el gen de la ODC, al menos de manera parcial para el caso de la mutante heterocarión, la cantidad de poliaminas generadas en la mutante es menor que en la cepa silvestre. La putrescina y la espermidina tuvieron una disminución del 52% y 78%, respectivamente, en comparación con la cepa silvestre. Estas diferencias son mayores que las obtenidas en la mutante de agmatinasa ( $\Delta ags-1$  het), donde se encontró que la cantidad de putrescina y espermidina disminuía en 22% y 2%, respectivamente

(Pérez-Mozqueda, 2015). Lo anterior indica que la ODC, produce la mayor cantidad de poliaminas presentes en *N. crassa*.

Mediante un análisis microscópico a mayor aumento, se pudo observar como la cepa mutante heterocarión presenta deformidades en sus hifas y un Spk más pequeño, comparado con la cepa silvestre. Al parecer se encuentra parcialmente des-ensamblado y su dinámica no es tan estable como en la cepa silvestre. La morfología de las hifas se debe precisamente a la desestabilización del Spk, quien es el encargado de dirigir el crecimiento celular. Claramente se observa que una deficiencia de poliaminas repercute no solamente en la velocidad de crecimiento y demás defectos en la morfología colonial, sino también en la organización y estructura celular.

Con respecto a las Rho GTPasas CDC-42 y RAC, se planteó en un principio realizar una fusión vegetativa entre las cepas YFP-CDC-42 y YFP-RAC con la cepa  $\Delta odc$ , no obstante, debido a que la mutante homocarión es inviable, se planteó una fusión con la cepa heterocarión. La propuesta anterior se descartó, ya que una mutante heterocarión arrojaría datos sesgados y no proporcionarían la información necesaria para emitir un juicio certero acerca de los efectos que tienen la privación de poliaminas en estas GTPasas. Por lo anterior, se procedió a utilizar DFMO, con el fin de inhibir a la ODC, simulando los efectos de una mutante nula del gen *odc*. El tratamiento fue previo a escanear las cepas en el microscopio confocal.

En presencia de DFMO, CDC-42 no mostró estar afectada en su localización, sin embargo, su ubicación llegó a cambiar, ocupando un área mayor e incluso llegando a verse en todo el domo apical. RAC por su parte, tuvo una dinámica en la que se observó extenderse hacia la punta de la hifa, sobre la zona de localización de CDC-42, región en donde se llegó a observar un fenómeno que fue descrito como solubilización; formando una "nube" de fluorescencia en el citosol que llegó a colocalizar con el Spitzenkörper. Además, la cepa YFP-CDC-42 mostró acumulaciones de fluorescencia en la región distal de la hifa, en promedio a 50 $\mu$ m.

Estos hallazgos pueden indicar que el DFMO, al provocar la privación de una fuente de poliaminas en *N. crassa*, afecta a las Rho GTPasas involucradas en el crecimiento polarizado.

La literatura sugiere que lo anteriormente mencionado se debe al hecho de que una ausencia de poliaminas estaría afectando a las moléculas GEF o GDI (Ray *et al.*, 2007; Ray *et al.*, 2011), inhibiendo la unión de CDC-42 y RAC a GTP, volviéndolas proteínas solubles en el citoplasma en lugar de estar unidas a

la membrana plasmática. Los resultados obtenidos son insuficientes para asegurar que esto esté ocurriendo, solamente se puede inferir que los defectos en sus dinámicas son debido a todos los procesos afectados por la falta de poliaminas, desde la transcripción de los genes, su traducción y su respectiva función.

Con respecto a los puntos de fluorescencia encontrados en las regiones distales de la cepa YFP-CDC-42 posiblemente sean también un efecto de la ausencia de poliaminas, similar a las observaciones descritas en epitelio intestinal de rata (Vaidya *et al.*, 2004), donde la Rho GTPasa RAC cambia su localización en la membrana hacia la región perinuclear, previniendo su activación y afectando la homeostasis del citoesqueleto de actina. Sin embargo, cabe la posibilidad que estas acumulaciones se vean incrementadas debido a los efectos generales que ocasiona el DFMO, puesto que se presentan aún en la cepa control YFP-CDC-42.

## Capítulo 5. Conclusiones

---

- La delección del gen *odc*, que codifica para la proteína ornitina descarboxilasa (ODC) genera un fenotipo de letalidad, indicando que es esencial para el correcto desarrollo de *N. crassa*.
- La cepa  $\Delta odc$  heterocarión produce una menor cantidad de poliaminas con respecto a la cepa silvestre.
- La cepa mutante  $\Delta odc$  heterocarión presenta defectos en su morfofisiología.
- Al inhibir la actividad ODC se afecta la dinámica de las proteínas Rho GTPasas CDC-42 y RAC.
- La actina también se ve afectada al inhibir la ODC, repercutiendo en el crecimiento de las hifas.

## Literatura citada

---

- Algranati, I.D. y Goldemberg, S.H. (1977). Polyamines and protein synthesis: Studies in various polyamine-requiring mutants of *Escherichia coli*. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 16(2), 71.
- Almud, J.J., Oliveira, M.A., Kern, A.D., Grishin, N.V, Phillips, M.A., y Hackert, M.L. (2000). Crystal structure of human ornithine decarboxylase at 2.1 Å resolution: structural insights to antizyme binding. *Journal of Molecular Biology*, 295(1), 7-16.
- Araujo-Palomares, C.L., Richthammer, C., Seiler, S. y Castro-Longoria, E. (2011). Functional Characterization and Cellular Dynamics of the CDC-42 - RAC - CDC-24 Module in *Neurospora crassa*. *PLoS One*, 6(11), 1-15.
- Bey, P., Danzin, C., Van Dorsselaer, V., Mamont, P., Jung, M., y Tardif, C. (1977). Analogues of ornithine as inhibitors of ornithine decarboxylase. New Deductions Concerning the Topography of the Enzyme's Active Site. *Journal of Medicinal Chemistry*, 21(1), 50-55.
- Beadle G.W. y Tatum E.L. (1941). Genetic control of biochemical reactions in *Neurospora*. *PNAS*, 27(11), 499-506.
- Bitonti A.J., y Couri D. (1981). Drug-induced migration of cytoplasmic ornithine decarboxylase into rat liver nucleus is not related to increased RNA polymerase activity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 99(4), 1040-1044.
- Borkovich, K.A., Alex, L.A., Yarden, O., Freitag, M., Turner, G.E., Read, N.D., Seiler, S., Bell-Pedersen, D., Paietta, J., Plesofsky, N., Plamann, M., Goodrich-Tanrikulu, M., Schulte, U., Mannhaupt, G., Nargang, F.E., Radford, A., Selitrennikoff, C., Galagan, J.E., Dunlap, J.C., Loros, J.J., Catchside, D., Inoue, H., Aramayo, R., Polymenis, M., Selker, E.U., Sachs, M.S., Marzluf, G.A., Paulsen, I., Davis, R., Ebbole, D.J., Zelter, A., Kalkman, E.R., O'Rourke, R., Bowring, F., Yeadon, J., Ishii, C., Suzuki, K., Sakai, W. y Pratt, R. (2004). Lessons from the Genome Sequence of *Neurospora crassa*: Tracing the Path from Genomic Blueprint to Multicellular Organism. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 68(1), 1-108.
- Ceriani, M.C. (1997). Metabolismo de poliaminas en *Crithidia fasciculata*: Caracterización, clonado y secuenciación de la enzima ODC. Tesis de Doctorado en Ciencias. Universidad de Buenos Aires. pp. 115
- Chapin, F.S., Matson, P.A., y Mooney, H.A. (2002). Principles of terrestrial ecosystem ecology. New York: Springer. pp. 153.
- Chen, G., Kim, Y. y Chan, C.S.M. (1997). The Cdc42 GTPase-associated proteins Gic1 and Gic2 are required for polarized cell growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes y development*, 11(22), 2958-2971.
- Cohen, S.S. (1998). A guide to the polyamines. Estados Unidos. Oxford University Press. pp. 595.

- Cohn, M. S., White, C. y Tabor, H. (1980). Regulatory mutations affecting ornithine decarboxylase activity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bacteriology*, 142(3), 791-799.
- Davis, R.H. (2000). *Neurospora: Contributions of a model organism*. Estados Unidos: Oxford University Press. pp. 333.
- Davis, R.H., Krasner, G. N., DiGangi, J. J., y Ristow, J. L. (1985). Distinct roles of putrescine and spermidine in the regulation of ornithine decarboxylase in *Neurospora crassa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 82(12), 4105–4109.
- Davis, R.H., Lawless, M.B. y Port, L.A. (1970). Arginaseless *Neurospora*: Genetics, Physiology, and Polyamine Synthesis. *Journal of Bacteriology*, 102(2), 299-305.
- Davis, R.H., Lieu, P., y Ristow, J.L. (1994). *Neurospora* mutants affecting polyamine-dependent processes and basic amino acid transport mutants resistant to the polyamine inhibitor,  $\alpha$ -difluoromethylornithine. *Genetics*, 138(3), 649–655
- Davis, R.H. y Ristow, J.L. (1988). Polyamine Transport in *Neurospora crassa*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 267(2), 479-489.
- Davis, R.H. y Ristow, J.L. (1991). Polyamine Toxicity in *Neurospora crassa*; Protective Role of the Vacuole. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 285(2), 306-311.
- Delgado-Álvarez, D. L., Callejas-Negrete, O. a., Gómez, N., Freitag, M., Roberson, R. W., Smith, L. G., and Mouriño-Pérez, R. R. (2010). Visualization of F-actin localization and dynamics with live cell markers in *Neurospora crassa*. *Fungal Genetics and Biology*, 47(7), 573-586.
- Fong, W.F., Heller, J.S. y Canellakis, E.S. (1976). The appearance of an ornithine decarboxylase inhibitory protein upon the addition of putrescine to cell cultures. *Biochimica et Biophysica Acta*, 428(2), 456-465.
- Galagan, J. E., Calvo, S. E., Borkovich, K. A., Selker, E. U., Read, N. D., Jaffe, D., ... Schulte, U. (2003). The genome sequence of the filamentous fungus *Neurospora crassa*, 422(6934), 859-868.
- Gao, J.-H., Guo, L.-J, Huang, Z.-Y, Rao, J.N. y Tang, C.W. (2013). Roles of cellular polyamines in mucosal healing in the gastrointestinal tract. *Journal of physiology and pharmacology*, 64(6), 681-693.
- Heby, O., y Persson, L. (1990). Molecular genetics of polyamine synthesis in eukaryotic cells. *Trends in Biochemical Sciences*, 15(4), 153-158.
- Heiskala, M., Zhang, J., Hayashi, S., Hölttä, E., y Andersson, L.C. (1999). Translocation of ornithine decarboxylase to the surface membrane during cell activation and transformation. *The EMBO Journal*, 18(5), 1214-22.
- Herrero, A.B., López, M.C., García, S., Schmidt, A., Spaltmann, F., Ruiz-herrera, J., y Domínguez, A. (1999). Control of Filament Formation in *Candida albicans* by Polyamine Levels. *Infection and Immunity*, 67(9), 4870–4878.



- Inderlied, C.B., Cihlar, R.L. y Sypherd, P.S. (1980). Regulation of ornithine decarboxylase during morphogenesis of *Mucor racemosus*. *Journal of bacteriology*, 141(2), 699-706.
- Jack, D. L., Paulsen, I. T. y Saier, J. (2000). The amino acid/polyamine/organocation (APC) superfamily of transporters specific for amino acids, polyamines and organocations. *Microbiology*, 146(8), 1797-1814.
- Keeling, P., Leander, B.S. y Simpson, A. (2009). Eukaryotes. Eukaryota, Organisms with nucleated cells. Version 28 October 2009. Consultado el 9 de noviembre de 2016, de <http://tolweb.org/Eukaryotes/3/2009.10.28>
- Kern, A. D., Oliveira, M.A., Coffino, P., y Hackert, M. L. (1999). Structure of mammalian ornithine decarboxylase at 1.6 Å resolution: Stereochemical implications of PLP-dependent amino acid decarboxylases. *Structure*, 7(5), 567-581.
- Kidron, H., Repo, S., Johnson, M.S. y Salminen, T.A. (2007). Functional classification of amino acid decarboxylases from the alanine racemase structural family by phylogenetic studies. *Molecular Biology and Evolution*, 24(1), 79-89.
- Kronstad, J.W. y Staben, C. (1997). Mating type in filamentous fungi. *Annual review of genetics*, 31(1), 245-276.
- Kucharzewska, P., Welch, J.E., Svensson, K.J. y Belting, M. (2010). Ornithine decarboxylase and extracellular polyamines regulate microvascular sprouting and actin cytoskeleton dynamics in endothelial cells. *Experimental Cell Research*, 316(16), 2683-2691.
- Lee, F-J. S. y Hsu, J-W. (2013). Arf3p GTPase is a key regulator of Bud2p activation for invasive growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Biology of the Cell*, 24(15), 2328-39.
- Lodish H.F., Berk, A., Lawrence-Zipursky, Matsudaira, S.P., Baltimore, D., y Darnell, J. (2008). *Molecular Cell Biology*, 6th edition. New York: W. H. Freeman.
- López-Contreras, A.J. (2008). Caracterización de ODCp como una nueva proteína inhibidora de antizimas (AZIN2). Aspectos estructurales y funcionales. Tesis de Doctorado. Universidad de Murcia.
- Marchler-Bauer, A., Derbyshire, M.K., Gonzales, N.R., Lu, S., Chitsaz, F., Geer, J.H., Gwadz, M., Hurwitz, D.I., Lanczycki, C.J., Lu, F., Marchler, G.H., Song, J.S., Thanki, N., Wang, Z., Yamashita, R.A., Zhang, D., Zheng, C. y Bryant, S.H. (2015). CDD: NCBI's conserved domain database. 43(Database Issue), 222-226.
- Martell, A.E. (1982). Reaction pathways and mechanisms of pyridoxal catalysis. *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology*. 53, 163-199.
- McCormack, S.A., Ray, R.M., Blanner, P.M., y Johnson, L.R. (1999). Polyamine depletion alters the relationship of F-actin, G-actin, and thymosin beta4 in migrating IEC-6 cells. *The American Journal of Physiology*, 276(2), C459-C468.

- McCormick, F. (1977). Polyamine Metabolism in Enucleated Mouse L-Cells. *Journal of Cellular Physiology*, 93(2), 285-292.
- McDougall, K. J., Deters, J. y Miskimen J. (1977). Isolation of putrescine-requiring mutants of *Neurospora Crassa*. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 43(2), 143-151.
- Medina-Enriquez, M.M. (2009). Caracterización de la inhibición de la ornitina descaboxilasa por la cloroacetil-l-ornitina y su posible efecto antineoplásico. Tesis de Maestría en Ciencias. Instituto Politécnico Nacional. pp.60.
- Mendoza-Forero, C. y Rocha-Salavarrieta, P.J. (2002). Poliaminas: reguladores del crecimiento con múltiples efectos en las plantas. *Palmas*, 23(4), 39-46.
- Metcalf, B.W., Bey, P., Danzin, C., Jung, M.J., Casara, P. y Vevert, J.P. (1978). Catalytic irreversible inhibition of mammalian ornithine decarboxylase by substrate and product analogs. *Journal of the American Chemical Society*, 100(8), 2551-2553
- Micklos, D.A. y Freyer, G.A. (2003). *DNA Science: A first course*. Estados Unidos. CSHL Press.
- Miyamoto S., Kashiwagi K., Ito K., Watanabe S., Igarashi K. Estimation of polyamine distribution and polyamine stimulation of protein synthesis in *Escherichia coli* (1993). *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 300(1), 63-8.
- Mistry, S.K., Burwell, T.J., Chambers, R.M., Rudolph-Owen, L., Spaltmann, F., Cook, W.J. y Morris, S.M. (2002). Cloning of human agmatinase. An alternate path for polyamine synthesis induced in liver by hepatitis B virus. *American Physiological Society*, 282(2), G375-G381.
- Morera-Oliveros, B. (2001). Producción de poliaminas en *Phycomyces blakesleeanus*. Tesis de Doctorado en Ciencias. Universidad de Sevilla. pp. 110.
- Müller, S., Da'dara, A., Lüersen, K., Wrenger, C., Das Gupta, R., Madhubala, R. y Walter, R.D. (2000). In the Human Malaria Parasite *Plasmodium falciparum*, polyamines are synthesized by a bifunctional ornithine decarboxylase, S-adenosylmethionine Decarboxylase. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(11), 8097-8102.
- Murakami, Y., Matsufuji, S., Hayashi, S., Tanahashi, N. y Tanaka, K. (2000). Degradation of ornithine decarboxylase by the 26S proteasome. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 267(1), 1-6.
- Nobes, C.D. y Hall, A. (1995). Rho, Rac, and Cdc42 GTPases Regulate the Assembly of Multimolecular Focal Complexes Associated with Actin Stress Fibers, Lamellipodia, and Filopodia. *Cell*, 81(1), 53-62.
- Palanivelu, R. y Preuss, D. (2000). Pollen tube targeting and axon guidance: parallels in tip growth mechanisms. *Trends in cell biology*, 10(12), 517-524.
- Paulus, T.J., Kiyono, P. y Davis, R.H. (1982). Polyamine-deficient *Neurospora crassa* mutants and synthesis of cadaverine. *Journal of bacteriology*, 152(1), 291-297.

- Pegg, A.E. (2013). Toxicity of Polyamines and Their Metabolic Products. *Chemical Research in Toxicology*, 26(12), 1782-1800.
- Perez-Mozqueda, L.L. (2015). Localización y papel de la agmatinasa en el crecimiento celular del hongo *Neurospora crassa*. Tesis de Doctorado en Ciencias. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California. pp. 59.
- Perkins, D.D. y Davis, R.H. (2002). *Neurospora*: a model of model microbes. *Nature Reviews*, 3(5), 7-13.
- Pittendrigh, C.S., Bruce, V.G., Rosenzweig, N.S. y Rubin, M.L. (1959). Growth Patterns in *Neurospora*: A biological clock in *Neurospora*. *Nature*, 184(4681), 169-170.
- Poulin, R., Lu, L., Ackermann, B., Bey, P. y Pegg, A. E. (1992). Mechanism of the irreversible inactivation of mouse ornithine decarboxylase by  $\alpha$ -difluoromethylornithine. Characterization of sequences at the inhibitor and coenzyme binding sites. *Journal of Biological Chemistry*, 267(1), 150-158.
- Ray, R.M., Vaidya, R.J., y Johnson, L.R. (2007). MEK/ERK Regulates Adherens Junctions and Migration Through Rac1, 64(3), 143-156.
- Ray, R.M., Bavaria, M.N., Bhattacharya, S., y Johnson, L.R. (2011). Activation of Dbl restores migration in polyamine-depleted intestinal epithelial cells via Rho-GTPases, 300(6), 988-997.
- Reynoso-Orozco, R., Delgado-Saucedo, J.I., Puebla-Pérez, A.M., Calvo-Méndez, C., Carr, D., Velázquez-Magaña, S. y Santerre, A. (2008). Difluorometil ornitina y el extracto acuoso de *Bursera fagaroides* en el modelo de linfoma murino L5178y en ratones Balb/C: Comparación de su efecto en el metabolismo de las poliaminas. *Revista de salud animal*, 30(2), 128-132.
- Riquelme, M. Yarden., O., Bartnicki-Garcia, S., Bowman, B., Castro-Longoria, E., Free, S.J., Fleißner, A., Freitag, M., Lew, R.R., Mouriño-Pérez, R., Plamann, M., Rasmussen, C., Richthammer, C., Roberson, R.W., Sanchez-Leon, E., Seiler, S. y Watters, M.K. (2011). Architecture and development of the *Neurospora Crassa* Hypha - A model cell for polarized growth. *Fungal Biology*, 115(6), 446-474.
- Roa-Cordero, M.V. y Rosas-Quijano, R. (2013). La Biosíntesis de las poliaminas en el hongo fitopatógono *Macrophomina Phaseolina*. *Revista mexicana de fitopatología*, 31(1), 45-59.
- Sahai, E. y Marshall, C.J. (2002). RHO-GTPases and cancer. *Nature Reviews Cancer*, 2(2), 133-142.
- San-Blas, G., Sorais, F., San-Blas, F. y Ruiz-Herrera, J. (1996). Ornithine decarboxylase in *Paracoccidioides brasiliensis*. *Archives of microbiology*, 165(5), 311-316.
- Sargent, M.L. y Briggs, W.R. (1967). The effects of light on a circadian rhythm of condiation in *Neurospora*. *Planta Physiology*, 42(11), 1504-1510.
- Selker, E.U. (1990). Premeiotic instability of repeated sequences in *Neurospora Crassa*. *Annual review of genetics*, 24, 579-613.
- Schipper, R. G., y Verhofstad, A.A.J. (2002). Distribution patterns of ornithine decarboxylase in cells and tissues: facts, problems, and postulates. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry: Official Journal of the Histochemistry Society*, 50(9) 1143-1160.

- Tabor, C. y Tabor H. (1985). Polyamines in microorganisms. *Microbiological Reviews*, 49(1), 81-99.
- Tapas, S., Kumar, P., Madhubala, R. y Tomar, S. (2012). Biochemical, Mutational and In Silico Structural Evidence for a Functional Dimeric Form of the Ornithine Decarboxylase from *Entamoeba histolytica*, 6(2), 1-15.
- Taylor J.W., Bowman B.H., Berbee M.L. y White, T.J. (1993). Fungal model organisms: Phylogenetics of *Saccharomyces*, *Aspergillus*, and *Neurospora*. *Systematic Biology*, 42(4), 440-457.
- Terui, Y., Ohnuma, M., Hiraga, K., Kawashima, E. y Oshima, T. (2005). Stabilization of nucleic acids by unusual polyamines produced by an extreme thermophile, *Thermus thermophilus*. *Biochemical Journal*, 388(2), 427-433.
- Tobias, K. E., y Kahana, C. (1993). Intersubunit location of the active site of mammalian ornithine decarboxylase as determined by hybridization of site-directed mutants. *Biochemistry*, 32(22), 5842-7.
- Uribe E., Salas M., Enriquez S., Orellana M.S. y Carvajal, N. (2007) Cloning and functional expression of a rodent brain cDNA encoding a novel protein with agmatinase activity, but not belonging to the arginase family. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 461(1), 146-150
- Vaidya, R.J., Ray, R.M. y Johnson, L.R. (2004). MEK1 restores migration of polyamine-depleted cells by retention and activation of Rac1 in the cytoplasm. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 288(2), C350-C359.
- Valdés-Santiago, L., Cervantes-Chávez, J.A., Winkler, R., León-Ramírez, C.G. y Ruiz-Herrera, J. (2012). Phenotypic comparison of *samdc* and *spe* mutants reveals complex relationships of polyamine metabolism in *Ustilago maydis*. *Microbiology*, 158(3), 674–684.
- Van der Kleij, I.J. y Veenhuis, M. (2006). Yeast and filamentous fungi as model organisms in microbody research. *Biochimica et biophysica acta*, 1763(12), 1364-1373.
- Wang, X., Ying, W., Dunlap, K.A., Lin, G., Satterfield, M.C., Burghardt, R.C., Wu, G., y Bazer, F.W. (2014). Arginine decarboxylase and agmatinase: An alternative pathway for de novo biosynthesis of polyamines for development of mammalian conceptuses. *Biology of reproduction*, 90(4), 1-20.
- Watanabe S., Kusama-Eguchi K., Kobayashi H. e Igarashi K. (1991). Estimation of polyamine binding to macromolecules and ATP in bovine lymphocytes and rat liver. *The Journal of Biological Chemistry*. 266(31), 20803-9.
- Weiss, R.L., y Davis, R.H. (1973). Intracellular localization of enzymes of arginine metabolism in *Neurospora*. *The journal of biological chemistry*, 248(15), 5403-5408.
- Whitney, P.A, y Morris D.R. (1978). Polyamine auxotrophs of *Saccharomyces Cerevisiae*. *Journal of bacteriology*, 134(1), 214-220.
- Williams, K. (1997). Interactions of polyamines with ion channels. *Biochemical journal*. 325(2). 289-297.

Yu, J.H., Hamari, Z., Han, K-H., Seo, J.A., Reyes-Dominguez Y. y Scazzocchio, C. (2004). Double-joint PCR: a PCR-based molecular tool for gene manipulations in filamentous fungi. *Fungal genetics and biology*, 41(11), 973-981.

## Anexos

---

### Anexo A. Medios de cultivo utilizados

Medio mínimo de Vogel (MMV) 500mL	
Agar (opcional, solo para medio sólido)	7.5g (1.5%), 15g (3%)
Sacarosa	10g
Sales de Vogel	10mL
Elementos traza	2mL
Biotina 0.1mg/mL	1mL

Medio para aislamiento de colonia (FGS) 300mL	
Volumen final 200mL	
Sorbosa	5.3g
Sorbitol	48.5g
Agar	5.3g
Volumen final 100mL	
Sales de Vogel	8mL
Fructosa	0.20g
Glucosa	0.20g

Medio Luria-Bertani (LB) 500mL	
Triptona	5g
Extracto de levadura	2.5g
Cloruro de sodio	5g
Agar	10g

<b>Medio sintético de cruza (MSC) 500mL</b>	
<b>Nitrato de Potasio</b>	0.5g
<b>Fosfato de potasio dibásico</b>	0.35g
<b>Fosfato de potasio monobásico</b>	0.25g
<b>Sulfato de magnesio heptahidratado</b>	0.25g
<b>Cloruro de calcio</b>	0.05g
<b>Cloruro de sodio</b>	0.05g
<b>Sacarosa 1.5%</b>	7.5g
<b>Elementos traza</b>	50µL
<b>Biotina 0.1mg/mL</b>	2.5mL
<b>Agar</b>	9g

## Anexo B. Datos de caracterización fenotípica de la cepa $\Delta odc$ heterocarión

Tasa de crecimiento (en centímetros)

Horas	15	18	21	24	27	30	33	36
WT	0.40	0.89	1.62	2.41	3.40	4.35	5.33	6.37
$\sigma$	0.059	0.16	0.24	0.284	0.357	0.396	0.478	0.522
$\Delta odc$ het	0.25	0.52	0.83	1.22	1.69	2.08	2.54	3.13
$\sigma$	0.032	0.08	0.153	0.185	0.249	0.307	0.355	0.307

Tasa de esporulación

Cepa	$1 \times 10^6$ Conidios/ml
WT	101.11
$\sigma$	12.19
$\Delta odc$ het	31.11
$\sigma$	8.21

Producción de biomasa

Cepa	mg/50mL
WT	66.52
$\sigma$	12.50
$\Delta odc$ het	54.44
$\sigma$	17.35



## Generación de hifas aéreas

Cepa	mm
WT	10.22
$\sigma$	1.39
$\Delta odc$ het	6.33
$\sigma$	0.50

## Índice de ramificación

Ramas por hifa	WT	$\Delta odc$ het
0	2	0
1	6	3
2	10	3
3	10	4
4	4	7
5	2	10
6	1	4
7	0	4
8	0	0

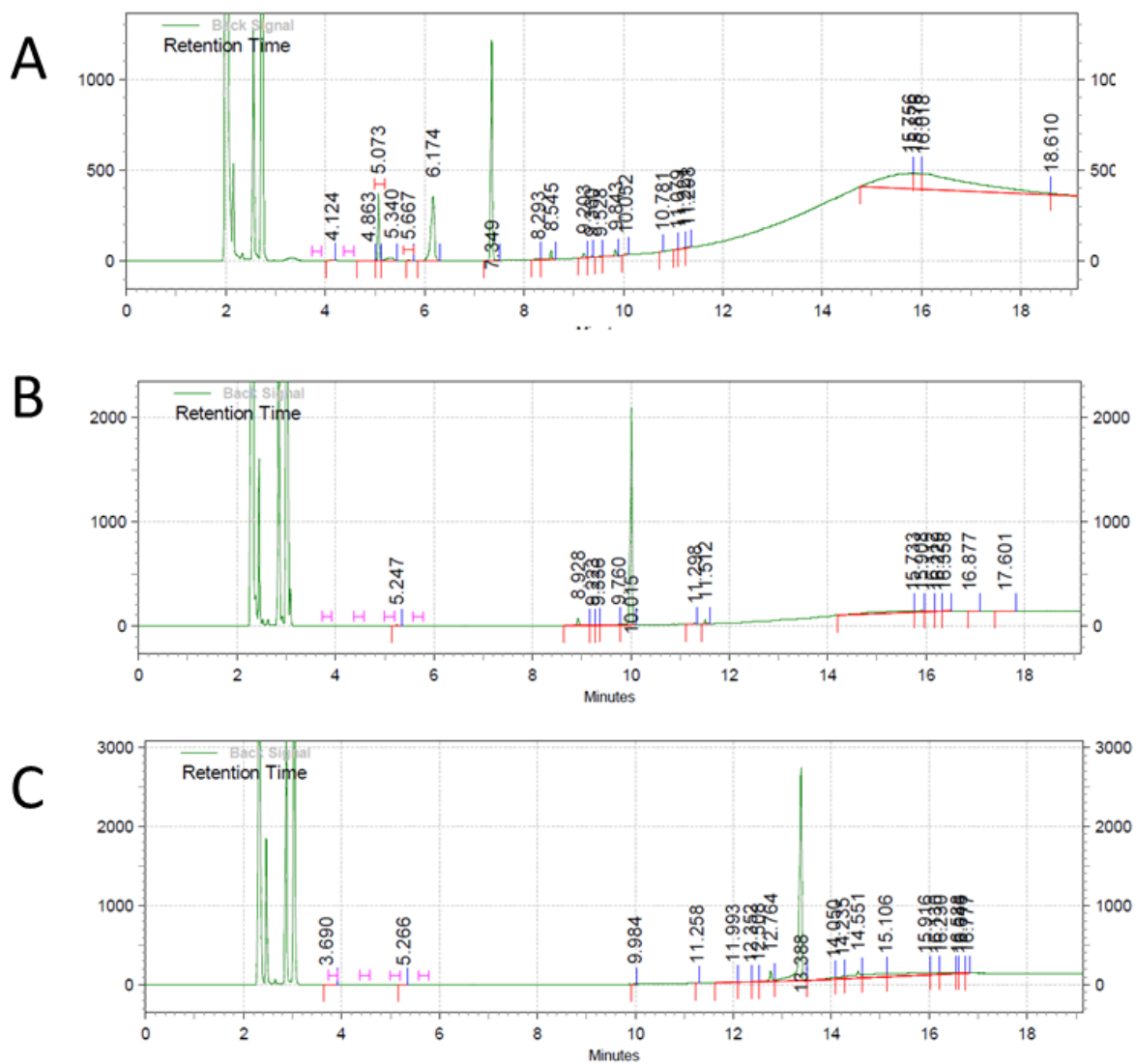
## Recuperación de fenotipo

Ramas por hifa	Put 0.2mM	Put 0.4mM	Put 0.6mM	Put 0.8mM	Put 1.0mM
0	0	0	0	2	1
1	0	3	1	7	6
2	2	8	6	16	16
3	9	18	18	8	8
4	15	6	7	2	4
5	6	0	3	0	0
6	3	0	0	0	0
7	0	0	0	0	0
8	0	0	0	0	0

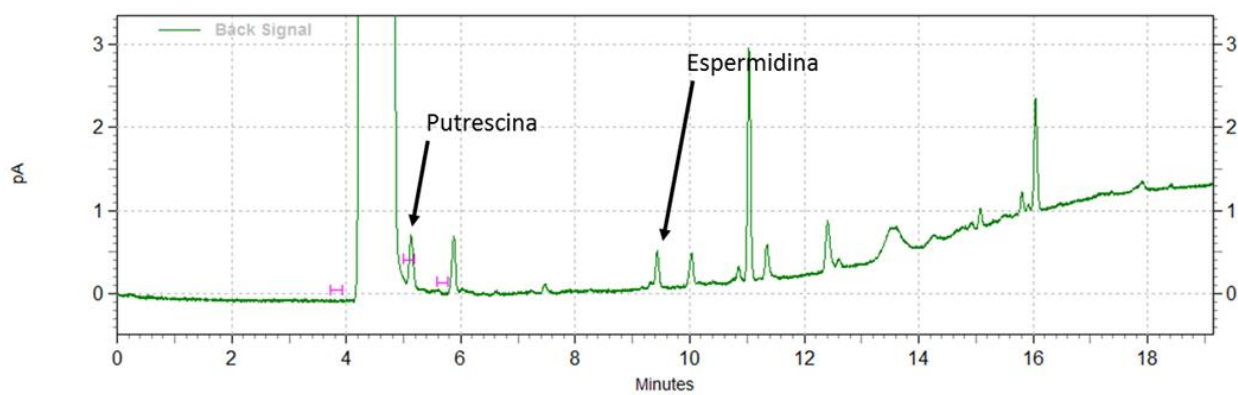
## Recuperación de ascosporas

	Crecimiento ( $\mu\text{m}$ )	Tiempo (hrs)
Control	300	24
0.8mM	500	40
1.0mM	500	48
1.5mM	800	63
2.0mM	1000	72

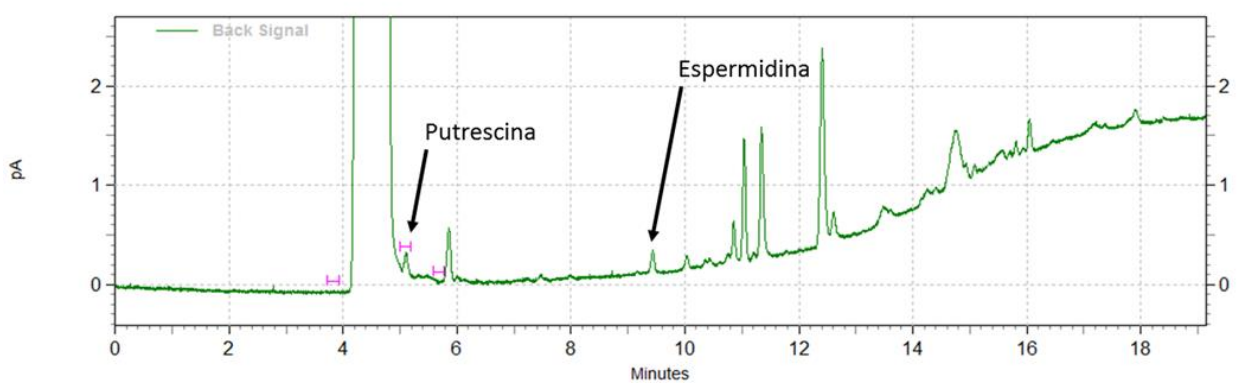
## Anexo C. Cromatogramas



Cromatogramas de las poliaminas purificadas. Putrescina con un tiempo de retención de 5 minutos (A), espermidina con un tiempo de retención de 10 minutos (B) y espermina con un tiempo de retención de 13.3 minutos (C).



Cromatograma de poliaminas extraídas en la cepa silvestre.



Cromatograma de poliaminas extraídas en la cepa  $\Delta odc$  heterocarión.