

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



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

**Caracterización enzimática de la agmatinasa de *Neurospora
crassa* y su relación con el citoesqueleto de actina**

Tesis

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

Presenta:

Luis Leobardo Pérez Mozqueda

Ensenada, Baja California, México
2020

Tesis defendida por
Luis Leobardo Pérez Mozqueda

y aprobada por el siguiente Comité

Dra. Ernestina Castro Longoria
Directora de tesis

Dr. Rafael Vázquez Duhalt

Dra. Rosa Reyna Mouriño Pérez

Dr. Enrique Rudiño Piñera



Dra. Patricia Juárez Camacho
Coordinadora del Posgrado en Ciencias de la Vida

Dra. Rufina Hernández Martínez
Directora de Estudios de Posgrado

Resumen de la tesis que presenta **Luis Leobardo Pérez Mozqueda** como requisito parcial para la obtención del grado de Doctor en Ciencias en ciencias de la vida con orientación en microbiología.

Caracterización enzimática de la agmatinasa de *Neurospora crassa* y su relación con el citoesqueleto de actina

Resumen aprobado por:

Dra. Ernestina Castro Longoria
Directora de tesis

La agmatinasa es una metaloenzima que usa agmatina para producir putrescina y urea, en bacterias, plantas y mamíferos participa en la ruta alterna para la síntesis de poliaminas. Sin embargo, en hongos filamentosos como *Neurospora crassa* su función no es del todo clara, por lo que el objetivo principal de este trabajo es elucidar la relación entre la agmatinasa (AGM-1) y el citoesqueleto de actina y proveer una caracterización enzimática de dicha proteína. Para lograr este objetivo, se comparó la localización de la proteína AGM-1 con proteínas de unión a actina (FIM-1 y TPM-1), también se analizó la localización de la proteína AGM-1 en presencia de inhibidores de la polimerización de actina, así como ensayos de polimerización y despolimerización de filamentos de actina en presencia y ausencia de agmatina y agmatinasa. Además, se realizó una mutación puntual en el sitio de unión al sustrato, con la finalidad de corroborar que la localización intracelular se debe a la unión con la agmatina. Por otra parte, se realizó una caracterización enzimática de la proteína AGM-1 de *N.crassa*, en la cual se evaluó la presencia de cofactores ($MnCl_2$), perfil de pH, la termoestabilidad, el y parámetros cinéticos (K_m , V_{max} y k_{cat}). Los resultados mostraron que la proteína AGM-1 colocaliza con las proteínas de unión a actina FIM-1 y TPM-1 y que su localización se ve afectada principalmente por latrunculina B un inhibidor de los filamentos de actina, aunque también se afecta por el inhibidor de los microtúbulos, en menor medida. Además, se demostró que la AGM-1 puede despolimerizar los filamentos de actina (*in vitro*) cuando son polimerizados con ayuda de la agmatina y que la proteína AGM-1 se deslocaliza cuando se modifica el sitio de unión al sustrato. Por otra parte, se observó que la actividad enzimática de la proteína AGM-1 decae cuando se usa EDTA. Mediante la curva de temporalidad se determinó que la actividad específica fue de 1.5 U/mg. También se observó que el pH óptimo está en el rango de 8 a 8.5. Con respecto a la termoestabilidad se observó que la proteína pierde su capacidad catalítica hasta en un 80% a 70°C por 15 min. AGM-1 tuvo una K_m de 105×10^{-6} M. La k_{cat} calculada fue de 0.029 s^{-1} y se obtuvo una eficacia catalítica (k_{cat}/K_m) de $2.7 \times 10^2 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$. Los resultados presentados sugieren que la AGM-1 tiene un papel importante en la polimerización de los filamentos de actina, y que se requiere que el sitio de unión al sustrato este intacto para que pueda haber una relación entre la agmatinasa y la actina, además se determinó que la agmatinasa presenta características enzimáticas similares a las agmatinasas reportadas en otros organismos.

Palabras clave: Agmatina, Poliaminas, Agmatina ureohidrolasa, Urea, Hongos

Abstract of the thesis presented by **Luis Leobardo Perez Mozqueda** as a partial requirement to obtain the Doctor of Science degree in science of life with orientation in microbiology.

Structural characterization of agmatinase from *Neurospora crassa* and its relationship with the actin cytoskeleton

Abstract approved by:

Dra. Ernestina Castro Longoria
Thesis Director

The agmatinase is a metalloenzyme that uses agmatine to produce putrescine and urea; in bacteria, plants, and mammals the agmatinase participates in the alternative route for the synthesis of polyamines. However, in fungi such as *N. crassa*, its function is still not clear. Therefore, the main objective of this work is to elucidate the relationship between the agmatinase (AGM-1) and the actin cytoskeleton and provide an enzymatic characterization of the AGM-1. To achieve this goal, we compared the localization of the protein AGM-1 with actin-binding proteins (FIM-1 and TPM-1), we also analyzed the localization of the protein AGM-1 in the presence of actin filamentation inhibitors, as well as polymerization and depolymerization essays of actin filaments, in the presence and absence of agmatine and agmatinase. Also, a site-specific mutation in the binding site of the enzyme to the substrate was performed, to corroborate that intracellular localization is due to the binding with the agmatine. On the other hand, a characterization of the enzyme AGM-1 was carried out; the following parameters were assessed: the presence of cofactors (MnCl₂), pH profile, thermostability, and kinetic parameters (K_m, V_{max}, and k_{cat}). The results showed that the protein AGM-1 colocalizes with the actin-binding proteins FIM-1 and TPM-1 and its localization was affected mainly by the inhibitor of actin filaments, although it is also affected by the inhibitor of microtubules, to a lesser extent. In addition, we demonstrated that AGM-1 can depolymerize actin filaments (*in vitro*) when they are polymerized with the aid of agmatine, and that the protein AGM-1 is delocalized when the binding site to the substrate is changed. On the other hand, it was observed that the enzymatic activity of the protein AGM-1 decays when using EDTA in the reaction mixture, and by using the curve of temporality the specific activity was determined, which was 1.5 U/mg. It was also observed that the optimal pH is in the range of 8 to 8.5, and with respect to the thermal stability it was found that the protein loses its catalytic ability, up to 80% at 70° C for 15 min. The kinetic parameters observed were a K_m of 105 x10⁻⁶ M. The k_{cat} calculated was of 0.029 s⁻¹ and was obtained a catalytic efficiency (k_{cat}/K_m) of 2.7x10² s⁻¹ M⁻¹. The obtained results here strongly suggest that the AGM-1 plays an important role in the polymerization of actin filaments, and that the binding site to the substrate is required to be intact, suggesting a relationship between the agmatinase and actin. The agmatinase from *N. crassa* showed enzymatic properties similar to agmatinases from other organisms.

Keywords: agmatine, polyamines, agmatine ureohydrolase, urea, fungi

Dedicatoria

El presente trabajo lo dedico a mis padres: Luis Pedro Pérez Prado y María de Lourdes Mozqueda Quiroz, que gracias a sus enseñanzas he podido llegar hasta este momento y aunque lejos físicamente, siempre estuvieron conmigo emocionalmente y apoyándome en todas mis decisiones sin importar lo malas o buenas que fueran.

A mi esposa, amiga y confidente Margarita Aldama por todo el apoyo que me ha brindado, porque gracias a su fortaleza he podido levantarme cuando se dificultaba la situación.

A mi Hermano Daniel, a mi hermana Laura y a mi tío Cipriano por su apoyo incondicional y sus consejos.

A mis dos amigos más cercanos: Roberto Alcalá y Martha Ornelas (Molly) por apoyarme en el trayecto final de este trabajo y por su compañía en los momentos más difíciles de esta profesión y de la vida.

Por último, pero no menos importante quiero agradecer a mi maestra, amiga y madre académica, Dra. Ernestina Castro que mas que una tutora ha sido una guía tanto en la parte académica como en mi vida en Ensenada.

A todas las personas anteriormente mencionadas y a todas las personas que han formado parte de mi vida en todo este trayecto quiero agradecerles por que han contribuido de alguna manera mi formación académica y a mi vida diaria.

¡GRACIAS!

Agradecimientos

El presente trabajo no hubiera sido posible sin la cooperación de grandes personas e instituciones.

Agradezco al CONACyT por haber sustentado mis estudios económicamente, dándome la posibilidad de realizar este trabajo satisfactoriamente.

Al Departamento de Microbiología del CICESE por haberme prestado sus equipos y laboratorios para la realización del presente trabajo.

Al Centro de Nanociencias y Nanotecnología de la UNAM por haberme prestado sus aulas y el equipo necesario para los análisis cromatográficos.

A mi tutora la Dra. Ernestina Castro Longoria por haber confiado en mí, por su apoyo durante el trabajo realizado, por sus enseñanzas, su constante preocupación para por brindarme los reactivos necesarios para el trabajo experimental, además de una excelente dirección de este trabajo.

A la ayuda brindada por el Dr. Rafael Vázquez Duhalt por su apoyo con equipo y reactivos para el presente estudio.

A la ayuda brindada por la Dra. Katrin Quester para la realización de los ensayos de purificación de la proteína

A mi comité de tesis por sus comentarios 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	x
Capítulo 1. Introducción.....	1
1.1 Antecedentes	1
1.1.1 Crecimiento celular	2
1.1.2 Citoesqueleto de actina.....	2
1.1.3 Citoesqueleto de actina en hongos filamentosos	4
1.1.4 Poliaminas	6
1.1.5 Metabolismo de poliaminas.....	7
1.1.6 Agmatina y agmatinasa	8
1.2 Justificación	10
1.3 Hipótesis.....	10
1.4 Objetivos	11
1.4.1 Objetivo general.....	11
1.4.2. Objetivos específicos.....	11
Capítulo 2. Metodología.....	12
2.1 Cepas utilizadas	12
2.2 Construcción de plásmidos	12
2.2.1 Plásmido pLP02	13
2.2.2 Plásmido pLP03	13
2.3 Construcción de cepas	15
2.3.1 Construcción de cepas por fusión	15
2.4 Análisis de microscopía confocal.....	16
2.5 Ensayos <i>in vitro</i> de polimerización y despolimerización de actina	16

2.6	Análisis de microscopía electrónica de transmisión	17
2.7	Extracción y cuantificación de poliaminas intracelulares	17
2.8	Extracción de proteínas totales.....	18
2.9	Purificación de la proteína AGM-1-ent-GFP-6xhis y ensayo de enteroquinasa	18
2.10	Purificación de la proteína AGM-1-GFP	19
2.11	Ensayo de actividad del complejo proteico AGM-1-GFP	19
2.12	Caracterización bioquímica de la AGM-1	19
2.12.1	Efecto del manganeso como cofactor.....	20
2.12.2	Determinación de actividad específica	20
2.12.3	Determinación de la termoestabilidad	20
2.12.4	Determinación del pH óptimo.....	21
2.12.5	Determinación de parámetros cinéticos.....	21
Capítulo 3.	Resultados	22
3.1	Relación entre la agmatinasa y la actina	22
3.1.1	El Spk está afectado en la cepa $\Delta agm-1$	22
3.1.2	La cepa mutante heterocarion $\Delta agm-1$ het tiene menor concentración de agmatina que la silvestre (WT)	22
3.1.3	El complejo agmatinasa-GFP colocaliza con proteínas de unión a actina	23
3.1.4	Los disruptores de F-actina y de los filamentos de tubulina afectan la dinámica y localización de la AGM-1.....	25
3.1.5	La agmatina favorece la polimerización de la G-actina <i>in vitro</i>	26
3.1.6	El sitio de unión al sustrato en la AGM-1 es esencial para su localización intracelular.....	27
3.2	Caracterización enzimática de la agmatinasa	28
3.2.1	Curva de concentración de urea	29
3.2.2	La proteína purificada AGM-1-GFP de <i>N. crassa</i> presenta actividad enzimática.....	30
3.2.3	Purificación de la proteína AGM-1	30
3.2.4	La actividad de la enzima agmatinasa de <i>N. crassa</i> depende del ion manganeso.....	31
3.2.5	Curva de temporalidad y actividad específica de la agmatinasa de <i>N. crassa</i>	32
3.2.6	Perfil de pH de la agmatinasa de <i>N. crassa</i>	33
3.2.7	Termo estabilidad de la agmatinasa de <i>N. crassa</i>	34
3.2.8	Determinación de parámetros cinéticos de la agmatinasa a de <i>N. crassa</i>	35

Capítulo 4. Discusión	37
4.1 Elucidando la relación de la agmatinasa con el citoesqueleto de actina	37
4.2 Caracterización enzimática de la AGM-1 de <i>N. crassa</i>	40
Capítulo 5. Conclusiones	43
Literatura citada	44
Anexos.....	48

Lista de figuras

Figura		Página
1	Esquema de un filamento de actina.....	3
2	Modelo de nucleación de la actina.....	5
3	Ruta de síntesis de poliaminas.....	8
4	Modelo de la agmatinasa en <i>D. Radiodurans</i> y <i>H. sapiens</i>	9
5	Localización del Spk.....	22
6	Concentración intracelular de poliaminas.....	23
7	Localización intracelular de la agmatinasa.....	24
8	Efecto de Latrunculina B y Benomilo.....	26
9	Filamentos de actina polimerizados <i>in vitro</i>	27
10	Localización intracelular de la proteína AGM-1.1	28
11	Curva patrón de urea.....	29
12	Análisis enzimático <i>in vitro</i> de la proteína AGM-1-GFP.....	30
13	SDA PAGE de la proteína purificada.....	31
14	Efecto del manganeso en la actividad de la AGM-1.....	32
15	Curva de temporalidad.....	33
16	Efecto del pH en la actividad enzimática de la AGM-1.....	34
17	Termo estabilidad de la agmatinasa.....	35
18	Gráfica Michaelis-Menten.....	36
19	Mapa de plásmidos utilizados para la construcción de las cepas.....	48
20	Gráfico de purificación de la proteína por FPLC. El pico entre los minutos 11 y 15 corresponden a la proteína de interés (AGM-1).....	49

Lista de tablas

Tabla		Página
1	Poliaminas más abundantes en los organismos.....	6
2	Cepas utilizadas en este estudio.....	12
3	Oligonucleótidos utilizados en este estudio.....	14
4	Absorbancia de G-actina en solución.....	27
5	Absorbancia de Urea.....	29

Capítulo 1. Introducción

1.1 Antecedentes

El hongo filamentoso *Neurospora crassa* ha sido un organismo modelo de células eucarióticas por más de 90 años (Shear and Dodge, 1927). Este organismo ha sido utilizado en estudios de señalización celular, genética clásica, síntesis de pared celular, ritmos circadianos y en un sinnúmero de áreas de importancia para el entendimiento de las células eucarióticas (Beadle y Tatum, 1941; Bartnicki-Garcia, 1968; Castro-Longoria et al., 2010; Araujo-Palomares et al., 2011). Todos estos estudios han sido posibles gracias a la gran versatilidad que tiene *N. crassa*, por ser un hongo filamentoso de rápido crecimiento e inocuo para la salud de otros organismos.

Una de las características más importantes de *N. crassa* en los estudios de biología celular y molecular, es el tipo de crecimiento y la morfología celular que posee. La célula principal de los hongos filamentosos como *N. crassa* se denomina hifa, la cual tiene una forma tubular pudiendo generar ramificaciones laterales hasta llegar a formar una red de hifas, denominada micelio. Durante el crecimiento de las hifas, los procesos celulares se encuentran en la región apical de cada célula, ya que es la región donde ocurre la síntesis de pared y membrana celular, además de que es el sitio en el que se encuentra la maquinaria que establece y dirige el crecimiento (Riquelme et al., 2011). Durante el proceso de crecimiento polarizado, diversas moléculas interactúan entre sí, dentro de estas destacan grandes familias de proteínas como las Rho GTPasas (Araujo-Palomares et al., 2011), la actina y proteínas de unión a actina (ABPs, por sus siglas en inglés) (Virag and Griffiths, 2004; Berepiki et al., 2011). Otra parte esencial para este tipo de crecimiento, es un cúmulo de vesículas apical llamado Spitzenkörper (Spk), el cual se encuentra compuesto por macrovesículas y microvesículas denominadas quitosomas (Virag y Harris, 2006; Verdín et al., 2009; Riquelme y Sánchez-León, 2014). El Spk actúa como un centro suministrador de vesículas que llevan proteínas de síntesis y señalización hacia la membrana plasmática apical (Bartnicki-Garcia et al., 1989). Diversos estudios han demostrado que al desensamblar al Spk, la hifa deja de crecer y al reensamblarlo recupera su crecimiento (Sánchez-León et al., 2015). Otros estudios han revelado que al manipular el Spk con pinzas ópticas se puede orientar la dirección del crecimiento polarizado (Bracker et al., 1997).

1.1.1 Crecimiento celular

El crecimiento polarizado, no es único de los hongos. Los tubos polínicos y las neuronas también tienen este tipo de crecimiento pero de manera temporal, mientras que en hongos filamentosos es constante, siempre y cuando tengan los nutrientes necesarios para continuar creciendo. Esta característica es muy relevante para los estudios sobre crecimiento celular, ya que los procesos moleculares que ocurren para que la célula pueda elongarse y continuar creciendo suceden una y otra vez, lo cual facilita su estudio.

El crecimiento celular en los hongos puede ser de dos tipos: filamentosos y levaduriforme. A pesar de esta diferencia, los procesos y las moléculas implicadas en ambos tipos de crecimiento son muy parecidas y cumplen funciones similares. Por ejemplo, la familia de las proteínas Rho GTPasas desempeñan un papel esencial como interruptores moleculares para la activación de cascadas de señalización, involucradas en el establecimiento y continuidad del crecimiento polarizado, además participan en la ruta de señalización para la formación de filamentos de actina para la elongación de la célula hifal o para la división celular en una célula levaduriforme (Mahlert et al., 2006; Araujo-Palomares et al., 2011).

Otras proteínas ampliamente descritas son la actina y las ABPs. La actina se encuentra en la célula en dos formas: globular (G-actina) y filamentososa (F-actina). La actina globular es la unidad monomérica utilizada para la formación de la actina filamentososa, aunque para que los filamentos de actina se mantengan estables y funcionales es necesario la participación de las ABPs, dentro de las cuales se encuentran la tropomiosina y fimbrina; que ayudan a la polimerización de la G-actina mediante la formación de una red junto con los monómeros de actina para la formación de filamentos. Entre otros componentes se encuentran las forminas y las profilinas las cuales, son necesarias para la nucleación y el reclutamiento de la G-actina respectivamente (Pruyne et al., 2002; Kovar et al., 2005; Berepiki et al., 2011). Por otra parte, desde los años 70s se ha propuesto que existen moléculas de carácter no protéico que también participan en la polimerización de la actina (Oriol-Audit, 1978), dichas moléculas son llamadas poliaminas debido a los múltiples grupos aminos que poseen.

1.1.2 Citoesqueleto de actina

El citoesqueleto de actina es uno de los componentes esenciales en las células eucariotas. Está compuesto principalmente por actina, la cual se encuentra organizada de dos maneras distintas en la

célula: monomérica o G-actina y filamentosa o F-actina. La G-actina unida a ATP es más estable que la G-actina unida a ADP, esta situación facilita la polimerización de los monómeros en filamentos (Wegner and Isenberg, 1983). La nucleación, ensamblaje y polimerización de la G-actina es un proceso controlado que requiere la hidrólisis de ATP para formar la F-actina. La F-actina se ensambla mediante dos filamentos de actina globular que se entrelazan para formar una doble hélice dando como resultado un filamento de aproximadamente 7 nm los cuales, tienen una polaridad que depende de la velocidad de nucleación, en el extremo (+) el monómero de actina unido a ATP y ayudado por la profilina se une a los filamentos formados produciendo una elongación del filamento, mientras que en el extremo (-) el ATP es hidrolizado y apoyado por la cofilina permitiendo que la G-actina se libere del filamento y regrese a su forma monomérica **Figura 1**. Además de la actina y el ATP, el proceso formación de F-actina también involucra ABPs como por ejemplo la fimbrina, la tropomiosina y al complejo Arp 2/3 (Dominguez and Holmes, 2011).

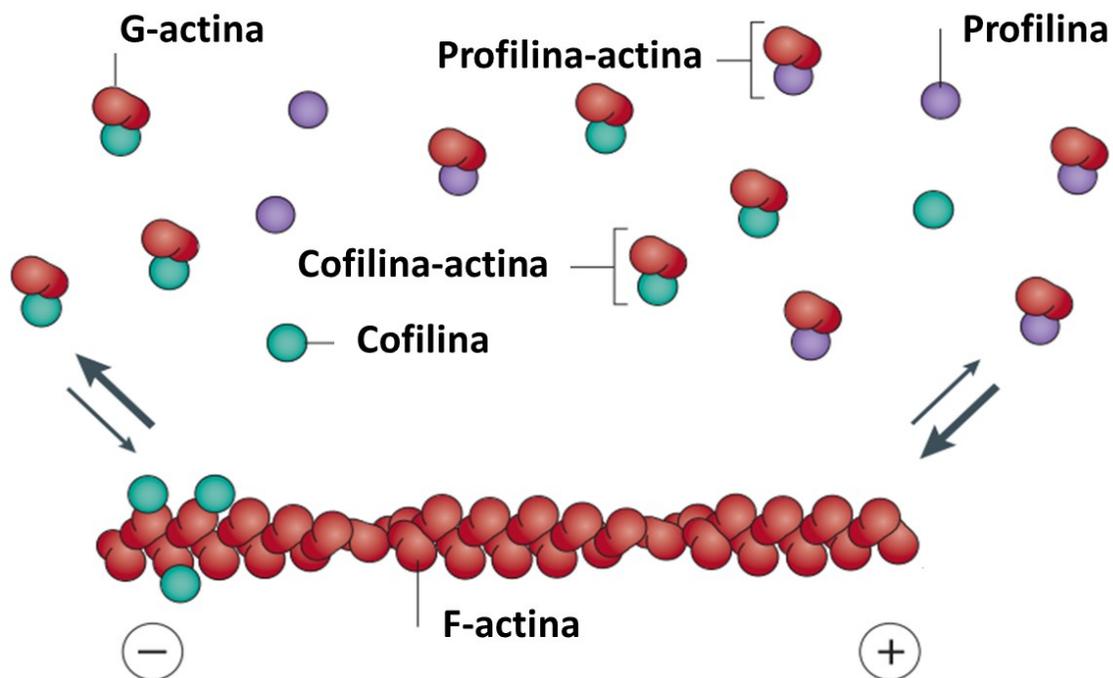


Figura 1. Esquema de un filamento de actina. Las flechas indican la tasa de polimerización y despolimerización. En la imagen se esquematiza la flecha más gruesa en el extremo (+) debido a que la tasa de polimerización es mayor que en el extremo (-) (Tomado y modificado de Berepiki et al., 2011)

Las ABPs son muchas, pero se pueden clasificar según la función que desempeñan con el citoesqueleto; Nucleación, regulación del crecimiento del filamento, estabilidad y desensamblaje, proteínas de entrecruzamiento, etc. (Winder and Ayscough, 2005). Cabe destacar que el proceso de nucleación de los filamentos es energéticamente desfavorable ya que la G-actina posee una carga neta negativa. Sin

embargo, la nucleación es posible gracias a las ABPs, pero el mecanismo de acción de muchas de estas proteínas aun es desconocido.

La F-actina es una estructura esencial en la célula ya que permite el crecimiento y movilidad celular de diferentes organismos, por ejemplo: en fibroblastos el citoesqueleto de actina participa en la proliferación celular al igual que en los contactos focales, en los que se ha visto que el uso de inhibidores de la polimerización como la citocalasina impide el correcto crecimiento celular (Domnina et al., 1982; Torralba et al., 1998). Además, en organismos como levaduras el citoesqueleto de actina es esencial durante la reproducción ya que se ha visto que el citoesqueleto tiene que polimerizarse hacia la célula hija para que por medio de este las proteínas encargadas del transporte vesicular puedan llegar a la célula hija y ejercer su función (Doyle and Botstein, 1996).

1.1.3 Citoesqueleto de actina en hongos filamentosos

En hongos filamentosos el estudio del citoesqueleto de actina ha sido de mucha importancia para la comprensión del crecimiento celular ya que se ha reportado que este conjunto de proteínas está involucrado en el movimiento de vesículas secretoras, en procesos de endocitosis para el reciclamiento de componentes membranales, en la exocitosis de proteínas sintetizadoras pared celular, en el mantenimiento de la forma tubular en estos organismos y en los procesos de crecimiento de la membrana y pared celular durante la septación (Virag y Griffiths, 2004; Mouriño-Pérez, 2013; Heilig et al., 2014; Riquelme y Martínez-Nuñez, 2016).

En hongos filamentosos, la nucleación de la actina depende en gran medida de las forminas, estas proteínas se encuentran ampliamente distribuida en los hongos. En *A. nidulans*, así como en *N. crassa* solo se ha reportado una formina (SepA y BNI-1 respectivamente). La BNI-1 en *N. crassa*, se localiza en el centro del Spk, en la parte apical de la hifa y en el septo, estas regiones son sitios en donde la nucleación de la actina es constante (Lichius et al., 2012). A diferencia de *A. nidulans* y *N. crassa*; *S. cerevisiae*, *S. pombe*, *A. gossypii* y *C. albicans* poseen múltiples forminas que se encuentran localizadas de manera diferencial en regiones específicas de la célula (Berepiki et al., 2011).

A parte de las forminas, también se requiere de proteínas reguladoras como las RhoGTPasas, MesA y Boi1/2 para lograr que las forminas sean activadas y puedan permitir la nucleación a partir de sus dominós

FH1 y FH2, una vez que las forminas están listas para comenzar la nucleación, la profilina participa uniéndose al dominio FH1 y posteriormente uniendo los monómeros de actina al dominio FH2 de la formina **Figura 2** y de esta manera comenzar la nucleación (Berepiki et al., 2011). En el sitio de septación existen otras proteínas involucradas como la RHO-4, BUD-3 y BUD-4 las cuales, participan durante la polimerización de los filamentos de actina durante la septación.

El proceso de polimerización de la actina es un mecanismo altamente controlado por proteínas que ayudan a que los filamentos puedan formarse y mantenerse polimerizados. Sin embargo, no solo las proteínas de unión a actina participan en mantener y polimerizar los filamentos de actina, también se ha propuesto que un grupo de moléculas llamadas poliaminas participan en la polimerización y mantenimiento de los filamentos de actina, aunque los mecanismos por los cuales regulan este proceso aun no son claros y las investigaciones son muy pocas (Oriol-Audit, 1978; Pohjanpelto et al., 1981; McCormack et al., 1999; Sowa et al., 2006)

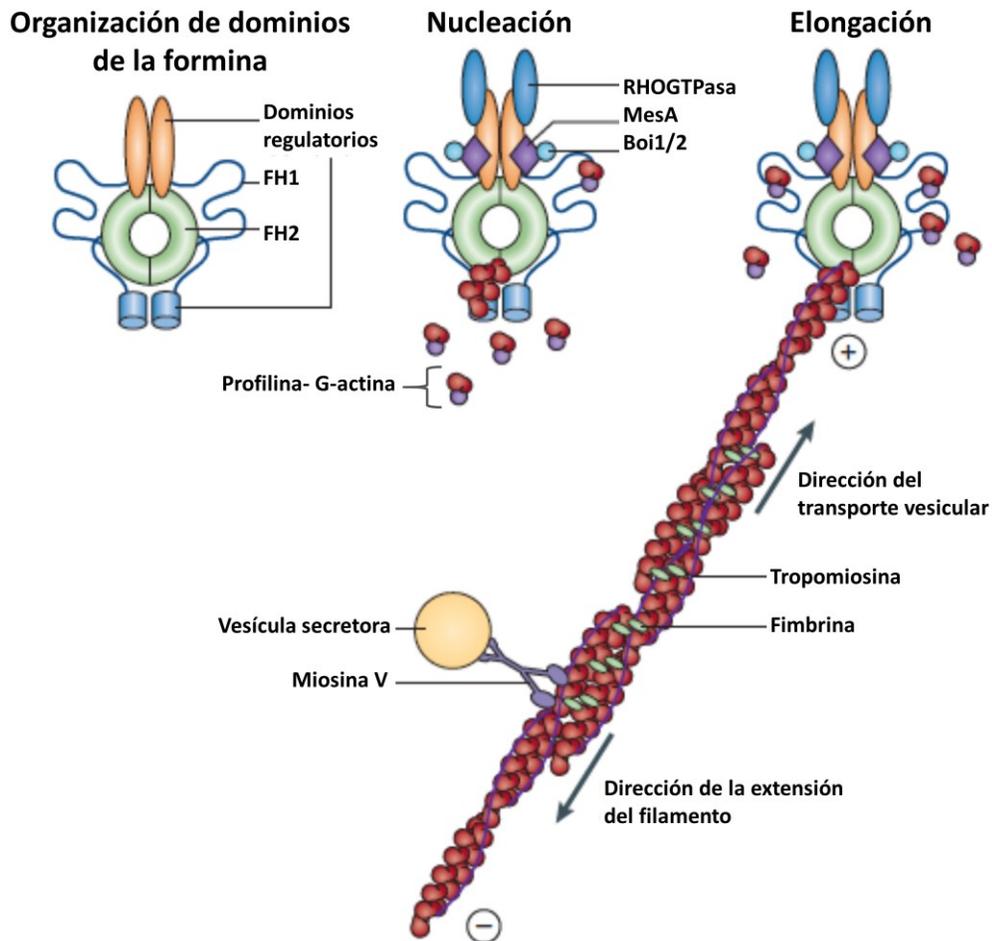
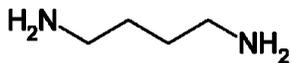
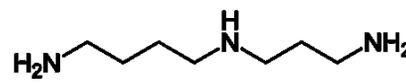
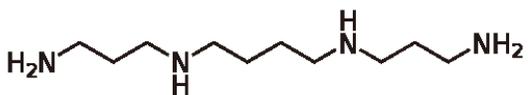
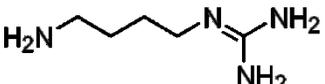


Figura 2. Modelo de nucleación de actina mediado por formina (tomado y modificado de Berepiki et al., 2011).

1.1.4 Poliaminas

Las poliaminas son moléculas de carácter policatiónico, característica dada por los grupos amino que posee la molécula, dichas moléculas se encuentran conservadas en todos los organismos en diferente concentración. Las poliaminas más abundantes en los organismos son principalmente tres: la putrescina, la espermidina y la espermina; aunque existen otras en menor abundancia como la cadaverina y la agmatina (**Tabla. 1**) (Tabor and Tabor, 1985). Las poliaminas fueron descubiertas por Antonie van Leeuwenhoek quien fue el primero en observar cristales de espermidina bajo el microscopio en 1678. Sin embargo, el estudio de las poliaminas comienza en 1889 con la putrescina, la primer poliamina aislada de *Vibrio cholerae* (Wallace et al., 2003). A partir de esa época diversos estudios han ido otorgándoles diferentes funciones debido a su capacidad de interactuar mediante cargas con moléculas aniónicas en las células. Algunas de las funciones que tienen las poliaminas son las de interactuar con la cadena de DNA y RNA y mediante enrollamiento de las hebras de ácidos nucleicos regular la transcripción de diversos genes (Kusano et al., 2008; Pasini et al., 2014). Otra función muy importante, es la interacción con proteínas, donde mediante regulación positiva o negativa promueven procesos celulares como la migración y la adhesión celular (Ray et al., 2003).

Tabla 1. Poliaminas más abundantes en los organismos (Tabor and Tabor, 1985)

Nombre	Estructura
Putrescina	
Espermidina	
Espermina	
Cadaverina	
Agmatina	

1.1.5 Metabolismo de poliaminas

En la actualidad, se sabe que las tres poliaminas principales se sintetizan mediante dos principales rutas de síntesis: la ruta constitutiva y la ruta alterna. La ruta constitutiva comienza con la hidrólisis de la arginina mediante la arginasa produciendo ornitina, esta a su vez es descarboxilada a putrescina por la acción de la ornitina descarboxilasa (ODC), enzima limitante en la ruta constitutiva. Una característica de esta ruta es que presenta una regulación en retroalimentación, es decir, que cuando los niveles de poliaminas son elevados se induce la transcripción de la antienzima (AZ) la cual, es la encargada de unirse a la ornitina descarboxilasa para formar un heterodímero y exponer el carboxilo terminal de la ODC para ser reconocido por el proteosoma 26S e hidrolizar la ODC liberando así a la antienzima y continuar el ciclo. Cabe mencionar que esta ruta se encuentra presente en la mayoría de los organismos vivos con algunas excepciones como en *Arabidopsis thaliana*.

La ruta alterna que solo se ha descrito en bacterias, plantas y recientemente en mamíferos inicia con la descarboxilación de arginina para producir agmatina mediante la arginina descarboxilasa (ADC). Posteriormente la síntesis puede tomar dos vías, una que es común en bacterias y mamíferos, en la cual la agmatina es hidrolizada a putrescina por la agmatinasa (AGS), con producción de urea como segundo producto. La segunda vía que es común en plantas cataliza la reacción de agmatina mediante la agmatina desaminasa para producir N-carbamil putrescina, posteriormente esta molécula es hidrolizada a putrescina mediante la N-carbamilputrescina amidohidrolasa. Es a partir de este punto que tanto la ruta alterna así como la ruta constitutiva siguen una misma vía de síntesis para la producción de espermidina y espermina la cual involucra a la S-adenosilmetionina descarboxilada que a su vez es utilizada como donador de grupos amino por la espermidina sintasa y espermina sintasa para producir las respectivas poliaminas **Figura 3** (Tabor and Tabor, 1985).

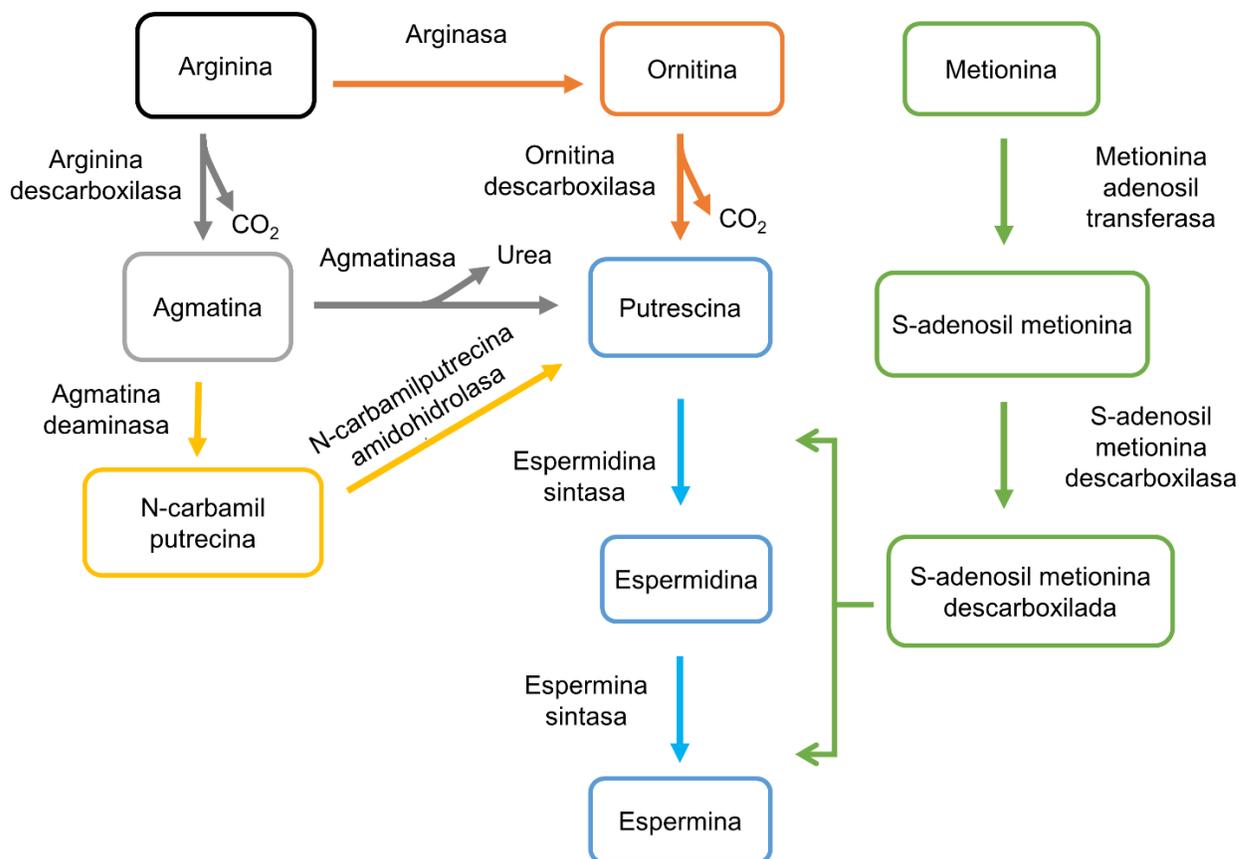


Figura 3. Rutas de síntesis de poliaminas. Ruta constitutiva presente en la mayoría de los organismos (color anaranjado), ruta alterna en mamíferos, bacterias y hongos (color gris), ruta alterna en plantas (color amarillo), ruta universal para espermidina y espermina (color azul) y ruta accesoria (color verde).

1.1.6 Agmatina y agmatinasa

En bacterias la agmatinasa juega el papel de enzima catalítica para producir urea y putrescina, en estos microorganismos es donde más se ha estudiado y ya se cuenta con la estructura cristalina de dicha proteína, lo cual dio a conocer los residuos de aminoácidos esenciales para la unión e hidrólisis de la agmatina. La estructura cristalina de la agmatinasa resuelta por cristalografía de rayos X mostró las variaciones y la conservación que hay en el plegamiento de la estructura con respecto a secuencias de agmatinasas pertenecientes a otros organismos. La agmatinasa en bacterias está involucrada en la biosíntesis de putrescina a partir de agmatina y requiere dos iones de manganeso para poder interactuar con el sustrato, además de que su forma más estable y funcional es un homohexamero **Figura 4** (Hyung et al., 2004). Otra característica importante es que en su secuencia solo tiene el dominio de agmatinasa sin contar con

dominios de unión a otras proteínas o dominios transmembranales, lo cual resulta interesante ya que se encuentra en todo el citoplasma sin estar asociada a ninguna estructura, esto le da la versatilidad de poder degradar agmatina en cualquier región de la célula. Por otra parte, en mamíferos la estructura cristalina de esta proteína aún no ha sido revelada. Sin embargo, con base en reconstrucciones tridimensionales y ensayos *in silico* se ha determinado que la agmatinasa de *Homo sapiens* presenta las mismas características que su homólogo en *Deinococcus radiodurans* con ligeras diferencias **Figura 4**, pero con el sitio catalítico conservado. Esto implica que en mamíferos la agmatinasa mantiene su función. En *D. radiodurans* el monómero de la agmatinasa presenta 11 α -hélices y 10 β -hojas, su estructura funcional es un homohexamero que requiere dos núcleos de manganeso por monómero para su correcta unión al sustrato. La cristalización de la proteína agmatinasa más el inhibidor (1,6-diaminohexano) sugiere un motivo de Gly-Gly-Asp-His (altamente conservado) necesario para la unión al grupo guanidina del sustrato, además de 12 aminoácidos esenciales involucrados en la unión e hidrólisis en el sitio activo.

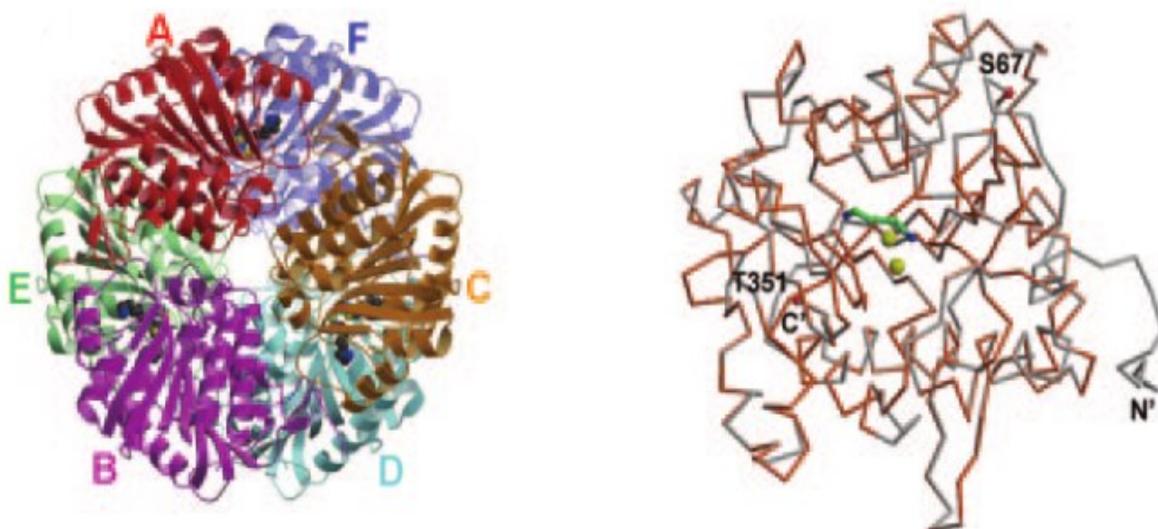


Figura 4. Modelo del homohexamero formado por la agmatinasa de *Deinococcus radiodurans* cada letra representa un monómero (lado izquierdo). Superposición del modelo de la agmatinasa de *D. radiodurans* (gris) y de *H. sapiens* (anaranjado) (lado derecho) en la cual se muestran los extremos carboxilo y amino C' y N' respectivamente de la agmatinasa de *D. radiodurans*, mientras los de *H. sapiens* están representados por la Serina 67 y Treonina 351, los puntos amarillos representan los iones de manganeso y en color verde y azul se encuentra el sustrato (agmatina) (Tomado y modificado de Hyung et al., 2004)

Por otro lado, ensayos *in vitro* han demostrado que la agmatina puede favorecer la polimerización de los filamentos de actina y mantenerlos estables por más tiempo en comparación con filamentos de actina sin presencia de agmatina (Oriol-Audit, 1978). Esta característica se atribuye a las cargas positivas que posee la agmatina que son capaces de interactuar con las cargas negativas de la actina y favorecer la

filamentación. En *N. crassa* se ha reportado una secuencia que codifica para una agmatinasa hipotética (NCU01348), la cual es esencial para el crecimiento celular de dicho hongo ya que una mutante homocarión de esta secuencia no es capaz de crecer y sus esporas sexuales solo logran germinar escasos 300-500 μm . Aunado a esto, la cepa mutante heterocarión del gen *agm-1* presenta serios defectos en su desarrollo celular como, por ejemplo, una tasa de conidiación baja, menor velocidad de elongación durante su crecimiento vegetativo, menor producción de biomasa en peso seco, todo en comparación con una cepa silvestre (WT por sus siglas en inglés). Además, se reveló que la localización de la agmatinasa parece estar estrechamente relacionada con las poblaciones de F-actina, dicha observación es muy interesante ya que no se ha descrito nada similar en otros organismos (Pérez-Mozqueda, 2015). Por lo cual se requieren nuevos análisis para corroborar lo anteriormente descrito.

1.2 Justificación

La proteína agmatinasa es una enzima importante en los organismos en los que se ha descrito, ya que junto con la ornitina descarboxilasa se encarga de producir poliaminas (Tabor and Tabor, 1985), las cuales participan en diversos procesos celulares como por ejemplo crecimiento, migración y adhesión celular. Por otro lado, en organismos patógenos se ha reportado que participan en la regulación de la patogenicidad. Sin embargo, no en todos los organismos se ha descrito la agmatinasa. En hongos, específicamente en el hongo filamentoso *N. crassa*, se realizó un estudio sobre la presencia de la agmatinasa en el cual, se reveló que la localización de la agmatinasa parece estar estrechamente relacionada con las poblaciones de F-actina y que probablemente su función en la producción de poliaminas no sea el papel principal en este organismo (Pérez-Mozqueda, 2015). Por tal motivo es importante determinar que la agmatinasa se encuentre presente en hongos, debido que hasta el momento no se ha descrito ninguna proteína con características de agmatinasa en estos organismos. Por lo cual, el estudio de la agmatinasa en hongos podría abrir nuevas puertas para el desarrollo de fármacos para el control de hongos patógenos, así como nuevas líneas de investigación sobre el metabolismo de poliaminas en hongos.

1.3 Hipótesis

En este trabajo se pretende averiguar si la localización de la agmatinasa esta mediada por la unión al sustrato y que de ser así participe en la regulación del crecimiento celular de dicho hongo. Por otra parte,

también se pretende revelar si dicha proteína tiene actividad de agmatinasa y describir sus características enzimáticas.

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo general

Estudiar la función de agmatina ureohidrolasa en la agmatinasa y elucidar su relación con el citoesqueleto de actina en *Neurospora crassa*

1.4.2. Objetivos específicos

Determinar la capacidad catalítica de la agmatinasa hipotética de *N. crassa*.

Elucidar la relación de la agmatinasa con las diferentes poblaciones de F- actina en *N. crassa*.

Analizar las características enzimáticas de la agmatinasa.

Capítulo 2. Metodología

2.1 Cepas utilizadas

Las cepas de *N. crassa* usadas en este estudio se encuentran enlistadas en la **Tabla 2**. La cepa FGSC# 9717 se cultivó en matraces de 500 mL con 200 mL de Medio Mínimo de Vogel (MMV) a 30°C durante tres días en oscuridad y dos en luz para una máxima producción de conidios. Los conidios se recuperaron en 40 mL de agua destilada estéril y fría, se mezclaron por agitación lenta en vórtex y se filtraron con tela tipo “Magitel®” estéril para eliminar el exceso de micelio. La suspensión de conidios se centrifugó a 8,000 rpm durante 10 min con el fin de eliminar el exceso de agua y recuperar los conidios en tubos de 1.5 mL con 1 mL de sorbitol 1 M. Los conidios se contaron en una cámara de Neubauer para su uso posterior.

Tabla 2. Cepas utilizadas en este estudio

Cepa	Genotipo	Referencia
Silvestre	ORS-SL6a mat a	FGSC# 4200
Silvestre	OR74A mat A	FGSC# 9013
mus-51 mat A	Δ mus-51::bar+; his-3 mat A	FGSC# 9717
agm-1::gfp	pccg-1-agm-1::egfp::his-3+ mat A	Perez-Mozqueda, et al., 2019
agm-1 ^{D207V, H209F, D211V} ::gfp (AGM-1.1)	pccg-1-agm-1 ^{D207V, H209F, D211V} ::egfp::his-3+mat A	Este estudio
agm-1::gfp::6xhis	pccg-1-agm-1-ent::egfp-6xhis::his-3+mat A	Este estudio
PRM-019DD03	Pccg-1-fim-1-mchfp::his-3+mat A	Prm-019dd03
TRM48-OC29	pccg-1-tpm-1-mchfp::his-3+mat A	Delgado-Alvarez, 2010

2.2 Construcción de plásmidos

Todos los oligonucleótidos y plásmidos utilizados (**Anexo A**) en este estudio se muestran en la **Tabla 3**.

2.2.1 Plásmido pLP02

Para la creación de la cepa mutante puntual AGM-1D207V, H209F, D211V se utilizó el plásmido pLP-02 el cual se construyó a partir del vector pMF272 que contiene el promotor constitutivo pCCG-1 y la secuencia codificante para la GFP. La secuencia codificante para la proteína mutante (AGM-1D207V, H209F, D211V) se obtuvo a partir de dos fragmentos (Fr1 y Fr2) amplificados del DNA genómico de *N. crassa* mediante la siguiente combinación de oligonucleótidos “F agm-1Xba1/R agm-1-mut” y “F agm-1-mut/R agm-1Pac1”, posteriormente se realizó un PRC de fusión de los amplicones resultantes usando la siguiente combinación de oligonucleótidos “F agm-1Xba1/R agm-1Pac1”. Una vez obtenido el amplicón (agm-1D207V, H209F, D211V) se purificó mediante el kit Zymoclean™ Gel DNA Recovery y se ligó dentro del vector comercial de clonación pGEM®-T Easy Vector System siguiendo las especificaciones del proveedor para la ligación y la transformación de la cepa de *Escherichia coli* DH5- α . Después de un día de incubación a 37° C se recuperaron las colonias transformadas y se procedió a realizar la purificación del vector mediante el kit Zyppy™ Plasmid miniprep.

Una vez purificado el vector pGEM- agm-1D207V, H209F, D211V se realizó la digestión, tanto del vector pMF272 como del vector pGEM- agm-1D207V, H209F, D211V con las enzimas Xba1/Pac1. Posteriormente se realizó la purificación del vector pMF272 linealizado y del fragmento agm-1D207V, H209F, D211V mediante el kit Zymoclean™ Gel DNA Recovery. Una vez purificados ambos productos se realizó la ligación mediante protocolos estándar. El vector resultante pLP-02 (pMF272+ agm-1D207V, H209F, D211V) se transformó en la cepa de *E. coli* DH5- α para su posterior uso en la transformación de *Neurospora crassa*.

2.2.2 Plásmido pLP03

Para la generación del plásmido pLP03 se utilizó la técnica de Golden Gate Cloning, todas las reacciones de PCR para este vector se realizaron con la enzima CloneAmp HiFi PCR Premix (Clontech) y se tomó como vector base el plásmido pMF272. Dicho vector se linealizó mediante PCR con el siguiente par de oligonucleótidos “F pmf272 /R pmf272” resultando un fragmento de 8,479 pb en el cual la región 3' tiene el sitio de corte para la enzima Pac1 y en la región 5' tiene el sitio de corte para la enzima SpeI. Por otro lado, dos fragmentos fueron amplificados para clonar simultáneamente en el vector lineal pMF272: el fragmento “pmf272-agm-1-enteroquinasa” se amplificó con la siguiente combinación de oligonucleótidos “F pmf272agm-1 /R agm-1ent ” el cual resultó en un fragmento de ~1.5 kb que contiene en su extremo 5',

15 nucleótidos de homología con la secuencia 5' del vector lineal pMF272, el marco abierto de lectura del gen *agm-1* y 15 nucleótidos de homología con el sitio de enteroquinasa en su extremo 3'; el fragmento "enteroquinasa-gfp-6xhis-pfm272" se amplificó con el siguiente par de oligonucleótidos "F entgfp /R gfp6xpmf272", el amplicón resultante fue de ~1 kb, el cual contiene en su extremo 5' 15 nucleótidos de homología con el sitio de reconocimiento de enteroquinasa, el marco abierto de lectura del gen *gfp-6xhis* y en su extremo 3' 15 nucleótidos de homología con el extremo 3' del vector lineal pMF272.

Tabla 3. Oligonucleótidos utilizados en este estudio

Nombre	Secuencia
HphF-PCSN44	5'-GATTTTCAGTAACGTTAAGTGG-3'
HphR-pCSN44	5'-GACAGAAGATGATATTGAAGG-3'
F agm-1 Xba1	5'-GCTCTAGAATGTTGCGCCCAACTTT-3'
R agm-1 Pac1	5' -CCTTAATAAAAAGATCGTGCGGCTG-3'
F agm-1 mut	5'-TTTGTTAGCTTTCTCGTGAGCTGGCGACCC-3'
R agm-1 mut	5'- GCTCACGAGAAAAGCTAACAAAGTGGATGAC-3'
F pmf272	5'- GAATTCGATATCAAGCTTATCGATACCGTC- 3'
R pmf272	5'-ACTAGTTCTAGATTTGGTTGATGTGAGGGG- 3'
F pmf272agm-1	5'-CAACCAAATCTAGAACTAGTATGTTGCGCCCAACTTTCAT3'
R agm-1ent	5 -TGCTCACCATGTTAATTAATTTATCGTCGT- 3'
F entgfp	5'-ATTAATTAACATGGTGAGCAAGGGCGAGGA-3
R gfp6xpmf272	5'-ATAAGCTTGATATCGAATTCTTAGTGATGGTGATGATGGT-3'

Una vez contruidos todos los amplicones, se procedió a la purificación de estos mediante el kit NucleoSpin 96 PCR Clean-Up (MACHEREY-NAGEL). Posteriormente, se realizó la reacción de fusión de los tres amplicones purificados mediante el kit In-Fusion HD Cloning Plus (Clontech) siguiendo las recomendaciones del proveedor. La reacción resultante se transformó en células Stellar Competent Cells de la cepa *E. coli* HST08 siguiendo el protocolo del proveedor, una vez seleccionadas las colonias positivas, el plásmido se purificó mediante el kit Zyppy™ Plasmid miniprep para ser transformado en cepas de *N. crassa*.

2.3 Construcción de cepas

Para la construcción de la cepa transformantes, se utilizaron los plásmidos pLP02 y pLP03. Los conidios de la cepa FGSC# 9717 se transformaron mediante electroporación con los plásmidos pLP02 y pLP03. Se utilizó un total de 1.25×10^8 conidios, se lavaron con 500 μL de sorbitol 1 M, posteriormente se centrifugaron a 6 000 x g durante 1 min y se desechó el sobrenadante, este procedimiento se realizó tres veces. Una vez lavados los conidios, se añadieron 3 μg del plásmido pLP02 y pLP03. La transformación fue incubada en hielo por 5 min, posteriormente se transfirieron 40 μL de la mezcla a una cubeta de electroporación de 0.2 cm y se electroporó bajo los siguientes parámetros: 1.5 kv, 600 Ω y 25 μF en un electroporador Gene PulserXCell (Bio-Rad). Inmediatamente, se añadió 1mL de sorbitol 1M y se mezcló con 10 mL de solución de recuperación (2% de sales de Vogel), y se incubó a 30°C a 150 rpm por 2 h, posteriormente esta solución se mezcló con 20 mL de solución de gelatinización (agar 1%, sales de Vogel 2%, sorbitol 1 M y 10% de solución FIGS), una vez mezclada la muestra se vertió en cajas Petri de 150 x 15 mm con 30 mL de medio para aislamiento de colonias (agar 1.8%, sales de Vogel 2% y 10% de solución FIGS).

Las cajas se incubaron a 30°C durante cinco días. Se aislaron 10 colonias de cada una de las cepas transformadas en tubos de vidrio con medio MMV y se incubaron a 30°C durante tres días. Posteriormente se analizaron mediante PCR para corroborar la integración de ambos fragmentos en cada una de las muestras.

2.3.1 Construcción de cepas por fusión

Para la visualización de la AGM-1-GFP y los marcadores de actina TPM-1-mCherry y FIM-1-mCherry se realizaron ensayos de fusión con las siguientes combinaciones: AGM-1-GFP/ TPM-1-mCherry y AGM-1-GFP/FIM-1-mcherry. Los ensayos de fusión se llevaron a cabo con una mezcla de conidios de ambas cepas con 1×10^8 esporas de cada cepa y se inocularon en cajas Petri de 90 x 15 mm con 30 mL de MMV sólido, se incubaron a 30°C durante 16 h y posteriormente el micelio se analizó mediante microscopia confocal.

2.4 Análisis de microscopia confocal

La cepa transformante AGM-1.1 (AGM-1^{D207V, H209F, D211V}-GFP) y las cepas con doble marcaje se crecieron en cajas Petri de (90 X 15mm) con medio mínimo de Vogel al 3% de agar. Además, se evaluó el efecto de drogas anti-F-actina y microtúbulos en la cepa AGM-1-GFP. Se colocaron 10 μ l de Latrunculina B (10 μ g/mL) y 10 μ l de Benomilo (2.5 μ g/mL) respectivamente, de inmediato las muestras fueron observadas en el microscopio. Para la toma de imágenes, se usó el método del bloque de agar invertido (Hickey et al., 2005). Las muestras fueron observadas por microscopía confocal de barrido laser en un microscopio invertido (Olympus Fluoview FV-1000). La fluorescencia de las muestras fue detectada con los siguientes parámetros: GFP (Excitación 488 nm con un láser de Argón, emisión 515-530nm), FM4-64 y mcherry (excitación 488 nm con un láser de Argón, emisión 590-613 nm). Las muestras se visualizaron bajo un objetivo de inmersión en aceite Planacromático 60x/1.4 de apertura numérica y la intensidad del láser se mantuvo al 7% para reducir el foto-blanqueamiento y efectos fototóxicos. Las imágenes de microscopía confocal se capturaron usando el programa FV-10 ASW y fueron evaluadas con el programa FV-10 ASW viewer (versión 4.1). Algunas series de imágenes fueron analizadas con el programa ImageJ.

2.5 Ensayos *in vitro* de polimerización y despolimerización de actina

La actina globular (G-actina) fue disuelta a 1 mg/mL en buffer de polimerización (BP) (2 mM Tris, 0.2 mM CaCl₂, 0.5 mM 2-mercaptoetanol, 0.5mM ATP, 3 mM azida de sodio, pH 7.5). Dos experimentos se realizaron en 1 mL de BP; el experimento control (100 μ g de G-actina ajustada a 1 mL con BP) y el experimento problema (100 μ g de G-actina, 1 mM de agmatina disuelta en BP, ajustado a 1 mL con BP). En ambos experimentos los solutos se mezclaron y centrifugaron a 100 000 x g por 3 h, y las absorbancias fueron medidas en el sobrenadante. El precipitado resultante fue analizado por microscopia electrónica de transmisión. Además, se realizaron dos ensayos para analizar la tasa de despolimerización. Para el primer ensayo, el precipitado obtenido del ensayo de polimerización con agmatina se trató con 10 μ l de agmatinasa purificada de *N. crassa* (100 ng/mL) y con buffer de actividad (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 0.1 mM MnCl₂). Para el segundo ensayo, el precipitado obtenido del ensayo de polimerización con agmatina se trató con buffer de actividad sin enzima (agmatinasa). Después de una incubación por 1 h a 30°C, las muestras fueron ultracentrifugadas a 100 000 x g por 3 h y se midió la absorbancia en el sobrenadante. Adicionalmente, se realizó otro ensayo, pero esta vez se adicionó 1 M de agmatina para saturar la reacción.

2.6 Análisis de microscopía electrónica de transmisión

Los precipitados obtenidos de los ensayos de polimerización (F-actina) fueron colocados en una rejilla de cobre previamente sumergida en buffer de polimerización con 1 mM de agmatina. Posteriormente la rejilla fue tratada con acetato de uranilo al 4% por 2 minutos. Los filamentos de actina fueron analizados bajo un microscopio electrónico de transmisión (Hitachi H-750) (80 Kv).

2.7 Extracción y cuantificación de poliaminas intracelulares

La extracción de poliaminas intracelulares de *N. crassa* se realizó a partir de cultivos líquidos de 3 d de incubación, con aproximadamente 1×10^6 conidios de las cepas WT y $\Delta agm-1$ het; el micelio resultante se liofilizó y se pulverizó para la extracción. Un total de 600 mg de micelio liofilizado fue utilizado para la extracción de poliaminas con 1 mL de metanol por cada 10 mg de micelio; esta solución fue mezclada por vortex por 30 s y centrifugada por 10 min a 8 000 x g. El sobrenante se transfirió a un tubo nuevo y se lavó con 0.5 mL de hexano por cada mL de metanol, la mezcla fue centrifugada por 1 min a 6 000 x g; la fase del hexano fue desechada y este paso de lavado se repitió dos veces. Las poliaminas extraídas fueron secadas bajo flujo por nitrógeno, para después ser resuspendidas en 0.5 mL de acetonitrilo y derivatizadas con 0.5 mL de BSA (N, O-Bis-trimetilsilil-acetamida); la reacción de derivatización fue incubada por 15 min a 75°C.

Las poliaminas fueron cuantificadas usando una curva de calibración con estándar para cada poliamina (putrescina, espermidina, espermina y agmatina). Cuatro diferentes concentraciones fueron usadas (10, 20, 30 y 40 μ mol) y derivatizadas como se describió anteriormente. Las poliaminas fueron cuantificadas mediante un cromatógrafo de gases equipado con un detector FID (Ionización de flama) (Agilent 7820 A) y una columna Ultra- 1 (25m x 320 μ m x 0.52 μ m) (Agilent, Santa Clara, CA). Dos μ l de cada muestra fue inyectada en el cromatógrafo y el programa de temperatura comenzó en 150°C por 2 min con incrementos de 14°C por min hasta los 320°C en donde se mantuvo por 5 min. La cuantificación de poliaminas se llevó en tres replicas y por triplicado para cada replica y las desviaciones estándar fueron calculadas. La significancia fue calculada por la prueba de t de student.

2.8 Extracción de proteínas totales

La extracción de proteínas totales se realizó a partir de cultivos en medio líquido. Aproximadamente 1×10^7 conidos fueron cultivados en 2 L de medio mínimo de Vogel líquido (MMV) por 7 días, después el micelio se filtró con vacío para quitar el exceso de líquido, posteriormente se liofilizó durante 4 hs. Una vez seco el micelio, se pulverizó y resuspendió en buffer de extracción (50 mM Tris-HCL, pH 7.5; 100 mM de NaCl, 10 mM de $MgCl_2$, 0.5% (v/v) de NP-40) suplementado con inhibidor de proteasas (mini complete Roche), se mezcló por agitación con vortex durante 1 min y se dejó incubar a 4°C durante 30 min. Posteriormente, la mezcla se centrifugó a 8 000 x g durante 10 min a 4°C, se recuperó el sobrenadante y se centrifugó nuevamente en una ultracentrífuga Optima™ MAX-XP (Beckman-Coulter) a 40,000 x g x g durante 1 h, se recuperó el sobrenadante y se filtró mediante tubos de ultrafiltración Amicon® Ultra-15 (Merck Millipore) a 8 000 rpm durante 1 h para concentrar la muestra proteica en 10 mL con buffer A para FPLC (40 mM de imidazol, 50 mM de NaH_2PO_4 , 300 mM NaCl, a pH 8 y filtrado por 0.45 μm). El extracto proteico se almacenó a -80°C para su uso posterior.

2.9 Purificación de la proteína AGM-1-ent-GFP-6xhis y ensayo de enteroquinasa

La purificación de la proteína AGM-1-ent-GFP-6xhis se realizó mediante Flash Protein Liquid Chromatography FPLC (Äkta prime plus, GE Healthcare Life Sciences). Una vez obtenido el extracto proteico se resuspendió en 10 mL de buffer A (40 mM de imidazol, 50 mM de NaH_2PO_4 , 300 mM NaCl, a pH 8 y filtrado por 0.45 μm). Para la purificación se utilizó una columna de afinidad de níquel de 5 mL, y el buffer B (500mM de imidazol, 50 mM NaH_2PO_4 , 300 mM NaCl a pH 8) se utilizó para la elución de la proteína, el programa utilizado fue el recomendado por el proveedor para purificación de proteínas con histag (Histag purification program). Una vez purificada la enzima, se sometió 1 mL de enzima purificada al tratamiento con la enteroquinasa para liberar la agmatinasa de la GFP, los parámetros utilizados fueron los siguientes: 0.5 U/ μl de enteroquinasa con 4 h de incubación a 37°C.

2.10 Purificación de la proteína AGM-1-GFP

La cepa que expresa a la proteína AGM-1-GFP se cultivó en medio mínimo de Vogel líquido por 7 d en oscuridad para evitar la formación de hifas aéreas y conidiosporas, una vez crecido el micelio, fue pulverizado con nitrógeno líquido y resuspendido en buffer de extracción 1X (20mM Tris HCL, pH 7.5, 500 mM de NaCl, 0.5% de NP-40 e inhibidor de proteasas) y se centrifugó a 8 000 x g a 4°C. El sobrenadante se colectó para realizar la purificación mediante inmunoprecipitación con perlas magnéticas fusionadas a un anticuerpo anti-GFP (Allele GFP-nAB Magnetic agarose beads) siguiendo las instrucciones del proveedor, con las siguientes excepciones: el buffer de lisis, el de unión, y el de lavado fueron sustituidos con el buffer de extracción descrito anteriormente. Para recuperar la proteína purificada, las perlas magnéticas se resuspendieron con 200 mM de glicina a pH 2.5 y se ajustó el pH con 1 M de Tris-base.

2.11 Ensayo de actividad del complejo proteico AGM-1-GFP

Dos ensayos de actividad fueron realizados usando 0.5 y 1 µg de agmatinasa-GFP, en buffer de actividad (50 mM Tris-HCl pH 8.5, 0.1 mM MnCl₂ y 100 mM de agmatina) en 1 mL. Las reacciones fueron incubadas a 30°C por 24 hs. Posteriormente se cuantificó la producción de urea usando métodos estándar con el kit urea 37° (Spinereact). Ambos ensayos fueron hechos por triplicado.

2.12 Caracterización bioquímica de la AGM-1

Para caracterizar la actividad de la proteína purificada se realizaron ensayos con 10 µL de agmatinasa purificada (39 µg/mL). Los parámetros variables fueron los siguientes: pH, termoestabilidad, cinética de transformación y presencia de cofactores. Posteriormente, se cuantificó la producción de urea usando métodos estándar mediante el kit urea 37° (Spinereact®).

2.12.1 Efecto del manganeso como cofactor

Los ensayos para determinar la actividad de la agmatinasa en presencia de manganeso se llevaron a cabo en 1 mL de una solución con sulfato de agmatina 10 mM, 0.39 μ g de agmatinasa purificada y buffer Tris-HCl 50 mM a pH de 7.5. Cada reacción se incubó 60 min a 30°C y se realizaron tres ensayos por triplicado. Al primero se le agregó 0.1 mM de cloruro de manganeso (MnCl_2), al segundo ensayo no se agregó cloruro de manganeso y al tercero se le agregaron 100 mM de EDTA sin la adición de cloruro de manganeso. Las tres reacciones se aforaron a 1 mL con agua destilada, y se analizó la producción de urea como se describió anteriormente.

2.12.2 Determinación de actividad específica

Para determinar la actividad específica de la agmatinasa se realizó una curva de producción de urea con respecto al tiempo. La producción de urea se determinó mediante siete ensayos por triplicado, los cuales se llevaron a cabo en 1 mL de una solución con sulfato de agmatina 10 mM, 0.39 μ g de agmatinasa purificada, 0.1 mM de MnCl_2 y buffer Tris-HCl 50 mM a pH de 7.5. Cada reacción se incubó a 30°C desde 0 a 70 min en intervalos de 10 min y posteriormente, se analizó la producción de urea como se describió anteriormente mediante el kit urea 37 (Spinereact®).

Las gráficas correspondientes se realizaron utilizando el programa Excel Microsoft 365 y se calculó la actividad específica en U/mg.

2.12.3 Determinación de la termoestabilidad

Para evaluar la termoestabilidad de la enzima purificada, se utilizó como control una muestra de enzima que permaneció a 4°C desde su purificación hasta su uso, mientras que los ensayos siguientes se realizaron incubando la enzima 15 min a diferentes temperaturas, desde 20° a 70°C en intervalos de 10°C. Posteriormente, se realizaron 7 ensayos por triplicado, los cuales se llevaron a cabo en 1 mL de una solución con sulfato de agmatina 10 mM, 0.39 μ g de agmatinasa purificada, 0.1 mM de MnCl_2 y buffer Tris-

HCl 50 mM a pH de 7.5. Cada reacción se incubó a 30°C durante 60 min y posteriormente se analizó la producción de urea como se describió anteriormente mediante el kit urea 37 (Spinereact®).

Las gráficas correspondientes se realizaron el programa Excel Microsoft 365 y se determinó el porcentaje de producción de urea, tomando como 100% la cantidad de urea producida en el control.

2.12.4 Determinación del pH óptimo

La evaluación del pH óptimo de reacción se realizó mediante 8 ensayos por triplicado, los cuales se llevaron a cabo en 1 mL de una solución con sulfato de agmatina 10 mM, 0.39 µg de agmatinasa purificada, 0.1 mM de MnCl₂ y buffer ácido cítrico-fosfato para los pH de 3, 4, 5 y 6, Tris-HCl 50 mM a pH de 7 y 8, y Buffer Borato-NaOH para pH de 9.4 y 10.6. Cada reacción se incubó a 30°C durante 60 min y posteriormente se analizó la producción de urea como se describió anteriormente mediante el kit urea 37 (Spinereact®).

2.12.5 Determinación de parámetros cinéticos

Para analizar los parámetros cinéticos de la enzima purificada, se realizaron 6 ensayos por triplicado con diferente cantidad sustrato; desde 0 hasta 150 mM, los ensayos se llevaron a cabo en 1 mL de una solución con 0.39 µg de agmatinasa purificada, 0.1 mM de MnCl₂ y buffer Tris-HCl 50 mM a pH de 7.5. Cada reacción se incubó a 30°C durante 60 min y posteriormente se analizó la producción de urea como se describió anteriormente mediante el kit urea 37 (Spinereact®).

Después de analizar la producción de urea en cada ensayo, en todos los casos se determinaron las velocidades iniciales y los datos se ajustaron a curvas hiperbólicas tipo Michaelis-Menten. La determinación de los parámetros cinéticos se realizó con la representación secundaria de Lineweaver-Burk ($1/v$ y $1/[S]$) con ayuda del software Excel Microsoft 365.

Capítulo 3. Resultados

3.1 Relación entre la agmatinasa y la actina

3.1.1 El Spk está afectado en la cepa $\Delta agm-1$

Para determinar si el Spk así como la ramificación están afectados por la deficiencia de la agmatinasa, se usó la cepa mutante $\Delta agm-1$ het debido a que la mutante homocarion no crece. Además, se usó el marcador FM4-64 para visualizar al Spk y la membrana plasmática. En la WT la ramificación de las hifas es de manera lateral principalmente, además, el Spk se encuentra organizado en la parte apical de la hifa **Figura 5A**. Sin embargo, en la cepa mutante $\Delta agm-1$ het la ramificación es de manera apical y el Spk se observa en forma de una nube de fluorescencia de manera desorganizada, además, se observaron acumulaciones de fluorescencia circulares a lo largo de toda la hifa **Figura 5B**.

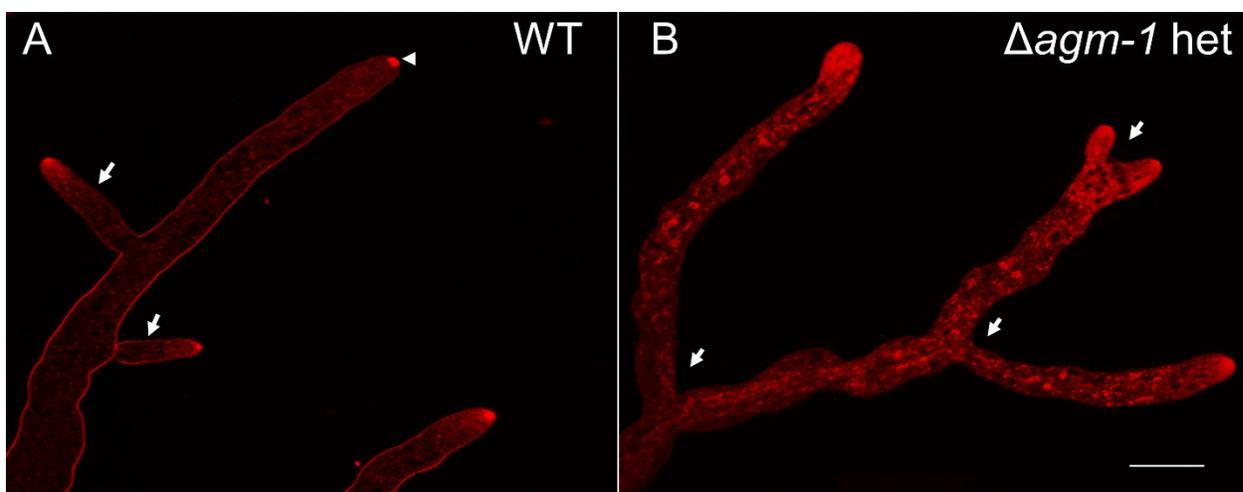


Figura 5. Localización del Spk (cabeza de flecha) y ramificación (flecha). La fluorescencia corresponde al marcador lipofílico FM4-64. Barra de escala 20 μ m

3.1.2 La cepa mutante heterocarion $\Delta agm-1$ het tiene menor concentración de agmatina que la WT

Con la finalidad de evaluar si la deficiencia de la AGM-1 afecta la concentración de poliaminas intracelulares, se cuantificaron por cromatografía de gases. Los resultados en la cepa mutante mostraron una concentración de agmatina intracelular de 4.80 ± 0.17 μ g/10 mg de micelio liofilizado, mientras que en la WT la concentración de agmatina fue de 2.97 ± 0.29 μ g/10 mg ($p < 0.05$). Sin embargo, la

concentración de putrescina fue de $10.17 \pm 1.65 \mu\text{g}/10 \text{ mg}$ en la WT y $8.20 \pm 0.93 \mu\text{g}/10 \text{ mg}$ en la cepa mutante ($p > 0.05$), mientras que la concentración de espermidina fue de $31.90 \pm 0.12 \mu\text{g}/10 \text{ mg}$ en la WT y $31.72 \pm 0.69 \mu\text{g}/10 \text{ mg}$ en la cepa mutante ($p > 0.05$) **Figura 6**. Además, no se logró detectar la concentración de espermina.

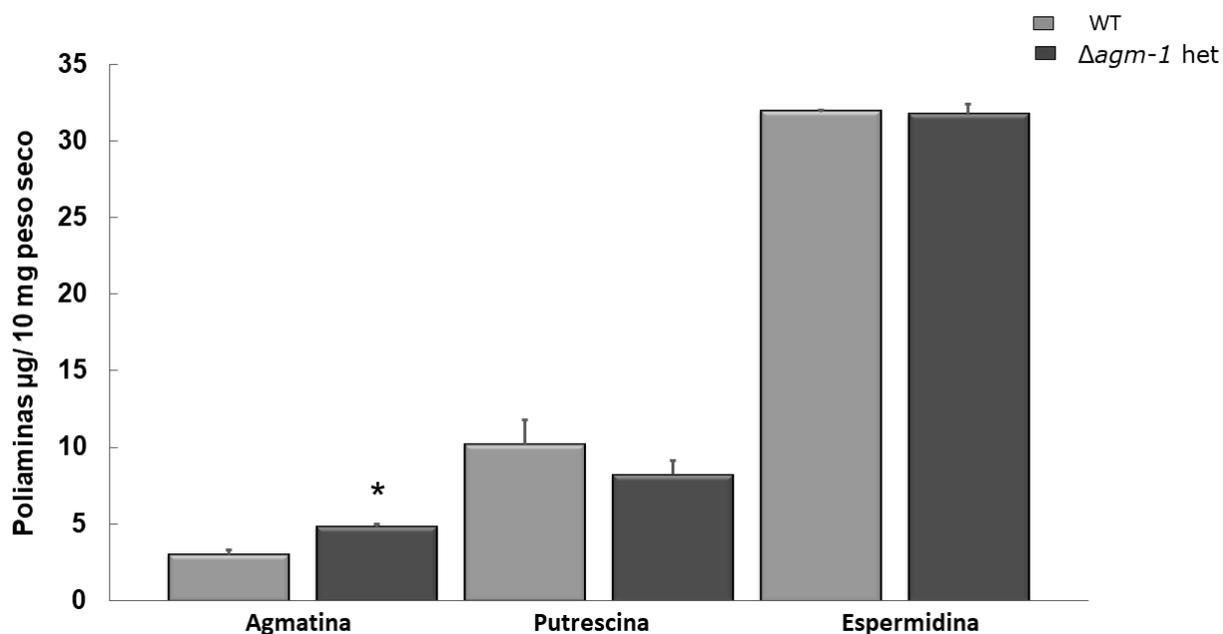


Figura 6. Concentración intracelular de poliaminas (agmatina, putrescina y espermidina) en la WT y mutante heterocarión. No se encontró diferencia significativa en las concentraciones de putrescina y espermidina, pero si en la agmatina.

3.1.3 El complejo agmatinasa-GFP colocaliza con proteínas de unión a actina

Previamente se observó que la agmatinasa podría estar relacionada con las diferentes poblaciones de F-actina (Pérez-Mozqueda, 2015). Para confirmar esta relación, se llevaron a cabo ensayos de colocalización con dos marcadores de las poblaciones de F-actina la tropomiosina (TPM-1) que se localiza en la región del Spk y la fimbrina (FIM-1) que se localiza en el anillo endocítico y ambas en el septo. En cepas que coexpresan la agmatinasa-GFP (AGM-1-GFP) con la tropomiosina-mcherry (TPM-1-mCherry) y con la fimbrina-mcherry (FIM-1-mCherry) respectivamente, se observó que AGM-1-GFP se encuentra localizada en junto con la F-actina en la región del Spk, colocalizando con TPM-1-mCherry **Figura 7A**. AGM-1-GFP también se localizó en la región del collar endocítico junto con FIM-1-mCherry **Figura 7B**. Sin embargo, se

observan sitios de fluorescencia en la periferia de la hifa correspondientes a la AGM-1-GFP los cuales no colocalizan con la FIM-1 **Figura 7B**.

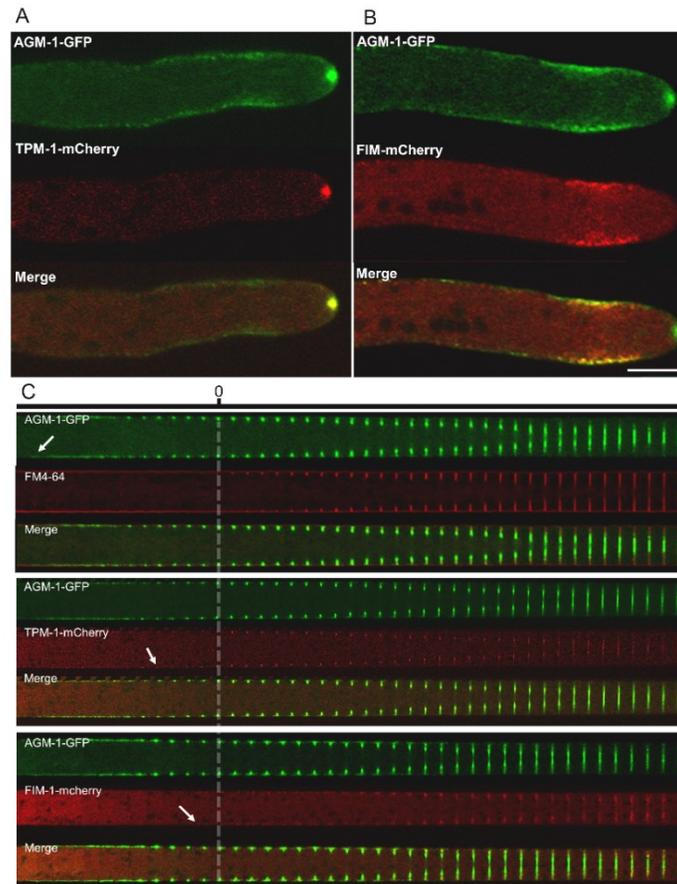


Figura 7. Localización intracelular de la agmatinasa, tropomiosina y fimbrina en *N. crassa*. Mediante ensayos de fusión fue posible observar que la AGM-1 colocaliza con dos componentes del citoesqueleto de actina A) la tropomiosina la cual se localiza en la punta de la célula en la región del Spk y B) la fimbrina la cual se localiza en la región del anillo endocítico. C) la serie de tiempo muestra la localización de la agmatinasa, la tropomiosina y la fimbrina durante el desarrollo del septo en la cual, se puede observar que la fluorescencia de la AGM-1 se acumula en la membrana plasmática antes de la invaginación de la membrana la cual está marcada con FM4-64. Además, se observa que la TPM-1 y la FIM-1 aparecen en la membrana plasmática después de la AGM-1. Las flechas indican el momento de aparición de dichas proteínas y la línea punteada indica el momento de la invaginación de la membrana. Barra de escala 10 μm .

Por otra parte, durante una serie de tiempo en el momento de formación del septo, se logró observar que la AGM-1 es la primera de las tres proteínas estudiadas en localizarse en el sitio donde se formará un septo. Además, de que comienza como una acumulación en la periferia de la hifa antes de que comience la invaginación de la membrana **Figura 7C**. Una vez iniciada la invaginación de la membrana, la fluorescencia de la AGM-1 comienza a cerrarse localizándose en los polos internos del anillo contráctil del

septo. En cuanto a la TPM-1 y la FIM-1, se logró observar que la fluorescencia también aparece antes de la invaginación de la membrana **Figura 7C**, pero a diferencia de la AGM-1 el tiempo de aparición es más cercano a que suceda dicho evento.

3.1.4 Los disruptores de F-actina y de los filamentos de tubulina afectan la dinámica y localización de la AGM-1

La localización de la AGM-1-GFP y Lifeact-GFP fue analizada bajo la presencia de disruptores de la F-actina y de los microtúbulos; Latrunculina B y Benomilo, respectivamente. Los resultados mostraron que al utilizar Latrunculina B, la fluorescencia de la AGM-1, así como la de Lifeact-GFP se ve afectada, al igual que la localización del marcador lipofílico FM4-64; los tres marcadores (AGM-1-GFP, Lifeact-GFP y FM4-64) se localizaron en la periferia de la hifa madura, además con el marcador FM4-64 se puede observar que en presencia de Latrunculina B el Spk desaparece. En cambio, cuando se usa Benomilo la morfología de la hifa se ve afectada, pero la fluorescencia de la AGM-1-GFP y de Lifeact-GFP no desaparece de la zona apical de la hifa. Sin embargo, se logró apreciar como la fluorescencia en la región del Spk no es tan definida como en las cepas sin tratamiento **Figura 8**. Por otra parte, con el marcador FM4-64 se logró observar como el Spk se encuentra difuso cuando se expone la hifa al Benomilo **Figura 8**.

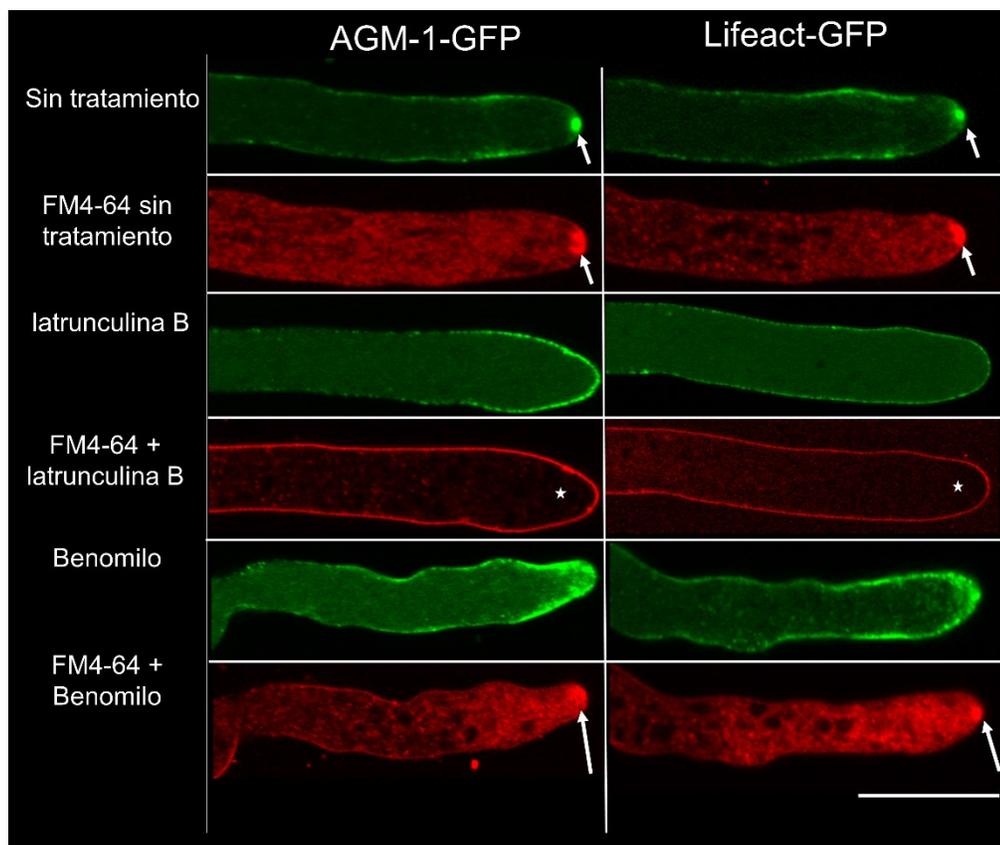


Figura 8. Localización de la AGM-1-GFP y Lifeact-GFP en presencia de Latrunculina B y Benomilo. Latrunculina B afecta la localización de la AGM-1-GFP y de Lifeact-GFP; la fluorescencia de ambos marcadores se pierde en la región del Spk y del anillo endocítico, además el Spk no es detectado con el FM4-64 (asterisco). La exposición a Benomilo afecta la morfología de la hifa y se observa una ligera afeción en la localización de la AGM-1 y de Lifeact-GFP. Por otro lado, el Spk en presencia de Benomilo (Flechas) no se encuentra bien definido en comparación con las imágenes sin tratamiento. Barra de escala 20 μ m.

3.1.5 La agmatina favorece la polimerización de la G-actina *in vitro*

La polimerización de los filamentos de actina en presencia de agmatina se evaluó en ensayos *in vitro*. Los resultados obtenidos muestran la absorbancia a tres diferentes longitudes de onda (290, 300 y 310) correspondiente a la actina globular (G-actina), la cual, es proporcional a la cantidad de G-actina en solución. Los resultados de absorbancia antes de la incubación muestran datos similares con y sin agmatina, sin embargo, después de la incubación los datos de absorbancia son menores en la muestra con agmatina en comparación con la muestra sin agmatina **Tabla 4**. Después de analizar las absorbancias del sobrenadante también se analizó el precipitado por microscopía electrónica, las imágenes resultantes muestran la formación de los filamentos de actina (F-actina) en la muestra sin agmatina **Figura 9A**, así como en la muestra con agmatina **Figura 9B**.

Tabla 4. Datos de absorbancia correspondientes a la cantidad de G-actina en solución.

λ	Abs antes de la incubación		Abs despues de la incubación		Abs filamentos de actina sin agmatinasa	Abs filamentos de actina con agmatinasa
	Sin agmatina	Con agmatina	Sin agmatina	Con agmatina		
290 nm	0.129±0.001	0.128±0.004	0.021±0.006	0.008±0.002	0.005±0.002	0.023±0.002
300 nm	0.138±0.004	0.140±0.004	0.019±0.0005	0.003±0.002	0.004±0.001	0.019±0.002
310 nm	0.139±0.007	0.143±0.005	0.020±0.003	0.003±0.004	0.002±0.001	0.018±0.001

± (Desviación estándar de tres replicas)

Por otra parte, los resultados de los ensayos de despolimerización con los filamentos de actina más agmatina (F-actina+agmatina) muestran un aumento en la absorbancia en la muestra con agmatinasa en comparación con la muestra sin agmatinasa **Tabla 4**.

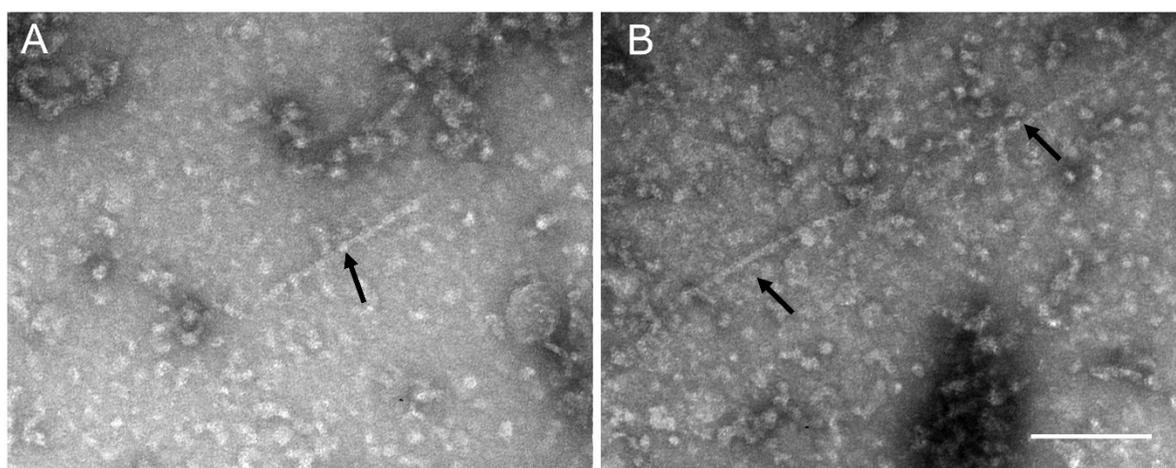


Figura 9. Filamentos de actina polimerizados *in vitro*. A) F-actina polimerizada sin tratamiento de agmatina, B) F-actina polimerizada con agmatina, las flechas señalan el filamento. Barra de escala 100 nm.

3.1.6 El sitio de unión al sustrato en la AGM-1 es esencial para su localización intracelular

Para determinar si la localización de la agmatinasa es debido a su unión al sustrato agmatina, se realizó una cepa mediante mutagénesis sitio dirigida la cual, expresa una agmatinasa mutante (AGM-1.1) que consiste en la sustitución de tres aminoácidos esenciales para la unión con la agmatina (D207V, H209F y D211V). Posteriormente, se visualizó la localización intracelular de dicha proteína (AGM-1^{D207V, H209F, D211V}-GFP). Los resultados obtenidos mostraron que la proteína AGM-1.1 pierde su localización en las regiones del collar endocítico, el septo y el Spk y se encuentra localizada en todo el citoplasma de la hifa en forma de puntos fluorescentes los cuales no llegan a la región apical de la célula **Figura 10**. Sin embargo, con el marcador FM4-64 se observa que el Spk se sigue formando de manera normal, además de que la

morfología de la célula no se ve alterada. Esto es debido a que la cepa mutante conserva la agmatinasa silvestre por lo que el crecimiento y desarrollo no se debería ver afectado.

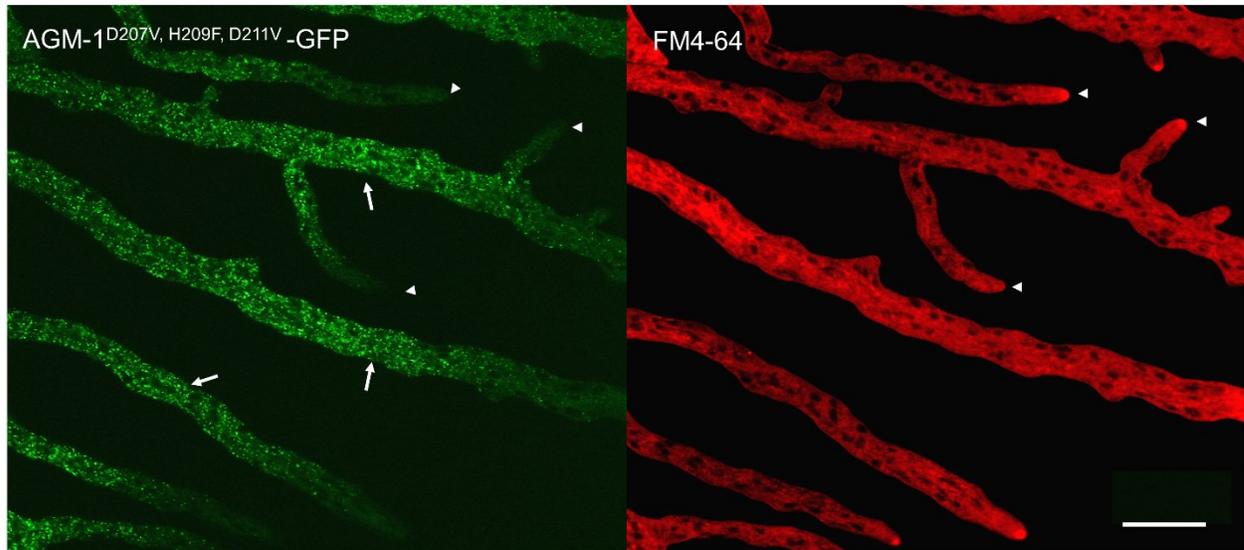


Figura 10. Localización intracelular de la proteína AGM-1.1 (AGM-1^{D207V, H209F, D211V}-GFP). En el panel izquierdo se puede observar la deslocalización de la proteína AGM-1.1 en las regiones el anillo endocítico y del Spk y se presenta en forma de puntos fluorescentes (flechas) distribuidos por todo el citoplasma de la hifa excluyendo la zona apical de la misma (cabeza de flecha). En el panel derecho, se aprecia el Spk (cabeza de flecha) marcado con FM4-64. Barra de escala 10 μ m.

3.2 Caracterización enzimática de la agmatinasa

Los ensayos de caracterización enzimática se realizaron mediante la cuantificación de la urea producida en la reacción, para lo cual se realizó la curva de calibración de la urea a diferentes concentraciones y poder determinar la concentración de urea con respecto a la absorbancia medida en el espectrofotómetro. Mediante ensayos enzimáticos se evaluaron las características enzimáticas de la proteína agmatinasa, dentro de estos parámetros se evaluó la dependencia del ion divalente manganeso para la actividad enzimática, la temporalidad de la reacción y su actividad específica, la termo estabilidad de la enzima, su estabilidad a diferentes pH y los parámetros cinéticos.

3.2.1 Curva de calibración de urea

Se determinó la concentración de urea con respecto a la absorbancia mediante una curva de calibración en la cual, se midió la absorbancia a 510 nm en diferentes concentraciones de urea **Tabla 5** y se determinó la ecuación de la recta y el coeficiente de correlación que fue $R^2=0.9684$ **Figura 11**.

Tabla 5. Absorbancias (510 nm) y concentraciones de urea usadas para la curva de calibración

Cantidad de urea ($\mu\text{g/ml}$) 2ml	Molaridad (μM)	Abs (510 nm)
0	0.00	0
2.5	41.63	0.0103
5	83.25	0.0146
10	166.50	0.0248
15	249.75	0.0361
25	416.25	0.0796

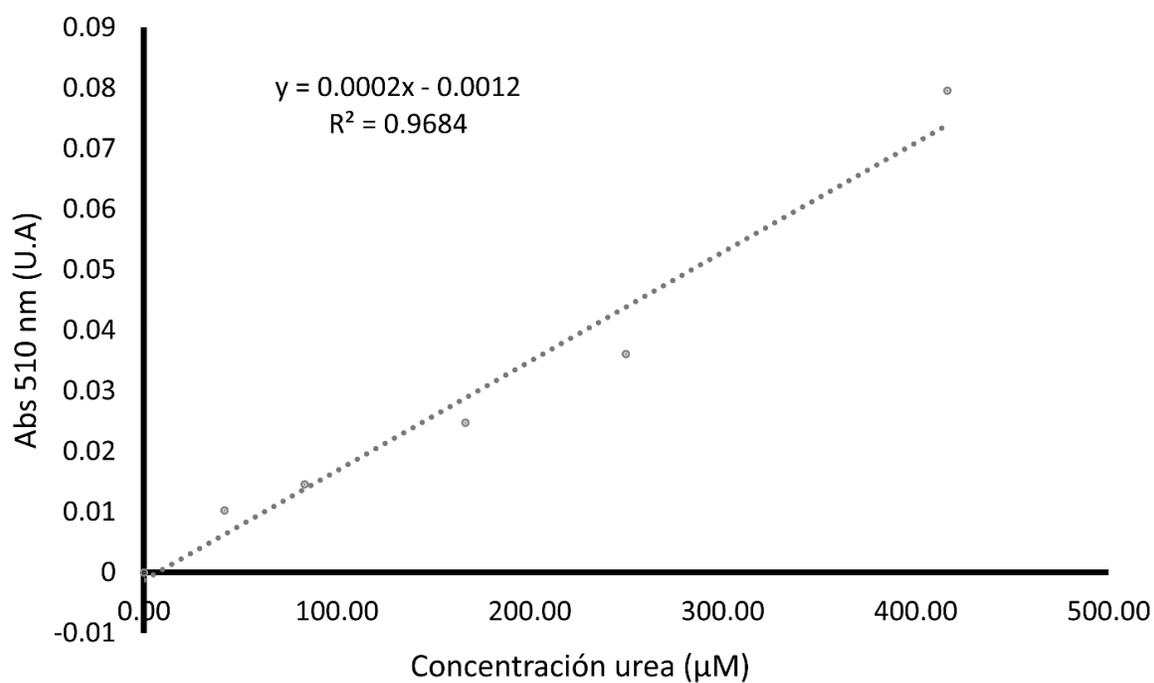


Figura 11. Curva de patrón de concentración de urea, el inserto muestra la ecuación resultante de la regresión lineal.

3.2.2 La proteína purificada AGM-1-GFP de *N. crassa* presenta actividad enzimática

Para probar si la AGM-1 marcada con GFP tiene o no actividad enzimática, se purificó la proteína de *N. crassa* y se determinó su actividad enzimática *in vitro*. En los organismos la agmatinasa (AGM-1) hidroliza a la agmatina para producir urea y putrescina, por lo cual, dos ensayos independientes fueron realizados usando dos cantidades de agmatinasa; 0.5 y 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de proteína. Después del periodo de incubación de la reacción, se cuantificó la cantidad de urea producida dando como resultado 7.35 ± 0.67 y 12.7 ± 1.53 μg de urea/mL respectivamente **Figura 12**.

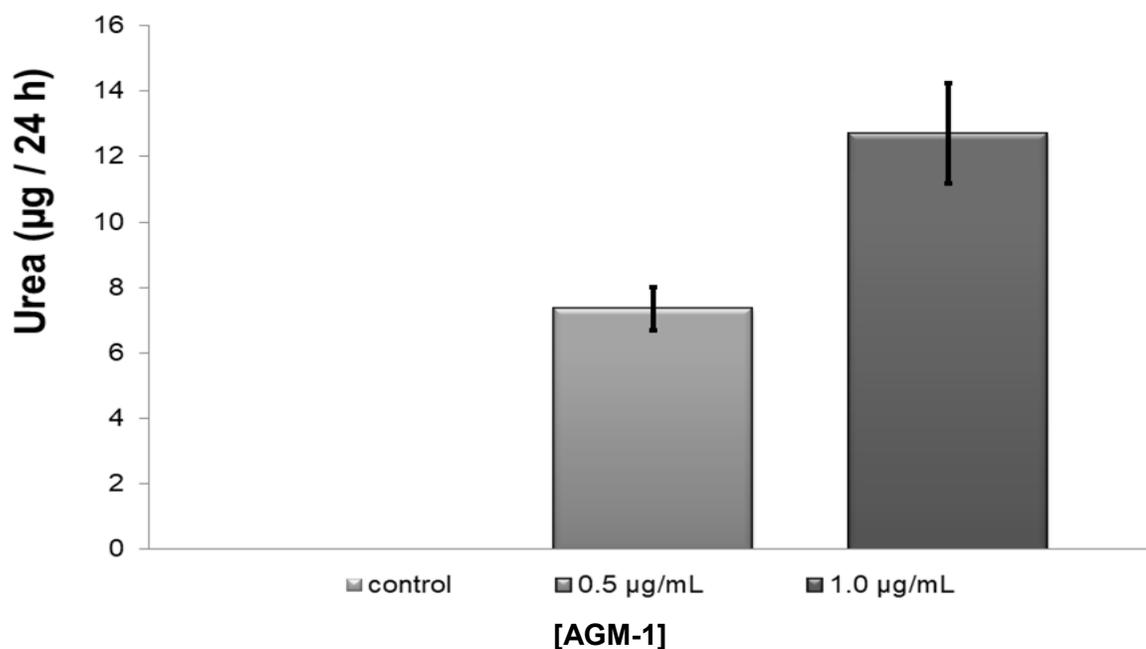


Figura 12. Análisis enzimático *in vitro* de la proteína AGM-1-GFP. Cuantificación de la producción de urea en dos diferentes concentraciones de proteína

3.2.3 Purificación de la proteína AGM-1

La purificación de la enzima se realizó mediante FPLC con columna de afinidad a níquel **Anexo B** posteriormente se evaluó la purificación mediante SDS page en el cual, se pudo corroborar la purificación del complejo AGM-1-GFP con una banda de aproximadamente 68 kDa (AGM-1: Aprox. 43kDa y GFP: Aprox. 25 kDa) **Figura 13 carril 3** también, se observó otra banda más grande que se encuentra entre 100 y 130 kDa. Por otra parte, una vez realizada la digestión con la enteroquinasa se corroboró la separación de la proteína AGM-1 y de la GFP con dos bandas de aproximadamente 43 y 25 kDa respectivamente. No obstante, se continuó observando la banda de 100 a 130 kDa. **Figura 13 carril 4**.

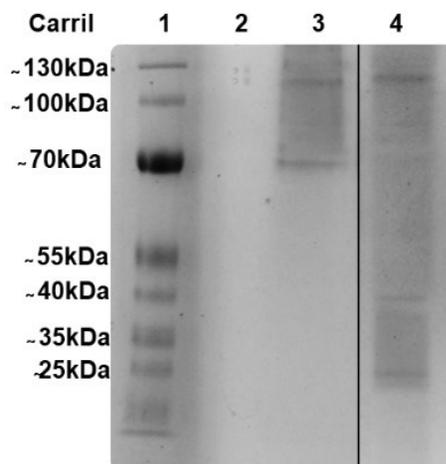


Figura 13. SDS PAGE de la proteína purificada. Carril 1: Marcador de peso molecular, Carril 2: Vacío, Carril 3: complejo proteico AGM-1-GFP~63 kDa y Carril 4: Proteína AGM-1 y GFP separadas ~43 y 25 kDa respectivamente.

3.2.4 La actividad de la enzima agmatinasa de *N. crassa* depende del ion manganeso

Mediante la cuantificación de la urea, se determinó la actividad de la enzima AGM-1 en presencia y ausencia del ion manganeso (Mn), los resultados muestran que a 0.1 mM de cloruro de manganeso la enzima agmatinasa produce 15.24 ± 1.01 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de urea, sin manganeso la concentración de urea disminuye a 7.24 ± 0.38 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y con la adición de 100 mM de EDTA la concentración de urea disminuye drásticamente a 1.68 ± 0.38 $\mu\text{g}/\text{mL}$ **Figura 14**

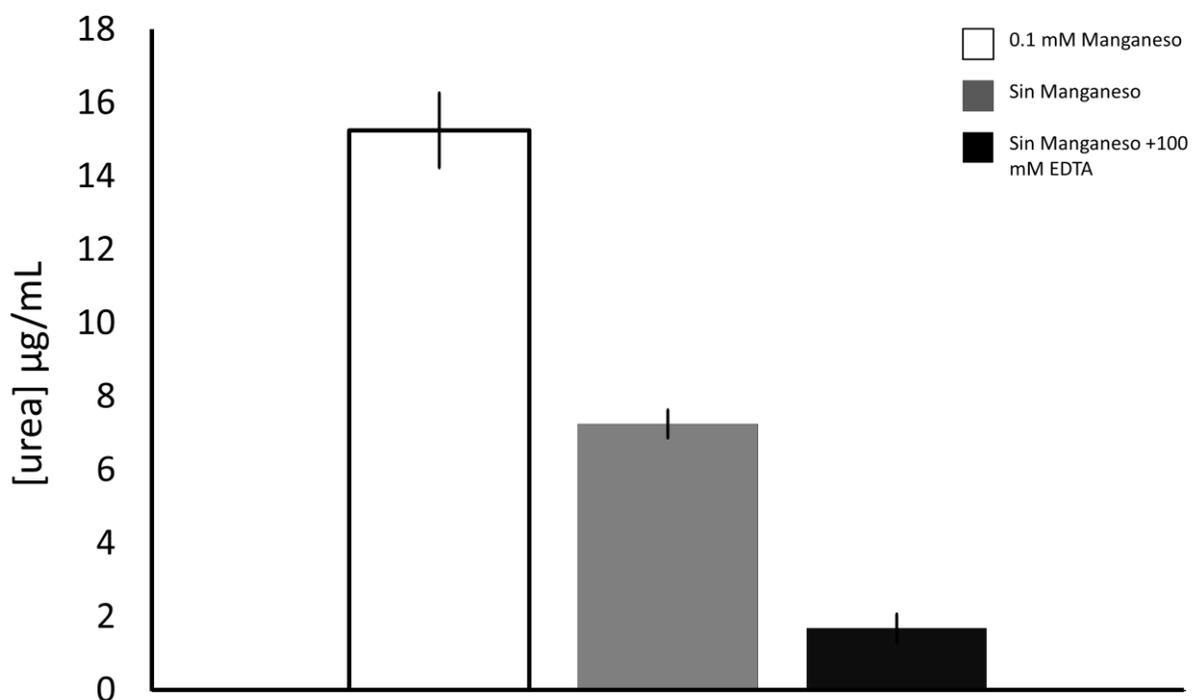


Figura 14. Actividad enzimática de la agmatinasa en presencia de manganeso. La gráfica muestra la producción de urea en tres diferentes ensayos enzimáticos con 0.1mM de $MnCl_2$, sin $MnCl_2$ y sin $MnCl_2$ adicionando 100 mM de EDTA. La mayor concentración de urea producida se observa en el tratamiento con $MnCl_2$.

3.2.5 Cinética de transformación y actividad específica de la agmatinasa de *N. crassa*

Los resultados mostraron que la absorbancia correspondiente a la concentración de urea aumenta cuando los tiempos de incubación aumentan, alcanzando el punto máximo a los 60 min de incubación. La cantidad de urea producida durante los ensayos enzimáticos es detectable desde los 20 min de incubación a 30°C

Figura 15. Con los resultados obtenidos de la cinética de transformación, se obtuvo la ecuación de la recta de la fase lineal de la curva que representa la velocidad máxima de transformación con la que se determinó la actividad específica, la cual resultó en 1.5 U/mg de proteína.

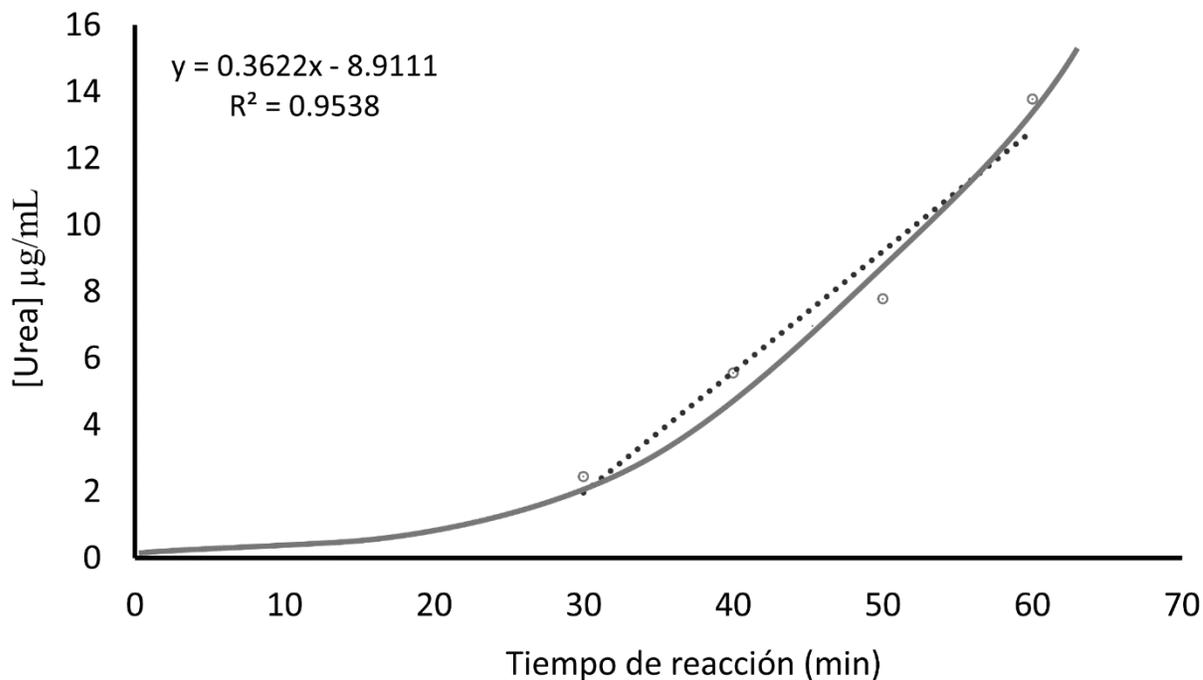


Figura 15. Producción de urea con respecto al tiempo de incubación. La gráfica muestra la ecuación de la recta obtenida de la fase lineal de la curva (línea punteada) y el punto máximo de producción de urea alcanzado a los 60 min de incubación. Posterior a este tiempo la gráfica llega a la asíntota.

3.2.6 Perfil de pH de la agmatinasa de *N. crassa*

Se encontró que la actividad de la enzima agmatinasa depende del pH de la solución, los resultados obtenidos mostraron que la producción de urea es detectable a un pH de 2. Sin embargo, cuando el pH de la solución aumenta también aumenta la producción de urea, alcanzando el punto máximo de producción a un rango de pH de 8 a 8.5, al incrementar más el pH de la solución, la producción de urea disminuye drásticamente **Figura 16**.

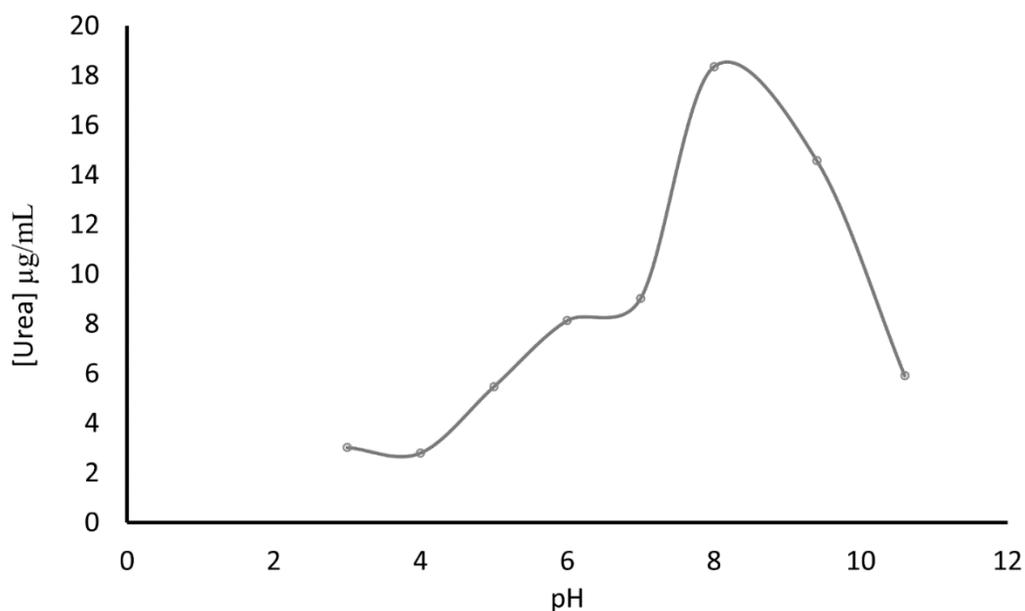


Figura 16. Actividad enzimática de la agmatinasa a diferentes pH. La gráfica muestra la urea producida por la agmatinasa a diferentes pH, se observa un pico máximo de producción en el rango de pH 8 a 8.5 y posteriormente un decremento.

3.2.7 Termoestabilidad de la agmatinasa de *N. crassa*

Los ensayos de termo estabilidad mostraron que la enzima agmatinasa pierde cerca del 30% de su actividad incubándola a 20° C antes de la reacción y solo bastan 30° C para que la enzima pierda el 50 % de su actividad **Figura 17**. Sin embargo, a los 70° C aún se puede detectar cerca del 6 % de actividad de la enzima. Todos los porcentajes fueron calculados con respecto al 100% del control el cual, consistió en la reacción enzimática sin incubar la agmatinasa antes del ensayo, en esta reacción, la agmatinasa usada siempre se mantuvo a 4° C hasta su uso.

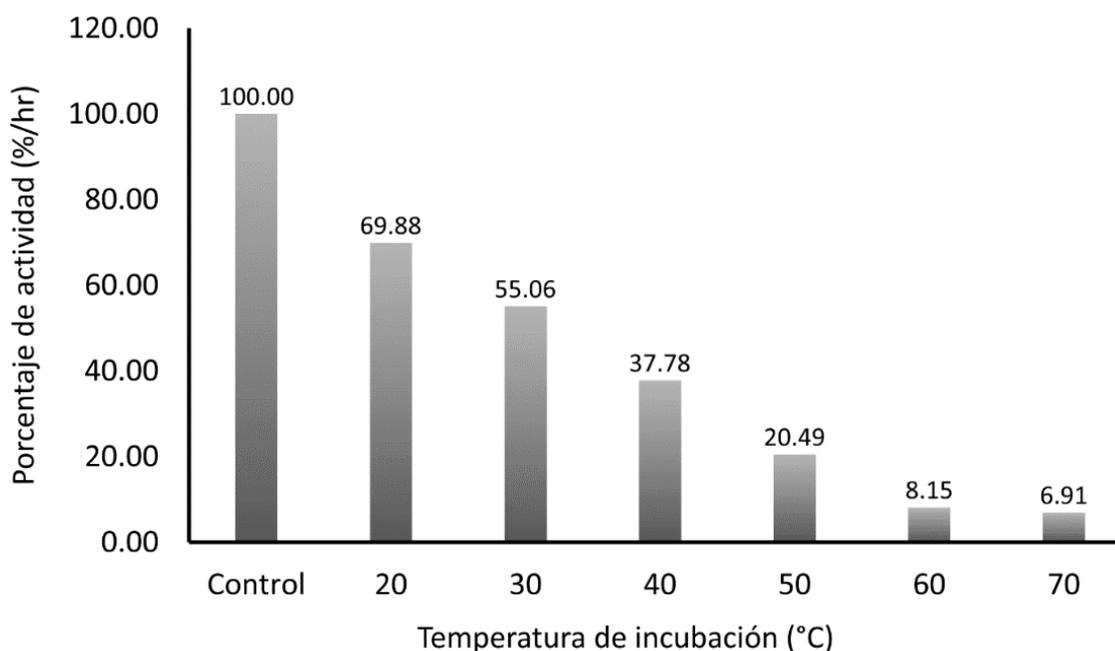


Figura 17. Termoestabilidad de la agmatinasa. La enzima agmatinasa mantiene cerca del 70% su actividad después de una incubación a 20° C durante 15 min. Y pierde aproximadamente 93% de su actividad a 70°C.

3.2.8 Determinación de parámetros cinéticos de la agmatinasa a de *N. crassa*

Los parámetros cinéticos resultantes de la agmatinasa con respecto al sustrato agmatina mostraron un comportamiento de tipo Michaelis-Menten **Figura 18**, con una K_m de 105.6×10^{-6} M. la k_{cat} calculada fue 0.029 s^{-1} y se obtuvo una eficacia catalítica (k_{cat}/K_m) de $2.7 \times 10^2 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$

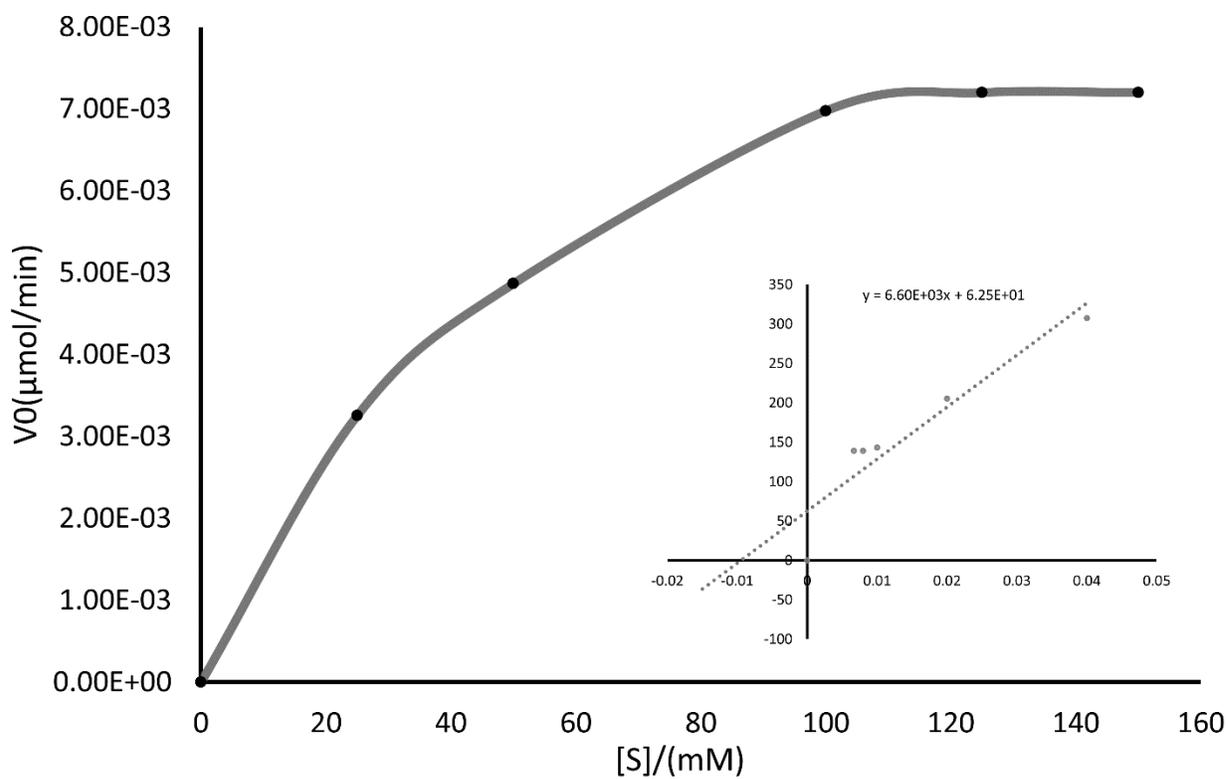


Figura 18. Velocidades iniciales de la agmatinasa a incrementos de concentraciones de agmatina. Los datos se ajustaron a una curva de tipo hiperbólico. En el inserto se muestra la representación de Lineweaver-Burk y la ecuación de la recta.

Capítulo 4. Discusión

4.1 Elucidando la relación de la agmatinasa con el citoesqueleto de actina

La agmatinasa (AGM-1) es una metaloenzima la cual hidroliza agmatina para producir putrescina y urea en la ruta alterna para la biosíntesis de poliaminas en bacterias, plantas y mamíferos (Michael, 2016). Sin embargo, en hongos como *N. crassa* la AGM-1 no había sido reportada, de hecho la ruta de la ODC había sido descrita como la única ruta de síntesis de poliaminas en este organismo (McDougall et al., 1977). No obstante, la secuencia de la AGM-1 (NCU01348) en *N. crassa* contiene los residuos de aminoácidos esenciales para la unión e hidrolisis del sustrato como se ha reportado previamente en *D. radiodurans* (Hyung et al., 2004) y *E. coli* (Satishchandran and Boyle, 1986). Además, en otros hongos como *M. oryzae*, *A. nidulans*, and *P. anseria* la secuencia peptídica de esta enzima mostró altos porcentajes de identidad con la secuencia de la agmatinasa de *N. crassa* lo cual, permite asumir la existencia de agmatinasas funcionales en dichos organismos (Pérez-Mozqueda, 2015). Además, se mostró que la mutante heterocarión de la AGM-1 produce defectos en el fenotipo de *N. crassa* y que la eliminación total del gen *agm-1* produce letalidad en dicho organismo. En ese mismo trabajo se reportó que la agmatinasa se localiza de manera similar al marcador de actina filamentososa Lifeact-GFP lo cual, sugiere que la agmatinasa de *N. crassa* mantiene una relación estrecha con el citoesqueleto de actina (Pérez-Mozqueda, 2015). Con base en esta hipótesis el trabajo realizado en este estudio estuvo enfocado en analizar la relación entre el citoesqueleto de actina y la agmatinasa de *N. crassa*, así como elucidar las características enzimáticas de dicha proteína.

La colocalización de la AGM-1-GFP con proteínas de unión a actina (FIM-1-mCherry y TPM-1-mCherry) mostró que la proteína AGM-1 se localiza en la membrana plasmática antes de que la fluorescencia de ambas proteínas de unión a actina pueda observarse en la región del septo, indicando que la AGM-1 participa en estadios tempranos durante la formación del septo. Debido a que la AGM-1-GFP presenta una dinámica y localización similar al marcador de actina Lifeact-GFP, se usaron dos compuestos (Latrunculina B y Benomilo) para observar el efecto de estos inhibidores en la localización y dinámica de la AGM-1 y compararla con el reportero Lifeact-GFP.

Ambos inhibidores provocaron desorganización de proteínas intracelulares en la hifa, similar al efecto reportado previamente por Delgado-Álvarez et al. (2010). Cuando se usó Benomilo para desensamblar los microtúbulos, se observó una ligera deslocalización de Lifeact-GFP y AGM-1-GFP, esto es posible ya que se ha observado que en *Aspergillus nidulans* los microtúbulos interactúan con los filamentos de actina en la

región apical de la célula a través de proteínas como la TeaA y la SepA, las cuales son requeridas para la correcta filamentación de los microtúbulos y de la actina respectivamente (Takeshita et al., 2014). En *N. crassa* no se ha descrito aún esta asociación, pero se piensa que pudiera ser de la misma manera que en *A. nidulans*. Por otra parte, cuando se usó la Latrunculina B, la cual afecta el ensamblaje de los filamentos de actina, se logró observar que la proteína AGM-1-GFP y el marcador Lifeact-GFP se deslocalizan. Estos resultados sugieren que la AGM-1 tiene una relación estrecha con la F-actina, a pesar de que en su secuencia peptídica no hay sitios de unión a actina. No obstante, existe una posibilidad de que la AGM-1 pueda estar interactuando de manera indirecta con el citoesqueleto de actina a través de su actividad catalítica sobre la agmatina. Esto es posible debido a que se ha demostrado que las poliaminas como la agmatina inducen la polimerización de la actina (Oriol-Audit, 1978). También, se ha reportado que inyecciones de agmatina incrementan la polimerización de la actina en leucocitos de rata (Brodyak et al., 2014). Además, los monómeros de actina y los heterodímeros de tubulina están cargados negativamente, produciendo repulsión electrostática la cual, es desfavorable para la nucleación por lo que se requiere de moléculas cargadas positivamente que faciliten la nucleación y elongación de los filamentos. Este fenómeno ha sido estudiado por Mechulam et al. (2009), usando tubulina pura en ensayos *in vitro* encontraron que la filamentación de la tubulina es promovida por la adición de poliaminas, con lo que concluyeron que las poliaminas juegan un papel importante en la regulación de la red de microtúbulos *in vivo* (Mechulam et al., 2009) siguiendo la misma idea de Mechulam et al. (2009) y basándose en los estudios en donde relacionan a las poliaminas con los filamentos de actina, es posible que la agmatina juegue un papel crucial en la regulación de la actina filamentosa en *N. crassa*. Para probar esta hipótesis se analizó la polimerización de la actina globular en presencia de agmatina y los resultados mostraron que la agmatina incrementa la tasa de polimerización de los filamentos al igual que lo reportado por Oriol-Audit, (1978), un fenómeno interesante fue que al adicionar agmatinasa (purificada directamente de *N. crassa*) a los filamentos de actina polimerizados con agmatina, se pudo observar un incremento en la absorbancia correspondiente a la actina globular indicando que los filamentos de actina se despolimerizaron por la acción de la agmatinasa lo cual, se corroboró con el ensayo control sin agmatinasa. Además, mediante la localización de la proteína AGM-1 mutante se logró determinar *in vivo* que el sitio de unión al sustrato en la agmatinasa es esencial para su localización relacionada con el citoesqueleto de actina. Los resultados anteriormente mencionados indican que la agmatina mantiene la interacción con la actina filamentosa a través de la degradación de la agmatina unida a los filamentos de actina.

Por otra parte, se sabe que se requiere un citoesqueleto de actina intacto y funcional para mantener la integridad del Spk el cual, se vio afectado en la mutante heterocarion $\Delta agm-1$. La dinámica del Spk en esta cepa constantemente desaparece y reaparece como dos Spk nuevos, provocando que la hifa ramifique

apicalmente. La ramificación apical se asocia con contracciones citoplasmáticas, usualmente ligadas a la deslocalización del Spk, el cual es requerido para la correcta polarización de la célula. Las contracciones citoplasmáticas son atribuidas al desensamblaje de la red de actina-miosina que se encuentra en el centro del Spk (Riquelme and Bartnicki-Garcia, 2004). Además, el fenotipo de la mutante heterocarión $\Delta agm-1$ (Pérez-Mozqueda, 2015) es similar al fenotipo de las cepas $\Delta bni-1$ het (Lichius et al., 2012) y $\Delta crn-1$ (Echauri-Espinosa et al., 2012). Se ha reportado que la deficiencia de ambas proteínas de unión a actina afecta el ensamblaje y la dinámica del Spk en *N. crassa*, lo que indica que la polimerización de los filamentos de actina es vital para mantener la integridad del Spk y el crecimiento polarizado de manera constante. Las proteínas BNI-1 y CRN-1 son proteínas de unión a actina; la BNI-1 es una formina que actúa como nucleador central de los filamentos de actina en la región apical de la hifa, este proceso también involucra proteínas moduladoras de la función de la formina como las RHO-GTPasas (Berepiki et al., 2011). Esta proteína es de vital importancia para la estabilidad del Spk y el correcto crecimiento polarizado (Lichius et al., 2012), ya que permite mantener una constante polimerización de la actina en la región apical de la célula lo cual, es esencial para mantener un flujo de vesículas de secreción hacia la punta de la hifa. También, es muy importante durante el proceso de septación, pero en esta región hay otras proteínas encargadas de localizar a la formina (RHO-4, BUD-3 y BUD-4) (Berepiki et al., 2011). En los sitios de polimerización de la actina, la AGM-1 se encuentra presente en ambas regiones (Spk y septo) y los resultados sugieren que su participación es constante durante las etapas más tempranas de la nucleación hasta las etapas tardías de la filamentación, ya que se puede observar a la AGM-1 en el Spk durante todo el crecimiento polarizado y en el septo desde que los filamentos de actina se acumulan en dicha región. Por otra parte, la CRN-1 es un componente del collar endocítico, pero su delección provoca un desensamblaje del Spk (Echauri-Espinosa et al., 2012), no obstante el mecanismo de acción no es del todo claro. La misma situación se observa con la AGM-1, la cual colocaliza con la FIM-1 en el collar endocítico. El Spk de la cepa mutante heterocarión de la AGM-1, también está afectado, la diferencia es que en este caso al ser una cepa heterocarión aun produce AGM-1 pero en menor concentración, lo que sugiere que el efecto de la AGM-1 en *N. crassa* es dependiente de la concentración intracelular.

Las proteínas BNI-1 y CRN-1 participan en la polimerización y ensamblaje de la actina monomérica, al igual que muchas otras proteínas como la FIM-1 y la TPM-1 (Delgado-Álvarez et al., 2010; Riquelme et al., 2011). No obstante, los procesos anteriormente descritos están principalmente relacionados con la polimerización de los filamentos de actina y cabe resaltar que no se pueden mantener siempre polimerizados, ya que el crecimiento es constante y el hecho de mantener filamentos polimerizados de una misma longitud no permitiría un adecuado crecimiento celular. Por lo cual, es de vital importancia la despolimerización de los filamentos para mantener un crecimiento adecuado y para el reciclaje de actina

monomérica y es justo en este proceso en el que se propone que actúa la agmatinasa al degradar agmatina y permitir que los monómeros de actina se desensamblen. Es decir, mientras las proteínas de unión a actina como la formina, la profilina y la tropomiosina actúan para polimerizar y mantener los filamentos de actina estables, la AGM-1 actúa para despolimerizar los filamentos de actina al igual que cofilina y otras proteínas como la Aip1 (Rodal et al., 1999) la cual, se ha observado que produce letalidad en combinación con mutantes de la cofilina en *S. cerevisiae*.

Los resultados obtenidos en este trabajo indican que la AGM-1 está involucrada en la modulación del ensamblaje y desensamblaje del citoesqueleto de actina, mediante la degradación de la agmatina y que cuando esta proteína (AGM-1) no está en las concentraciones adecuadas como en la mutante heterocarión $\Delta agm-1$, se observa un incremento en las concentraciones de agmatina intracelular, provocando así alteraciones en el desensamblaje del citoesqueleto de actina desencadenando un fenotipo aberrante en la cepa mutante heterocarión.

4.2 Caracterización enzimática de la AGM-1 de *N. crassa*

La agmatinasa (AGM-1) de *N. crassa* no había sido descrita hasta este trabajo, no obstante, la secuencia peptídica ya se encontraba en las bases de datos anotada como una agmatinasa hipotética. En este trabajo se ha observado que la agmatinasa juega un papel esencial en el crecimiento del hongo *N. crassa* y se sugiere que es debido a que está ligada al citoesqueleto de actina. Además, se determinó que la proteína AGM-1 tiene actividad catalítica de agmatina ureohidrolasa a pesar de estar fusionada a la proteína verde fluorescente (GFP). Sin embargo, las características enzimáticas de esta proteína no se conocían y solo se tienen algunos reportes de las características de agmatinasas de otros organismos como la agmatinasa de *Escherichia coli*, (Satishchandran and Boyle, 1986), *Pyrococcus horikoshii* (Goda et al., 2005), *Rattus norvegicus* (Sastre et al., 2002) y *Evernia prunastri* (Vicente and Legaz, 1982).

Por lo cual, en este trabajo se realizó un análisis de las principales características enzimáticas de la agmatinasa de *N. crassa*. Dentro de lo observado se analizó si la proteína AGM-1 de *N. crassa* requiere al ion divalente manganeso para su actividad enzimática. Los resultados obtenidos mostraron que la actividad de la proteína agmatinasa decae cuando se adiciona EDTA a la reacción enzimática, indicando que al igual que proteínas homólogas en otros organismos, esta proteína AGM-1 es una metaloenzima que requiere de la participación de un ion divalente. No obstante, en este trabajo solo se probó el ion

manganeso, pero en otros estudios se ha observado que las proteínas de esta familia pueden tener actividad con otros iones (Vicente y Legaz, 1982; Goda et al., 2005) y aunque el ion manganeso sea el que está reportado como el cofactor por excelencia de las agmatinasas, se ha observado que dependiendo de la especie el cofactor que mejora la actividad enzimática es diferente. Por ejemplo, la agmatinasa de *P. horikoshii* después de ser sometida a una diálisis se realizó un ensayo para saber que ion divalente recupera en mayor medida la actividad de esta proteína, dicho ensayo reveló que el CoCl_2 es más efectivo que el CaCl_2 , MnCl_2 , ZnCl_2 o el MgCl_2 para recuperar la actividad de la agmatinasa de *P. horikoshii* (Goda et al., 2005) en comparación con la agmatinasa de *E. coli* en la cual el ion más efectivo fue el Mn^{2+} (Carvajal et al., 1999). Cabe resaltar que no todos los iones divalentes ayudan a la actividad enzimática de las agmatinasas, también dependiendo de la especie hay iones que inhiben la actividad de dicha enzima (Carvajal et al., 1999).

Por otra parte, se analizó la actividad específica de la AGM-1 de *N. crassa* la cual resultó en 1.5 U/mg a 30°C lo cual, es comparable con las actividades específicas reportadas en otras agmatinasas, en *E. coli* la actividad específica de su agmatinasa es de 0.58 U/mg (Satishchandran and Boyle, 1986), en *P. horikoshii* la actividad es 1.7 U/mg a 50°C (Goda et al., 2005) y de *E. prunastri* es 1.02 U/mg (Vicente and Legaz, 1982). Además, se analizó el perfil de pH de la AGM-1, los resultados indicaron que el pH óptimo de la enzima se encuentra en el rango de 8-8.5. No obstante, la enzima mostró actividad desde un pH de 4, en comparación con las agmatinasas reportadas se pudo observar que la actividad de la enzima depende de la especie y de sus características fisiológicas ya que en *P. horikoshii* el pH óptimo de su agmatinasa es de 11 el cual, ha sido el más alto reportado hasta el momento, es importante no perder de vista que este organismo es extremófilo (Goda et al., 2005), pero en comparación con otras especies mesófilas como *E. prunastri* el pH óptimo (6.9) (Vicente and Legaz, 1982) se encuentra más cercano al reportado en este trabajo.

En cuanto a la termoestabilidad de la AGM-1 los resultados mostraron que la proteína al igual que su homóloga en *E. prunastri* a 70°C (Vicente and Legaz, 1982) pierde más del 80% de actividad, en cambio la proteína homóloga en *P. horikoshii* tiene su actividad al 100% en 100°C (Goda et al., 2005), lo cual es de esperarse ya que es una arquea hipertermófila, siendo la agmatinasa con mayor termoestabilidad reportada. Por último, se analizaron las características cinéticas de la proteína AGM-1, los resultados mostraron que la enzima presenta una cinética tipo Michaelis-Menten al igual que todas las agmatinasas reportadas, la K_m calculada a partir de la gráfica de Lineweaver-Burk fue de 0.1 mM, mientras que en *P. horikoshii* se reportó una K_m de 0.53 mM (Goda et al., 2005), para *E. coli* una K_m de 1.2 mM (Satishchandran and Boyle, 1986), para *R. novergicus* 5.3 mM (Sastre et al., 2002) y para *E. prunastri* 6.4 mM (Vicente and Legaz, 1982), lo cual indica que hasta el momento la enzima de *N. crassa* presenta mayor

afinidad a la agmatina, esto concuerda con lo observado en las imágenes de microscopia confocal en donde se sugiere que su localización depende de la unión al sustrato.

Este trabajo indica que la agmatinasa presente en *N. crassa* es una agmatinasa verdadera con características enzimáticas similares a sus homólogas en otros organismos y que su función principal en este hongo filamentoso no es la producción de poliaminas, lo cual deja muchas preguntas por responder. Además, los resultados obtenidos permiten hipotetizar la presencia de agmatinasas funcionales en otros hongos filamentosos y levaduriformes. Las características enzimáticas presentadas en este estudio son un acercamiento para comprender enzimáticamente a la agmatinasa de *N. crassa*. No obstante, aún faltan características por analizar como por ejemplo la especificidad de sustrato, el comportamiento enzimático ante diferentes iones divalentes e inhibición por retroalimentación, para que de esta manera se pueda entender como es la regulación de esta enzima en el hongo filamentoso *N. crassa*.

Capítulo 5. Conclusiones

- La proteína AGM-1 de *N. crassa* mantiene una relación estrecha con el citoesqueleto de actina en regiones ricas en filamentos.
- La agmatinasa podría funcionar como proteína moduladora de la F-actina, participando en la despolimerización de los filamentos.
- La agmatinasa presenta características enzimáticas similares a las agmatinasas reportadas en otros organismos.
- La agmatinasa de *N. crassa* es la enzima más afín a la agmatina reportada hasta el momento.

Literatura citada

- Araujo-Palomares, C. L., Richthammer, C., Seiler, S., Castro-Longoria, E. 2011. Functional characterization and cellular dynamics of the CDC-42 - RAC - CDC-24 module in *Neurospora crassa*. *PloS One*, 6(11), e27148. doi:10.1371/journal.pone.0027148
- Bartnicki-Garcia, S., Hergert, F., Gierz, G. 1989. Computer simulation of fungal morphogenesis and the mathematical basis for hyphal (tip) growth. *Protoplasma*, 153(1–2), 46–57. doi:10.1007/BF01322464
- Beadle, G. W., Tatum, E. L. 1941. Genetic control of biochemical reactions in *Neurospora*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 27(11), 499–506. doi:10.1086/281267
- Berepiki, A., Lichius, A., Read, N. D. 2011. Actin organization and dynamics in filamentous fungi. *Nature Reviews Microbiology*, 9(12), 876–887. doi:10.1038/nrmicro2666
- Bracker, C. E., Lopez-Franco, R. 1997. Laser microbeam manipulation of cell morphogenesis growing in fungal hyphae. *SPIE-The International Society for Optical Engineering*, 67(1996), 67–80. doi:10.1117/12.274325
- Brodyak, I. V., Bila, I. I., Overchuk, M., Sybirna, N. O. 2014. Effect of agmatine on actin polymerization in leukocytes of streptozotocin-induced diabetic rats. *Studia Biologica*, 8, 17–30.
- Carvajal, N., López, V., Salas, M., Uribe, E., Herrera, P., Cerpa, J. 1999. Manganese is essential for catalytic activity of *Escherichia coli* agmatinase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. doi:10.1006/bbrc.1999.0709
- Delgado-Álvarez, D. L., Callejas-Negrete, O. A., Gómez, N., Freitag, M., Roberson, R. W., Smith, L. G., 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. doi:10.1016/j.fgb.2010.03.004
- Dominguez, R., Holmes, K. C. 2011. Actin Structure and Function. *Annual Review Biophysics*, 40, 169–186. doi:10.1146/annurev-biophys-042910-155359
- Domnina, L. V., Gelfand, V. I., Ivanova, O. Y., Leonova, E. V., Pletjushkina, O. Y., Vasiliev, J. M., Gelfand, I. M. 1982. Effects of small doses of cytochalasins on fibroblasts: preferential changes of active edges and focal contacts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 79(24), 7754–7757. from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=347426&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Doyle, T., Botstein, D. 1996. Movement of yeast cortical actin cytoskeleton visualized in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(9), 3886–3891. doi:10.1073/pnas.93.9.3886

- Echauri-Espinosa, R. O., Callejas-Negrete, O. A., Roberson, R. W., Bartnicki-García, S., Mouriño-Pérez, R. R. 2012. Coronin is a component of the endocytic collar of hyphae of *Neurospora crassa* and is necessary for normal growth and morphogenesis. *PLoS ONE*, 7(5), e38237. doi:10.1371/journal.pone.0038237
- Goda, S., Sakuraba, H., Kawarabayasi, Y., Ohshima, T. 2005. The first archaeal agmatinase from anaerobic hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus horikoshii*: Cloning, expression, and characterization. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*, 1748(1), 110–115. doi:10.1016/j.bbapap.2004.12.010
- Heilig, Y., Dettmann, A., Mouriño-Pérez, R. R., Schmitt, K., Valerius, O., Seiler, S. 2014. Proper Actin Ring Formation and Septum Constriction Requires Coordinated Regulation of SIN and MOR Pathways through the Germinal Centre Kinase MST-1. *PLoS Genetics*, 10(4), e1004306. doi:10.1371/journal.pgen.1004306
- Hickey, P. C., Swift, S. ., Roca, M. G., Read, N. D. 2005. Live-cell imaging of filamentous fungi using vital fluorescent dyes and confocal microscopy. In T. Savidge & C. Pothoulakis (Eds.), *Methods in Microbiology* (Elsevier). London. pp. 63–87.
- Hyung, J. A., Kyoung, H. K., Lee, J., Ha, J. Y., Hyung, H. L., Kim, D., Yoon, H. J., Kwon, A. R., Se, W. S. 2004. Crystal structure of agmatinase reveals structural conservation and inhibition mechanism of the ureohydrolase superfamily. *Journal of Biological Chemistry*, 279(48), 50505–50513. doi:10.1074/jbc.M409246200
- Kusano, T., Berberich, T., Tateda, C., Takahashi, Y. 2008. Polyamines: Essential factors for growth and survival. *Planta*, 228(3), 367–381. doi:10.1007/s00425-008-0772-7
- Lichius, A., Yáñez-Gutiérrez, M. E., Read, N. D., Castro-Longoria, E., Grote, E. 2012. Comparative Live-Cell Imaging Analyses of SPA-2, BUD-6 and BNI-1 in *Neurospora crassa* Reveal Novel Features of the Filamentous Fungal Polarisome. *PLoS ONE*, 7(1), e30372. doi:10.1371/journal.pone.0030372
- Mahlert, M., Leveleki, L., Hlubek, A., Sandrock, B., Bölker, M. 2006. Rac1 and Cdc42 regulate hyphal growth and cytokinesis in the dimorphic fungus *Ustilago maydis*. *Molecular Microbiology*, 59(2), 567–578. doi:10.1111/j.1365-2958.2005.04952.x
- McDougall, K. J., Deters, J., Miskimen, J. 1977. Isolation of putrescine-requiring mutants of *Neurospora crassa*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 43(2), 143–151. doi:10.1007/BF00395669
- Mechulam, A., Chernov, K. G., Mucher, E., Hamon, L., Curmi, P. a., Pastré, D. 2009. Polyamine sharing between tubulin dimers favours microtubule nucleation and elongation via facilitated diffusion. *PLoS Computational Biology*, 5(1), 1–14. doi:10.1371/journal.pcbi.1000255
- Michael, A. J. 2016, June 7. Polyamines in eukaryotes, bacteria, and archaea. *Journal of Biological Chemistry*, Vol. 291. doi:10.1074/jbc.R116.734780
- Mouriño-Pérez, R. R. 2013, May. Septum development in filamentous ascomycetes. *Fungal Biology Reviews*, Vol. 27. doi:10.1016/j.fbr.2013.02.002

- Oriol-Audit, C. 1978. Polyamine -Induced Actin Polymerization. *European Journal of Biochemistry*, 376(September 1977), 371–376.
- Pasini, A., Caldarera, C. M., Giordano, E. 2014, March. Chromatin remodeling by polyamines and polyamine analogs. *Amino Acids*, Vol. 46. doi:10.1007/s00726-013-1550-9
- Pérez-Mozqueda, L. L. 2015. Localización y papel de la agmatinasa en el crecimiento celular del hongo *Neurospora crassa*. Tesis de Maestría en Ciencias. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California. 70 pp.
- Ray, R. M., McCormack, S. a, Covington, C., Viar, M. J., Zheng, Y., Johnson, L. R. 2003. The requirement for polyamines for intestinal epithelial cell migration is mediated through Rac1. *Journal of Biological Chemistry*, 278(15), 13039–13046. doi:10.1074/jbc.M208741200
- Riquelme, M., Bartnicki-Garcia, S. 2004. Key differences between lateral and apical branching in hyphae of *Neurospora crassa*. *Fungal Genetics and Biology*, 41(9), 842–851. doi:10.1016/j.fgb.2004.04.006
- Riquelme, M., Martínez-Nñez, L. 2016. Hyphal ontogeny in *Neurospora crassa*: A model organism for all seasons. *F1000Research*, 5(0), 1–12. doi:10.12688/f1000research.9679.1
- Riquelme, M., Sánchez-León, E. 2014. The Spitzenkörper: A choreographer of fungal growth and morphogenesis. *Current Opinion in Microbiology*, Vol. 20. doi:10.1016/j.mib.2014.04.003
- 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., Watters, M. K., Fleissner, A., ... Watters, M. K. 2011. Architecture and development of the *Neurospora crassa* hypha - a model cell for polarized growth. *Fungal Biology*, 115(6), 446–474. doi:10.1016/j.funbio.2011.02.008
- Rodal, A. A., Tetreault, J. W., Lappalainen, P., Drubin, D. G., Amberg, D. C. 1999. Aip1p interacts with cofilin to disassemble actin filaments. *Journal of Cell Biology*, 145(6), 1251–1264. doi:10.1083/jcb.145.6.1251
- Sánchez-León, E., Bowman, B., Seidel, C., Fischer, R., Novick, P., Riquelme, M. 2015. The Rab GTPase YPT-1 associates with Golgi cisternae and Spitzenkörper microvesicles in *neurospora crassa*. *Molecular Microbiology*, 95(3), 472–490. doi:10.1111/mmi.12878
- Sastre, M., Regunathan, S., Galea, E., Reis, D. J. 2002. Agmatinase Activity in Rat Brain: A Metabolic Pathway for the Degradation of Agmatine. *Journal of Neurochemistry*, 67(4), 1761–1765. doi:10.1046/j.1471-4159.1996.67041761.x
- Satishchandran, C., Boyle, S. M. 1986. Purification and properties of agmatine ureohydrolyase, a putrescine biosynthetic enzyme in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 165(3), 843–848.
- Shear, C. L., Dodge, B. O. 1927. Life Histories and Heterothallism of the Red Bread-Mold Fungi of the *Monilia sitophila* group. *Journal of Agricultural Research*, 34(11), 1019–1042. from

<https://naldc.nal.usda.gov/download/IND43967403/PDF>

- Sowa, G. Z., Cannell, D. S., Liu, A. J., Reisler, E. 2006. Polyamine-induced bundling of F-actin. *Journal of Physical Chemistry B*, 110(44), 22279–22284. doi:10.1021/jp063371w
- Tabor, C. W., Tabor, H. 1985. Polyamines in Microorganisms. *Microbiological Reviews*, 49(1), 81–99.
- Takeshita, N., Manck, R., Grün, N., de Vega, S. H., Fischer, R. 2014, August. Interdependence of the actin and the microtubule cytoskeleton during fungal growth. *Current Opinion in Microbiology*, Vol. 20. doi:10.1016/j.mib.2014.04.005
- Torralba, S., Raudaskoski, M., Pedregosa, A. M., Laborda, F. 1998. Effect of cytochalasin A on apical growth, actin cytoskeleton organization and enzyme secretion in *Aspergillus nidulans*. *Microbiology*, 144(1), 45–53. doi:10.1099/00221287-144-1-45
- Verdín, J., Bartnicki-Garcia, S., Riquelme, M. 2009. Functional stratification of the Spitzenkörper of *Neurospora crassa*. *Molecular Microbiology*, 74(5), 1044–1053. doi:10.1111/j.1365-2958.2009.06917.x
- Vicente, C., Legaz, M. E. 1982. Purification and properties of agmatine amidinohydrolase of *Evernia prunastri*. *Physiologia Plantarum*, 55(3), 335–339. doi:10.1111/j.1399-3054.1982.tb00301.x
- Virag, A., Griffiths, A. J. F. 2004. A mutation in the *Neurospora crassa* actin gene results in multiple defects in tip growth and branching. *Fungal Genetics and Biology*, 41(2), 213–225. doi:10.1016/j.fgb.2003.10.010
- Virag, A., Harris, S. D. 2006. The Spitzenkörper: a molecular perspective. *Mycological Research*, 110(1), 4–13. doi:10.1016/j.mycres.2005.09.005
- Wallace, H. M., Fraser, A. V, Hughes, A. 2003. A perspective of polyamine metabolism. *The Biochemical Journal*, 376(Pt 1), 1–14. doi:10.1042/BJ20031327
- Wegner, a, Isenberg, G. 1983. 12-Fold Difference Between the Critical Monomer Concentrations of the Two Ends of Actin Filaments in Physiological Salt Conditions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 80(16), 4922–4925. from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=384159&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Winder, S. J., Ayscough, K. R. 2005. Actin-binding proteins. *Journal of Cell Science*, 118, 651–654. doi:10.1242/jcs.01670

Anexo A

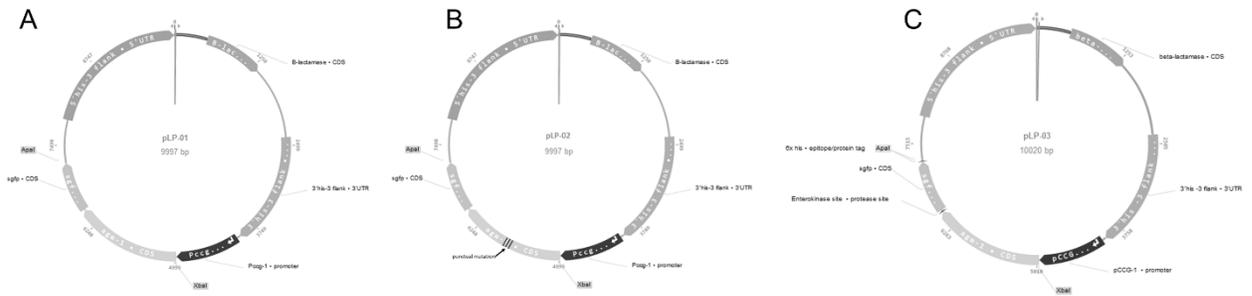


Figura 19. Mapa de plásmidos utilizados para la construcción de las cepas.

Anexo B

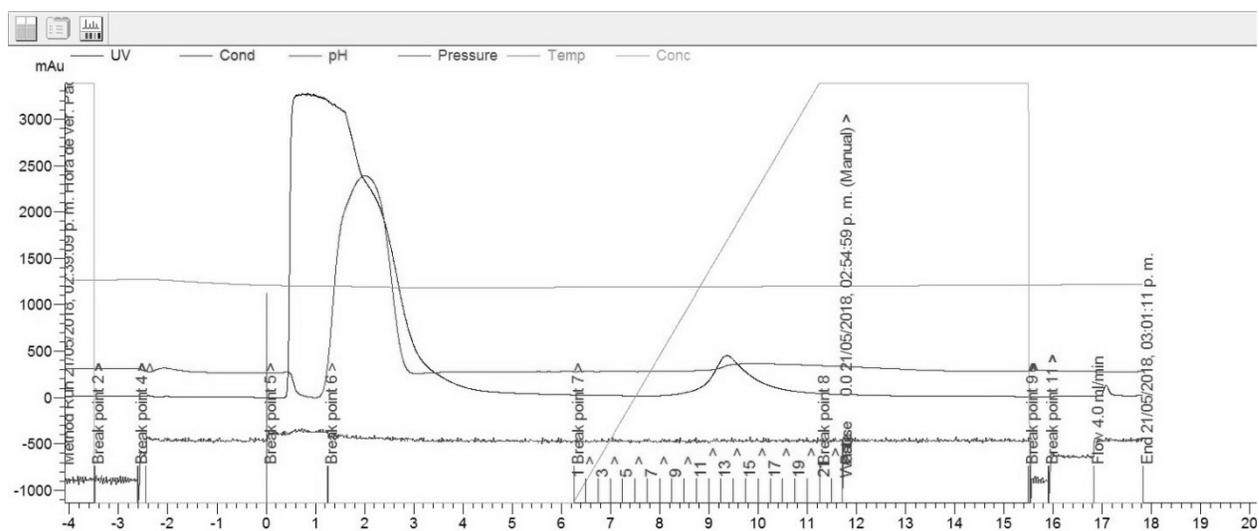


Figura 20. Gráfico de purificación de la proteína por FPLC. El pico entre los minutos 11 y 15 corresponden a la proteína de interés (AGM-1).