

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



**Programa de Posgrado en Ciencias
en Ciencias de la Vida**

**Localización y papel de la agmatinasa en el crecimiento
celular del hongo *Neurospora crassa***

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

Presenta:

Luis Leobardo Pérez Mozqueda

Ensenada, Baja California, México
2015

Tesis defendida por

Luis Leobardo Pérez Mozqueda

y aprobada por el siguiente Comité

Dra. Ernestina Castro Longoria

Dra. Rosa Reyna Mouriño Pérez

Dra. María Lucila Del Carmen Lares Reyes

Dr. Rafael Vázquez Duhalt



Dra. Rufina Hernández Martínez

Coordinadora del posgrado en ciencias de la vida

Dr. Jesús Favela Vara

Director de Estudio de Posgrado

Luis Leobardo Pérez Mozqueda © 2015

Queda prohibida la reproducción parcial o total de esta obra sin el formal y expícito permiso del autor

Resumen de la tesis que presenta Luis Leobardo Pérez Mozqueda como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Ciencias de la Vida con orientación en Microbiología.

Localización y papel de la agmatinasa en el crecimiento celular del hongo *Neurospora crassa*.

Resumen aprobado por:

Dra. Ernestina Castro Longoria

Estudios en *Neurospora crassa* han revelado diversos procesos celulares y moleculares que regulan el crecimiento y desarrollo en hongos filamentosos. Sin embargo, moléculas como las poliaminas no se han estudiado a fondo para elucidar su papel en la morfogénesis celular de estos organismos. Trabajos desde bacterias hasta mamíferos han implicado a la putrescina, espermidina y espermina en el proceso de desarrollo y crecimiento celular. Las poliaminas pueden ser sintetizadas mediante dos rutas metabólicas, en la primera ruta, la síntesis se lleva a cabo mediante la ornitina descarboxilasa que produce putrescina a partir de ornitina, mientras que en la segunda, la agmatinasa produce putrescina a partir de agmatina. En hongos filamentosos sólo la ruta catalizada por ornitina descarboxilasa ha sido descrita. Sin embargo, en el genoma de *N. crassa* se ha reportado una secuencia nucleotídica que codifica para una agmatinasa hipotética. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo es investigar el papel de dicha proteína en el crecimiento celular de *N. crassa*. Para ello se generó y analizó una mutante $\Delta ags-1het$ y los resultados revelaron que la ausencia de este gen es letal para el hongo, mientras que la deficiencia produce un fenotipo aberrante. Además, se analizó la localización y dinámica de la AGS-1::GFP en *N. crassa*, con lo cual se observó que la agmatinasa aparentemente mantiene una relación estrecha con el citoesqueleto de actina, también se analizó la localización y dinámica de la F-actina, CDC-42 y RAC (proteínas implicadas en la organización del citoesqueleto de actina) en la mutante $\Delta ags-1het$. No se detectó fluorescencia en las poblaciones de F-actina localizadas en la región del septo y del anillo endocítico, mientras que hubo una acumulación de fluorescencia en la población de F-actina presente en el ápice de la hifa. La localización de CDC-42 también se ve afectada, pero no la localización de RAC. Estos resultados son preliminares, pero el gen *ags-1* es claramente esencial para la sobrevivencia de *N. crassa*. También, los resultados sugieren una posible relación, quizá de forma indirecta, entre la AGS-1::GFP con el citoesqueleto de actina.

Palabras Clave: Agmatinasa, poliaminas, *Neurospora crassa*, citoesqueleto, GTPasas

Abstract of the thesis presented by Luis Leobardo Pérez Mozqueda as a partial requirement to obtain the Master of Science degree in Science of the life with orientation in Microbiology

Localization and role of agmatinase in the cell growth of *Neurospora crassa*

Abstract approved by:

Ph.D. Ernestina Castro Longoria

Studies in *Neurospora crassa* have revealed several molecular and cellular processes involved in growth and development of filamentous fungi. However, molecules such as the polyamines have not been studied thoroughly to elucidate their role in the cell growth of these organisms. Reports from bacteria to mammals have implicated the polyamines (putrescine, spermidine and spermine) in cell growth and development. Polyamines are produced by two biosynthetic pathways: in the first pathway, putrescine is produced from ornithine by ornithine decarboxylase, whereas, in the second pathway putrescine is produced from agmatine by agmatinase. In filamentous fungi only the pathway catalyzed by the ornithine decarboxylase has been described. However, in the genome of *N. crassa*, a nucleotide sequence has been reported to encode a hypothetical agmatinase. Therefore, the aim of this study is to investigate the role of this protein in the cellular growth of *N. crassa*. For that we generated and analyzed a mutant strain $\Delta ags-1$ het and the results revealed that the lack of this gene is lethal for the fungus and its deficiency provoke an aberrant phenotype. Also, the localization and dynamics of AGS-1::GFP in *N. crassa* were analyzed. It was observed a possible relationship among agmatinase and the actin cytoskeleton. Also, the localization and dynamics of F-actin, CDC-42 and RAC (proteins implicated in the organization of the acting cytoskeleton) were analyzed in the mutant strain $\Delta ags-1$ het. It was observed that the localization of F-actin in the mutant strain were modified compared with the F-actin in the wild type strain. The population of F-actin in the sub-apical region and in septa was not detected whereas in the apical region of the hypha a high concentration was observed. The localization of CDC-42 was also affected, but not the localization of RAC. These results are preliminary, but this gene is clearly essential for the survival of *N. crassa*. Also, the results suggest a possible relationship among the actin cytoskeleton and AGS-1::GFP.

Key words: Agmatinase, polyamines, *Neurospora crassa*, cytoskeleton, GTPases

Dedicatoria

El presente trabajo está dedicado a mis dos grandes maestros de la vida: mis padres, que aunque lejos físicamente, siempre estuvieron conmigo emocionalmente apoyandome en todas mis decisiones aunque no les pareciera correcto, gracias a sus enseñanzas siempre salí adelante.

A mis hermanos Laura y Daniel que fueron y serán un gran apoyo para mí.

A mi compañera y esposa Margarita, que ha sido un gran apoyo durante todo el tiempo que hemos estado juntos, que siempre se ha preocupado por mi bienestar y ha estado conmigo en todo momento amándome, cuidándome y apoyándome.

A todas las personas anteriormente mencionadas les doy gracias por formar parte de mi vida y por el apoyo brindado, además de sus consejos y enseñanzas. Me siento muy feliz de poder contar con personas como ustedes.

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 Dra. Olga Alicia Callejas Negrete por la construcción del vector de transformación con el que desarrolle parte de este trabajo.

A la ayuda brindada por el Dr. Rafael Vázquez Duhalt por su apoyo en el trabajo de cromatografía, además de apoyarme con equipo y reactivos para el presente estudio.

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

Tabla de contenido

	Página
Resumen español	ii
Resumen inglés	iii
Dedicatorias	iv
Agradecimientos	v
Lista de figuras	viii
Lista de tablas	x
Capítulo 1. Introducción	1
1.1 Hongos filamentosos y su crecimiento.....	1
1.2 Poliaminas.....	4
1.3 F-actina.....	6
1.4 RAS GTPasas.....	7
Capítulo 2. Antecedentes	10
Capítulo 3. Objetivos	13
3.1 Objetivo general.....	13
3.2 Objetivos particulares.....	13
Capítulo 4. Material y método	14
4.1 Cepas, medios y condiciones de crecimiento.....	14
4.2 Análisis de la proteína AGS-1.....	15
4.3 Construcción de cepas de <i>N. crassa</i>	15
4.4 Análisis microscópico de células transformantes de <i>N. crassa</i>	18
4.5 Obtención de ascosporas.....	18
4.6 Caracterización fenotípica de las cepas de <i>N. crassa</i>	18
4.6.1 Morfología colonial.....	19
4.6.2 Determinación de la tasa de crecimiento.....	19
4.6.3 índice de ramificación.....	19
4.6.4 Conidiación.....	19
4.6.5 Medición de biomasa.....	19
4.7 Extracción y cuantificación de poliaminas endógenas.....	20
4.7.1 Extracción, purificación y derivatización de poliaminas	
endógenas de <i>N. crassa</i>	20
4.7.2 Cuantificación de poliaminas mediante cromatografía de	
gases.....	20

Capítulo 5. Resultados	21
5.1 Análisis de la secuencia peptídica AGS-1.....	21
5.2 Construcción y obtención de la cepa mutante homocarión $\Delta ags-1$	21
5.3 Caracterización fenotípica de la mutante $\Delta ags-1het$	25
5.3.1 Crecimiento de la mutante $\Delta ags-1het$	25
5.3.2 Producción de biomasa de la cepa $\Delta ags-1het$	25
5.3.3 Producción de ramificaciones en la cepa mutante $\Delta ags-1het$...	27
5.3.4 Conidiación en la cepa mutante $\Delta ags-1het$	28
5.4 Localización intracelular de la agmatinasa en <i>Neurospora crassa</i>	30
5.4.1 Localización de la AGS-1::GFP en el ápice y sub-ápice de hifas maduras.....	30
5.4.2 Localización de la AGS-1::GFP en la formación del septo.....	34
5.4.3 Localización de la AGS-1::GFP en germínulas.....	35
5.5 Localización de las proteínas CDC-42 y RAC en la cepa $\Delta ags-1 he$	37
5.5.1 La localización de la proteína CDC-42 cambia en la cepa mutante $\Delta ags-1het$	38
5.5.2 Localización de la proteína RAC en la cepa mutante $\Delta ags-1het$	39
5.6 Localización de la F-actina en la cepa $\Delta ags-1 het$	40
5.7 Cuantificación de poliaminas.....	44
Capítulo 6. Discusión	45
Capítulo 7. Conclusiones	50
Lista de referencias bibliográficas	51
Anexos	56

Lista de figuras

Figura		Página
1	Ciclo celular de <i>Neurospora crassa</i>	3
2	Biosíntesis y estructuras de las poliaminas.....	5
3	Ciclo general de las GTPasas.....	8
4	Alineamiento de secuencias.....	22
5	Electroforesis del fragmento recombinante.....	23
6	Formación de peritecios y germinación de ascosporas.....	24
7	Crecimiento radial.....	26
8	Biomasa producida.....	27
9	Producción de ramas laterales.....	28
10	Producción de esporas asexuales.....	29
11	Localización de la proteína AGS-1::GFP en <i>Neurospora crassa</i>	31
12	Localización de la proteína GFP::AGS-1 en hifas de <i>Neurospora crassa</i>	32
13	Localización de la agmatinasa a lo largo de la hifa de <i>N. crassa</i>	33
14	Localización de agmatinasa en hifas estresadas y no estresadas.....	34
15	Formación del septo en hifas de <i>Neurospora crassa</i>	36
16	Localización de la agmatinasa en germínulas de <i>N. crassa</i>	37
17	Localización de la proteína CDC-42 en una hifa deficiente de agmatinasa.....	38
18	Localización de la proteína CDC-42 en hifas deficientes de agmatinasa.....	39
19	Localización de la proteína RAC en una hifa deficiente de agmatinasa.....	40

20	Localización de la F-actina mediante el marcaje con LIFEACT::GFP..	40
21	Localización de la F-actina marcada con LIFEACT::GFP en el septo de la cepa $\Delta ags-1$ het.....	42
22	Localización de la F-actina mediante el marcaje con LIFEACT::GFP en la cepa $\Delta ags-1$ het.....	43
A1	Cromatogramas de poliaminas estándares.....	56
A2	Cromatograma de poliaminas extraídas de la cepa silvestre.....	57
A3	Electroforesis de los PCRs de comprobación para las cepas <i>ags-1:gfp</i> y <i>lifeact::gfp</i>	57

Lista de tablas

Tabla		Página
1	Cepas de <i>N. crassa</i> utilizadas.....	14
2	Cepas, plásmidos y fragmento recombinante usado.....	16
3	Oligonucleótidos usados en la técnica DoubleJoint PCR.....	17
4	Concentración de poliaminas en la cepa silvestre y en la cepa mutante $\Delta ags-1$ het.....	44
A1	Oligonucleótidos utilizados en la comprobación de las cepas <i>ags-1:gfp</i> y <i>lifeact::gfp</i>	58
A2	Crecimiento promedio de la cepa silvestre (WT) y de la cepa mutante ($\Delta ags-1$ het).....	59

Capítulo 1. Introducción

1.1 Hongos filamentosos y su crecimiento

Los hongos son organismos heterótrofos, comprenden formas que van desde las levaduriformes hasta las filamentosas. Estos organismos se encuentran ampliamente distribuidos por todo el planeta, su importancia en la naturaleza se debe a que son excelentes descomponedores de materia orgánica, además de ser importantes también en el área médica, veterinaria y en la fitopatología, ya que algunos de estos organismos son patógenos seres humanos, así como de plantas y animales. Cabe resaltar que su importancia en la medicina no sólo radica en su aspecto patogénico, sino que debido a su gran producción de metabolitos secundarios como los antibióticos (Fischer *et al.*, 2008) estos organismos han sido ampliamente estudiados en investigaciones de genética, biología celular y molecular como modelos.

Los hongos filamentosos poseen un mecanismo de crecimiento polarizado, su morfología les permite optimizar la absorción de nutrientes en diversos ambientes, dando como resultado una rápida tasa de crecimiento (Riquelme *et al.*, 2011). El crecimiento polarizado no es una característica única de los hongos filamentosos, diversos tipos de células como las neuronas o los tubos de polen también presentan este tipo de crecimiento. El crecimiento polarizado involucra mecanismos multifactoriales, en los cuales se incluyen moléculas de señalización como las GTPasas y moléculas estructurales como las proteínas del citoesqueleto entre otros muchos procesos como la endocitosis y la exocitosis (Riquelme *et al.*, 2011). Estos mecanismos son altamente conservados en el crecimiento polarizado. En organismos como los hongos estos mecanismos son importantes para la morfogénesis y en algunos casos para el desarrollo de la patogenicidad (Cheng *et al.*, 2012).

El hongo filamentoso *Neurospora crassa* es uno de los modelos más importantes en la biología celular, molecular y genética, uno de los primeros trabajos donde se utilizó a este organismo fue en el trabajo que estableció la teoría de un gen una enzima (Beadle y Tatum, 1941). Este organismo también se ha utilizado como organismo modelo para estudios de reparación de DNA, metilación de DNA, importación de proteínas

mitocondriales y ritmos circadianos (Galan *et al.*, 2003; Castro-Longoria *et al.*, 2010). Debido a que *N. crassa* es un organismo filamentoso multicelular es un excelente modelo de las células eucariotas para estudiar diferenciación celular y desarrollo, entre otros aspectos. Este hongo presenta características que facilitan su estudio: es fácil de cultivar en laboratorio, su genoma se encuentra completamente secuenciado facilitando la manipulación genética y además se encuentra provisto de un ciclo de vida corto lo que facilita su estudio además de presentar una fase sexual y otra asexual (Deacon, 1990).

El ciclo celular de *N. crassa* (Figura 1; Borkovich *et al.*, 2004) comienza con la germinación de esporas dando lugar a la formación del micelio vegetativo, este micelio puede producir diferentes estructuras, dependiendo de los nutrientes que tenga disponibles. Se han identificado hasta ahora 28 tipos celulares diferentes durante el ciclo de vida de *N. crassa* y cada uno de ellos está bien delimitado por ciertos genes (Bistis *et al.*, 2003). En determinada etapa del crecimiento vegetativo ocurre la diferenciación celular que da lugar a la formación de las hifas aéreas, a partir de las cuales se produce la fase de macroconidiación. Durante esta etapa, las hifas aéreas forman septos consecutivos en la parte apical hasta formar el conidióforo, estas estructuras tienen forma de rosario, donde cada una de sus cuentas da lugar a un macroconidio multinucleado. Una fase alterna a la macroconidiación es la microconidiación, donde una hifa vegetativa forma una fialide la cual da lugar a un microconidio generalmente uninucleado que tiene la función de fertilización en el ciclo sexual. En la fase sexual del ciclo celular, el micelio vegetativo forma protoperitecios que actúan como estructuras femeninas, mientras que otro micelio formará conidios, que son las estructuras masculinas. Una vez que los protoperitecios son fertilizados dan lugar a los peritecios maduros, en los cuales se forman las hifas ascógenas que tienen forma de bastón y son tetranucleadas, posteriormente los núcleos sufren meiosis dando lugar a ocho núcleos contenidos en las ascas, cada núcleo formará una ascospora haploide binucleada terminando así con las tres fases del ciclo celular (Borkovich *et al.*, 2004).

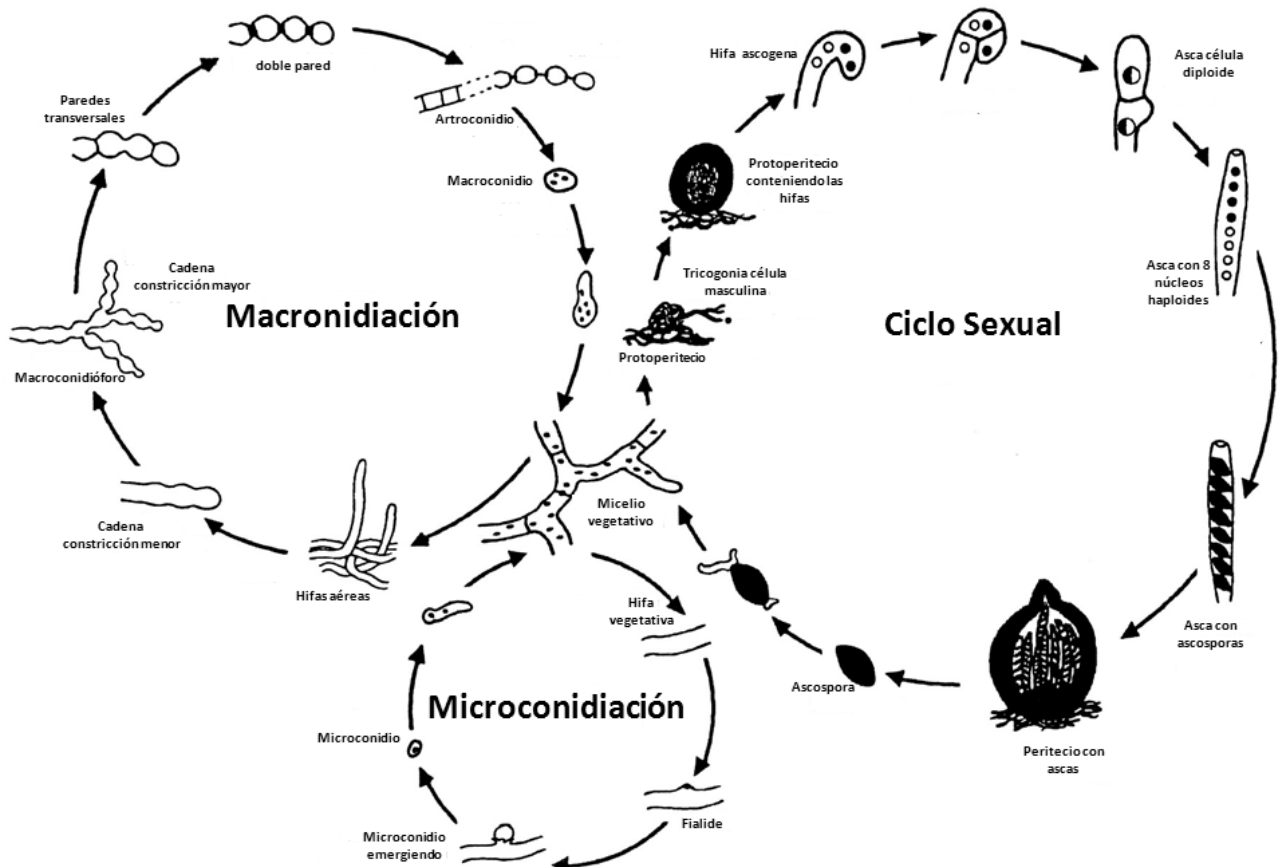


Figura 1. Ciclo celular de *Neurospora crassa*. El ciclo celular de *N. crassa* consta de tres fases que se desarrollan de acuerdo a la disponibilidad de nutrientes, dos de estas fases se presentan durante el ciclo asexual: la fase de macroconidiación que se desarrolla a partir de las hifas aéreas generando macroconidios multinucleados y la microconidiación la cual se inicia con la formación de la fialide que da lugar a microconidios uninucleados. La tercera fase se presenta durante el ciclo sexual, en el cual se produce la formación de estructuras sexuales (protoperitecios y tricogonias femenino y masculino respectivamente) las cuales se fusionan para formar el peritecio en donde se forman las ascas las cuales por meiosis dan lugar a las ascosporas haploides uninucleadas (Tomado y modificado de Borkovich *et al.*, 2004).

1.2 Poliaminas

Las poliaminas fueron descubiertas por Antoine Van Leeuwenhoek en 1678; sin embargo el estudio de estas moléculas comenzó en 1889 con la putrescina, la primer poliamina aislada de *Vibrio cholerae* (Wallace *et al.*, 2003). Estas moléculas son de naturaleza policatiónica y existen tres principales poliaminas encontradas en los organismos; putrescina, espermidina y espermina (Figura 2A) (Tabor y Tabor, 1985). La biosíntesis de poliaminas deriva del metabolismo de dos aminoácidos esenciales; L-metionina y L-arginina (Algranati *et al.*, 2006).

Las poliaminas son tan importantes en los organismos que cuentan con una ruta de biosíntesis constitutiva, en la cual a partir de la arginina se sintetiza ornitina mediante la enzima arginasa. Después, a partir de la ornitina se sintetiza la putrescina (1,4-diaminobutano) mediante la acción de la enzima ornitina descarboxilasa (*ODC*). También existe una ruta alterna, en la cual a partir de la arginina se sintetiza agmatina mediante la arginina descarboxilasa, posteriormente la putrescina es sintetizada a partir de agmatina mediante la enzima agmatinasa (*AGS-1*) (Tabor y Tabor, 1985); esta ruta se ha descrito en bacterias como *Escherichia coli*, plantas y en células de mamíferos (Uribe *et al.*, 2007). Después, la biosíntesis sigue una misma ruta en la cual la putrescina es convertida a espermidina y ésta a su vez a espermina mediante las enzimas espermidina sintasa y espermina sintasa, respectivamente, las cuales requieren un grupo aminopropil que es donado por la S-adenosilmetionina descarboxilada sintetizada a partir de la S-adenosilmetionina por la acción de la S-adenosilmetionina descarboxilasa (*SAMDC*) (Figura 2B).

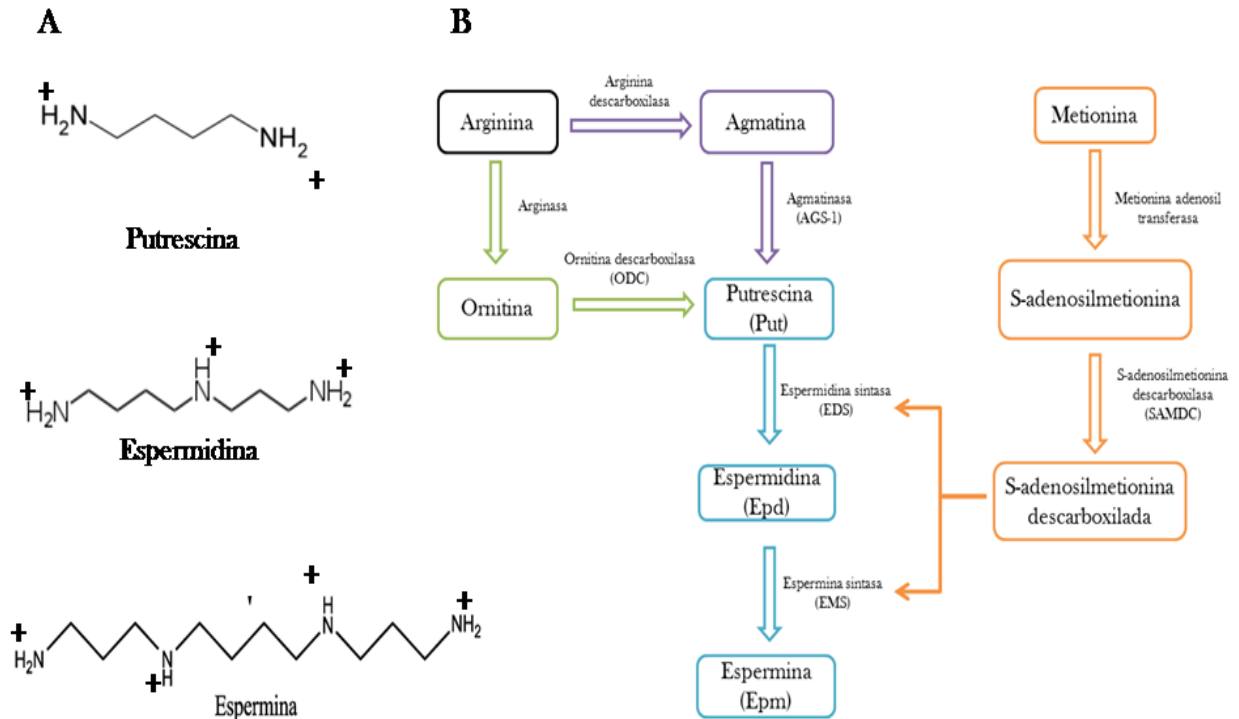


Figura 2. Biosíntesis y estructuras de las poliaminas. A) Estructura molecular de las tres poliaminas B) La síntesis de poliaminas (azul) tiene dos rutas: la constitutiva (verde) que se encuentra en todos los organismos y es mediada por la ornitina descarboxilasa (ODC), y la alterna (morado) esta ruta solo se ha descrito en plantas, bacterias y recientemente en células de mamíferos, se encuentra mediada por la agmatinasa (AGS-1). Adicionalmente la biosíntesis de poliaminas requiere de los grupos aminopropil donados por la S-adenosilmetionina descarboxilada una molécula derivada del metabolismo de la metionina (anaranjado).

La función de las poliaminas putrescina, espermidina y espermina es esencial para la homeostasis celular en los organismos, participando en diversos procesos como crecimiento celular y migración celular. Se cree que su función radica en su naturaleza policatiónica, ésta característica facilita la interacción con el DNA donde se ha reportado que debido a su carga positiva a espermidina y la espermina funcionan como abrazaderas en el DNA uniendo el surco mayor con el surco menor de la doble cadena (Matthews, 1993).

La gran mayoría de los mecanismos por los cuales las poliaminas están regulando a la célula se desconocen, pero se sabe bien que la deficiencia de poliaminas producida por inhibidores de enzimas catalizadoras para la biosíntesis provoca fenotipos aberrantes en las células, llegando incluso a provocar que la célula no sea viable (Wang y Casero, 2010).

1.3 F-Actina

En fibroblastos la función de las poliaminas en el crecimiento y proliferación celular se encuentra relacionada con la organización del citoesqueleto, principalmente en la polimerización de filamentos de actina (F-actina), donde las poliaminas participan en su estabilización (Sowa *et al.*, 2006) de igual manera están involucradas con la estabilización y polimerización de α y β -tubulina (Mechulam *et al.*, 2009).

La actina es la proteína más abundante en las células eucariotas, se encuentra de dos formas en la célula: monomérica (G-actina) y filamentosa (F-actina). La transición de G-actina a F-actina es un proceso sumamente controlado, la hidrólisis de ATP por la F-actina es uno de los principales factores para la formación de filamentos, la G-actina unida a ATP es más estable que la G-actina unida a ADP (Wegner y Isenberg, 1983). La ATP-G-actina se une a los filamentos en los centros de nucleación en el extremo (+), el ATP es hidrolizado y la G-actina menos estable es liberada del filamento regresando a su forma monomérica en el extremo (-). Además de la hidrólisis, los filamentos de actina también son ayudados en su polimerización por proteínas de unión a actina como el complejo Arp 2/3, el cual es un centro de nucleación para la formación de filamentos de ramificación (Domínguez y Holmes, 2011).

El proceso de polimerización de actina es uno de los mecanismos más controlados en la célula. Los filamentos de actina son esenciales en el crecimiento polarizado, ya que el uso de inhibidores de la polimerización de actina como la citocalacina confirma es requerida para un correcto crecimiento celular (Torralba *et al.*, 1998) así como para la proliferación celular y contactos focales de fibroblastos (Domnina *et al.*, 1982).

1.4 RAS GTPasas

El proceso de polimerización y despolimerización de actina para la proliferación y/o crecimiento celular se encuentra regulado por cascadas de señalización, desencadenadas por factores extra o intracelulares los cuales tienen receptores en la membrana celular. Estos receptores activan a una de las más importantes superfamilias de proteínas señalizadoras llamadas RAS GTPasas.

La superfamilia de las RAS GTPasas son pequeñas proteínas de unión a GTP (guanosil trifosfato) y se encuentran distribuidas ampliamente como interruptores moleculares. En su forma activa la proteína se encuentra unida a GTP, mientras que en su forma inactiva se encuentra unida a GDP, estas proteínas se ayudan de los factores intercambiadores de guanosil (GEF por sus siglas en Inglés) para favorecer el cambio de GDP a GTP (Bourne *et al.*, 1990). Una vez unida a GTP el siguiente paso es la hidrólisis, para esto la GTPasa se ayuda de la proteína activadora de GTPasa (GAP por sus siglas en Inglés) para hidrolizar el GTP y regresar a su estado inactivo (Figura 3; Jaffe y Hall, 2005).

Las RAS GTPasas se pueden dividir en seis clases: RHO, RAS, RAB, ARF, SAR, y RAN; de estas seis subfamilias las RHO GTPasas juegan un papel protagonista en el ensamblaje, desensamblaje y organización de los filamentos de actina para la proliferación y el crecimiento celular (Hall y Lalli, 2010). Dentro de la subfamilia de la RHO GTPasas se encuentran las proteínas RAC y CDC-42 (Nobes y Hall, 1995), se sabe que fibroblastos, la vía de señalización de Rac1 está regulando la polimerización de actina para la formación en lamelipodios (Ridley y Hall, 1992) mientras que la vía de señalización de Cdc42 está involucrada en la formación de filopodios (Nobes y Hall, 1995). En hongos filamentosos RAC y CDC-42 juegan un papel muy importante, ya que además de estar regulando la formación de filamentos de actina, también participan en el establecimiento del crecimiento polarizado.

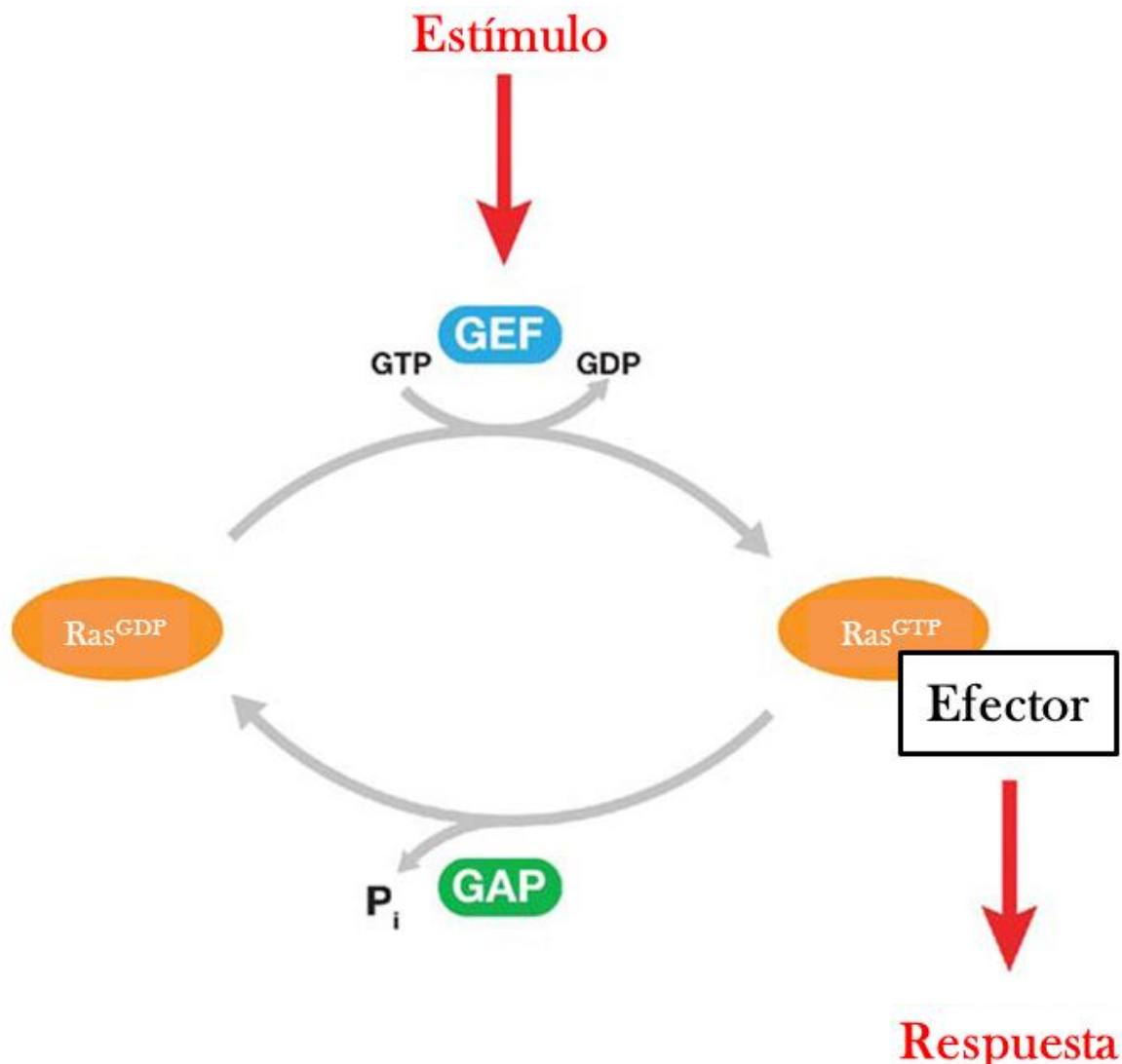


Figura 3. Ciclo general de las GTPasas. Las GTPasas requieren de dos proteínas reguladoras las GEF y las GAP, para completar su ciclo, cuando las GEF son activadas por un estímulo provocan el intercambio de GDP por GTP activando así a la proteína RAS provocando una respuesta en el organismo, las GAP ayudan a la proteína RAS a hidrolizar el GTP regresándola a su forma inactiva unida a GDP (Tomado y modificado de Jeffe y Hall, 2005).

En organismos como los hongos filamentosos se ha observado que RAC juega un papel importante en el crecimiento de las hifas (Mahlert *et al.*, 2006), además, en organismos como *Aspergillus nidulans* se ha observado que CDC-42 (ModA) parece ser la responsable de dirigir el crecimiento polarizado (Virag *et al.*, 2007). En el hongo filamentosos *N. crassa* se realizó un estudio en donde se muestra la localización de las proteínas RAC y CDC-42 en tubos de germinación y en hifas maduras, este estudio mostró que RAC y CDC-42 son esenciales en el crecimiento polarizado de *N. crassa*,

así como su localización es clave para su función (Araujo-Palomares *et al*, 2011). Por otra parte investigaciones en cultivos de células epiteliales del intestino muestran que Rac1 es necesaria para la proliferación celular cuando se encuentra en el citoplasma. Sin embargo, se observa que la inhibición en la biosíntesis de poliaminas de estas células provoca un incremento de Rac1 en la fracción nuclear, así mismo la proliferación celular se ve disminuida debido a que Rac1 se encuentra secuestrada en el núcleo y no está libre en el citoplasma (Vaidya *et al.*, 2005). Las proteínas GTPasas cuentan con muchos reguladores positivos y negativos y las poliaminas han ido tomando auge en esta regulación, a pesar de esto aún se desconoce la función específica que desempeñan sobre las proteínas de unión a GTP.

Los estudios sobre las poliaminas sólo se han realizado inhibiendo su ruta de biosíntesis constitutiva, encontrada hasta ahora en todos los organismos, mientras que la ruta que se encuentra catalizada por la enzima agmatinasa se ha dejado de lado, debido a que solo se ha descrito en bacterias, plantas y hasta hace poco en células de mamíferos. En el hongo filamentoso *N. crassa* sólo se ha descrito la ruta de biosíntesis de putrescina a partir de ornitina (McDougall *et al.*, 1977) y a pesar de que este hongo posee el homólogo de la agmatinasa de *E. coli* se desconoce el papel que desempeña en este organismo y en los hongos filamentosos en general. Es por ello que este estudio se enfocará en elucidar si la agmatinasa está involucrada en la ruta de biosíntesis de las poliaminas en *N. crassa* y cuál es el papel que desempeña en el crecimiento y polaridad celular de este hongo.

Capítulo 2. Antecedentes

El hongo filamentoso *N. crassa* ha participado en diversos estudios como protagonista, debido a que es un excelente modelo de las células eucariotas para estudiar diferenciación y desarrollo celular. Este hongo presenta características que facilitan su estudio, es fácil de cultivar en laboratorio, su genoma se encuentra completamente secuenciado facilitando la manipulación genética, se encuentra provisto de un ciclo de vida corto lo que facilita su estudio, además de presentar una fase sexual y otra asexual (Deacon, 1990).

En *N. crassa* así como en todos los organismos el crecimiento celular es un proceso de suma importancia para la sobrevivencia, dicho proceso se encuentra regulado por diversas moléculas y es un mecanismo sumamente controlado. Dentro de estas moléculas las poliaminas juegan un papel esencial en la regulación del crecimiento celular.

Tabor y Tabor (1985) hacen mención sobre dos rutas de biosíntesis de las poliaminas en *Escherichia coli* involucrando en cada ruta una enzima principal: la ornitina descarboxilasa (ODC) y la agmatinasa (AGS), siendo la reacción catalizada por ODC la ruta de síntesis constitutiva en la mayoría de los organismos. Sin embargo, en organismos como *Arabidopsis thaliana* no se ha encontrado el gen que codifica para la ODC, siendo la vía de la AGS la única encargada de la síntesis de poliaminas, esto hace pensar que en plantas la ruta constitutiva se encuentra catalizada por la AGS (Kusano *et al.*, 2008) a diferencia de *E. coli*. En células de mamíferos las poliaminas se sintetizan a partir de ambas enzimas, además de poder ser obtenidas de manera exógena mediante la alimentación (Ruiz-Cano *et al.*, 2012). Sin embargo, en *N. crassa* sólo se ha descrito la síntesis por ODC, a pesar de contar con un homólogo de la agmatinasa de *E. coli* (Mc Dougall *et al.*, 1977).

Las poliaminas han tomado un gran interés en la investigación, debido a las interacciones que pueden tener con moléculas participantes en la regulación del crecimiento y proliferación celular. Dentro de estas moléculas existen dos principales tipos: las de señalización celular, como son las proteínas de unión a GTP (GTPasas) y las moléculas estructurales, como las proteínas del citoesqueleto. Estos dos tipos de

moléculas son de suma importancia en todas las células, debido a esto diversas investigaciones se han enfocado en describir la interacción que las poliaminas tienen con este tipo de moléculas.

Mc Cormack *et al.* (1999) mencionan que las poliaminas están involucradas en la regulación de las interacciones de la F-actina, G-actina y la timosina $\beta 4$, debido posiblemente a que la estructura de las poliaminas ayuda a la timosina $\beta 4$ a secuestrar monómeros de G-actina para mantenerlos como reserva, además, en células deficientes de poliaminas se puede observar que la F-actina incrementa en la corteza celular, así mismo la migración celular se ve disminuida.

En 2006 Coburn y colaboradores publicaron un artículo en donde relacionan a la espermidina con el fosfatidilinositol-4,5-bifosfato (PI-(4,5)-P₂) y éste, a su vez, con los filamentos de actina. Ellos observaron que en células deficientes de poliaminas la cantidad de PI-(4,5)-P₂ disminuía al igual que la polimerización de actina, observando que en células HL60 existen conglomerados de PI-(4,5)-P₂ sensibles a cambios en concentraciones de espermidina, los cuales regulan la interacción de citoesqueleto con membrana. Por otra parte, Mechulam *et al.* (2009) realizaron estudios con las proteínas estructurales α - β tubulina, en donde presentan un modelo de la interacción de las poliaminas con α - β tubulina para facilitar la polimerización de los microtúbulos. Debido a la naturaleza catiónica de las poliaminas estas moléculas podrían interactuar con el carboxilo terminal de la α y β tubulina facilitando la polimerización entre dímeros.

Aparte de la relación directa que las poliaminas podrían tener con el citoesqueleto de actina, también existe una relación indirecta, la cual está involucrando proteínas de señalización como RAC y CDC-42 las cuales pertenecen a proteínas GTPasas. En *N. crassa* se sabe que las proteínas RAC y CDC-42 participan de manera importante en el establecimiento del crecimiento polarizado en hifas maduras. De acuerdo con Araujo-Palomares *et al.* (2011) las proteínas RAC y CDC-42 se localizan en las regiones subapical y apical de la hifa respectivamente, además de observar a ambas proteínas en la parte apical de tubos de germinación. En este mismo estudio se demuestra que estas proteínas son necesarias para mantener un crecimiento adecuado del organismo, ya que en cepas knock-out de estas proteínas el crecimiento se ve muy afectado.

En 2003 Ray y colaboradores mencionan que en células epiteliales la migración celular depende de las proteínas RhoA, Rac1 y Cdc-42, estas proteínas son reguladas por poliaminas, ya que la inhibición de la biosíntesis de las poliaminas por α -difluorometilornitina (DFMO) provoca que la cantidad de Rac1, Cdc-42 y RhoA unidas a GTP disminuya en gran parte, provocando que las células no migren, además de un desarreglo del citoesqueleto. Aunado a esto Vaidya *et al.* (2004) publicaron un estudio del efecto en la localización de Rac1 en células de mamífero deficientes de poliaminas, reportando que Rac1 se localiza en la región nuclear y perinuclear de la célula, a diferencia de una célula con un contenido normal de poliaminas, en la cual Rac1 se localiza en el citoplasma. Esta deslocalización de Rac1 provoca que la célula no migre además de que la F-actina se concentra en la corteza celular.

Por otra parte, en hongos, Cheng y colaboradores en 2012 realizaron un estudio con *Glomus etunicatum*, donde demuestran que la administración de poliaminas estimula la germinación de esporas, produciendo múltiples tubos germinativos en una espora, lo cual es necesario para el proceso de colonización de la micorriza *G. etunicatum*. De acuerdo con estos autores las poliaminas podrían estar participando de manera similar a factores de ramificación y así provocar este efecto. Otro estudio que demuestra la importancia de las poliaminas en los hongos es el realizado por Kummasook *et al.*, (2013) en el que se utilizaron mutantes del hongo patógeno *Penicillium marneffeii*, productos de la delección del gen que codifica para la enzima S-adenosilmetionina descarboxilasa (Sad A), la cual es requerida para la síntesis del donador del grupo aminopropil durante la síntesis de espermidina y espermina. En este estudio se demuestra que las poliaminas son requeridas para la morfogénesis de *P. marneffeii*, además de ser requeridas también para la conidiogénesis, ya que en la cepa mutante estos procesos se vieron afectados en ausencia de poliaminas. Sin embargo, cuando se cultiva la mutante en presencia de poliaminas exógenas el fenotipo silvestre se recupera en su mayoría. En *N. crassa* hasta ahora sólo se ha reportado una enzima como la responsable de sintetizar moléculas tan importantes como las poliaminas. Sin embargo, existe la posibilidad de que pudiera tener una ruta alterna para la biosíntesis de poliaminas de la cual la agmatinasa sería la encargada, y así asegurar la síntesis de estas moléculas esenciales para su sobrevivencia.

Capítulo 3. Objetivos

3.1 Objetivo general

Determinar el papel de la proteína agmatinasa (AGS-1) en el crecimiento polarizado del hongo filamentoso *Neurospora crassa*.

3.2 Objetivos particulares

- Describir la localización de la proteína agmatinasa en *Neurospora crassa*.
- Caracterizar fenotípicamente a la cepa mutante $\Delta ags-1$ het de *N. crassa*.
- Determinar la concentración de poliaminas endógenas (putrescina, espermidina y espermina) en la cepa mutante $\Delta ags-1$ het.
- Describir la localización de las proteínas GTPasas CDC-42 y RAC en la cepa mutante $\Delta ags-1$ het.
- Describir la dinámica del citoesqueleto de actina en cepas $\Delta ags-1$ het

Capítulo 4. Material y Método

4.1 Cepas, medios y condiciones de crecimiento

Las cepas de *N. crassa* usadas en este estudio se encuentran enlistadas en la Tabla 1. Las cepas FGSC# 9717 y 9718 se cultivaron en matraces de 500 mL con 200 mL de Medio Mínimo de Vogel (MMV) a 30°C durante dos días en oscuridad y tres en luz para una máxima producción de conidios. Los conidios se recuperaron en 40 mL de agua destilada estéril y fría fueron mezclados por agitación lenta en vórtex y filtrados 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.

Tabla 1. Cepas de *Neurospora crassa* usadas en este estudio

Cepa	Genotipo	Referencia
<i>Cepa silvestre</i>	<i>OR74A mat A</i>	FGSC# 9013
<i>mus-51 mat A</i>	$\Delta mus-51::bar+$; <i>his-3⁻ mat A</i>	FGSC# 9717
<i>mus-51 mat a</i>	$\Delta mus-51::bar+$ <i>mat a</i>	FGSC# 9718
$\Delta ags-1het$	$\Delta ags-1::hph^R$ <i>mat a</i>	este estudio
$\Delta ags-1-lifeact::gfp$	<i>pccg-1-lifeact::egfp::his-3⁺</i> ; $\Delta ags-1::hph^R$ <i>mat A</i>	este estudio
$\Delta ags-1-yfp::cdc-42$	<i>pgpd-yfp::cdc-42::his-3⁺</i> ; $\Delta ags-1::hph^R$ <i>mat A</i>	este estudio
$\Delta ags-1-yfp::rac$	<i>pgpd-yfp::rac::his-3⁺</i> ; $\Delta ags-1::hph^R$ <i>mat A</i>	este estudio
<i>ags-1::gfp</i>	<i>pccg-1-ags-1::egfp::his-3⁺ mat A</i>	este estudio

4.2 Análisis de la proteína AGS-1

Para el análisis de la proteína AGS-1, se utilizó la secuencia peptídica para realizar un alineamiento en Clustal W con agmatinasas conocidas y reportadas en organismos como *Escherichia coli*, *Homo sapiens*, así como con otras secuencias de posibles agmatinasas en hongos como *Magnaporthe oryzae*, *Sacharomices cerevisiae*, *Aspergillus nidulans* y *Podospora anserina*, con la finalidad de obtener el porcentaje de identidad y encontrar los residuos de aminoácidos esenciales para la función de agmatinasa.

4.3 Construcción de cepas de *N. crassa*

Para la construcción de la cepa que expresa la proteína AGS unida a la proteína verde fluorescente (GFP), se utilizó el plásmido pOC-02. En el caso de las cepas $\Delta ags-1$, $\Delta ags-1-yfp::cdc-42$, $\Delta ags-1-yfp::rac$ y $\Delta ags-1-lifeact::gfp$, se utilizó un fragmento recombinante con el gen de resistencia a higromicina para sustituir el gen de la agmatinasa y plásmidos que contienen la proteína de interés unida a alguna proteína fluorescente (Tabla 2).

El fragmento recombinante se generó mediante la técnica de “doublejoint PCR” (Yu *et al.*, 2004), la cual consiste en amplificar por separado regiones de aproximadamente 1,000 pb que flanquean al gen de interés, y así se obtuvo un fragmento río arriba (región 5´) con los oligonucleótidos 1 y 2 y otro fragmento río abajo (región 3´) con los oligonucleótidos 3 y 4. En otra reacción de PCR, con los oligonucleótidos 5 y 6 se amplificó el fragmento correspondiente al gen *hph*, que codifica para la fosfotransferasa, la cual confiere resistencia a higromicina B. En la amplificación se utilizó como templete el plásmido pCSN44, el cual contiene el gen de resistencia a higromicina (*hph*) de *E. coli*, flanqueado por el promotor y terminador del gen *trpC* de *A. nidulans* (Staben *et al.*, 1989). En una última reacción de PCR, se hizo la construcción del fragmento recombinante, para ello se utilizó como templete los tres fragmentos generados anteriormente (fragmento 5´, fragmento 3´ y fragmento *hph*) y los oligonucleótidos 7 y 8. Todos los oligonucleótidos usados se muestran en la Tabla 3.

Los conidios de las cepas FGSC# 9717 y 9718 se transformaron mediante electroporación con el fragmento recombinante que contiene el gen de resistencia a higromicina. Se utilizó un total de 1.25×10^8 conidios de cada cepa, se lavaron con 500

μ L de sorbitol 1 M, se centrifugaron a 8 000 rpm durante 1 min y se desechó el sobrenadante, este procedimiento se realizó tres veces. Una vez lavados, se añadieron 5 μ g del producto de PCR de fusión (fragmento recombinante), 5 μ g del plásmido que contiene las siguientes construcciones *pccg-1-ags-1::egfp* *pccg-1-lifeact::egfp*, *pgpd-yfp::cdc-42* y *pgpd-yfp::rac* para su respectiva cepa (Tabla 2), todas las transformaciones fueron incubadas en hielo por 5 min.

Tabla 2. Cepas, plásmidos y fragmento recombinante usado en la construcción de cepas

Cepa	Fragmento Recombinante	Plásmido	Construcción
FGSC# 9718	Gen <i>hph</i>	-----	Δ <i>ags-1</i>
FGSC# 9717	-----	pOC-02 (Cepario Dra. Castro-Longoria)	<i>pccg-1-ags-1::egfp</i>
FGSC# 9717	Gen <i>hph</i>	pRM49-OC30 (Delgado-Álvarez <i>et al.</i> , 2010)	Δ <i>ags-1-pccg-1-lifeact::egfp</i>
FGSC# 9717	Gen <i>hph</i>	pPgpdYFP-RAC (Araujo-Palomares <i>et al.</i> , 2011)	Δ <i>ags-1-pgpd-yfp::cdc-42</i>
FGSC# 9717	Gen <i>hph</i>	pPgpdYFP-CDC-42 (Araujo-Palomares <i>et al.</i> , 2011)	Δ <i>ags-1-pgpd-yfp::rac</i>

Se transfirieron 40 μ L de cada mezcla a una cubeta de electroporación de 0.2 cm y se electroporaron bajo los siguientes parámetros: 1.5 kv, 600 Ω y 25 μ F en un electroporador Gene PulserXCell (Bio-Rad). Inmediatamente se añadieron 960 μ L de sorbitol frío 1 M y se mezcló con 20 mL de solución de recuperación (2% de sales de Vogel con 2% de extracto de levadura), y se incubaron a 30°C a 150 rpm por 2 h, posteriormente esta solución se mezcló con 20 mL de solución de gelatinización (agar 1%, extracto de levadura 2%, sales de Vogel 2%, sorbitol 1 M y 10% de solución FIGS), fue plaqueada inmediatamente en cajas Petri de 150 x 15 mm con 40 mL de medio para

aislamiento de colonias (agar 1.8%, extracto de levadura 2%, sales de Vogel 2% y 10% de solución FIGS) adicionado con 300 µg/mL de higromicina B.

Tabla 3. Oligonucleótidos usados en la técnica DoubleJoint PCR

Nombre	Secuencia de oligonucleótido
HphF-pCSN44 (5)	5'-GATTTTCAGTAACGTTAAGTGG-3'
HphR-pCSN44 (6)	5'-GACAGAAGATGATATTGAAGG-3'
F5 <i>ags-1</i> (1)	5'-TGACACTTAGGAGTGTGTGC-3'
R5 <i>ags-1</i> (2)	5'- ATCCACTTAACGTTACTGAAATCACTGATAGGG TAGCTTGTCGATCG-3'
F3 <i>ags-1</i> (3)	5'-GCTCCTTCAATATCATCTTCTGTCCACCACCTCA TAAATCTCC-3'
R3 <i>ags-1</i> (4)	5'-GGACTTATACCGCCTTGTCG-3'
NestedF <i>ags-1</i> (7)	5'-GACGCCGTTAATAAGGCCTAGTTG-3'
NestedR <i>ags-1</i> (8)	5'-CTCGCTTCTTTGGTTCGATCAGC-3'

Para la transformación de la cepa FGSC# 9717 se utilizaron medios similares a excepción de que no contuvieron extracto de levadura. 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 adicionado con 300 µg/mL de higromicina B y se incubaron a 30°C durante tres días. Este procedimiento se realizó cinco veces para posteriormente analizar las cepas mediante PCR e identificar las mutantes generadas por recombinación homóloga además, se corroboró la integración el fragmento *ags-1::gfp* (Figura A3) mediante PCR con los oligonucleótidos de la tabla A1.

4.4 Análisis microscópico de células transformantes de *N. crassa*

Las imágenes de las hifas de *N. crassa* expresando la proteína verde fluorescente (GFP) se obtuvieron mediante el método del bloque de agar invertido en un microscopio confocal OlympusFluoview FV-1000. Las muestras se observaron con el objetivo plan apocromático 60X/1.40 usando aceite de inmersión. Se usó un laser de xenón con una longitud excitación de 543 nm y un filtro para la proteína EGFP, las imágenes fueron tomadas con un fotomultiplicador el cual combina la imagen de fluorescencia con la imagen de contraste de interferencia diferencial (DIC Nomarski). Para la captura y análisis de imágenes del microscopio confocal se utilizó el programa FV-10 ASW 4.1 viewer.

4.5 Obtención de ascosporas

Para la obtención de ascosporas se procedió a sembrar conidios en un extremo de una caja Petri con Medio Sintético de Cruza (MSC) sólido y se dejaron crecer durante 6 días a temperatura ambiente. Después de este periodo, se inocularon conidios de la cepa compatible (mat A o mat a, según el caso) en sitios tomados al azar de esta misma caja, se dejaron en incubación a temperatura ambiente hasta observar la expulsión de ascosporas en la tapa de la caja. Las ascosporas se recuperaron en 1 mL de agua destilada estéril. Para inducir la germinación de las ascosporas, se tomó un volumen de 5 μ L de la solución con ascosporas en 50 μ L de agua destilada estéril y se incubaron a 60°C durante 30 min. De la solución de ascosporas, se tomaron 25 μ L y se plaquearon en una caja Petri con MMV adicionado con higromicina B. El cultivo se incubó a 30°C por 12 h y las ascosporas se analizaron en un microscopio estereoscópico (SZXILLB2-100 Olympus®).

4.6 Caracterización fenotípica de las cepas de *N. crassa*

Los parámetros utilizados para la evaluación fenotípica de las cepas fueron los siguientes: se midió la tasa de crecimiento, la producción de conidios, la producción de biomasa y la frecuencia de ramificación, todos los ensayos se realizaron tres veces y por triplicado en la cepa mutante Δ ags-1 het y en la cepa parental.

4.6.1. Morfología colonial

La morfología colonial se determinó inoculando aproximadamente 1 000 conidios en el centro de las cajas Petri con MMV sólido y cultivándolas a 30°C durante 24 h. Posteriormente se tomaron imágenes digitales para comparar su fenotipo.

4.6.2. Determinación de la tasa de crecimiento

Se inocularon aproximadamente 1 000 conidios concentrados en un volumen de 2 µL en un extremo de una caja Petri de 150 x 15 mm con MMV sólido. Se monitoreó y midió el crecimiento de las cepas cada 4 h a partir de un periodo inicial de 16 h de incubación a 30 ° C. Se midió el crecimiento en 10 transectos de cada caja en cada experimento. Los resultados obtenidos se promediaron y se calcularon las desviaciones estándar.

4.6.3. Índice de ramificación

Se sembraron aproximadamente 1 000 conidios en el extremo de una caja Petri con MMV sólido y se incubaron a 30°C durante 24 h. El índice de ramificación se obtuvo contando el número de ramas laterales producidas en los últimos 200 µm de los ápices de 10 hifas parentales de cada cepa.

4.6.4 Conidiación

Se inocularon aproximadamente 1 000 conidios de la cepa silvestre y la mutante $\Delta ags-1$ het en tubos de borosilicato con 5 mL de MMV sólido y se dejaron crecer tres días en oscuridad y dos en luz a 30°C. Los conidios se colectaron en 1 mL de agua estéril agitando con vórtex durante un minuto, se cuantificaron con una cámara de Neubauer y las cifras obtenidas se promediaron y se calcularon las desviaciones estándar.

4.6.5. Medición de biomasa

Se inocularon aproximadamente 1 000 conidios en matraces Erlenmeyer de 250 mL que contenían 50 mL de MMV líquido y se incubaron a una temperatura de 30°C durante 48 h en agitación constante a 150 rpm. Posteriormente el micelio se secó y liofilizó durante 24 h y se registró el peso seco.

4.7 Extracción y cuantificación de poliaminas endógenas

4.7.1 Extracción, purificación y derivatización de poliaminas endógenas de *N. crassa*

Se cultivó un total de 1×10^5 conidios de la cepa silvestre (WT) y de la cepa mutante (Δ ags-1het) durante tres días en medio líquido Vogel, posteriormente se liofilizó el micelio durante 48 h. Se utilizaron 600 mg de micelio liofilizado para la extracción de poliaminas, el cual fue triturado hasta quedar un polvo fino, posteriormente se adicionó 1 mL de metanol por cada 100 mg de muestra, la mezcla se agitó con vórtex durante 30 s y se centrifugó a 10 000 rpm durante 10 m. El sobrenadante fue transferido a un tubo nuevo, posteriormente se lavó el sobrenadante con 0.5 mL de hexano por cada mL de metanol utilizado, la mezcla se agitó con vórtex y se centrifugó durante 1 m a 8 000 rpm, y se desechó la fase de hexano, este paso se repitió dos veces. Las poliaminas purificadas se secaron bajo flujo de nitrógeno, y se realizó la extracción por triplicado para cada muestra.

Las poliaminas secas se disolvieron en 0.5 mL de acetonitrilo y se derivatizaron con 0.5 mL de BSA (N, O-Bis-trimetilsilil-acetamida), la reacción de derivatización se incubó a 75°C durante 15 min, para posteriormente ser analizadas por cromatografía de gases.

4.7.2 Cuantificación de poliaminas mediante cromatografía de gases

Para la cuantificación de poliaminas, se realizó una curva de concentración con los estándares para cada poliamina (putrescina, espermidina y espermina). Se utilizaron cuatro diferentes concentraciones para cada poliamina (10, 20, 30 y 40 μ moles). Una vez que se prepararon las diluciones se procedió a realizar el análisis por cromatografía de gases, se inyectaron 2 μ l de cada dilución en el cromatógrafo Agilent Technologies 7820 A con una columna Agilent (19091A-112 de 25 m x 320 μ m x 0.52 μ m). El programa de corrida inició con 150°C por 2 m, con incrementos de temperatura de 14°C/min hasta alcanzar 320°C y se mantuvo así por 5 min. Este mismo programa se utilizó para las muestras de poliaminas extraídas de la cepa silvestre y de la cepa mutante.

Capítulo 5. Resultados

5.1 Análisis de la secuencia peptídica AGS-1

El alineamiento de secuencias y la búsqueda de dominios de la secuencia peptídica AGS-1 de *N. crassa*, mostró una identidad del 35% con la secuencia peptídica de *Escherichia coli* y *Homo sapiens*, mientras que con *Saccharomyces cerevisiae* tuvo una identidad del 50%, *Aspergillus nidulans* 76%, *Magnaporthe oryzae* 83% y con *Podospora anserina* 88%, además los residuos de aminoácidos esenciales para la unión del sustrato (agmatina) y para la hidrólisis se conservan en todas las secuencias, incluso en la secuencia de organismos alejados filogenéticamente como *E. coli*. (Figura 4).

5.2 Construcción y obtención de la cepa mutante homocarión $\Delta ags-1$.

Mediante la transformación de conidios de la cepa FGSC #9718 con el fragmento recombinante que confiere resistencia a higromicina B (*hph*) y por recombinación homóloga, se obtuvo una cepa mutante resistente a higromicina B. Esta cepa fue crecida seis veces consecutivas en medio mínimo de Vogel adicionado con higromicina B. Después de la sexta siembra la cepa se cultivó para realizar la extracción de DNA y mediante análisis de PCR, se corroboró la sustitución del gen *ags-1* por el gen *hph*. El análisis de PCR mostró que la cepa mutante obtenida contiene el gen que le confiere resistencia a higromicina (*hph*) y el gen *ags-1* debido a que se trata de un heterocarión (Figura 5).

	125	135	145	155	165	175
Neurosp	NYDIAFIGAP	FDTGTSYRPG	ARFGPSGIRQ	GSRRLN-LYG	GYNVPLATNP	FNSWATI IDC
Podospo	DYDIAFIGAP	FDTGTSYRPG	ARFGPSGIRQ	GSRRLN-LYG	GYNVPLDTNP	FNSWAKVIDC
Magnapo	NYDIAFIGAP	FDTGTSYRPG	ARFGPSGIRQ	GSRRLN-LYG	GYNVPLAVNP	FNSWARV LDC
Aspergi	KYDIAFVGAP	FDTGTSYRPG	ARFGPSGIRQ	GSRRLN-LYG	GYNVPLEANP	FVSELKVLDC
Sacchar	SFDIAVIGAP	FDSGVSYRPG	ARFGPSGIRL	GSRRLAPAYS	VYNEKL--NP	YKNWAKIVDC
Homo sa	GLDAAFIGVP	LDTGTSNRPG	ARFGPRRIRE	ESVMLR----	TVNPSTGALP	FQS-LMVADL
Escheri	GLDAAFVGI P	LDIGTSQRS G	TRYGPRYIRA	ESVMIR----	PYNMATGAAP	FDS-LLVADI

	185	195	205	215	225	235
Neurosp	GDIPVTSYDN	TFALSQIERG	HHSILSRKPT	TDSALPGPSL	QGKTLPRVIT	LGGDHTITLP
Podospo	GDIPVTSYDN	TYALHQIENG	HFSILSRPPT	TDATKPGPSL	KGKTLPRVIT	LGGDHTITLP
Magnapo	GDIPVTSYDN	TWALRQIEEG	HHQILSRAPA	TNANKAGPAL	RSKTLPRVIT	LGGDHTITLP
Aspergi	GDIPVTSYDN	AWAIQQIEEG	HNSLLMRKPF	TDADAEGLSR	AGKTLPRIIT	LGGDHTITLP
Sacchar	GSPPVTP L DN	RIAI DQIYR-	ANRAAGKHSV	TKKNKFN---	-----HPKIVT	LGGDHTITLP
Homo sa	GDVNVNLYNL	QDSCRRIQEA	YEKIVAAGCI	P-----	-----LT	LGGDHTITYP
Escheri	GDVPINTYSL	LKSVQIIEDY	YTGLNSYPLI	P-----	-----LT	LGGDHTITLP

	245	255	265	275	285	295
Neurosp	LLRSINRSYG	PVSVIHFDSH	LDSWPKVFG	GSPSEVASVN	HGTYFYHAAQ	EGLLRNDSNI
Podospo	LLRSINRAYG	PVTVIHFDSH	LDTWPKVFG	GSPSETASIN	HGTYFYHAAQ	EGLLRNDTNI
Magnapo	LLRSINRAYG	PVSVIHFDSH	LDTWPKVFG	GSPSEVASIN	HGTYFYHASM	EGLLHNDTNI
Aspergi	LLRSINKAYG	PVTVIHFDSH	LDTWPKVFG	GSPSQVAAIN	HGTYFYHAAM	EGLLKNDTNI
Sacchar	AIKAAAYENWG	KISVIHFDSH	LDTWNPYYFG	GNVTDYQSLN	HGTYLHWAHE	KGLLS-DTSI
Homo sa	ILQAMAKKHG	PVGLLHVDAH	TDTTKALG-	-----EKLY	HGAPFRR CVD	EGLLDCKR VV
Escheri	ILRALTKKHG	PVGLLHVDAH	TDTNDEMFG-	-----EKIA	HGTTFRRAVE	EGLLDLKR VV

Figura 4. Alineamiento del dominio activo en diferentes agmatinasas. El recuadro azul enmarca el sitio de unión al sustrato (agmatina), las flechas rojas señalan los residuos de aminoácidos esenciales para la unión al sustrato y el recuadro rojo enmarca los residuos de aminoácidos esenciales para la hidrólisis.

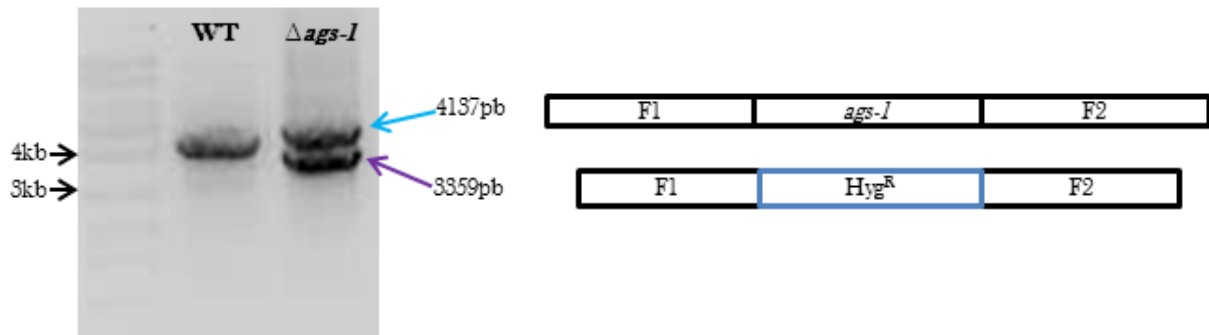


Figura 5. Corroboración de la integración del vector de delección del gen *ags-1*. En la columna de la cepa mutante, la flecha azul señala el fragmento que contiene el gen silvestre *ags-1* mientras que la flecha púrpura señala el fragmento que confiere resistencia a higromicina B, por otra parte en la columna de la cepa silvestre sólo se amplificó el fragmento del gen silvestre.

Para la obtención de una cepa homocarión se realizaron dos ensayos de cruza sexuales entre la mutante heterocarión y la cepa FGSC# 9013 para examinar la progenie y seleccionar la condición homocarión $\Delta ags-1$. En el primer ensayo se utilizó a la cepa silvestre como receptora (Figura 6A), en este ensayo se obtuvieron peritecios y ascosporas. En el segundo ensayo se utilizó a la cepa mutante $\Delta ags-1$ het como receptora (Figura 6B), sin embargo no se observó la formación de peritecios y no se obtuvieron ascosporas. Las ascosporas recuperadas fueron activadas y sembradas en cajas con medio de aislamiento de colonia adicionado con higromicina B, para así seleccionar solo la progenie resistente a este marcador de selección. Las ascosporas sembradas se incubaron a 30 °C durante cinco días revisando la geminación día con día. Se recuperaron 20 ascosporas germinadas en tubos de vidrio con medio mínimo de Vogel adicionado con higromicina B, sin embargo no hubo desarrollo posterior. Simultáneamente se monitoreó el crecimiento de las ascosporas que quedaban en la caja, pero al igual que las ascosporas aisladas nunca se desarrollaron (Figura 6C-D). Se realizó el conteo de las ascosporas germinadas y de las no germinadas. De un total de 1,255 ascosporas, 835 (67%) ascosporas no geminaron, mientras que 420 (33%) germinaron a los cinco días de ser plaqueadas (Figura 6E), sin embargo no se desarrolló micelio.

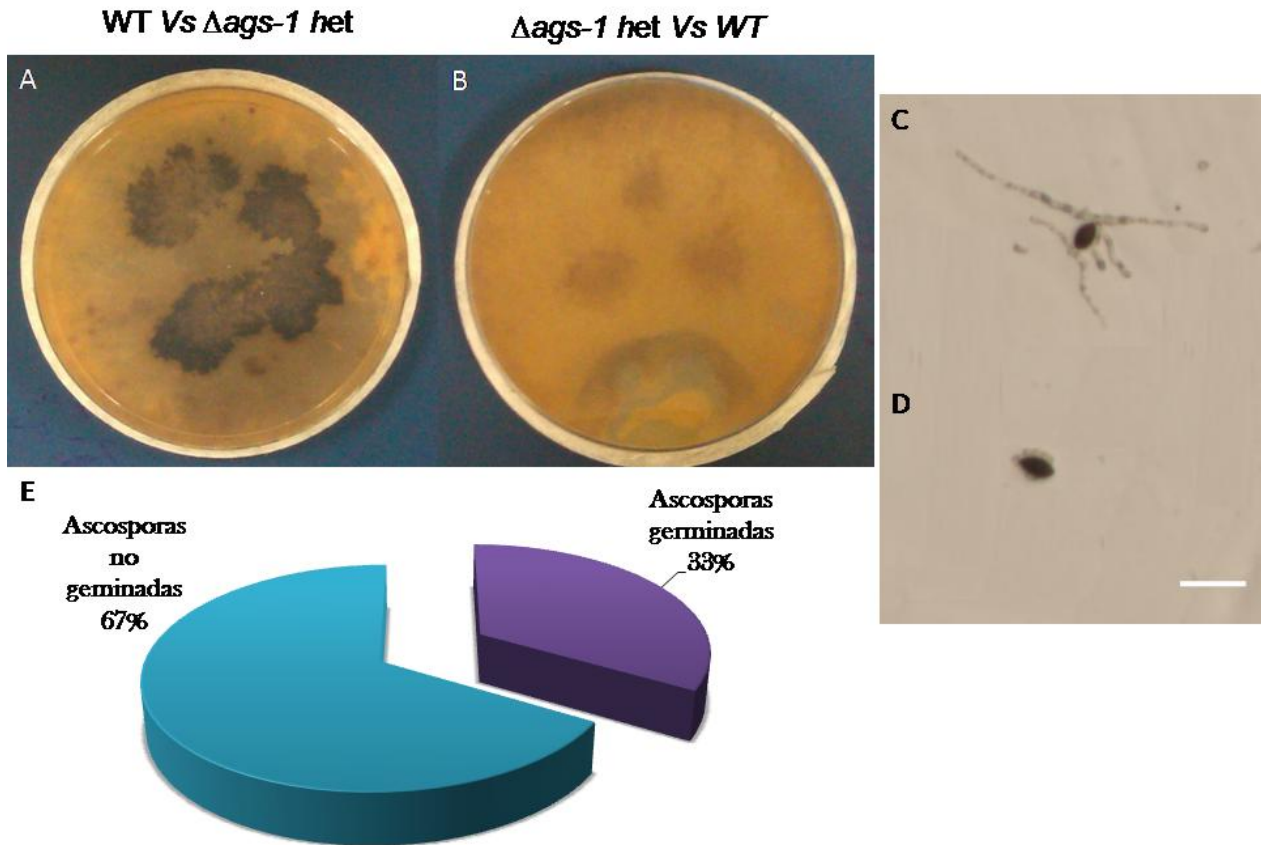


Figura 6. Formación de peritecios y germinación de ascosporas en las cruces WT Vs $\Delta ags-1$ het. A) La formación de peritecios se representa en forma de manchas negras en el ensayo donde la cepa receptora fue la cepa silvestre, B) en el ensayo en donde la cepa receptora fue la mutante no presenta formación de peritecios; C) las ascosporas germinadas presentan múltiples tubos germinativos, D) ascosporas no germinadas; E) El porcentaje de ascosporas germinadas fue un tercio del total de ascosporas sembradas, las ascosporas no germinadas representan más de la mitad del total de ascosporas. Barra de escala 4 μ m

Con la intención de obtener la cepa mutante homocarión $\Delta ags-1$, se realizó también la obtención de microconidios, sin embargo el resultado fue el mismo que en el ensayo de las ascosporas, los microconidios no crecieron cuando se sembraron en medio adicionado con higromicina B, por lo cual no fue posible obtener la cepa mutante homocarión $\Delta ags-1$ por lo que aparentemente el gen *ags-1* es esencial para *N. crassa*.

5.3 Caracterización fenotípica de la cepa mutante $\Delta ags-1$ het

Debido a que los resultados mostraron que el gen de la *ags-1* es esencial para el crecimiento de *N. crassa* y a que la cepa heterocarión muestra un desarrollo distinto al de la cepa silvestre, se decidió analizar la morfología de la cepa mutante heterocarión para determinar el grado de afectación en su desarrollo.

5.3.1 Crecimiento de la mutante $\Delta ags-1$ het

Se realizaron mediciones en ambas cepas cada cuatro horas, desde las 16 horas de la siembra de conidios, hasta las 48 horas de crecimiento, Se obtuvieron los promedios de las mediciones hechas en todas las horas, así como la velocidad promedio de crecimiento de ambas cepas (Tabla A2). Se observó que la cepa mutante $\Delta ags-1$ het crece sólo dos tercios de lo que crece la cepa silvestre, lo cual concuerda con la velocidad de crecimiento promedio para cada una de las dos cepas (Figura 7).

5.3.2. Producción de biomasa en la cepa $\Delta ags-1$ het

Se determinó que la cepa mutante produce menos biomasa. Aun cuando las desviaciones estándar son altas no se empalman, la diferencia entre la cantidad de biomasa producida entre ambas cepas es significativa (Figura 8).

En los ensayos de cuantificación de biomasa se observó un efecto similar al mostrado en el crecimiento radial, donde la producción de biomasa se redujo 1/3 en la cepa mutante en comparación con la cantidad de biomasa producida por la cepa silvestre.

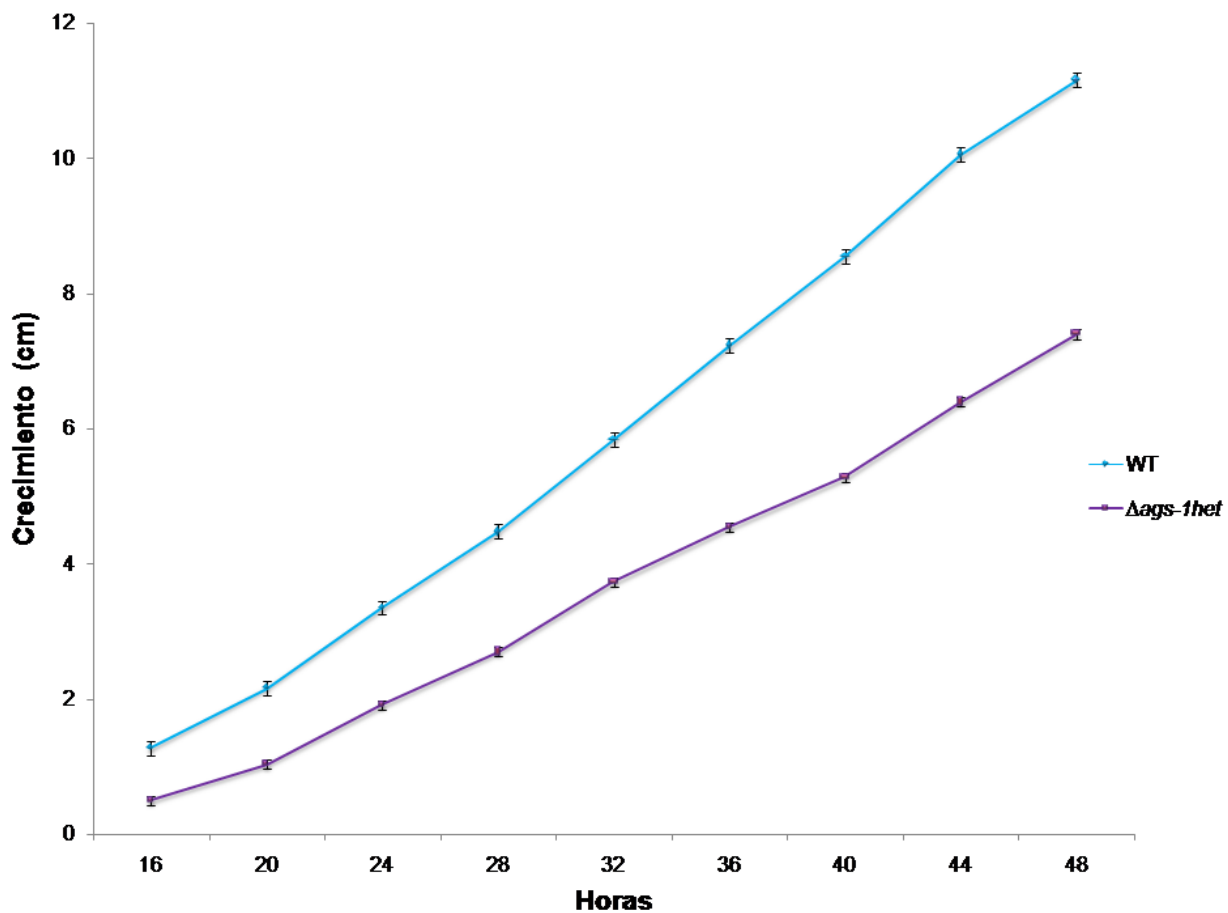


Figura 7. Crecimiento radial en la cepa silvestre (WT) y en la cepa mutante (Δ ags-1het); en la gráfica se observa una disminución de casi 1/3 del crecimiento en la cepa mutante con respecto al crecimiento de la cepa silvestre, las barras de error representan la desviación estándar.

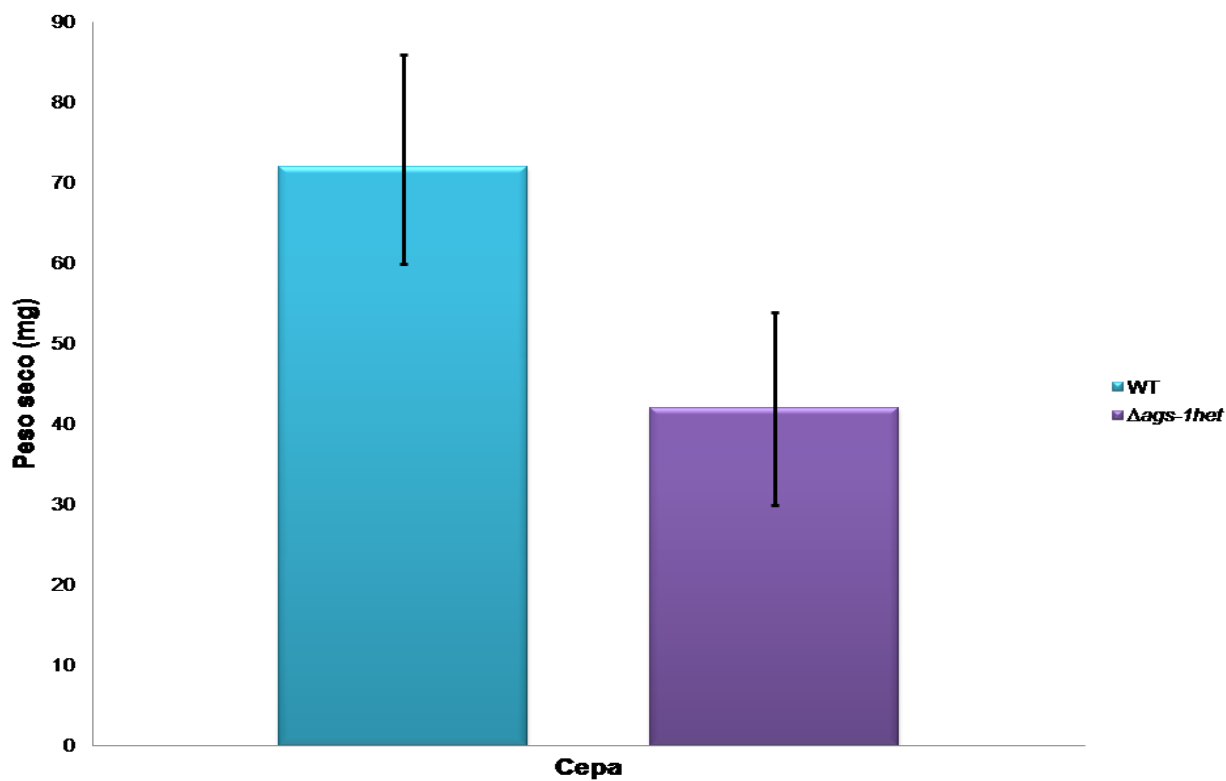


Figura 8. Producción de biomasa en la cepa mutante Δ ags-1het y en la cepa silvestre (WT) P-valor < 0.05

5.3.3. Producción de ramificaciones en la cepa mutante Δ ags-1het

Se realizó un histograma para observar la frecuencia de producción de una, dos y tres ramas en ambas cepas (Figura 9). Se encontró que la moda para la cepa silvestre es de dos ramas, a diferencia de la mutante en donde la moda es de una rama. Sin embargo, la media para ambas cepas es de dos ramas por hifa parental. Por lo cual la deficiencia de agmatinasa en la cepa mutante afecta muy poco la ramificación con respecto a la cepa silvestre.

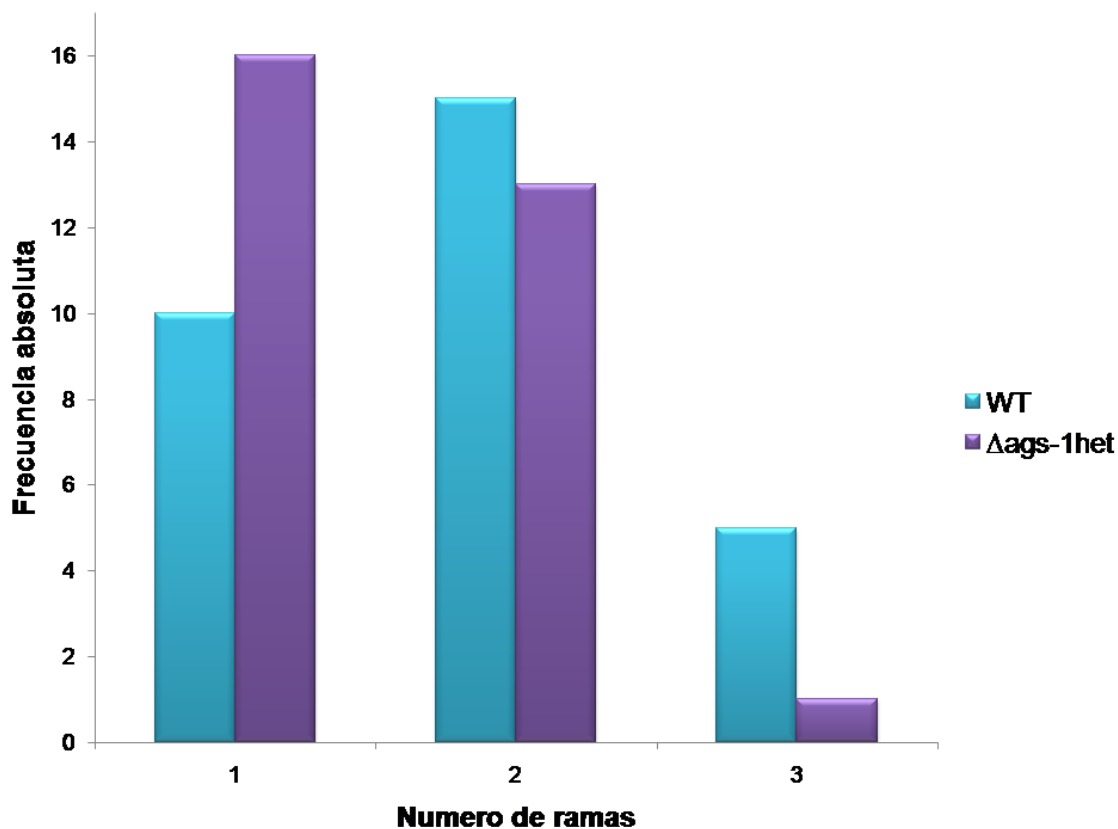


Figura 9. Producción de ramificaciones. La frecuencia de producción de dos ramas en ambas cepas es similar, sin embargo la cepa mutante Δ ags-1het produce más hifas parentales con una sola rama lateral y menos hifas con tres ramas laterales.

5.3.4. Conidiación en la cepa mutante Δ ags-1het

La producción de conidios en la cepa silvestre fue de 24×10^6 conidios por mL, mientras que en la cepa mutante fue de 5.22×10^6 conidios por mL, esta producción es alrededor de cuatro veces menos que en la cepa silvestre, además la cepa mutante presentó menor producción de hifas aéreas (Figura 10).

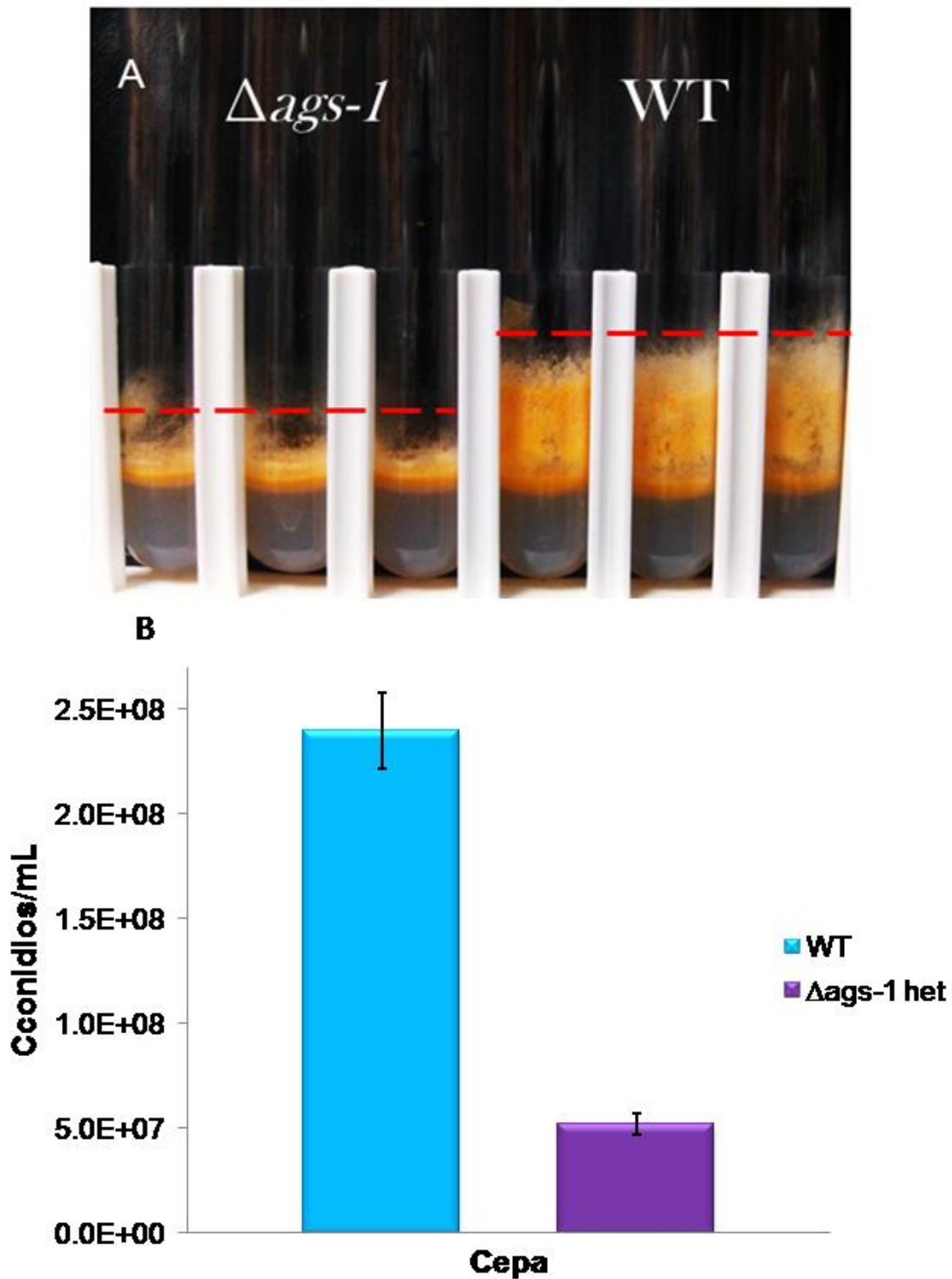


Figura 10. Producción de conidios. A) Se puede observar que la elongación de las hifas aéreas en la cepa mutante es alrededor de 2/3 menos que la elongación de las hifas aéreas en la cepa silvestre, B) Grafica de la producción de conidios, las barras de error representan la desviación estándar.

5.4 Localización intracelular de la agmatinasa en *Neurospora crassa*

Mediante microscopía confocal se analizó la localización de la proteína hipotética agmatinasa en hifas maduras y en germínulas, esto fue posible utilizando la cepa *ags-1::gfp* descrita previamente en materiales y método.

5.4.1 Localización de la AGS-1::GFP en el ápice y sub-ápice de hifas maduras

Las imágenes de microscopía confocal revelaron AGS-1::GFP se encuentra en toda la hifa, pero se le puede encontrar en la región apical y sub-apical de manera puntualizada. En la región apical la intensidad de fluorescencia correspondiente a AGS-1::GFP se observó acumulada en la zona del Spitzenkörper (Figuras 11, 12A). Además, se localizó en toda la periferia de la hifa (Figura 12A). Sin embargo, al desenfocar la periferia de la hifa y enfocar el plano donde se observa la parte interna, se puede observar una acumulación de fluorescencia en toda la parte apical a manera de puntos y filamentos que salen desde el ápice hacia la parte sub apical. La distribución de puntos y filamentos se observa a lo largo de toda la hifa siendo más evidente en los sitios de crecimiento (Figura 12). En la región interna y periférica de la célula, se logran observar puntos de fluorescencia moviéndose en sentido anterogrado y retrogrado a lo largo de toda la hifa, junto con estos puntos de fluorescencia también se observan filamentos desde la periferia hacia adentro de la hifa (Figura 13 A-C). Por otra parte, se observó que mientras la hifa se encuentra en un estado no estresado, la agmatinasa está localizada en la zona del Spitzenkörper y en la región apical (Figura 14 A-C) y la hifa crece aproximadamente 10 $\mu\text{m}/\text{min}$, en cambio cuando la hifa se encuentra estresada (Figura 14 D-F), la AGS-1::GFP se encuentra localizada en la porción apical a manera de una nube de fluorescencia sin estar concentrada en el Spitzenkörper y la hifa crece aproximadamente 2 $\mu\text{m}/\text{min}$.

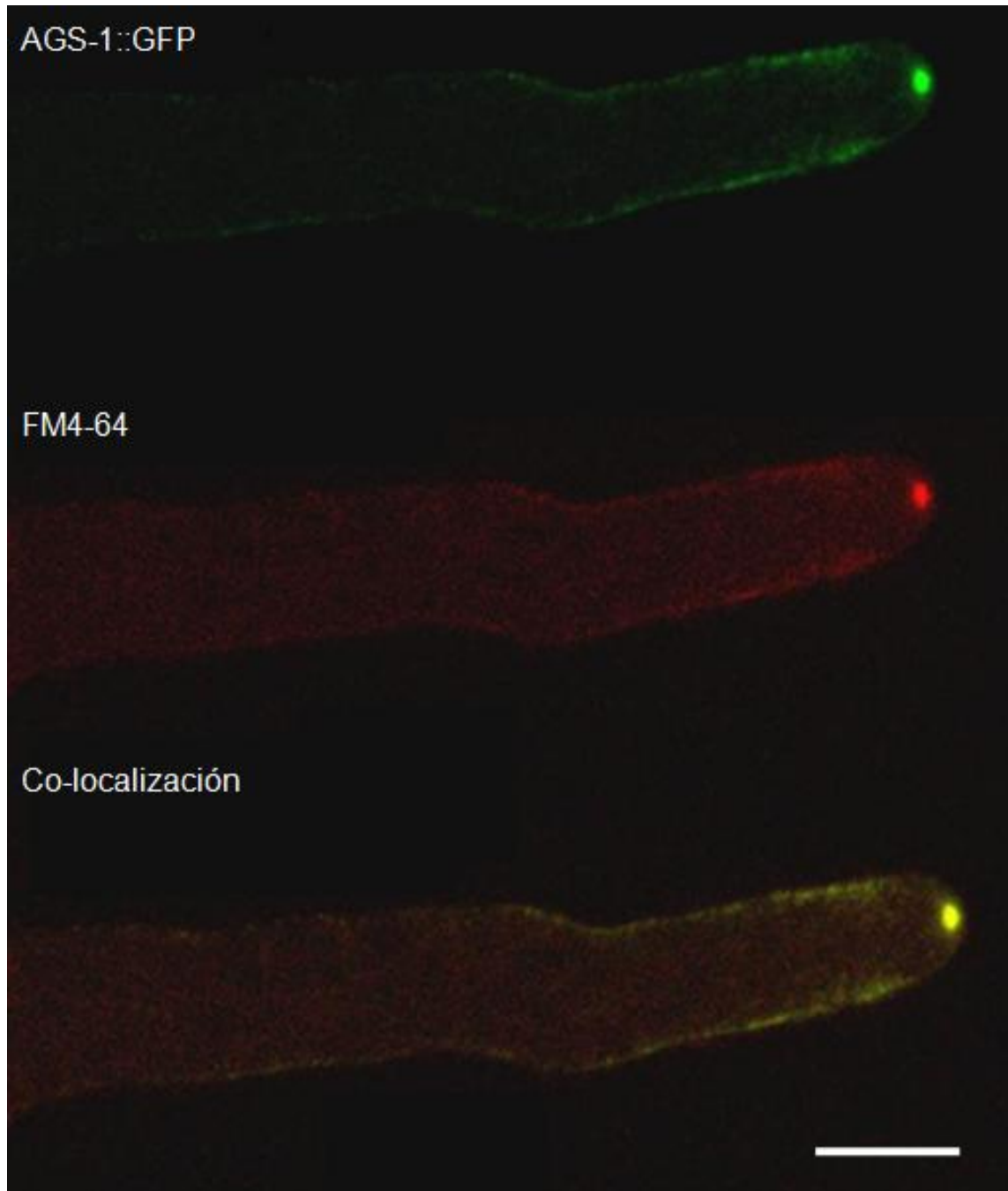


Figura 11. Localización de la proteína AGS-1::GFP en *Neurospora crassa*. Localización de la proteína agmatinasa en la región del Spitzenkörper y en la región subapical, tinción del Spitzenkörper con FM4-64 co-localización de la proteína agmatinasa con el Spitzenkörper, se observa una co-localización completa. Barra de escala 10 μm .

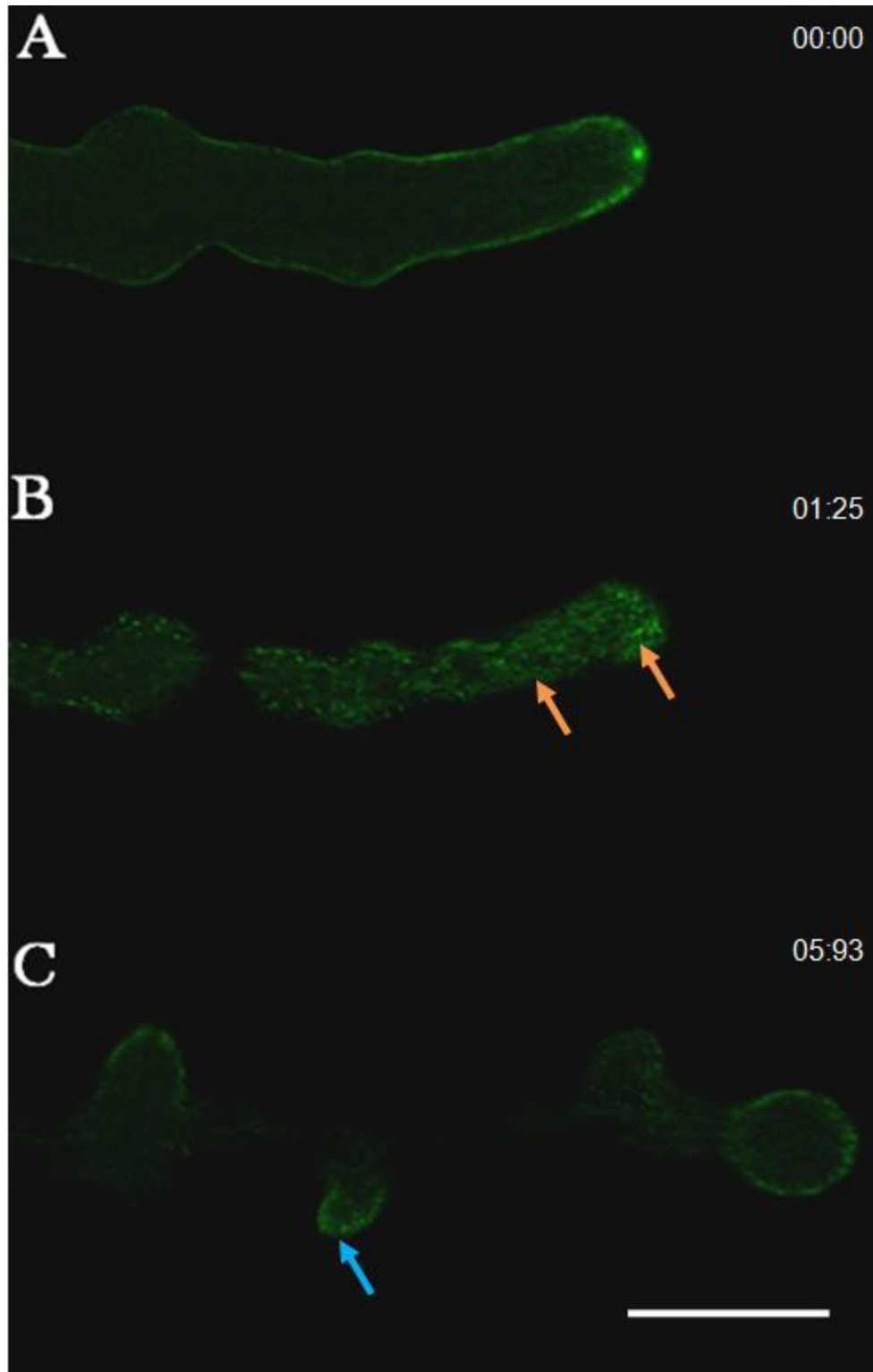


Figura 12. Localización de la proteína AGS-1::GFP en hifas de *Neurospora crassa*. A) Localización de la agmatinasa enfocando la periferia de la hifa, B) Localización de la agmatinasa desenfocando la periferia de la hifa, se logran observar puntos y filamentos (→) en la parte apical y subapical, C) Localización de la agmatinasa en sitios de crecimiento (→). Barra de escala 20 μm.

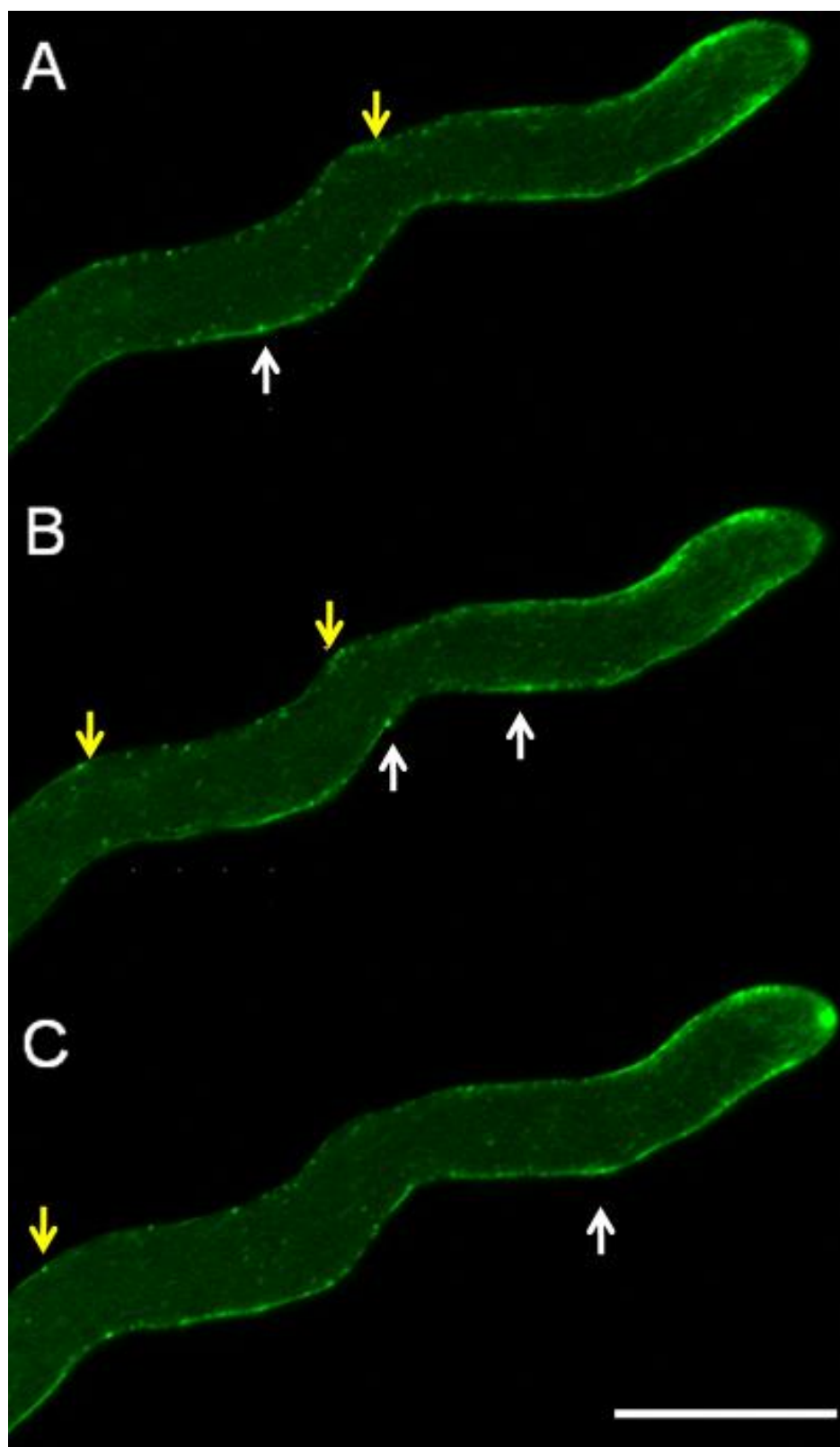


Figura 13. Localización de la agmatinasa a lo largo de la hifa de *N. crassa*. A-C) puntos y filamentos dentro de la hifa moviéndose en sentido anterogrado (flecha blanca) y retrogrado (flecha amarilla). Barra de escala 20 μm

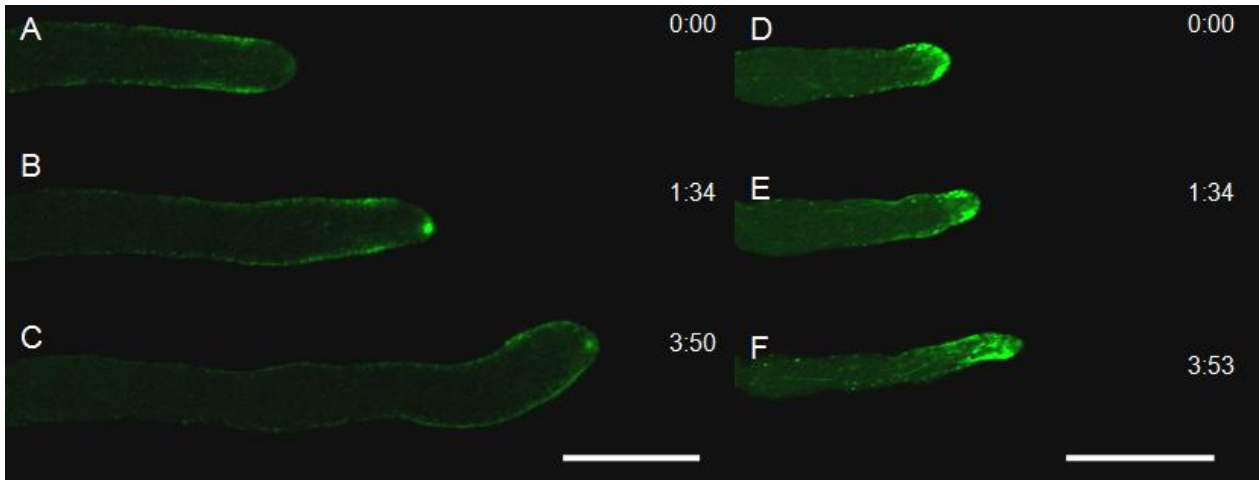


Figura 14. A,B,C) Localización de la agmatinasa en hifas sin estrés, se observa una localización de la agmatinasa en el Spitzenkörper y en la región subapical, también se observa un rápido crecimiento D, E, F) Localización de la agmatinasa en hifas estresadas de *N.crassa*, se observa una deslocalización de la agmatinasa y un crecimiento lento. Barra de escala 20 μ m.

5.4.2 Localización de la AGS-1::GFP en la formación del septo

La formación del septo es un evento sumamente importante en las células de *N. crassa*, previamente se ha descrito su formación desde el inicio hasta el final (Delgado-Álvarez *et al.*, 2009) mediante la dinámica del citoesqueleto, utilizando el péptido lifeact el cual está unido a la proteína GFP. En el análisis de la dinámica de la AGS-1::GFP, en una secuencia de imágenes a través del tiempo, se puede apreciar su localización en la formación del septo, siguiendo la dinámica de la maraña de actina-miosina, descrita por Delgado-Álvarez *et al.*, (2009).

Se observó una gran cantidad de filamentos y parches de fluorescencia dentro de la hifa en el sitio donde se formará el septo (Figura 15A), posteriormente se observó una acumulación de pequeños filamentos en el interior de la hifa (Figura 15B), después esta acumulación se movió hacia la periferia de la célula, conglomerándose en la región donde se formará el septo (Figura 15C). Ya conglomerados los filamentos en la periferia, se movieron hacia el interior de la hifa formando una maraña de filamentos y acercándose cada vez más para formar el septo (Figura 15D-G). Una vez formado el septo, se observó una gran cantidad de filamentos y puntos fluorescentes que salen de ambos lados del septo (Figura 15H).

5.4.3 Localización de la AGS-1::GFP en germínulas

Durante la etapa de germinación de los conidios la AGS-1::GFP se observó a manera de puntos y filamentos dentro de todo el conidio, en una secuencia de imágenes se logró observar que estos puntos y filamentos de fluorescencia tienen un movimiento azaroso, hasta que se empiezan a localizar en el sitio donde el conidio va a germinar, una vez iniciada la germinación se observó una mayor cantidad de fluorescencia en la punta de la germínula causada por la acumulación de la AGS-1::GFP, a pesar de este fenómeno los puntos y filamentos de fluorescencia siguieron observándose dentro del conidio (Figura 16).

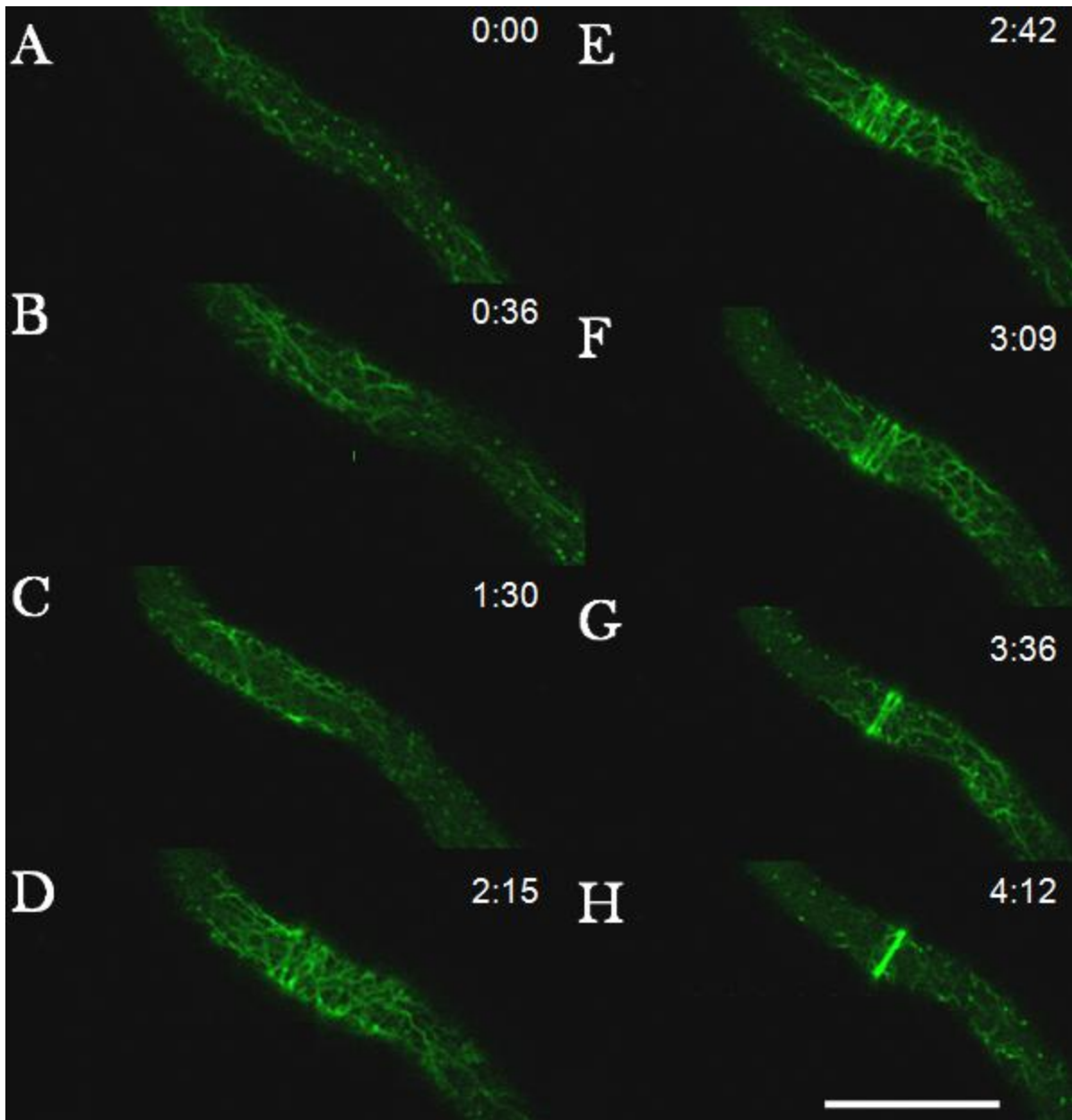


Figura 15. Formación del septo en hifas de *Neurospora crassa*. La secuencia de imágenes pertenecientes a un video muestra la localización de la AGS-1GFP en la formación del septo, B) se logra observar filamentos y puntos acumulándose dentro de la hifa, C) los filamentos comienzan a acumularse en la periferia de la célula, D) se forma la maraña de actina-miosina, E) la maraña de filamentos comienza a conglomerarse en el lugar de formación del septo, F-G) la formación del septo se completa H) se observan filamentos y puntos que salen del septo.

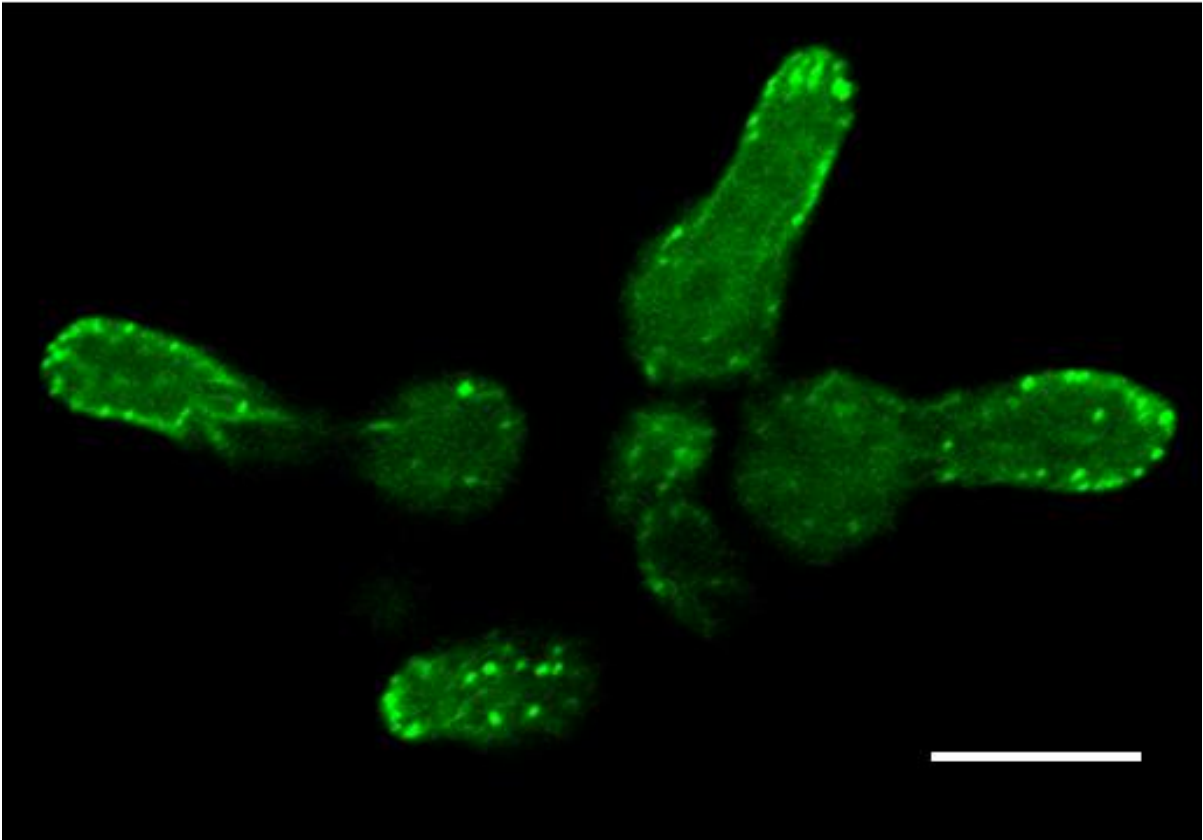


Figura 16. Localización de la AGS-1::GFP en germinulas de *N. crassa*. Se observa presencia de puntos y filamentos de fluorescencia dentro de toda la germinula, con una mayor cantidad de fluorescencia en la punta del tubo germinativo. Barra de escala 10 μ m

5.5 Localización de las proteínas CDC-42 y RAC en la cepa Δ *ags-1* het

Debido a la posible relación que muestra la agmatinasa con la población de F-actina en hifas maduras, se decidió observar la localización de las proteínas CDC-42 y RAC en la cepa mutante heterocarión, las cuales son componentes importantes para la organización de la actina y el crecimiento polarizado de la hifa.

5.5.1 La localización de la proteína CDC-42 cambia en la cepa mutante $\Delta ags-1het$

La proteína CDC-42 es de suma importancia durante el desarrollo de la hifa, su localización es muy importante para su función (Araujo-Palomares *et al.*, 2011). En el estudio de su localización se observó que la proteína CDC-42 se encuentra en la punta de la hifa a manera de media luna, además de localizarse en los sitios de ramificación y durante la etapa de germinación en la punta de la germínula, sin embargo en la cepa mutante $\Delta ags-1het$, se observó una localización dispersa atrás de la región subapical, aun así se logró observar un poco de fluorescencia en la punta de la hifa (Figura 17).

Otro fenómeno que se observó con menor frecuencia, es la formación de estructuras membranosas en forma de círculos y filamentos que muestran fluorescencia correspondiente a la proteína CDC-42 (Figura 18). Estas estructuras se encontraron a lo largo de toda la hifa desde la región subapical hacia partes más distales de la punta, a pesar de esto se continuó observando fluorescencia en la punta de la hifa.

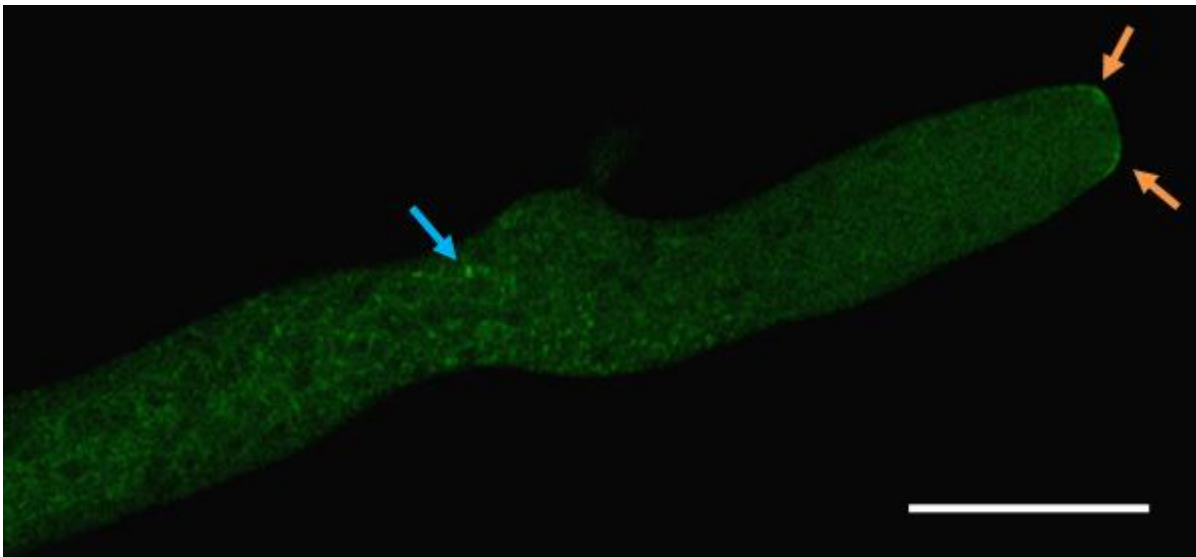


Figura 17. Localización de la proteína CDC-42 en una hifa de la cepa mutante $\Delta ags-1het$, se logra observar puntos de fluorescencia detrás de la parte subapical (\rightarrow) y fluorescencia en los sitios apicales de crecimiento (\rightarrow).

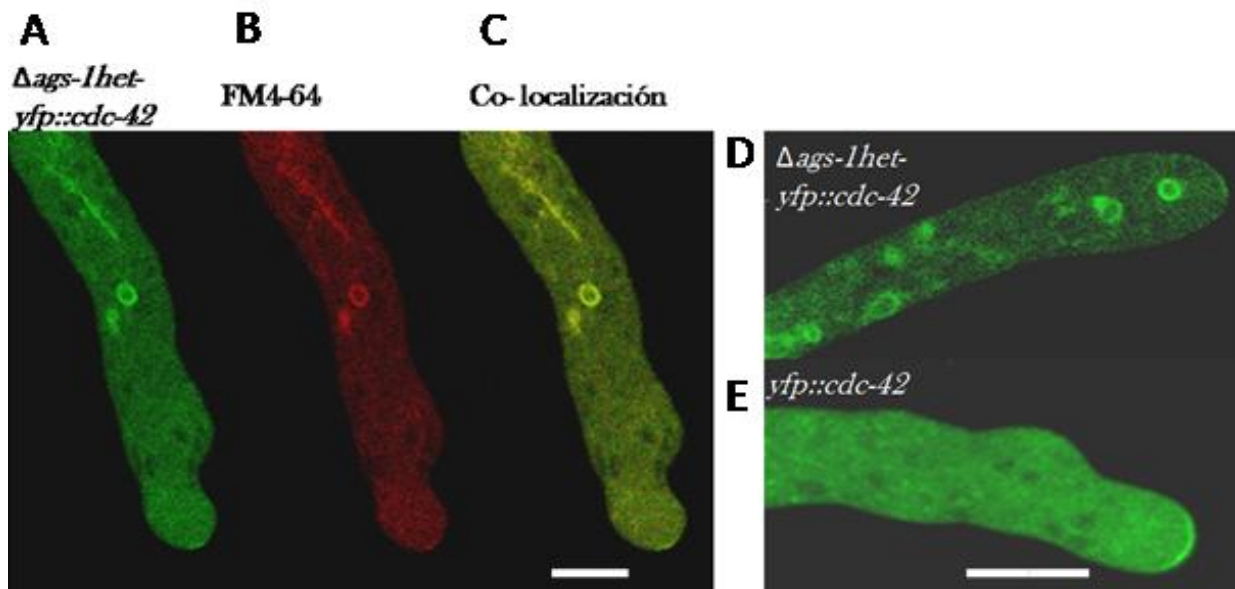


Figura 18. Localización de la proteína CDC-42 en hifas de la cepa mutante $\Delta ags-1het$, A-D) localización de la proteína CDC-42, se observan estructuras membranas, B) tinción con FM4-64, C) Co-localización, E) localización de CDC-42 en hifas normales. Barra de escala 10 μm

5.5.2 Localización de la proteína RAC la cepa mutante $\Delta ags-1het$

La proteína RAC al igual que la proteína CDC-42 es de suma importancia para el crecimiento polarizado de la hifa, entre las dos proteínas mantienen un crecimiento celular adecuado, se sabe que la función de estas dos proteínas va de la mano con su localización intracelular. En la cepa silvestre la proteína RAC se localiza como un anillo subapical en hifas maduras (Figura 19 A) dejando el espacio de la punta en donde se localiza la CDC-42 (Araujo-Palomares *et al.*, 2011). Sin embargo, en hifas de la cepa mutante $\Delta ags-1het$ la proteína RAC se localiza en toda la periferia de la región apical (Figura 19 B).

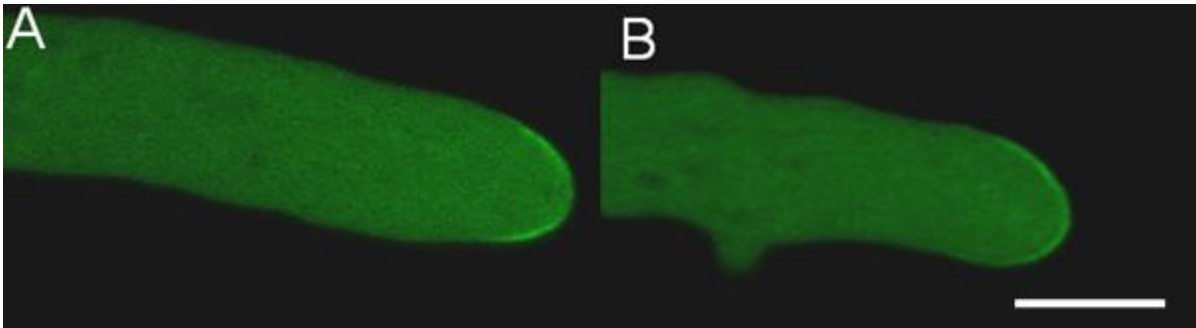


Figura 19. Localización de la proteína RAC. A) Localización de la proteína RAC en la cepa silvestre, se observa en el anillo subapical dejando un espacio libre de fluorescencia en la punta, B) localización de la proteína RAC en la cepa deficiente de agmatinasa, se observa en todo el contorno de la parte apical. Barra de escala 10 μ m

5.6 Localización de la F-actina en la cepa Δ *ags-1*het

La actina es una proteína de suma importancia para el crecimiento polarizado, se sabe que su unión con GFP resulta difícil, por lo cual se ha optado por marcar un péptido de unión a F-actina con la proteína GFP (Riedl et al., 2008), dicho péptido, denominado Lifeact, se une a la F-actina. En reportes previos, se ha observado a la F-actina de manera muy localizada en el Spitzenkörper durante el crecimiento hifal de *N. crassa* (Figura 20A), además se ha observado en la región subapical a manera de parches (Figura 20A).

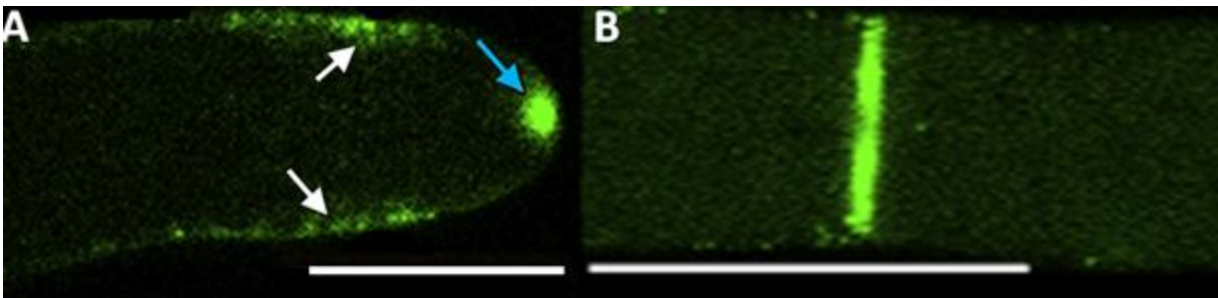


Figura 20. Localización de la F-actina mediante el marcaje con LIFEACT::GFP. A) Región apical y subapical de una hifa madura de *N. crassa*, se logra observar una fluorescencia muy focalizada en la región del Spitzenkörper (\rightarrow) y en la región del anillo subapical (flecha blanca), B) Septo maduro en una hifa de *N. crassa*. Imágenes tomadas y modificadas de Delgado-Álvarez et al., 2011. Barra de escala 10 μ m

Otra región donde se localiza de manera muy evidente la F-actina, es en el septo maduro y durante su formación (Figura 20B) (Delgado-Álvarez et al., 2011). Sin

embargo, la localización de la F-actina en la cepa $\Delta ags-1het$, es diferente a lo que se observó en la cepa silvestre. En la cepa mutante $\Delta ags-1het$, la actina no se logra observar en la formación del septo, ni a manera de parches distribuidos por la hifa (Figura 21A), solamente se observó un poco de fluorescencia cuando el septo ya se encuentra formado (Figura 21B), en comparación con la cepa silvestre en donde la co-localización de FM4-64 y LIFEACT::GFP muestran que la actina se encuentra en el septo y en parches distribuidos por toda la hifa (Figura 21C-D).

En la zona del Spitzenkörper, la fluorescencia de la F-actina es mucho mayor que en la cepa silvestre (Figura 22), además la fluorescencia observada abarca gran parte de la región apical en forma de una nube de fluorescencia. Sin embargo, no se logra observar en el anillo subapical.

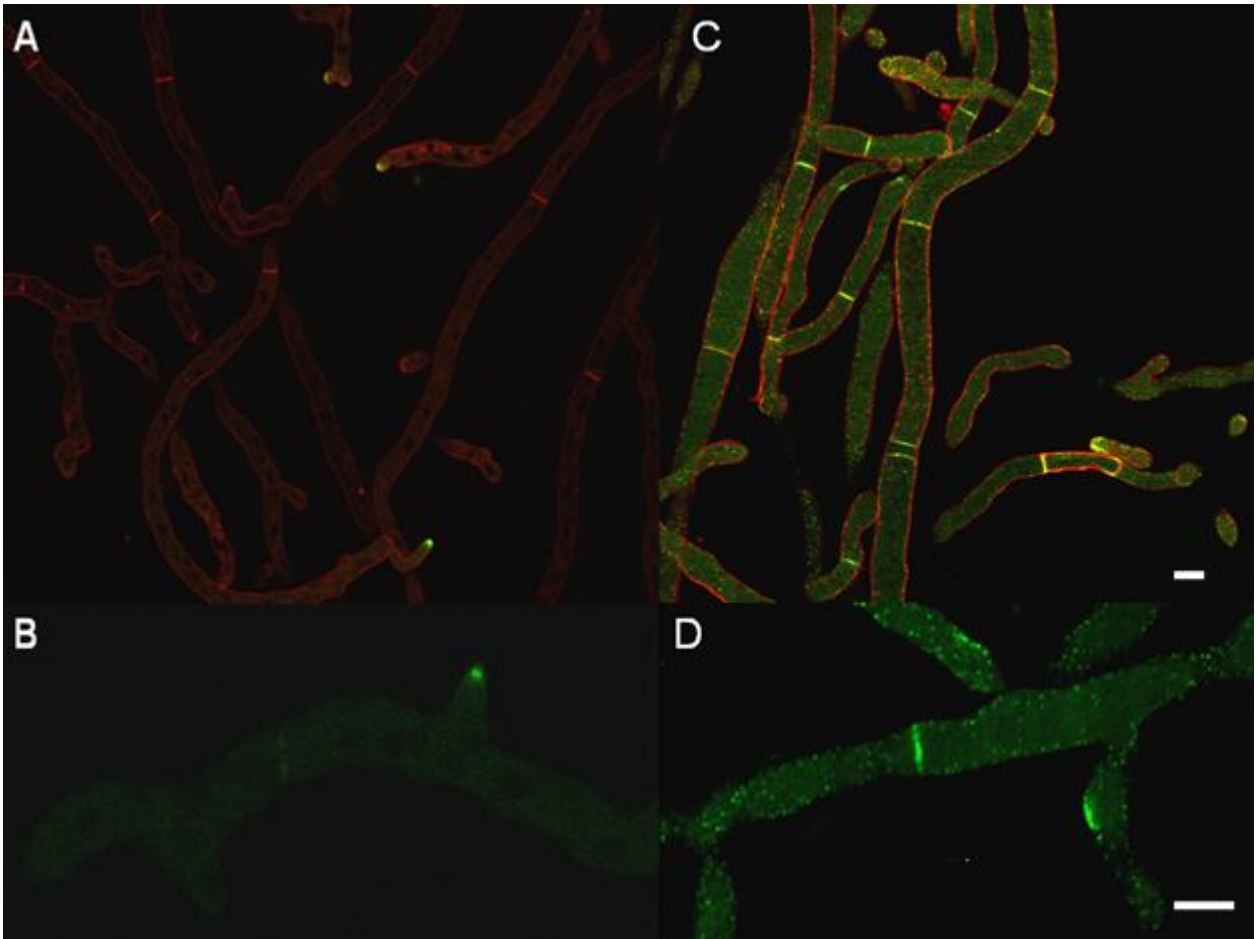


Figura 21. Localización de la F-actina marcada con LIFEACT::GFP en el septo de la cepa $\Delta ags-1$ het y en la cepa silvestre. A) Co-localización del marcaje con FM4-64 y LIFEACT::GFP en la cepa mutante $\Delta ags-1$ het, se logra observar hifas de *N. crassa* con el septo fluoresciendo en rojo a causa de la tinción con FM4-64, pero no se logra observar la fluorescencia con LIFEACT::GFP excepto en las puntas de las hifas. B) Zoom de una hifa de *N. crassa* de la cepa mutante $\Delta ags-1$ het en la cual se logra observar una ligera fluorescencia en la región del septo y en la porción apical de una hifa en crecimiento. C) Co-localización del FM4-64 y LIFEACT::GFP en la cepa silvestre, se logra observar hifas de *N. crassa* con el septo fluoresciendo en amarillo a causa de la co-localización LIFEACT::GFP y FM4-64, además se observan puntos verdes distribuidos por toda la hifa. D) Zoom de una hifa de *N. crassa* de la cepa silvestre en la cual se observa una gran intensidad de fluorescencia en el septo y de puntos de fluorescencia distribuidos en toda la hifa. Barra de escala 10 μ m

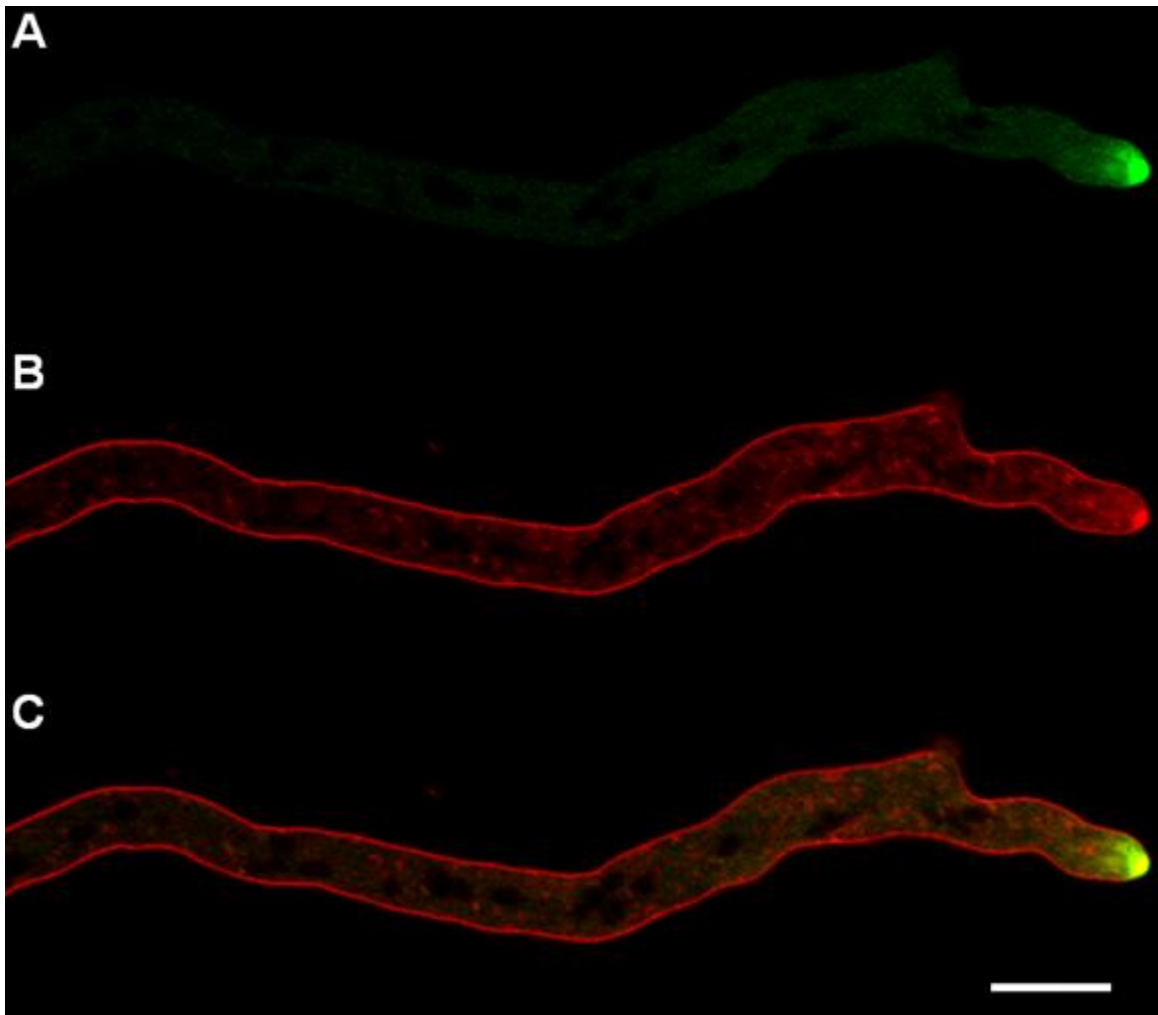


Figura 22. Localización de la F-actina mediante el marcaje con LIFEACT::GFP en la cepa $\Delta ags-1$ het. A) Se observa una gran intensidad de fluorescencia en la región apical de la hifa mientras que en las regiones más distales de la punta no se observa fluorescencia, B) tinción del Spitzenkörper mediante el fluorocromo FM4-64 y C) Co-localización del Spitzenkörper (FM4-64) y F-actina (LIFEACT::GFP). Barra de escala 10 μ m

5.7 Cuantificación de poliaminas

Se realizó la cuantificación de poliaminas mediante una curva de concentración la cual fue linearizada para poder obtener la ecuación de la recta y así determinar la concentración de las poliaminas en la cepa silvestre y en la cepa mutante.

La concentración promedio de las dos cepas se muestra en la Tabla 5. Los resultados muestran que la espermidina (Esd) es la de mayor concentración en ambas muestras, seguida por la putrescina (Put) y por último la espermina (Esm) que no se pudo detectar. Sin embargo, se observa una pequeña reducción en la cantidad de las dos poliaminas en la cepa mutante, lo cual concuerda con la hipótesis planteada, de que la deficiencia de agmatinasa pudiera estar provocando una reducción en la cantidad de poliaminas. Sin embargo, esta reducción no sería muy grande debido a que es una mutante heterocarión y que aún se encuentra la otra ruta de síntesis catalizada por la ornitina descarboxilasa.

Tabla 4 Concentración de poliaminas en la cepa silvestre y en la cepa mutante Δ ags-1 het

Poliamina Muestra	Putrescina nmoles/m	Espermidina nmoles/mg	Espermina nmoles/mg
Cepa silvestre	53.6 ± 4.8	74.0 ± 12.3	No detectada
Δags-1 het	41.6 ± 4.3	72.2 ± 12.5	No detectada

A pesar de la disminución en la concentración de poliaminas que se observa en la cepa mutante, la poliamina que presenta mayor concentración de las tres es la espermidina aun en la cepa silvestre, lo cual da un indicio de que pudiera tener mayor efecto que las otras dos en el mantenimiento y el crecimiento de la célula.

Capítulo 6. Discusión

El crecimiento celular es un proceso multifactorial, el cual involucra proteínas estructurales como la actina y proteínas señalizadoras como las RHO GTPasas, las cuales han sido ampliamente estudiadas en varios organismos modelo. Sin embargo, existe un grupo de moléculas implicadas en el crecimiento de las células, a las cuales se les denomina poliaminas (Kusano *et al.*, 2008) debido a que presentan múltiples grupos amino dentro de su estructura (Agostinelli *et al.*, 2010). Se sabe que en todos los organismos las poliaminas son de suma importancia en la homeostasis celular, ya que se encuentran involucradas en diversos procesos celulares: como en la regulación de la transcripción, regulación de la síntesis del DNA en el ciclo celular así como regulación del crecimiento y migración celular (Igarashi *et al.*, 2010, Igarashi y Morris, 1984 y McCormack *et al.*, 1999). Es tal su importancia que en organismos como bacterias, plantas y mamíferos las poliaminas se sintetizan mediante dos rutas de síntesis (Tabor y tabor, 1985., Kusano *et al.*, 2008). Una ruta catalizada por la ornitina descarboxilasa y la otra por la agmatinasa.

En hongos se ha descrito que las poliaminas se sintetizan mediante una única ruta de síntesis mediada por la ornitina descarboxilasa (Valdes-Santiago *et al.*, 2012b). En *N. crassa* al igual que en el resto de los hongos filamentosos se cree que las poliaminas se sintetizan únicamente por la ruta mediada por la ornitina descarboxilasa (Mc Dougall *et al.*, 1977). Sin embargo, si se realiza una búsqueda bioinformática se pueden encontrar genes que codifican hipotéticamente para agmatinasa en los diferentes hongos.

Este estudio reveló que la secuencia NCU 01348 que codifica hipotéticamente para la proteína agmatinasa en *N. crassa* es esencial para su supervivencia ya que la cepa mutante homocarión fue incapaz de crecer. Este resultado es de suma importancia debido a que se cree que en este organismo no existe dicha proteína (Mc Dougall *et al.*, 1977). Sin embargo, la secuencia peptídica NCU01348 de *N. crassa* tiene un porcentaje de identidad de 38% con la secuencia de la agmatinasa de *Escherichia coli*, la cual está bien caracterizada. Dicha proteína, es una enzima involucrada en la síntesis de poliaminas en bacterias y se caracteriza por producir putrescina y urea, utilizando como sustrato a la agmatina (Tabor y tabor, 1985).

La cepa mutante heterocarión de *N. crassa* que se generó fue caracterizada morfológicamente y presentó defectos en el crecimiento colonial, frecuencia de ramificación, morfología hifal, conidiogénesis, velocidad de crecimiento y producción de biomasa. Estos resultados concuerdan con lo observado en otros hongos como *Glomus mosseae* donde el crecimiento hifal se ve fuertemente reducido cuando se utiliza α -difluorometil ornitina (DFMO), el cual es un inhibidor irreversible y específico para ornitina descarboxilasa, lo que produce como consecuencia una disminución en la cantidad de poliaminas. Experimentos adicionales en *G. Mosseae* confirman que el fenotipo silvestre se recupera con la adición de putrescina exógena (El Ghachtouli *et al.*, 1996). Este mismo efecto se observó en *Ustilago maydis* en el cual se han realizado mutantes de otras enzimas participantes en la ruta de síntesis, como la S-adenosilmetionina descarboxilasa (Sad A) y espermidina sintasa (Spe). En estas mutantes se pudo apreciar una disminución en el crecimiento colonial, así como mayor sensibilidad a estrés iónico y al igual que en *G. mosseae* se recupera el fenotipo silvestre con la adición de espermidina exógena (Valdes-Santiago *et al.*, 2012a).

Al inhibir la síntesis de poliaminas se observan defectos en el crecimiento celular y dichos efectos son causados por la disminución en las concentraciones de poliaminas, las cuales necesitan estar a una determinada concentración para lograr el crecimiento adecuado de la célula. A pesar del fenotipo aberrante que presentan los hongos al tener una deficiencia de poliaminas por efecto de los inhibidores de la ornitina descarboxilasa, pueden continuar con su crecimiento aunque más lento. Es por esta razón, al crecer cepas auxótrofas a poliaminas en presencia de putrescina, se logra rescatar el crecimiento y recuperar el fenotipo silvestre, ya que las poliaminas no sólo se producen por el organismo, también pueden ser tomadas del medio gracias a transportadores en la membrana (Igarashi y Kashiwagi, 1999).

En este estudio se determinó la concentración de poliaminas en la cepa silvestre y en la cepa mutante heterocarión. No se encontraron grandes diferencias entre las concentraciones de poliaminas de ambas cepas. No obstante se logró distinguir una disminución en la concentración de putrescina y de espermidina aunque no se logró determinar la concentración de espermina para ninguna de las dos cepas. Estos resultados concuerdan con lo esperado ya que la cepa mutante heterocarión aun

mantiene cierta cantidad de la proteína hipotética agmatinasa, además de tener la ruta de síntesis mediada por la ornitina descarboxilasa intacta. Sin embargo, el fenotipo de la cepa mutante heterocarión es aberrante respecto al fenotipo de la cepa silvestre. Esto podría deberse no solo a la disminución en la concentración de poliaminas, sino también a otra posible función biológica de la proteína hipotética agmatinasa en *N. crassa* y que los efectos que se observan en la morfología y fisiología de este organismo se vean afectados por otro proceso que no sea solo la disminución en las concentraciones de poliaminas.

Además de la caracterización morfológica de la mutante heterocarión también se determinó la localización y dinámica de la agmatinasa en hifas de *N. crassa*. Los resultados obtenidos mostraron aparentemente una estrecha relación entre la agmatinasa y la F-actina. Este resultado fue sorprendente ya que pocos estudios han relacionado a la proteína agmatinasa con la actina. En *Mus musculus*, existe una proteína denominada “agmatinase like protein” la cual cuenta con actividad agmatinasa *in vitro*. Sin embargo, al ser comparada con agmatinasas verdaderas su secuencia tiene muy poca homología (Mella *et al.*, 2010). En dicho estudio, lo que resulta interesante de esta proteína es que contiene un dominio LIM, el cual es un dedo de zinc que le permite a la proteína interactuar con otras proteínas. Mediante análisis bioinformáticos se determinó que el dominio LIM de esta proteína pertenece a la familia de dominios LIM asociados a actina, por lo cual esta proteína podría unirse fácilmente a la actina (Uribe *et al.*, 2007).

A pesar de que la proteína hipotética agmatinasa de *N. crassa* no mostró ningún dominio LIM conocido dentro de su secuencia, sí se presentan ciertos dominios no identificados sobre todo en la parte amino terminal de la proteína. Además, las imágenes tomadas mediante microscopía confocal muestran que la fluorescencia de la agmatinasa sigue una dinámica muy similar a la población de F-actina reportada por Delgado-Álvarez *et al.* (2010). Este resultado junto el análisis bioinformático nos hace pensar en un posible intermediario entre la unión de la proteína hipotética agmatinasa con la F-actina, además de la importancia que pudiera tener en la polimerización de la actina.

Para tratar de elucidar si la agmatinasa tiene alguna relación con la población de F-actina, se realizaron observaciones en microscopía confocal de la proteína CDC-42, RAC y de la F-actina en la cepa mutante $\Delta ags-1$ heterocarión, ya que se sabe que en células de mamífero las proteínas Cdc-42 y Rac-1 se encargan de la señalización para la polimerización de la actina (Ridley *et al.*, 1992) para formar filopodios y lamelipodios que contribuyen a la migración celular (Nobes y Hall, 1995). Además, en hongos filamentosos como en *Aspergillus nidulans* se ha observado que estas proteínas son esenciales para lograr un eje de polarización estable para el crecimiento de las hifas (Virag *et al.*, 2007). En *N. crassa* se observó que CDC-42 y RAC se localizan en la región apical y sub-apical de la hifa, además de que contribuyen a mantener el crecimiento polarizado del organismo (Araujo-Palomares *et al.*, 2011) probablemente mediante la señalización para la formación de filamentos de actina. En este estudio, la localización de CDC-42 es distinta en la cepa mutante $\Delta ags-1$ heterocarión con respecto a la cepa silvestre. Aunque se sigue observando una localización con menor intensidad en la punta de la hifa, también se observa en estructuras membranosas en forma de anillos y en las regiones más distales se observa fluorescencia a manera de puntos. Dichas acumulaciones en forma de puntos no se observan en la cepa silvestre, y aunque la disminución de la fluorescencia podría deberse a que la deficiencia de agmatinasa afecta la localización de CDC-42, sorprendentemente esta misma deficiencia no afecta la localización de RAC, pero sí su dinámica. Sin embargo, cuando se observa la localización de la F-actina mediante el reportero LIFEACT::GFP en la cepa mutante, la fluorescencia cambia radicalmente respecto a la fluorescencia observada en la cepa silvestre. La fluorescencia de la LIFEACT::GFP en la cepa mutante heterocarión se deja de observar en la formación del septo, en el anillo sub-apical y disminuye mucho en el septo maduro. A pesar de esto, la cepa mutante sí presenta septos y la endocitosis no se ve afectada, ya que mediante la tinción con FM4-64 se logran observar septos maduros y la presencia del Spitzenkörper pero en la punta de la hifa se observa una mayor intensidad de fluorescencia que en la cepa silvestre. Estos resultados no son suficientes para decir que el déficit de putrescina y espermidina, o en su defecto la disminución de agmatinasa, afectan al citoesqueleto de actina, ya que aunque no se observe fluorescencia mediante el reportero LIFEACT donde debería de verse, sí se siguen observando las funciones para decir que el

citoesqueleto de actina continua en esas regiones (septo y anillo endocítico). Uno de los efectos que podrían estar sucediendo es que la disminución de la cantidad de agmatinasa en la capa mutante heterocarión, causa un aumento en las concentraciones de agmatina, la cual al tener las características de una poliamina puede unirse fácilmente a los filamentos de actina y ayudar en su polimerización, ya que se ha observado que las poliaminas (putrescina y principalmente espermidina) se unen a los filamentos de actina formando puentes de hidrógeno y enlaces electrostáticos los cuales ayudan a mantener la estabilidad y polimerización de los filamentos de actina (Oriol-Audit, 1978). También se ha observado que en leucocitos de ratones con diabetes mellitus, el tratamiento con agmatina modifica las concentraciones de actina; disminuyendo la población de la actina monomérica mientras la población de los filamentos de actina se incrementa (Brodyak *et al.*, 2014). La posibilidad de que en *N. crassa* la agmatina se una a los filamentos de actina y ayude a su polimerización es alta y a causa de esto podría suceder que por interferencia física bloquee la unión del reportero LIFEACT a los filamentos de actina. Por lo anterior es necesario utilizar otro reportero de actina para aclarar mejor esta incertidumbre y saber cuál es el mecanismo por el cual la deficiencia de la posible agmatinasa afecta la morfofisiología de *N. crassa*. Los resultados que se reportan en este trabajo, dejan muchas preguntas sin responder. Sin embargo, sientan las bases para continuar con estudios sobre esta proteína, debido a que no se cuenta con una caracterización enzimática para asegurar su función de agmatinasa. Por otro lado, la localización de la AGS-1::GFP causa sorpresa y adicionalmente queda por elucidar si la agmatinasa hipotética tiene otra función en *N. crassa*.

Capítulo 7. Conclusiones

- La delección de la secuencia nucleotídica NCU 01348, la cual codifica para la proteína hipotética agmatinasa es esencial para el crecimiento y desarrollo de *N. crassa*.
- La cepa mutante $\Delta ags-1$ heterocarión presenta defectos en la morfofisiología de *N. crassa*.
- En la cepa mutante $\Delta ags-1$ heterocarión se ve afectada la localización y dinámica de la proteína RHO GTPasa CDC-42 mientras que la localización de la proteína RAC no se afecta pero sí su dinámica.
- En la cepa mutante $\Delta ags-1$ heterocarión la localización y dinámica del reportero LIFEACT::GFP no muestra la misma dinámica que en la cepa silvestre.

Lista de referencias bibliográficas

- Agostinelli, E., Marques, M. P. M., Calheiros, R., Gil, F. P. S. C., Tempera, G., Viceconte, N and Toninello, a. (2010). Polyamines: fundamental characters in chemistry and biology. *Amino Acids*, 38(2), 393–403. <http://doi.org/10.1007/s00726-009-0396-7>
- Algranati, I. D., Serra, M. P. y González, C. C. N. S. (2006). Biología molecular del metabolismo de poliaminas en parásitos tripanosomátidos. Expresión de genes heterólogos de ornitina y arginina descarboxilasa en *Tripanosoma cruzi*. *Revista Química viva*, 5(2) 78–94.
- Araujo-Palomares, C. L., Richthammer, C., Seiler, S., and 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
- Beadle, G. W. and Tatum, E. L. (1941). Genetic control of biochemical reactions in *Neurospora*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 27 (11) 499-506.
- Boguslavsky, S., Chiu, T., Foley, K. P., Osorio-Fuentealba, C., Antonescu, C. N., Bayer, K. U. and Klip, A. (2012). Myo1c binding to submembrane actin mediates insulin-induced tethering of GLUT4 vesicles. *Molecular Biology of the Cell*, 23(20), 4065–78. doi:10.1091/mbc.E12-04-0263
- Borkovich, K. A., Alex, L. A., Yarden, O., Turner, G. E., Read, N. D., Seiler, S., and Freitag, M. (2004). Lessons from the Genome Sequence of *Neurospora crassa*: Tracing the Path from Genomic Blueprint to Multicellular Organism Lessons from the Genome Sequence of *Neurospora crassa*: Tracing the Path from Genomic Blueprint to Multicellular Organism. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 68 (1), 1-108. doi:10.1128/MMBR.68.1.1
- Bourne, H. R., Sanders, D. A., and McCormick, F. (1990). The GTPase superfamily: a conserved switch for diverse cell functions. *Nature*, 348 (8), 125-132.
- Brodyak, I. V, Bila, I. I., Overchuk, M., and Sybirna, N. O. (2014). Effect of agmatine on actin polymerization in leukocytes of streptozotocin-induced diabetic rats, *Studia biologica* 8 (3-4) 17–30.
- Castro-Longoria, E., Ferry, M., Bartnicki-Garcia, S., Hasty, J., and Brody, S. (2010). Circadian rhythms in *Neurospora crassa*: dynamics of the clock component frequency visualized using a fluorescent reporter. *Fungal Genetics and Biology* : FG and B, 47(4), 332–41. doi:10.1016/j.fgb.2009.12.013
- Cheng, Y., Ma, W., Li, X., Miao, W., Zheng, L., and Cheng, B. (2012). Polyamines stimulate hyphal branching and infection in the early stage of *Glomus etunicatum* colonization. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28(4), 1615–1621. Doi:10.1007/s11274-011-0967-0

- Deacon, J.W. (1990). *Introducción a la Micología Moderna*. LIMUSA. México, D. F. 350p.
- Delgado-Álvarez, D. L., Callejas-Negrete, O. a., Gómez, N., Freitag, M., Roberson, R. W., Smith, L. G., and Mouriño-Pérez, R. R. (2010). Visualization of F-actin localization and dynamics with live cell markers in *Neurospora crassa*. *Fungal Genetics and Biology*, 47(7), 573–586. <http://doi.org/10.1016/j.fgb.2010.03.004>
- Domnina, L. V., Gelfand, V. I., Ivanova, O. Y., Leonova, E. V., Pletjushkina, O. Y., Vasiliev, J. M., and 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.
- El Ghachtouli, N., Paynot, M., Martin-Tanguy, J., Morandi, D., and Gianinazzi, S. (1996). Effect of polyamines and polyamine biosynthesis inhibitors on spore germination and hyphal growth of *Glomus mosseae*. *Mycological Research*, 100(5), 597–600. [http://doi.org/10.1016/S0953-7562\(96\)80014-1](http://doi.org/10.1016/S0953-7562(96)80014-1)
- Fischer, R., Zekert, N., and Takeshita, N. (2008). Polarized growth in fungi--interplay between the cytoskeleton, positional markers and membrane domains. *Molecular Microbiology*, 68(4), 813–26. doi:10.1111/j.1365-2958.2008.06193.x
- Galagan, J. E., Calvo, S. E., Borkovich, K. a, Selker, E. U., Read, N. D., Jaffe, D., and Birren, B. (2003). The genome sequence of the filamentous fungus *Neurospora crassa*. *Nature*, 422(6934), 859–68. doi:10.1038/nature01554
- Hall, A., and Lalli, G. (2010). Rho and Ras GTPases in Axon Growth, Guidance, and Branching. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2 (2) 1–18.
- Igarashi, K., and Kashiwagi, K. (1999). Polyamine transport in bacteria and yeast. *The Biochemical Journal*, 344, 633–642.
- Igarashi, K., and Kashiwagi, K. (2010). Modulation of cellular function by polyamines. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 42(1), 39–51. <http://doi.org/10.1016/j.biocel.2009.07.009>
- Igarashi, K., and Morris, D. R. (1984). Physiological effects in bovine lymphocytes of inhibiting polyamine synthesis with ethylglyoxal bis(guanylhydrazone). *Cancer Research*, 44(11), 5332–5337.
- Jaffe, A. B., and Hall, A. (2005). Rho GTPases: biochemistry and biology. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 21, 247–69. doi:10.1146/annurev.cellbio.21.020604.150721
- Kusano, T., Berberich, T., Tateda, C., and Takahashi, Y. (2008). Polyamines: essential factors for growth and survival. *Planta*, 228(3), 367–381. <http://doi.org/10.1007/s00425-008-0772-7>

- Mahlert, M., Leveleki, L., Hlubek, A., Sandrock, B., and Bölker, M. (2006). Rac1 and CDC-42 regulate hyphal growth and cytokinesis in the dimorphic fungus *Ustilago maydis*. *Molecular Microbiology*, 59(2), 567–78. doi:10.1111/j.1365-2958.2005.04952.x
- Matthews, H. R. (1993). Polyamines, chromatin structure and transcription. *BioEssays*, 15 (8), 561-566.
- McCormack, S. a, Ray, R. M., Blanner, P. M., and Johnson, L. R. (1999). Polyamine depletion alters the relationship of F-actin, G-actin, and thymosin beta4 in migrating IEC-6 cells. *The American Journal of Physiology*, 276(2 Pt 1), C459–C468.
- McDougall, K. J., Deters, J., and Miskimen, J. (1977). Isolation of putrescine-requiring mutants of *Neurospora crassa*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 43(2), 143–151.
- Mechulam, A., Chernov, K. G., Mucher, E., Hamon, L., Curmi, P. a., and Pastré, D. (2009). Polyamine sharing between tubulin dimers favours microtubule nucleation and elongation via facilitated diffusion. *PLoS Computational Biology*, 5(1), e1000255. doi:10.1371/journal.pcbi.1000255.
- Mella, C., Martínez, F., De Los Ángeles García, M., Nualart, F., Castro, V., Bustos, P.,... Uribe, E. (2010). Expression and localization of an agmatinase-like protein in the rat brain. *Histochemistry and Cell Biology*, 134(2), 137–144. <http://doi.org/10.1007/s00418-010-0720-z>
- Nobes, C. D., and Hall, a. (1995). Rho, rac, and CDC-42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. *Cell*, 81(1), 53–62.
- Oriol-audit, C. (1978). Polyamine -Induced Actin Polymerization. *European Journal of Biochemistry*, 87(2), 371-376.
- Ridley, a J., and Hall, a. (1992). The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. *Cell*, 70(3), 389–99.
- Riquelme, M., Yarden, O., Bartnicki-Garcia, S., Bowman, B., Castro-Longoria, E., Free, S. J., ...Watters, M. K. (2011). Architecture and development of the *N. crassa* hypha -- a model cell for polarized growth. *Fungal Biology*, 115(6), 446–74. doi:10.1016/j.funbio.2011.02.008
- Sowa, G. Z., Cannell, D. S., Liu, A. J., and Reisler, E. (2006). Polyamine-induced bundling of F-actin. *The Journal of Physical Chemistry's*, 110(44), 22279–22284.
- Staben, C., Jensen, B., Singer, M., Pollock, J., Schechtman, M., Kinsey, J., and Selker, E. (1989). Use of a bacterial Hygromycin B resistance gene as a dominant selectable marker in *N. crassa* transformation. *Fungal Genetics Newsl.* 36:79-81.

- Tabor, C. W., and Tabor, H. (1985). Polyamines in Microorganisms. *Microbiological Reviews*, 49(1), 81-99. Doi: 0146-0749/85/010081-19
- Torralba, S., Raudaskoski, M., Pedregosa, A. M., and Laborda, F. (1998). Effect of cytochalasin A on apical growth, actin cytoskeleton organization and enzyme secretion in *Aspergillus nidulans*. *Microbiology*, 144, 45–53.
- Uribe E., Salas M, Enriquez S., Orellana MS, Carvajal N. (2007) Cloning and functional expression of a rodent brain cDNA encoding a novel protein with agmatinase activity, but not belonging to the arginase family. *Arch. Biochem. Biophys.* 461:146-150
- Uribe, E., Salas, M., Enríquez, S., Orellana, M. S., and Carvajal, N. (2007). Cloning and functional expression of a rodent brain cDNA encoding a novel protein with agmatinase activity, but not belonging to the arginase family. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 461(1), 146–150. <http://doi.org/10.1016/j.abb.2007.01.002>
- Vaidya, R. J., Ray, R. M., and Johnson, L. R. (2005). MEK1 restores migration of polyamine-depleted cells by retention and activation of Rac1 in the cytoplasm. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, 288(2), C350–C359. doi:10.1152/ajpcell.00290.2004
- Valdes-Santiago, L., Cervantes-Chavez, J. A, Winkler, R., Leon-Ramirez, C. G., and Ruiz-Herrera, J. (2012a). Phenotypic comparison of samdc and spe mutants reveals complex relationships of polyamine metabolism in *Ustilago maydis*. *Microbiology*, 158(Pt_3), 674–684. <http://doi.org/10.1099/mic.0.055954-0>
- Valdés-Santiago, L., Cervantes-Chávez, J. A, Winkler, R., León-Ramírez, C. G., and Ruiz-Herrera, J. (2012b). Polyamine metabolism in fungi with emphasis on phytopathogenic species. *Journal of Amino Acids*, 2012, 837932. <http://doi.org/10.1155/2012/837932>.
- Virag, A., Lee, M. P., Si, H., and Harris, S. D. (2007). Regulation of hyphal morphogenesis by CDC-42 and rac1 homologues in *Aspergillus nidulans*. *Molecular Microbiology*, 66(6), 1579–96. doi:10.1111/j.1365-2958.2007.06021.x
- Wallace, H. M., Fraser, A. V, and Hughes, A. (2003). A perspective of polyamine metabolism. *Biochemical Journal*, 376, 1-14.
- Wegner, a, and 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), 4922–5.

Yu, J. H., Hamari, Z., Han, K. H., Seo, J. A., Reyes-Domínguez, Y., and Scazzocchio, C. (2004). Double-joint PCR: A PCR-based molecular tool for gene manipulations in filamentous fungi. *Fungal Genetics and Biology*, 41(11), 973–981. doi:10.1016/j.fgb.2004.08.001.

Anexos

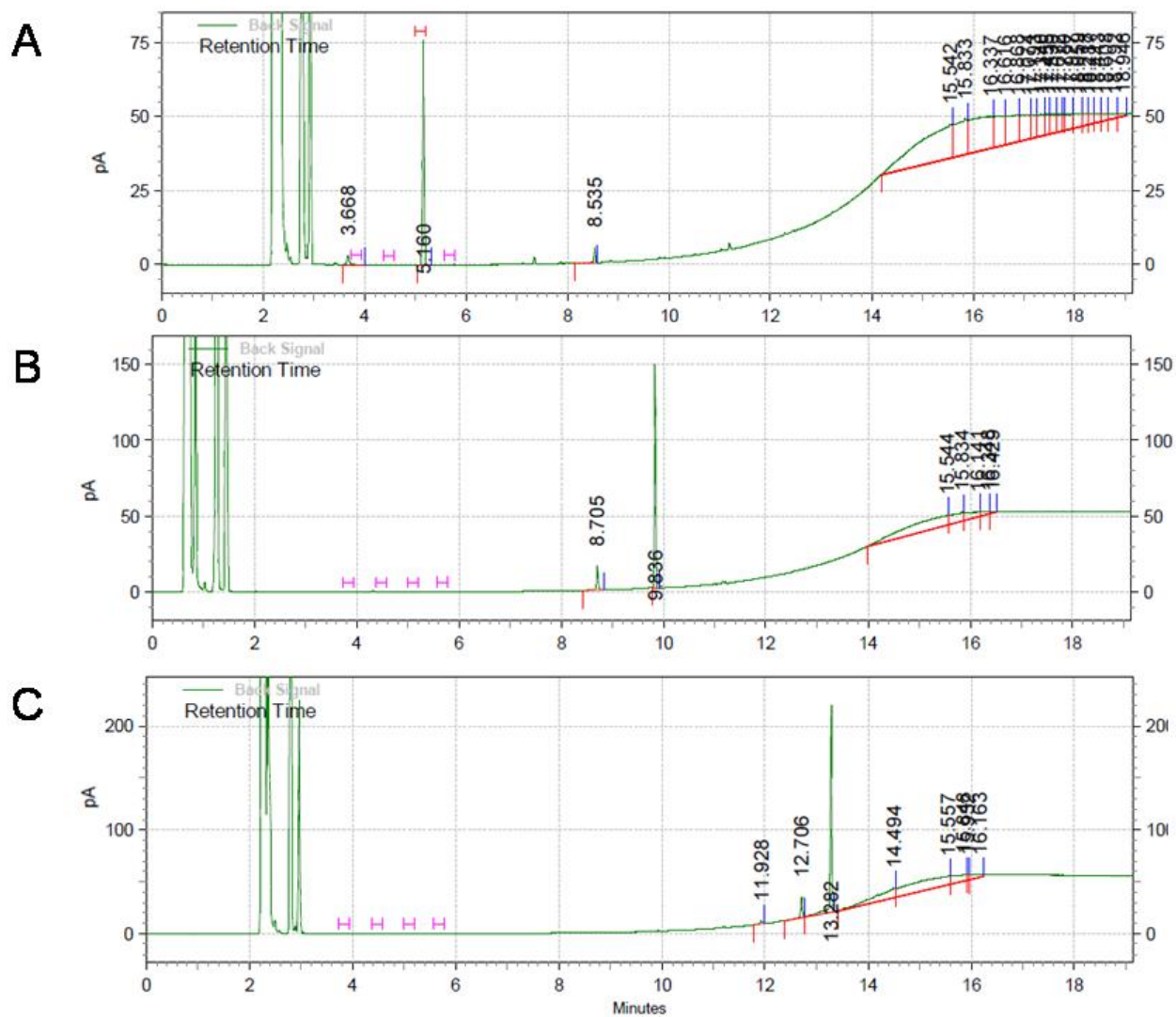


Figura A1. Cromatogramas de los estándares de poliaminas. A) putrescina con un tiempo de retención de 5.1 min, B) espermidina con un tiempo de retención de 9.8 min y C) espermina con un tiempo de retención de 13.2 min.

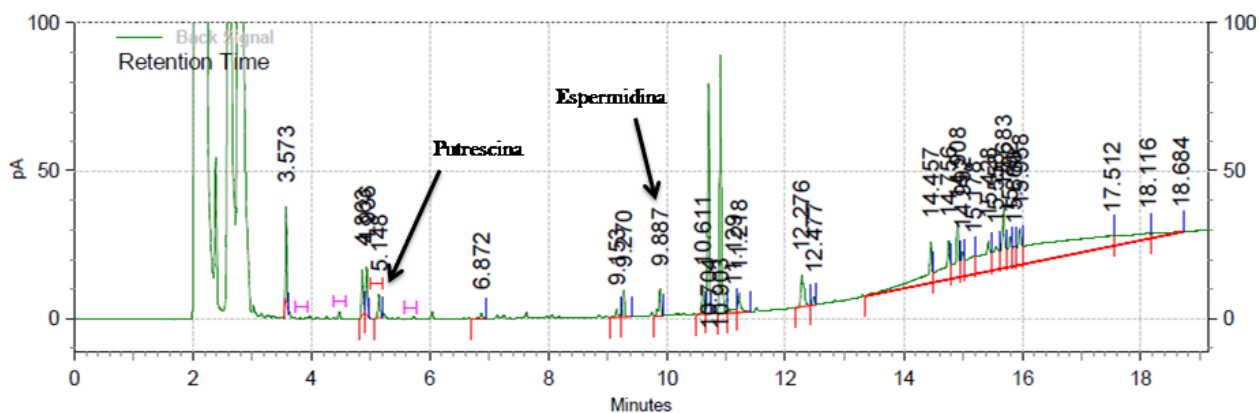


Figura A2. Cromatograma de poliaminas extraídas de la cepa silvestre. En el cromatograma se logran observar los picos correspondientes a la putrescina y a la espermidina. Sin embargo, se muestra la ausencia del pico de espermina a los 13 min.

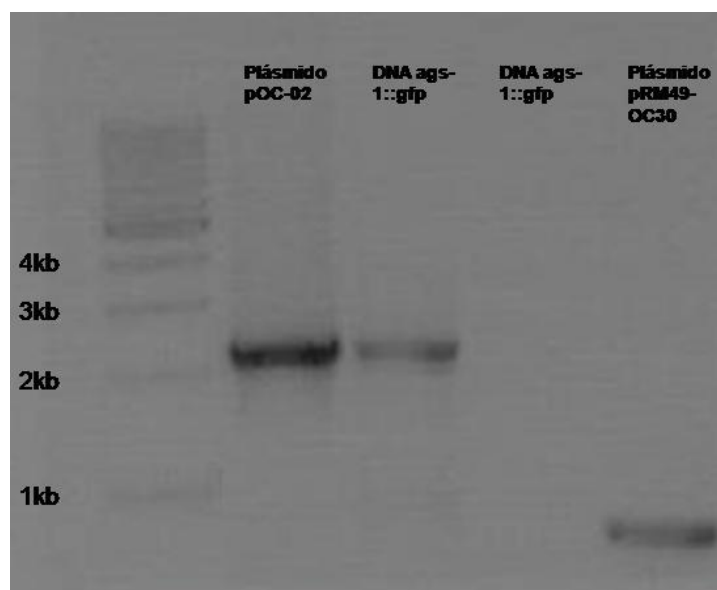


Figura A3. Electroforesis de los PCRs de comprobación para las cepas *ags-1::gfp* y *lifeact::gfp*. El primer carril corresponde al marcador de peso molecular, el segundo carril al control positivo para la amplificación de agmatinasa, el tercer carril corresponde al PCR realizado con los oligonucleótidos agmatinasa forward (AF) y GFP reverse (GR) con DNA de la cepa *ags-1::gfp*, el cuarto carril corresponde al PCR realizado con los oligonucleótidos lifeact forward (LF) y GPF reverse (GR) con DNA de la cepa *ags-1::gfp* en el ultimo carril se utilizo el plásmido pRM49-OC30 como control positivo para la amplificación del fragmento *lifeact::gfp*.

Tabla A1. Oligonucleótidos utilizados en la comprobación de las cepas *ags-1:gfp* y *lifeact::gfp*

Nombre	Secuencia
Agmatinasa forward (AF)	5'GGACTAGTATATTGCGCCCAA 3'
Life Act forward (LF)	5'ATGGGTGTCGCAGATTT 3'
GFP reverse (GR)	5'TTACTTGTACAGCTCGTCCAT 3'

Tabla A2. Crecimiento promedio de la cepa silvestre (WT) y de la cepa mutante ($\Delta ags-1$ het). Se muestra el crecimiento promedio a diferentes horas de medición, además se muestra también la velocidad de crecimiento en cm/hora.

Cepa	Hora de medición	Crecimiento radial promedio (cm)	Velocidad promedio de crecimiento (cm/h)
WT	16	1.27±0.07	0.31
	20	2.16±0.09	
	24	3.35±0.08	
	28	4.47±0.14	
	32	5.83±0.10	
	36	7.22±0.26	
	40	8.55±0.04	
	44	10.05±0.08	
	48	11.15±0.04	
$\Delta ags-1$ het	16	0.50±0.02	0.21
	20	1.02±0.07	
	24	1.90±0.06	
	28	2.69±0.08	
	32	3.72±0.04	
	36	4.54±0.09	
	40	5.27±0.11	
	44	6.39±0.03	
	48	7.39±0.07	