



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS  
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO  
NACIONAL**

UNIDAD ZACATENCO  
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

**“Cristalización de la Ornitina descarboxilasa de *Saccharomyces  
cerevisiae*”**

TESIS

Que presenta

**Q.F.B. JESSICA GEORGINA FILISOLA VILLASEÑOR**

Para obtener el grado de

**MAESTRA EN CIENCIAS**

En la Especialidad de

**BIOQUÍMICA**

Directores de la Tesis:

Dr. Edgar Morales Ríos

Dra. María Viridiana Olin Sandoval

La presente tesis se desarrolló en el laboratorio No. 2 “Estudios estructurales de motores moleculares” del Departamento de Bioquímica del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional. Con el financiamiento de una beca académica asignada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) con el No. de registro 614067; con el subsidio de la Secretaría de Educación Pública (SEP) y del Instituto de las Bebidas para el Bienestar y la Salud AC. La cepa W303 $\alpha$  de *Saccharomyces cerevisiae* empleada en este trabajo fue donada por el Dr. Samuel Zinker Ruzal. Se agradece al Dr. Jaime Ortega López, investigador del Departamento de Biotecnología, por haber realizado la donación de un FPLC a nuestro laboratorio sin el cual no habría sido posible la realización de este proyecto. A la Dra. Adela Rodríguez Romero, responsable del Laboratorio de Estructura de Proteínas del Laboratorio Nacional de Estructura de Biomacromoléculas (LANEM) por las facilidades en el uso del difractómetro de laboratorio. Al Dr. Alfredo Torres Larios por el apoyo para el análisis de los cristales en el sincrotrón del Laboratorio Nacional de Argonne, Chicago, IL. Por último, y no menos importante, le agradecemos a la IBT. Lorena Ramírez Reyes y a la Dra. Dulce María Delgadillo Álvarez de la Unidad de Genómica, Proteómica y Metabólica (UGPM) del Laboratorio Nacional de Servicios Experimentales (LANSE) por las facilidades otorgadas en el uso del espectrómetro de masas y termociclador durante el desarrollo de este proyecto.

## AGRADECIMIENTOS

**A mi mamá,** porque sin ti no hubiera llegado hasta donde he llegado, por el apoyo que me has dado a lo largo de mi vida. Por estar conmigo e impulsarme a seguir mis metas y sueños, gracias porque de no ser por ti no estaría aquí. Porque a pesar de nuestras diferencias siempre vas a tener un lugar especial en mi corazón. Por todo esto y mucho más, te amo y gracias por ser la mejor madre que pudiste ser para mí.

**A mi esposo y mejor amigo,** Samuel, por el gran apoyo incondicional en cada paso que he dado, por tu paciencia, comprensión y estos casi dos años juntos. Por alentarme a seguir adelante aun en las adversidades. Gracias por estar siempre conmigo, por las largas tardes y noches de espera, en las que a pesar de tu cansancio estabas esperándome.

**A mis hermanos,** Daniel, Tania y Nathalie, porque, aunque sé que no he sido la mejor hermana del mundo los quiero muchísimo. Sepan que siempre podrán contar conmigo incondicionalmente, solo me resta agradecerles la paciencia que me han tenido, por estar conmigo a pesar de todo y soportar que estuviera trabajando en las reuniones familiares.

**A mis tías y tíos,** Guille, Jaqueline, Laura, Martín, Pablo, Pepe y Ely, porque todos ustedes han contribuido de inexplicables maneras en mi vida, ya que gracias a ustedes he alcanzado una meta más. Gracias por sus consejos, cariño y buen humor, por el gran apoyo que me han brindado y porque sin el ejemplo de cada uno de ustedes no sería lo que soy hoy. Los amo y siempre serán muy especiales para mí.

**A mi tía Gis,** gracias por abrirme las puertas de tu corazón y hacerme sentir siempre como alguien muy especial, porque fuiste como una segunda madre y aunque sé que ya no estás en este mundo, siempre te agradeceré todo el esfuerzo y cariño que siempre me diste, te amo tía y muchas gracias por todo.

**A mi abuelita Elvia,** eres la mejor abuelita que alguien podría tener, mis hermanos, mis primos y yo hemos tenido la gran fortuna de que seas nuestra abue. Espero que estés a

mi lado muchísimos años más. Estaré agradecida contigo toda la vida, por todo lo siempre me has dado, te adoro abue y muchas gracias por todo.

**A mi abuelito Memito**, me hubiera encantado que estuvieras aquí, porque fuiste el mejor abuelito que pudimos tener. Extraño esas grandes historias que en cada reunión nos contabas las cuales siempre tenían una enseñanza para la vida y que en estos momentos me hacen mucha falta, te amo hoy y siempre.

**A todos mis primos**, Gaby, Carlos, Karina, Cesar, Miriam, Dianela, Alba, Iván, Bere y Aixa a todos ustedes gracias por estar siempre conmigo, en las buenas y en las malas, porque a pesar de que la diferencia de edades con algunos de ustedes es muy grande me han ayudado mucho a crecer como persona y me han apoyado.

**A mis suegritos y cuñado**, por el apoyo y comprensión que siempre me han brindado, aunque el inicio tal vez no fue sencillo, el paso del tiempo nos ha dado la oportunidad de conocernos y me ha llevado a aprender mucho de ustedes, les agradezco mucho el que estén para nosotros y estoy muy agradecida de que ahora sean parte de mi vida y mi familia.

**A mis amigos**, Julio, Marisol, Thalía, René, Karla y Nataly, porque desde que los conocí siempre han estado conmigo, y me han brindado su gran amistad, consejos, comprensión y cariño. Por los grandes momentos, buenos y no tan buenos, que hemos pasado juntos me atrevería a decir que son más que solo mis amigos, son mis hermanos. Los amo gracias por todo.

**A cada uno de mis compañeros**, en el laboratorio, Saúl, Dan y Rosalba (miembro honorario), y del departamento de Bioquímica quienes me han apoyado y enseñado tantas cosas, y de quienes me reservo los nombres por temor a la falta de alguno de ellos, por los ratos alegres, el apoyo moral y además de quiénes me llevo gran parte de sus consejos, sus experiencias, su ejemplo, a cada uno de ustedes simplemente gracias.

**A la Dra. Angélica Rueda y al Dr. Víctor Calderón**, a quienes les agradezco sus comentarios, consejos y críticas a mi trabajo, lo que me permitió mejorar el presente documento y mi formación como profesional.

**Al Dr. Edgar Morales y la Dra. Viridiana Olin**, a quienes agradezco enormemente su guía y exigencia, por haberme ayudado a adquirir mayor conocimiento y a exigirme más día con día, por creer que yo puedo hacer grandes cosas, muchas gracias por su apoyo incondicional para la elaboración del presente trabajo, porque ustedes son un gran ejemplo para mí, en lo profesional y personal, muchas gracias por todo. Gracias también al pequeño por siempre estar atento en mis exposiciones, por su apoyo desde el inicio en este proyecto.

**A todos mis profesores**, de toda la vida, que me han ayudado y en especial al profesor Ricardo, quien nos ha dejado en el camino. Por haberme enseñado todo lo que eh podido aprender, por la dedicación y esfuerzo de cada uno de ustedes, discúlpenme por no ser mejor alumna, porque sé que no soy una persona fácil y ahora entiendo lo mucho que les dificulte la tarea de enseñarme, muchas gracias.

# ÍNDICE

<b>ABREVIATURAS</b>	VIII
ÍNDICE DE TABLAS	X
ÍNDICE DE FIGURAS	XI
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
1. INTRODUCCIÓN	3
1.1 Poliaminas	3
1.1.1 Generalidades	3
1.1.2 Metabolismo	6
1.1.2.1 Regulación del metabolismo de PAs	9
1.1.2.1.1 Regulación de la ODC	13
1.1.2.1.2 Regulación de la AdoMetDC	14
1.2 Ornitina descarboxilasa	16
1.2.1 Generalidades	16
1.2.2 Inhibidores de la ODC	18
1.2.2.1 D, L- $\alpha$ -Difluorometil ornitina	18
1.2.2.2 1-Amino-oxi-3-aminopropano	21
2. ANTECEDENTES	23
3. JUSTIFICACIÓN	32
4. HIPÓTESIS	32
5. OBJETIVOS	32
5.1 Objetivo general	32
5.2 Objetivos particulares	32
6. MATERIAL Y MÉTODOS	33
6.1 Método químico para generar células competentes	33
6.2 Transformación de células competentes por choque térmico.	34
6.3 Extracción de ADN genómico de levadura	34
6.4 Electroforesis en gel de agarosa	35
6.5 Extracción de ADN plasmídico por lisis alcalina	36
6.6 Amplificación de ADN por PCR	36

6.7	Ensamble <i>in vivo</i>	40
6.8	Perfiles de expresión	41
6.9	Electroforesis en gel de acrilamida	42
6.10	Sobreexpresión y purificación de la Spe1p	43
6.11	Purificación de la proteína TEV	45
6.12	Cristalización	46
6.12.1	Preparación del licor madre	48
6.12.2	Microbatch	49
6.13	Medición de la actividad de Spe1p por espectrometría de masas	50
6.14	Medición de la actividad de Spe1p por espectrofotómetro	51
7.0	RESULTADOS	53
7.1	Extracción de ADN	53
7.2	Clonación por ensamble <i>in vivo</i>	53
7.3	Perfiles de expresión de la proteína Spe1p	56
7.4	Purificación de la proteína Spe1p	57
7.5	Cristalización de la Spe1p por microbatch	62
7.6	Determinación de la actividad de Spe1p	63
7.6.1	Cuantificación de Cadaverina y Putrescina por espectrometría de masas	63
7.6.2	Cuantificación de CO <sub>2</sub> por espectrofotometría	73
8.0	DISCUSIÓN	75
9.0	CONCLUSIONES	81
10.0	PERSPECTIVAS	81
11.0	REFERENCIAS	82

## ABREVIATURAS

1,3-DAP	1,3-diaminopropano
ADC	Arginina descarboxilasa
AdoMet	S-adenosilmetionina
AdoMetDC	S-adenosilmetionina descarboxilasa
AdoMetS	S-adenosilmetionina sintasa
AIH	Agmatina iminohidrolasa
APA	1-Amino-oxi-3-aminopropano
APAO	Poliamina oxidasa acetilada
AZ	Antizima
Cad	Cadaverina
CI50	Concentración inhibitoria 50
CMV	Citomegalovirus
CPA	N-carbamoil putrescina aminohidrolasa
DAO	Diamino oxidasa
dcAdoMet	S-adenosilmetionina descarboxilada
DE50	Dosis efectiva 50
DFMO	D, L- $\alpha$ -Difluorometilornitina
DTT	Ditiotreitol
FDA	Del inglés, Food and drug administration
FPLC	Del inglés, fast protein liquid chromatography
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrógeno
IPTG	Isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido
<i>K<sub>d</sub></i>	Constante de disociación aparente
<i>K<sub>i</sub></i>	Constante de inhibición
LC-MS/MS	Cromatografía de líquidos en tándem con espectrometría de masas
LDC	Lisina descarboxilasa
MTA	5-metiltioadenosina
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Anión superóxido
ODC	Ornitina descarboxilasa

OH <sup>-</sup> ●	Radical hidroxilo
Orn	Ornitina
PA	Poliamina
PAO	Poliamina oxidasa
PLP	Piridoxal 5'-fosfato
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
PSA	Persulfato de amonio
Put	Putrescina
RNOS	Especies reactivas de nitrógeno
ROO●	Radicales peroxilo
ROS	Especies reactivas de oxígeno
Spd	Espermidina
SpdS	Espermidina sintasa
Spe1p	Ornitina descarboxilasa de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Spm	Espermina
SpmO	Espermina oxidasa
SpmS	Espermina sintasa
SSAT	Espermidina/espermina acetil transferasa

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Estructuras cristalográficas de ODC en diferentes organismos con diferentes ligandos.	26
Tabla 2. Oligonucleótidos utilizados para llevar a cabo la amplificación del gen de Spe1p y el vector pRSET.	39
Tabla 3. Condiciones utilizadas para la amplificación del inserto y del vector.	39
Tabla 4. Condiciones de tiempo y temperatura para la incubación de las bacterias en los perfiles de expresión.	42
Tabla 5. Soluciones para realizar geles de acrilamida.	43
Tabla 6. Placas de licor madre, componentes y rango de concentraciones.	49

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura química de las PAs más abundantes en la naturaleza. ....	3
Figura 2. Metabolismo de PAs en diferentes organismos. ....	8
Figura 3. Regulación de PAs en células de mamíferos. ....	10
Figura 4. Monómero de ODC de humano en complejo con AZ. ....	14
Figura 5. ODC de humano. ....	16
Figura 6. Mecanismo propuesto para la inactivación de la ODC de ratón por DFMO. ....	19
Figura 7. Determinación de la enzima responsable de sintetizar Cad en <i>S. cerevisiae</i> . ....	25
Figura 8. Mapas de densidad de electrones de la ODC de <i>Vibrio vulnificus</i> . ....	28
Figura 9. Estructura terciaria de la ODC humana con PLP, APA y Cad. ....	28
Figura 10. Alineación múltiple de las secuencias de ODC en la región del sitio activo reportado para <i>V. vulnificus</i> . ....	29
Figura 11. Alineación múltiple de las secuencias de ODC en la región del sitio activo reportado para Humano. ....	30
Figura 12. Alineación múltiple de las secuencias de ODC en el sitio de interacción con Cad reportado para Humano. ....	31
Figura 13. Mapa del plásmido pRSET con el gen de Spe1p (pScODC). ....	38
Figura 14. Ensamble in vivo. ....	41
Figura 15. Diagrama de fases de cristalización de una macromolécula. ....	47
Figura 16. Placas de 60 pozos. ....	50
Figura 17. Productos de PCR del vector pRSET. ....	54
Figura 18. Producto de PCR del inserto correspondiente al gen de Spe1p. ....	55
Figura 19. Producto de PCR del inserto correspondiente al gen de Spe1p. ....	56
Figura 20. Perfiles de expresión de la Spe1p recombinante. ....	57
Figura 21. Cromatograma del proceso de purificación por cromatografía de afinidad de la proteína recombinante Spe1p. ....	58
Figura 22. Purificación de la Spe1p recombinante por cromatografía de afinidad. ....	59
Figura 23. Digestión de la proteína Spe1p empleando la enzima TEV. ....	60
Figura 24. Cromatograma del proceso de purificación por cromatografía de exclusión molecular de la proteína recombinante Spe1p. ....	61
Figura 25. Purificación de la Spe1p recombinante por cromatografía de exclusión molecular. ....	61
Figura 26. Cristales de Spe1p obtenidos por el método de microbatch a diferentes condiciones de cristalización. ....	62
Figura 27. Espectro de masas de la Cad a una concentración de 25 $\mu$ M. ....	64
Figura 28. Espectro de masas de Put a una concentración de 25 $\mu$ M. ....	65
Figura 29. Espectro de masas de la fragmentación de Cad a una concentración de 25 $\mu$ M. ....	67
Figura 30. Espectro de masas de la fragmentación de Put a una concentración de 25 $\mu$ M. ....	68
Figura 31. Espectros de masas de la Cad a diferentes concentraciones. ....	70
Figura 32. Espectros de masas de Put a diferentes concentraciones. ....	71
Figura 33. Superposición de los espectros de masas obtenidos en modo positivo con diferentes concentraciones de solución amortiguadora HEPES. ....	73

Figura 34. Cinética de formación de CO<sub>2</sub> de la enzima Spe1p. .... 74

## RESUMEN

Las poliaminas son policationes alifáticos ubicuos y están involucradas en diversos procesos celulares como transcripción, traducción, respuesta a estrés, crecimiento, etc. La síntesis de poliaminas inicia con la descarboxilación de la ornitina por la Ornitina descarboxilasa formando putrescina, seguida de la adición de grupos aminopropilo para formar espermidina y espermina por la espermidina y espermina sintasas, respectivamente.

Un mecanismo de respuesta al estrés oxidante en *Saccharomyces cerevisiae* involucra la exportación de espermidina y espermina por el transportador *TPO1*. En ausencia de este exportador, tres enzimas de la vía de síntesis de lisina aumentan su expresión en respuesta al estrés oxidante. Esto sugiere que existe una relación entre el metabolismo de lisina y el de las poliaminas. En bacterias, cianobacterias y algunas plantas, la lisina se descarboxila a cadaverina en una reacción catalizada por la enzima lisina descarboxilasa. Sin embargo, a pesar de que se ha detectado la presencia de cadaverina en hongos y animales, éstos carecen de un gen *ldc*. Recientemente, se identificó que en *S. cerevisiae*, la Ornitina descarboxilasa lleva a cabo esta reacción de descarboxilación de la lisina. Sin embargo, hasta el momento no se ha descrito un mecanismo atómico de la actividad dual de esta enzima. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue determinar las condiciones de cristalización de la Ornitina descarboxilasa de *Saccharomyces cerevisiae*.

Para esto, el gen *SPE1* se amplificó a partir del ADN genómico de *S. cerevisiae*, se clonó por ensamble *in vivo*, se sobre-expresó en *E. coli* y se purificó la proteína. Posteriormente, se llevó a cabo la inducción y optimización de cristales. Se lograron obtener cristales con baja calidad de difracción, por lo que seguimos optimizando las condiciones de cristalización para conseguir un patrón de difracción que permita obtener la estructura atómica en un futuro.

Por otro lado, se buscó medir la actividad de esta enzima utilizando diversos métodos tales como la determinación de putrescina y cadaverina por espectrometría de masas; o bien mediante la determinación del CO<sub>2</sub> producido por la enzima. Sin embargo, no fue posible medir la actividad de la Ornitina descarboxilasa utilizando estos métodos. Por lo tanto, se establecerá un protocolo para determinar la actividad de la Ornitina descarboxilasa mediante la determinación de putrescina y cadaverina derivatizadas con cloruro de dansilo por HPLC acoplado a fluorescencia.

## ABSTRACT

Polyamines are ubiquitous aliphatic polycations that are involved in various cellular processes such as transcription, translation, stress response, growth, etc. The synthesis of polyamines starts with the decarboxylation of ornithine by Ornithine decarboxylase forming putrescine, followed by the addition of aminopropyl groups to form spermidine and spermine by spermidine and spermine synthases, respectively.

A mechanism of response to oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae* involves the export of spermidine and spermine by the *TPO1* transporter. In the absence of this exporter, three enzymes of the lysine biosynthesis pathway increase their expression in response to oxidative stress. This suggests that there is a relationship between the metabolism of lysine and polyamines. In bacteria, cyanobacteria and some plants, lysine is decarboxylated to cadaverine in a reaction catalyzed by the enzyme lysine decarboxylase. However, despite the presence of cadaverine in fungi and animals, they lack a *ldc* gene. Recently, it was identified that in *S. cerevisiae*, Ornithine decarboxylase catalyzes the decarboxylation of lysine. However, at the moment there is no atomic mechanism available for eukaryotes, where the dual activity of this enzyme is described. Therefore, the aim of this work was to determine the crystallization conditions for Ornithine decarboxylase from *Saccharomyces cerevisiae*.

For this, the *SPE1* gene was amplified from the genomic DNA of *S. cerevisiae*, cloned by assembly *in vivo*, overexpressed in *E. coli* and the protein was purified. Subsequently, the induction and optimization of crystals was carried out. We obtained crystals with low quality of diffraction, thus we continue to optimising these conditions in order to achieve a diffraction pattern that allows us to obtain the atomic structure in the future.

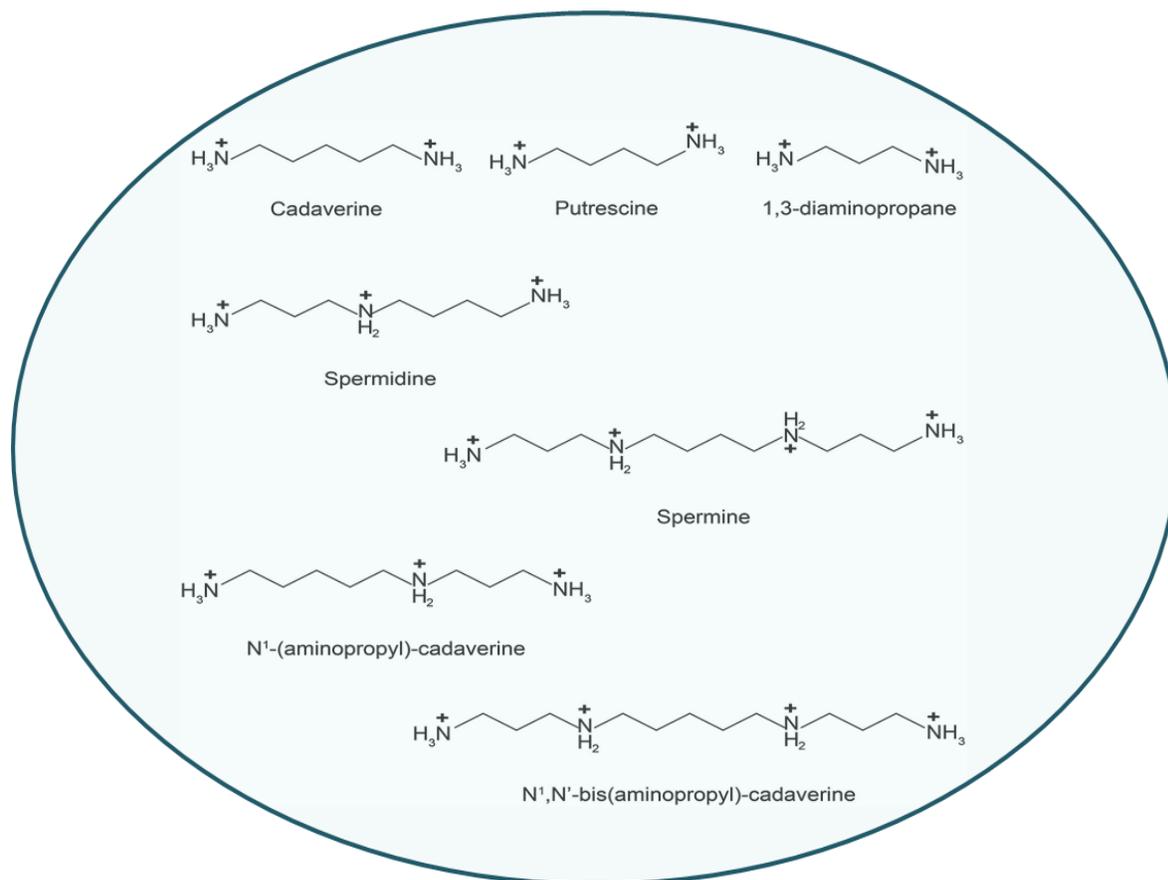
We tried to measure the activity of this enzyme, using several methods such as the determination of putrescine and cadaverine by mass spectrometry; or by determining the CO<sub>2</sub> produced. However, we were not able to detect activity. Therefore, a protocol will be established to determine Ornithine decarboxylase activity by determining putrescine and cadaverine derivatized with dansyl chloride by fluorescence-coupled HPLC.

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 Poliaminas

### 1.1.1 Generalidades

Las poliaminas (PAs) son pequeños policationes alifáticos que se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza. La espermina (Spm) y espermidina (Spd) fueron descritas por primera vez por Anton van Leeuwenhoek, en 1678, mientras estudiaba el fluido seminal (Tabor, *et al*, 1964; Bachrach, 2010). Las PAs más comunes son Spm, Spd y putrescina (Put), seguidas de la cadaverina (Cad) y 1,3-diaminopropano (1,3-DAP), entre otras (Figura 1) (Miller-Fleming, *et al*, 2015).



**Figura 1. Estructura química de las PAs más abundantes en la naturaleza.** Estas moléculas se encuentran cargadas positivamente a pH fisiológico (Miller-Fleming, *et al*, 2015).

Estas moléculas pueden encontrarse en forma libre o conjugadas con carbohidratos, esteroides, fosfolípidos, los grupos fosfato del ADN y ARN, péptidos o unidades sub-

estructurales de diversas familias de alcaloides (Hicks Gómez & Díaz Zagoya, 1988). Debido a esta propiedad, las PAs participan en una multitud de procesos celulares, tales como transcripción, traducción, regulación de la expresión génica, proliferación celular, estabilización de ADN, inhibición de la agregación plaquetaria, autofagia y resistencia al estrés (Jänne, *et al*, 1978; Heby, 1981; Grillo, 1985; Heby, 1986; Sjöholm, 1993; Rajam, *et al*, 2004).

Las PAs son capaces de estabilizar y remodelar la cromatina, gracias a que pueden interactuar y adherirse a los ácidos nucleicos y proteínas, por lo que son muy importantes como moléculas reguladoras de la expresión génica (Childs, *et al*, 2003). Se ha encontrado que las PAs están involucradas en la inducción de la ARN polimerasa, en la regulación ribosomal, en la fidelidad de la traducción, en el inicio y elongación de la cadena proteica, así como en la inhibición de las ribonucleasas (Sjöholm, 1993).

En los años 50's, se encontró que la Spm y Spd son capaces de promover el crecimiento de *Lactobacillus casei* (Kihara, *et al*, 1957). Además, en 1970, se realizaron diversas investigaciones en óvulos fertilizados de erizo de mar, donde se encontró que las PAs cambian su concentración cíclicamente y que, al inhibirse la síntesis de éstas, se afectaba notablemente la división del óvulo (Kusunoki, *et al*, 1976; Kusunoki, *et al*, 1978). En células procariontes, se ha observado una reducción en el crecimiento cuando se disminuyen las concentraciones de Spd y Put (Cunningham-Rundles, *et al*, 1975; Pitkin, *et al*, 1990; Xie, *et al*, 1993); este mismo hecho, en células eucariontes, causa una interrupción en la proliferación celular (Balasundaram, *et al*, 1991; Ray, *et al*, 1999; Chattopadhyay, *et al*, 2002). En el caso de *Saccharomyces cerevisiae*, se determinó que la Spd o Spm son esenciales para el crecimiento de la levadura en condiciones aeróbicas. Por lo tanto, en este organismo, el requerimiento de estas PAs para el crecimiento dependerá de las condiciones metabólicas en las que se encuentre (Balasundaram, *et al*, 1991).

La progresión del ciclo celular, en eucariontes, requiere de las PAs (Heby, *et al*, 1973; Heby, *et al*, 1976; Sunkara, *et al*, 1981). Se ha detectado un aumento de estas biomoléculas durante las fases del ciclo celular G1/S y G2. Sin embargo, durante las fases S y M hay un

decaimiento en la concentración de PAs, siendo mayor en la fase S (Odenlund, *et al*, 2009). Asimismo, cuando la concentración de PAs en la célula disminuye, el ciclo celular se detiene (Ray, *et al*, 2000), sin embargo, aún no se ha definido en qué fase se presenta esta detención. Se argumenta que puede ser en G, S o G2 o bien, existe la posibilidad que se vea detenido en todas las fases anteriores (Heby, *et al*, 1973; Cheetham, 1983; Anehus, *et al*, 1984; Kramer, *et al*, 1999; Ray, *et al*, 2000; Odenlund, *et al*, 2009). También se ha observado que la actividad de las enzimas Ornitina descarboxilasa (ODC) y S-adenosilmetionina descarboxilasa (AdoMetDC) cambia durante las diferentes fases del ciclo celular, observándose un aumento entre las fases G1/S y en G2 (Heby, *et al*, 1976; Terui, *et al*, 2007; Nishimura, *et al*, 2009).

Se ha descrito además que, dada su alta concentración en el citoplasma, las PAs pueden comportarse como osmolitos, los cuales son importantes para mantener el equilibrio en los fluidos y el volumen de la célula; además de que contribuyen a estabilizar la estructura terciaria de las proteínas (Hicks Gómez & Díaz Zagoya, 1988).

Las PAs varían en cuanto a su concentración y composición, de acuerdo con el organismo, especie o tipo de célula que se esté estudiando (Shah, *et al*, 2008; Valdés-Santiago, *et al*, 2014). Podemos encontrar que la concentración de Put es más alta que la de Spd y Spm en *Escherichia coli*, sin embargo, estas PAs son mayoritarias en otras células procariontes y eucariontes (Shah, *et al*, 2008; Valdés-Santiago, *et al*, 2014). Saccharomycotina, es uno de los pocos subfilos de hongos, en los que se ha detectado Spm (Valdés-Santiago, *et al*, 2014). En bacterias y plantas se ha determinado la presencia de Cad, sin embargo, generalmente en las otras especies su concentración es baja o inexistente (Rhee, *et al*, 2007; Kusano, *et al*, 2008; Shah, *et al*, 2008). Por otro lado, de acuerdo al proceso celular en el que se encuentre la célula la concentración de estas moléculas varía, por ejemplo, existe un aumento de éstas durante la proliferación celular. De igual forma, la concentración de las PAs presentes en la célula no son las mismas durante el crecimiento de la célula o durante la apoptosis (Grillo, 1985; Hicks Gómez & Díaz Zagoya, 1988).

Se sabe que la concentración de PAs varía en diferentes tejidos del mismo organismo, por ejemplo, en la próstata y páncreas de rata no se ha encontrado Put, sin embargo, contienen 7.73 y 8.62 moles/g de peso húmedo de Spd, respectivamente, y de Spm 4.77 y 0.80 moles/g de peso húmedo, respectivamente. La concentración de las PAs también varía entre los diferentes organismos, como en *Pseudomonas aeruginosa* y *Shigella sonnei* las cuales únicamente contienen 5.6 y 14 moles/g de peso húmedo de Put, respectivamente. Por otro lado, en los hongos *Aspergillus niger* solamente encontramos 4 moles/g de peso húmedo de Put y en *Aspergillus nidulans* tenemos 0.16 y 0.4 moles/g de peso húmedo de Spd y Spm, respectivamente. La Spm es mayor en tejidos diferenciados, y disminuye durante los procesos de diferenciación, como en la regeneración del hígado. Además, esta poliamina (PA) disminuye de manera constante con la edad (Hicks Gómez & Díaz Zagoya, 1988).

En diversos estudios en organismos como *S. cerevisiae* y *Drosophila melanogaster*, así como en células mononucleares de sangre periférica humana, se ha observado que los niveles de PAs disminuyen conforme aumenta la edad (Eisenberg, *et al*, 2009). Sin embargo, al suplementar con Spd, se restauran los niveles de PAs e incrementa la esperanza de vida de estos organismos (Vivó, *et al*, 2001; Gupta, *et al*, 2003; Eisenberg, *et al*, 2009). Además, en *D. melanogaster* la suplementación de esta PA evita la pérdida de memoria asociada a la edad en un mecanismo que involucra a la autofagia (Gupta, *et al*, 2003).

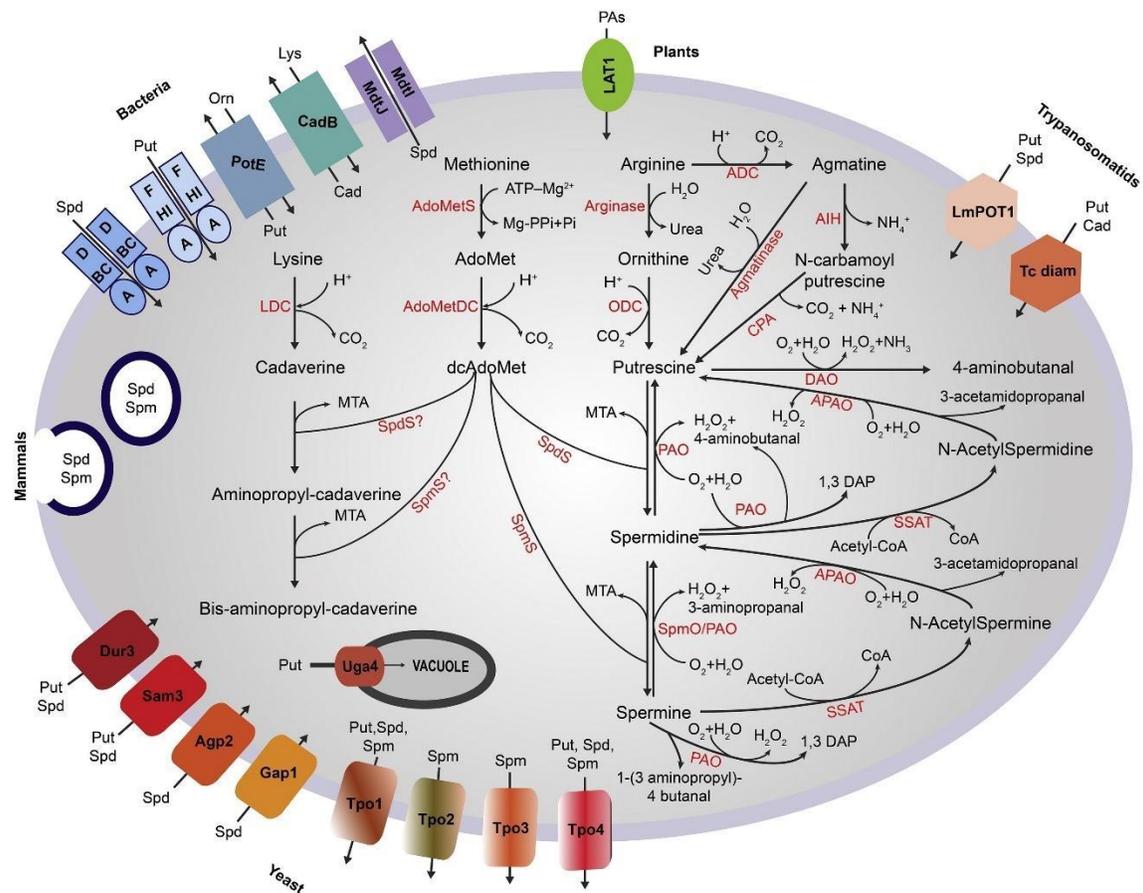
Algo importante de resaltar es que los niveles de PAs pueden elevarse por diferentes motivos, sin embargo, aunque no se encuentren detallados los mecanismos, las células eucariontes y procariontes tienen múltiples formas de prevenir la acumulación tóxica de las PAs, sugiriendo con esto que se deben evitar las concentraciones excesivas de estas moléculas (Heby, 1981).

### 1.1.2 Metabolismo

Las PAs se forman preferentemente a partir de los aminoácidos ornitina (Orn) y metionina. Sin embargo, no todos los organismos las sintetizan partiendo del mismo sustrato, por lo cual existen dos aminoácidos más, arginina y lisina, que funcionan como sustratos

alternativos para la síntesis de estas biomoléculas (Figura 2) (Tabor, *et al*, 1985; Rhee, *et al*, 2007; Kusano, *et al*, 2008; Shah, *et al*, 2008).

La ruta de la biosíntesis canónica de las PAs comienza con la descarboxilación de Orn, por la ODC, para formar Put. Spd y Spm se forman a partir de Put mediante la adición de grupos aminopropilo por la espermidina y espermina sintasas (SpdS, SpmS). Estos grupos son donados por el derivado de Met, S-adenosilmetionina descarboxilada (dcAdoMet), el cual es producto de la descarboxilación de S-adenosilmetionina (AdoMet) catalizada por la AdoMetDC. Además, la Put puede sintetizarse por otras vías alternas como se muestra en la figura 2 (Heby, 1981; Tabor, *et al*, 1985; Grillo, 1985; Heby, 1986; Luk & Yang, 1987; Sjöholm, 1993; Rhee, *et al*, 2007; Kusano, *et al*, 2008; Shah, *et al*, 2008). Un ejemplo de organismos que sintetizan Put por vías alternas son *Arabidopsis thaliana* y *Trypanosoma cruzi*, ya que carecen de un gen que codifique para ODC, por lo que no sintetizan PAs mediante la vía canónica (Carrillo, *et al*, 1999; Hanfrey, *et al*, 2001). *A. thaliana* sintetiza Put a partir de Arg en una reacción catalizada por la arginina descarboxilasa (ADC) mientras que el parásito *Trypanosoma cruzi* transporta Put y Cad del huésped (Le Quesne, *et al*, 1996; Hasne, *et al*, 2010).

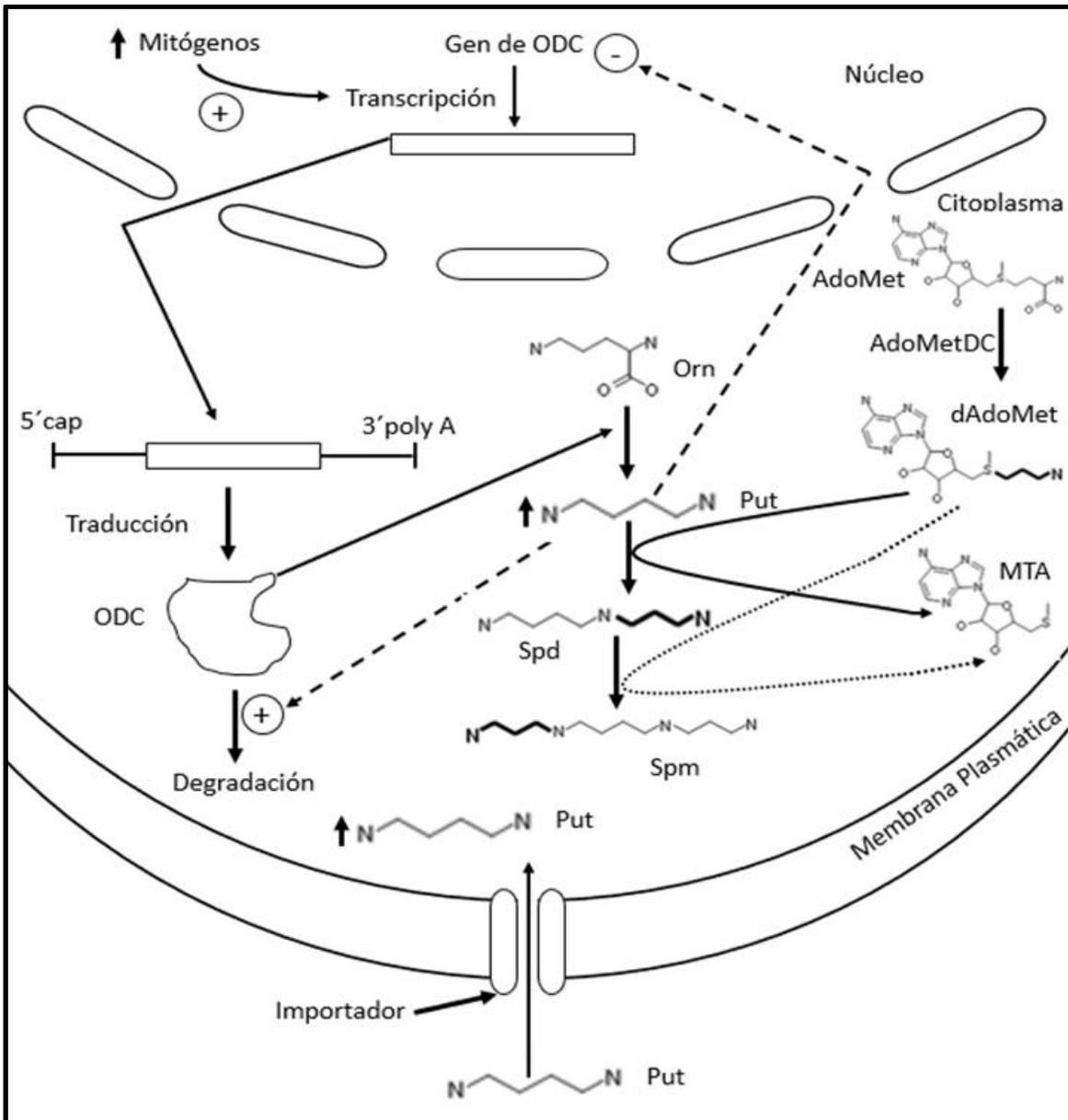


**Figura 2. Metabolismo de PAs en diferentes organismos.** La Put puede sintetizarse a través de diferentes reacciones en las cuales participan diferentes enzimas. La enzima ODC (Ornitina descarboxilasa), descarboxila a la Orn (la cual también se puede formar a partir de la arginina en una reacción catalizada por la arginasa) formando la Put, la cual a su vez puede añadir uno o dos grupos aminopropilo para formar Spd y Spm por las enzimas SpdS (espermidina sintasa) y SpmS (espermina sintasa), respectivamente. Los grupos aminopropilo son donados por la dcAdoMet (S-adenosilmetionina descarboxilada), la cual se forma a partir de la AdoMet (S-adenosilmetionina) que es descarboxilada por la AdoMetDC (S-adenosilmetionina descarboxilasa), esta AdoMet se sintetiza por la acción de la AdoMetS (S-adenosilmetionina sintasa) sobre la Met. La ADC (arginina descarboxilasa) actúa sobre la Arg formando agmatina, la cual es sustrato de dos enzimas, la agmatinasa, la cual forma Put; y la AIH (agmatina iminohidrolasa) que hidroliza la agmatina formando N-carbamoyl putrescina, que posteriormente es hidrolizada por la CPA (N-carbamoyl putrescina aminohidrolasa) formando Put. Asimismo, se esquematiza la degradación intracelular de las PAs a partir de la acetilación por medio de la SSAT (espermidina/espermina acetiltransferasa) la cual va a acetilar tanto a la Spd como a la Spm. Ambos productos acetilados se oxidan por la APAO (poliamina oxidasa acetilada), formándose Spd y Put. Además de la acetilación, se pueden dar reacciones de oxidación directa para degradar PAs, la Spm es oxidada por la PAO (poliamina oxidasa) formando 1,3-DAP; y la Put por la enzima DAO (diamino oxidasa) formando 4-aminobutanol. Existen organismos que además pueden sintetizar Cad a partir de Lys, que es descarboxilada por la LDC (Lisina descarboxilasa). Asimismo, diferentes organismos (plantas, tripanosomatidos, levaduras, mamíferos y bacterias) pueden transportar PAs desde y hacia el interior de la célula (Miller-Fleming, *et al*, 2015).

### 1.1.2.1 Regulación del metabolismo de PAs

La regulación de las PAs tiene un alto nivel de sofisticación y complejidad, lo cual representa otra fuerte evidencia de la importancia funcional de estas biomoléculas (Seiler, 1987). Las PAs están ampliamente reguladas en su transporte, anabolismo y catabolismo. La regulación de las enzimas involucradas en su metabolismo se da a nivel de transcripción, traducción y degradación de proteínas. En la célula, estos mecanismos se encuentran controlados por las concentraciones de las PAs. Esta regulación particular es muy crítica para la célula por lo que se encuentra ampliamente conservada en todos los reinos (Miller-Fleming, *et al*, 2015).

La ODC tiene una vida media corta, de 7 a 60 min en mamíferos, en hígado y mucosa intestinal de rata es de 11 (Russell & Snyder, 1968) y 22 min (Iwami, Wang & Jain, 1990), respectivamente. En *S. cerevisiae* la Ornitina descarboxilasa (Spe1p) tiene una vida media mucho más larga que en otros organismos eucariontes (6 h) (Tyagi, Tabor & Tabor, 1981). La ODC presenta un alto grado de síntesis inducida, que permite a las células incrementar rápidamente los niveles de PAs en respuesta a estímulos diferentes, como el aumento de mitógenos, estos son factores capaces de estimular la proliferación celular (Hicks Gómez & Díaz Zagoya, 1988; Heby & Persson, 1990). En la mayoría de los casos, el incremento en la actividad de la ODC se debe a un aumento en la concentración de proteína y, ocasionalmente se correlaciona con un incremento en el contenido del ARNm (Heby & Persson, 1990; Sjöholm, 1993). Las PAs regulan la actividad de sus enzimas por retroalimentación. De esta forma, cuando el contenido intracelular de PAs se incrementa, las actividades de la ODC y AdoMetDC disminuyen, esto ocurre debido a la reducción de la síntesis de estas proteínas y al aumento de su degradación (Sjöholm, 1993) (Figura 3). La Put, Spd y Spm inhiben la actividad de la ODC, sin embargo, la concentración de Put (1 mM) que se requiere para inhibir esta enzima es mayor que la que se requiere de Spd (0.15 mM) (BRENDA profesional, 2018). Por otro lado, la Put también estimula la actividad de AdoMetDC. Un aumento en la formación de Put aumenta la síntesis de dcAdoMet y por lo tanto acelera la conversión posterior de Put a Spd y Spm por las aminopropiltransferasas (Heby, 1981; Heby, 1986; Hicks Gómez & Díaz Zagoya, 1988; Heby & Persson, 1990).



**Figura 3. Regulación de PAs en células de mamíferos.** Un aumento en los mitógenos va a propiciar el inicio de la transcripción del gen de ODC. El ARNm formado sale del núcleo para ser traducido, formando la ODC. Esta enzima descarboxila a la Orn, formando Put, para posteriormente sintetizar Spd y Spm. Si ocurre una internalización al citoplasma de Put, la concentración de ésta aumenta provocando, por un lado, que comience la degradación de la ODC y por el otro que disminuya la transcripción (Modificada de: Heby & Persson, 1990).

Otra manera de regular la concentración de las PAs, en las células, es controlando el catabolismo mediante su oxidación y/o acetilación. La poliamina oxidasa (PAO) se encarga de regular la concentración de PAs, generando compuestos más pequeños que contienen aminas como, por ejemplo, Spd y Spm pueden ser oxidadas por la PAO a 1,3-DAP. Un alto nivel de PAO aumenta los niveles de Spd y Put. Al realizar estas reacciones se genera  $H_2O_2$

y 3-aminopropanal (Figura 2), este último subproducto se cree que se encuentra involucrado en el inicio de las señales que llevan a la muerte de la célula (Murray-Stewart, *et al*, 2002; Landry, *et al*, 2003; Wu, *et al*, 2003).

La Spm y Spd pueden acetilarse por la Spd/Spm acetiltransferasa (SSAT), para posteriormente ser transportadas y eventualmente excretadas de las células. La acetilación es un medio para disminuir la carga positiva neta de las PAs y así liberarlas de los sitios de unión aniónica. Sin embargo, no se ha encontrado ninguna función fisiológica de las PAs acetiladas (Seiler, 1987). Los derivados acetilados pueden eliminarse de las células por medio del transporte, y también se cree que este aumento en los derivados puede causar la supresión de la absorción de las PAs del medio. Además, se ha demostrado que el incremento de las PAs y AMPc produce la inducción de la SSAT. Estudios en tejido de cáncer de mama, han reportado que los niveles de esta enzima y de las PAs acetiladas se encuentran elevados, y el nivel de PAO está disminuido (Wallace, *et al*, 2000). Esto refuerza las teorías sobre el papel de los productos de oxidación de esta enzima y su relación con la apoptosis celular. El aumento de las PAs acetiladas y la disminución de los productos oxidados, promueve la longevidad de las células cancerígenas y su proliferación celular (Seiler, 1987; Wu, *et al*, 2003).

La SSAT se regula de diversas maneras de acuerdo con el tipo de célula, por ejemplo, en algunas líneas celulares tumorales (H157, A549 y H82) se ha visto que se necesita de un complejo para iniciar la transcripción de SSAT. Sin embargo, en algunas células tumorales (H157 y A549) (Shao, *et al*, 1996; Casero, *et al*, 1992) los análogos sintéticos de las PAs regulan positivamente a SSAT, lo que aumenta la degradación de las PAs (Seiler, 1987; Wang, 1998; Wang, *et al*, 2001).

Los sistemas de transporte de membrana de las PAs están descritos para diversos organismos (Figura 2). *E. coli* cuenta con los sistemas de transportadores PotABCD y PotFGHI, que se encargan de importar Spd y Put, respectivamente (Kashiwagi, *et al*, 1993; Igarashi, *et al*, 2001). Este organismo cuenta también con antiportadores conocidos como PotE (Orn o Lys/Put) y CadB (Lys/Cad), que se encargan de excretar Put o Cad al captar Orn o Lys (Kashiwagi, *et al*, 1997; Soksawatmaekhin, *et al*, 2004; Igarashi, *et al*, 2010). El

transportador CadB es altamente inducible en condiciones ácidas, teniendo una participación en la respuesta al estrés por pH (Kashiwagi, *et al*, 1997; Soksawatmaekhin, *et al*, 2004). La bacteria *E. coli* cuenta con un exportador MdtJI, el cual es un complejo formado por MdtJ y MdtI que son necesarios para transportar Spd y evitar la sobreacumulación de esta PA. Este transportador es muy útil para mantener la homeostasis de la célula, que se puede ver afectada por las PAs (Higashi, *et al*, 2008).

La levadura *S. cerevisiae* cuenta con cuatro transportadores (DUR3, Sam3, AGP2 y Gap1) implicados en el transporte de PAs hacia el interior de la célula (Uemura, *et al*, 2005; Aouida, *et al*, 2005; Uemura, *et al*, 2007). Por otro lado, cuenta también con cuatro exportadores (*TPO1 - TPO4*) los cuales llevan PAs hacia el exterior de la célula (Igarashi, *et al*, 1999; Kusano, *et al*, 2008). Existen otros dos transportadores que no se encuentran en la membrana plasmática, uno de ellos es Uga4, el cual se encarga de transportar Put entre la vacuola y el citoplasma; y el transportador (TPO5), el cual se encuentra en las vesículas secretoras de Golgi o post-Golgi y tiene como función exportar Put y Spd (Figura 2) (Uemura, *et al*, 2004; Tachihara, *et al*, 2005).

En mamíferos, no se han identificado transportadores específicos, por lo cual se cree que las PAs se transportan mediante un mecanismo endocítico (Igarashi, *et al*, 2010; Poulin, *et al*, 2012). En plantas tampoco se conocen sistemas de transporte específico, particularmente en *Arabidopsis*, se cree que la captación de las PAs está mediada por la familia de transportadores LAT (transportadores de aminoácidos tipo L) (Fujita & Shinozaki, 2014).

En el parásito *T. cruzi*, los transportadores son muy importantes, ya que este organismo carece de ODC por lo cual no es capaz de sintetizar sus propias PAs, obteniéndolas de su huésped (Hasne & Ullman, 2005).

### 1.1.2.1.1 Regulación de la ODC

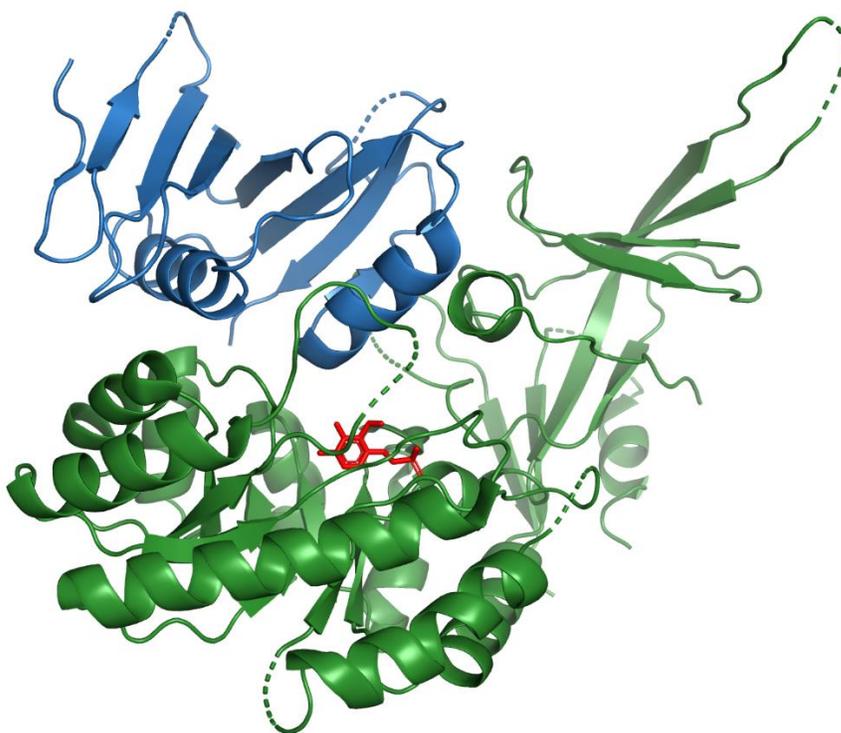
La regulación de ODC comienza en la transcripción, la cual ha sido ampliamente estudiada en mamíferos. El promotor de ODC responde a varios estímulos, como factores de crecimiento, hormonas y promotores tumorales (Wagner, *et al*, 1993; Qin, *et al*, 2004; Pegg, *et al*, 2006). Por otro lado, la regulación de la traducción depende de la concentración de las PAs, ya que, al aumentar su concentración en el interior de la célula, la traducción de ODC disminuye y viceversa. Sin embargo, hasta ahora, no se ha estudiado del todo cuál es el mecanismo a través del cual las PAs reprimen o activan la traducción de ODC (Gazdar, *et al*, 1976; Pegg, *et al*, 1988; Patchett, *et al*, 1996).

La ODC participa en la primera etapa de la síntesis de PAs y es la primera enzima limitante de estas reacciones. Cuando hay un estímulo con factores de crecimiento, la expresión de ODC aumenta, por lo tanto, el nivel de ODC activa se incrementa en la célula. Por otro lado, se ha demostrado que la expresión de ODC está muy elevada en células cancerosas (L1210, células hepáticas de rata) (Pegg, *et al*, 1988; Almrud, *et al*, 2000; Miller-Fleming, *et al*, 2015). Por esta razón es que se ha denominado que esta enzima es oncogénica, por lo que se han empleado inhibidores de ésta como agentes antitumorales (Almrud, *et al*, 2000).

La degradación de ODC se lleva a cabo por un proceso independiente de la ubiquitinación, mediante el proteosoma 26S, este un rasgo poco común ya que la mayoría de las proteínas para ser degradadas sufren de ubiquitinación (Murakami, *et al*, 1992; Erales, *et al*, 2014). En estudios *in vitro* se ha detectado que la ODC puede ser fosforilada e inactivada a través de la casein cinasa II que es dependiente de las PAs, sin embargo, aún no se conoce la relevancia fisiológica de esta reacción, ya que no se ha detectado en las células (Pegg, *et al*, 1986; Almrud, *et al*, 2000).

Para la degradación de la ODC por el proteosoma 26S se requiere de la antizima (AZ). Esta molécula es una proteína “antienzima para ODC”, la cual se activa por los niveles de PAs, y se considera un inhibidor macromolecular necesario en la degradación de ODC (Kay,

*et al*, 1973; Heller, *et al*, 1976; Miyazaki, *et al*, 1992). Cuando las células son expuestas a PAs exógenas, la concentración de AZ aumenta notablemente. Ésta tiene una alta afinidad por los monómeros de ODC, y actúa inhibiendo la formación de los dímeros de esta enzima por lo cual su actividad se ve disminuida (Heller, *et al*, 1976; Canellakis, *et al*, 1985). La formación del heterodímero (ODC/AZ) (Figura 4) causa un cambio conformacional en la ODC, que deja expuesto su extremo C-terminal en organismos como mamíferos (rata, ratón y humano). En el caso de *S. cerevisiae* o en *Kluyveromyces lactis* el extremo expuesto es el N-terminal, los cuales posteriormente son reconocidos por el proteosoma (Heller, *et al*, 1976; Gödderz, *et al*, 2011). A pesar de las diferencias entre las secuencias de ODC, de las diferentes especies, todas se degradan por medio de la unión a AZ y libres de ubiquitinación (Erales, *et al*, 2014).



**Figura 4. Monómero de ODC de humano en complejo con AZ.** Se muestra el monómero de ODC en color verde, la AZ en color azul, en rojo mostramos al PLP (código PDB 5BWA). Esta figura fue realizada usando el programa Pymol (Wu, *et al*, 2015).

#### 1.1.2.1.2 Regulación de la AdoMetDC

La AdoMetDC es una enzima crítica para la síntesis de PAs en diversos organismos como plantas o mamíferos. Se encarga de catalizar la reacción en la cual se forma dcAdoMet,

que es el donador de grupos aminopropilo. Hasta el momento es la única función que se le conoce, por lo cual los niveles de ésta son bajos y se encuentran regulados por la dcAdoMet (Pegg, 2009).

La enzima AdoMetDC se sintetiza como una proenzima inactiva, sufre una escisión que da como resultado la formación de un grupo piruvoilo, en el extremo N-terminal, produciendo la enzima activa (Pegg, 2009; Bale & Ealick, 2010).

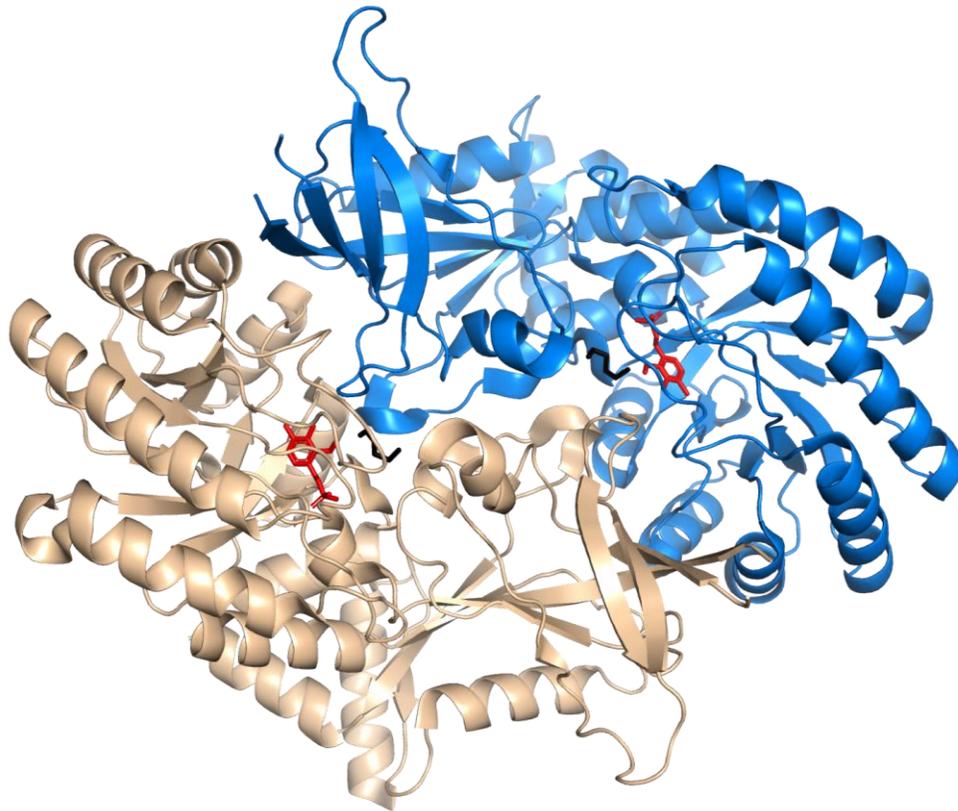
Las PAs se encargan de regular a la AdoMetDC, la Put regula o estimula su activación; mientras que la Spd y Spm regulan su inactivación (Pegg, 2009). El tratamiento hormonal, la regeneración tisular y la diferenciación celular son algunos de los estímulos que están asociados con el aumento en los niveles de esta enzima, ya que hasta el momento la regulación de la transcripción no está del todo clara (Lam, *et al*, 2005; Dayoub, *et al*, 2006; Pegg, 2009).

La vida media de la AdoMetDC es de menos de 1 h, lo cual depende de la especie u organismo. Por ejemplo, en *Crithidia fasciculata* su vida media es de 3 min (Nasizadeh & Persson, 2003); en humano la vida media de esta enzima es de 48 min (Svensson & Persson, 1995), sin embargo, cuando los niveles de Spd y Spm aumentan, el recambio de AdoMetDC aumenta (Nasizadeh & Persson, 2003; Pegg, 2009). Esta enzima, a diferencia de la ODC se degrada por poliubiquitinación por medio del proteosoma. Esta degradación se acelera cuando se transamina el grupo piruvoilo que es transformado en alanina. Esta transformación, además de promover su degradación, también inactiva la enzima (Yerlikaya & Stanley, 2004). Se ha propuesto que esta reacción induce un cambio conformacional en la enzima que hace que el sitio de poliubiquitinación sea más accesible y sea más fácilmente reconocido promoviendo la degradación (Pegg, 2009; Yerlikaya, *et al*, 2004).

## 1.2 Ornitina descarboxilasa

### 1.2.1 Generalidades

La ODC es una enzima dependiente de piridoxal 5'-fosfato (PLP). Su estado oligomérico activo más común es como un homodímero, cada subunidad con simetría molecular doble (Figura 5). El peso molecular de cada una de estas subunidades va de un rango de 51 a 53 kDa, dependiendo del organismo. Se forman dos sitios activos en la interfaz entre el dominio N-terminal de un monómero, que provee residuos implicados en las interacciones con PLP; y el dominio C-terminal de la otra subunidad (monómero) que proporciona residuos previamente identificados como interactuantes con el sustrato (Almud, *et al*, 2000; Kern, *et al*, 1999).



**Figura 5. ODC de humano.** Se muestran las dos subunidades una en color beige y la otra en azul, en rojo mostramos al PLP y en negro APA (código PDB 2000). Esta figura fue realizada usando el programa Pymol (Dufe, *et al*, 2007).

La ODC es una enzima extremadamente lábil, se encuentra en las células en estado de latencia en niveles bajos y representa el 0.0001% del total de proteína celular (Heby &

Persson, 1990). Esta enzima tiene una vida media corta siendo de 7 a 15 min en mamíferos. Como se mencionó anteriormente, la actividad de la ODC se regula en tres niveles: transcripcional, postraducciona y un control negativo de la estabilidad de la ODC por retroalimentación, regulado por los productos de la biosíntesis de PAs. Esta enzima es inducida de manera bifásica durante la fase tardía de G1 y en G2/M (Persson, *et al*, 1998; Shantz & Pegg, 1999; Balasundaram, *et al*, 1991). De igual manera, cuando la concentración de esta enzima se incrementa, se promueve una acumulación rápida de PAs en sistemas con crecimiento rápido tales como el embrionario, el tumoral y en la actividad secretoria de las glándulas endocrinas. Este aumento en la actividad de la ODC, frecuentemente estimulado por las hormonas en sus tejidos blancos, es uno de los eventos más tempranos que ocurre durante la transición de las células de la fase de letargo a la proliferación activa (Grillo, 1985; Luk, & Yang, 1987; Sjöholm, 1993).

La concentración de ODC puede alterarse en respuesta a diferentes tipos de perturbación celular. Por ejemplo, su síntesis se induce en respuesta a estímulos de crecimiento; en células eritroides de ratón infectadas por retrovirus se han encontrado niveles elevados de ODC. Además, en fibroblastos de embrión de pollo infectados por virus del sarcoma de Rous, la actividad de ODC aumentó 20 veces con respecto a las células no infectadas, 5 días después de esta infección (Don & Bachrach, 1975; Gazdar, *et al*, 1976). De igual manera, la infección aguda causada por virus del sarcoma murino aumenta de 6 a 26 veces la actividad de la ODC, lo cual es una evidencia más de que la infección por virus perturba las condiciones normales de ODC (Gazdar, *et al*, 1976; Pegg, 1988).

Se ha observado que la actividad de ODC aumenta en algunas afecciones premalignas, como la gastroenteritis. Algunos estudios han demostrado que el inicio de la proliferación celular de la mucosa intestinal depende de la ODC. Por otro lado, existe evidencia de que muchos promotores tumorales son capaces de inducir un aumento en la actividad de ODC, por lo cual, el contenido de Put se eleva durante el desarrollo de células neoplásicas, lo que al parecer es crítico para la inducción de tumores (Don & Bachrach, 1975; Luk & Baylin, 1984; Pegg, 1988; Patchett, *et al*, 1996).

La afinidad de la ODC por la Orn cambia de acuerdo con el organismo del que provenga esta enzima. Por ejemplo, en *Leishmania donovani*, en humano (Dufe, *et al*, 2007), en *Vibrio vulnificus* (Lee, *et al*, 2007) y en *Trypanosoma brucei* (Jackson, *et al*, 2000) la  $K_m$  es de 0.39-1.7 mM. También se reporta que la concentración intracelular de Orn es de 1.86 (*S. cerevisiae*) (Olin-Sandoval, *et al*, enviado) a 10 mM (*T. brucei*). Con esto se corrobora que la concentración del sustrato es mucho mayor a la  $K_m$  reportada, por lo que en la célula la enzima se encuentra saturada por su sustrato (Pillai, *et al*, 1999; Dufe, *et al*, 2007; Jackson, *et al*, 2000; Lee, *et al*, 2007).

Como ya se mencionó anteriormente, la actividad de la ODC está incrementada en diversas patologías. Estos hallazgos han llevado a un interés muy elevado en el diseño de inhibidores de la biosíntesis de PAs, ya que pueden ser útiles para el tratamiento de varias enfermedades en las que la proliferación celular se encuentra alterada (Pegg, 1988).

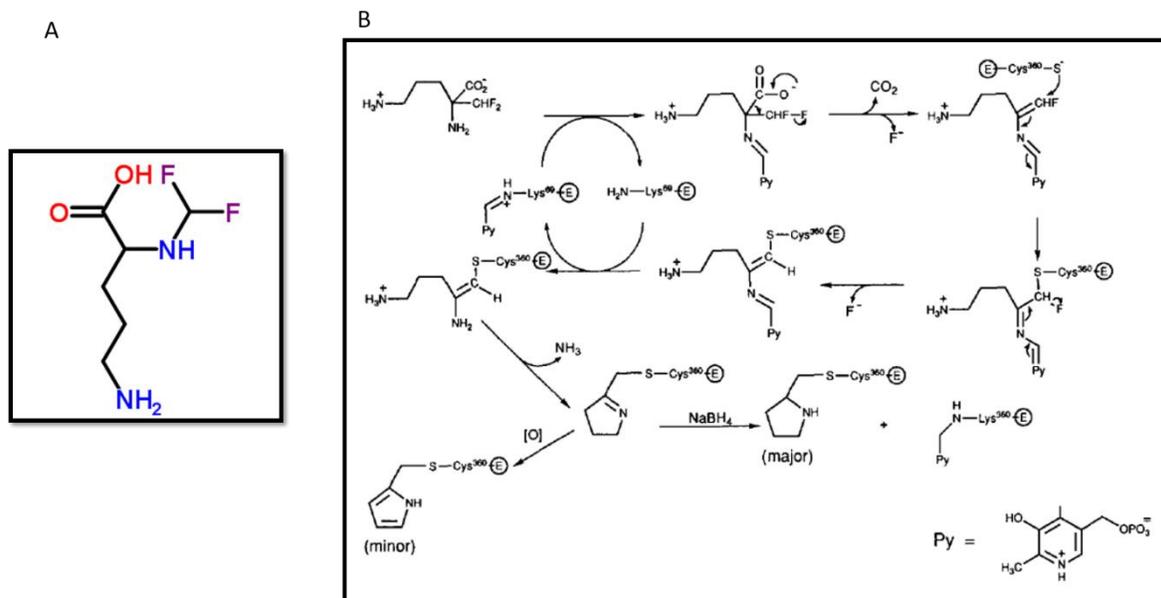
## 1.2.2 Inhibidores de la ODC

Debido a la gran importancia de esta enzima en el crecimiento celular y en enfermedades tales como el cáncer, se han diseñado algunos inhibidores de esta enzima.

### 1.2.2.1 D, L- $\alpha$ -Difluorometil ornitina

La D, L- $\alpha$ -Difluorometilornitina (DFMO) (Figura 6, sección A) es un inhibidor específico, potente e irreversible de la actividad enzimática de la ODC (Metcalf, *et al*, 1978; Poulin, *et al*, 1992; Satya Tapas, *et al*, 2013). Su constante de disociación aparente ( $K_d$ ) se encuentra en un rango de 1-39  $\mu$ M (para los inhibidores irreversibles la  $K_d$  y la  $K_i$  son iguales), por lo que hay una baja disociación del complejo enzima-ligando (Metcalf, *et al*, 1978; Sjöholm, 1993). Este inhibidor se absorbe por difusión pasiva en cultivo celular de riñón (ratón) y se une a la enzima en el sitio del sustrato. La inactivación de la ODC de ratón implica la descarboxilación de la DFMO y la unión estequiométrica es muy cercana a 1 mol de DFMO por subunidad de ODC (Metcalf, *et al*, 1978; Pegg, *et al*, 1987; Poulin, *et al*, 1992). Esta molécula pierde un átomo de flúor, produciendo un intermediario altamente reactivo

que alquila un residuo nucleofílico en el sitio activo y con eso inactiva permanentemente a la enzima (Figura 6, sección B) (Poulin, *et al*, 1992).



**Figura 6. Mecanismo propuesto para la inactivación de la ODC de ratón por DFMO.** Sección A. Representación de la estructura atómica de la DFMO (Royal Society of Chemistry, 2015). Sección B, se muestra la inactivación de la ODC donde, la DFMO reacciona con el PLP que se encuentra unido a la Lys-69 de la enzima ODC. Este PLP se une al nitrógeno que se encuentra formando un enlace con el carbono  $\alpha$  del inhibidor. La posterior descarboxilación genera la salida de un átomo de flúor, generando una molécula sensible a la formación de un enlace covalente entre el azufre de la Cys-360, de la ODC, y el carbono fluorado de la DFMO. Posteriormente pierde este último flúor por la estabilización de electrones resonantes. En esta etapa la Lys-69 recupera su unión con el PLP. El último paso de la reacción es la pérdida de un amonio seguido de la formación de un ciclo, generando S-((2-(1-pirrolina)) metil) cisteína que al oxidarse se convierte en S-((2-pirrol) metil) cisteína, mientras que al agregar borohidruro de sodio ( $\text{NaBH}_4$ ) se obtiene el compuesto reducido, S-((2-pirrolidina) metil) cisteína (Poulin, *et al*, 1992).

Los efectos de la DFMO son estudiados en varias enfermedades humanas que pueden responder a la inhibición de la actividad de la ODC y a la disminución de la síntesis de PAS (Romijn, *et al*, 1987). Este inhibidor, además se emplea en los estudios de la función fisiológica de las PAS y tiene un potencial considerable de uso farmacológico contra los parásitos (por ejemplo: *T. brucei gambiense* y *rhodesiense*, *Plasmodium falciparum*, etc.) y como agente antineoplásico (Mendez, *et al*, 1982; Fozard, *et al*, 1983; Mendez, *et al*, 1984). En los modelos, animal (BALB/c) y celular (PC-93 y RC-21), la DFMO inhibe efectivamente la actividad de la ODC a una concentración por arriba de  $50 \mu\text{M}$  (Romijn, *et al*, 1987). La DFMO no resultó tóxica en ratones, ésta fue administrada de forma oral en una solución al 2 %. Por otro lado, también se ha observado que suprime el incremento de la actividad uterina

de la ODC asociado con la embriogénesis temprana y detiene el desarrollo embrionario (Mendez, *et al*, 1982; Fozard, *et al*, 1983; Mendez, *et al*, 1984).

La DFMO ha demostrado inhibir la actividad de la ODC, el cual acompaña el inicio de la proliferación de varios tipos celulares. Esta inhibición retarda el crecimiento de muchos tipos celulares en cultivo, incluyendo las células del hepatoma de ratas (Mamont, *et al*, 1978), células de sarcoma EMT6 de ratón (Marton, 1981), células L1210 de leucemia en ratón (Mamont, *et al*, 1978; Russel, 1983), células de adenocarcinoma pancreático en hámster (Marx, *et al*, 1987), células tumorales de rata 9L (Marton, *et al*, 1986), mieloma murino (Marton, *et al*, 1986), células del adenoma prostático humano (Russel, 1983) y células del carcinoma de pulmón humano (Marton, *et al*, 1986).

Debido a que las PAs participan en la proliferación celular, éstas se encuentran involucradas en diversas enfermedades humanas tales como el cáncer, en la cual se ha observado un aumento en la actividad de ODC (Russell, *et al*, 1968). Por esta razón, se ha intentado usar a esta vía como una diana terapéutica. Se han desarrollado fármacos dirigidos a diferentes reacciones de la ruta metabólica de las PAs, pero su eficacia en el tratamiento contra el cáncer cae por debajo del éxito clínico. Uno de estos fármacos es la DFMO, la cual está aprobada por la Food and Drug Administration (FDA) para tratar tripanosomiasis africana (enfermedad del sueño). Se observó que la DFMO tiene actividad anticancerígena en modelos de ratones. Las pruebas iniciales con este fármaco fueron prometedoras, ya que actúa como citostático o al menos reduce la velocidad de crecimiento en células de mamífero. Sin embargo, se determinó que la DFMO sola o en combinación con otros agentes, no es clínicamente eficaz contra el cáncer (Russell, *et al*, 1968; Weeks, *et al*, 1982; Nigro, *et al*, 1986; Milord, *et al*, 1992; Nowotarski, *et al*, 2013). El efecto limitado de la DFMO en el tratamiento de algunas enfermedades infecciosas y varias formas de cáncer puede deberse a una variedad de mecanismos de regulación que sirven para mantener el contenido óptimo de PAs en la célula tales como la disminución en la degradación de estas biomoléculas (Tomas, *et al*, 1987; Tyms, *et al*, 1988).

También se ha demostrado que la DFMO tiene un efecto antiviral contra el virus de la vaccinia y el citomegalovirus humano (CMV) en células diploides humanas (MRC-5), con valores de dosis efectiva 50 (DE50) de aproximadamente 5 mM en cada caso. Los efectos antivirales de la DFMO pueden relacionarse al incremento o expresión continua de la actividad de la ODC en células infectadas con vaccinia o CMV, sin embargo, el mecanismo por el cual actúa aún no ha sido esclarecido (Tyms, *et al*, 1986).

#### 1.2.2.2 1-Amino-oxi-3-aminopropano

Otro potente inhibidor de la vía de síntesis de PAs es el 1-Amino-oxi-3-aminopropano (APA), el cual ejerce su efecto en al menos tres puntos diferentes de la biosíntesis de estas moléculas (Khomutov, *et al*, 1985).

APA es un análogo estructural de la canalina, que es un potente inhibidor de varias enzimas utilizan PLP como coenzima, dentro de las que se encuentra la ODC (Khomutov, *et al*, 1985). Se ha observado que el grupo aminooxilo de APA interactúa con el O4 del PLP, al igual que con una Arg mediante la formación de puentes de hidrógeno, esta interacción es importante ya que hace que el PLP rote e interactúe con APA en el sitio activo, lo que impide que la Orn sea descarboxilada por la ODC (Dufe, *et al*, 2007).

En experimentos realizados sobre la ODC de homogenados de riñón de ratón, APA se comporta como un inhibidor competitivo ( $K_i = 3.2$  nM), con respecto a Orn (Khomutov, *et al*, 1985). Por otro lado, también se ha estudiado el efecto de este inhibidor sobre la ODC de *Leishmania donovani* ( $K_i = 1.0$  nM), donde se encontró que inhibe el crecimiento del promastigote *in vitro*, y del amastigote en un modelo de macrófagos, con una concentración inhibitoria 50 (CI50) de 42 y 5  $\mu$ M, respectivamente (Singh, *et al*, 2006; Dufe, *et al*, 2007). Sin embargo, a pesar de que APA disminuye significativamente las concentraciones de Put, Spd y Spm en promastigotes y amastigotes de *Leishmania donovani*, el efecto de este inhibidor se revierte por la adición de Put y/o Spd. Esto se comprobó con células que sobreexpresan ODC, ya que éstas presentaron una resistencia significativa hacia APA (hasta de 200  $\mu$ M) (Singh, *et al*, 2006). Todos los fármacos que presentan actividad contra parásitos

deben ser selectivos entre el patógeno y el huésped, lo que ocurre en este caso, ya que al exponer los macrófagos a una concentración elevada de APA (200  $\mu$ M) éstos no se afectaron, siendo entonces un buen fármaco contra la Leishmaniasis, ya que la CI50, tanto para promastigotes como para amastigotes es menor (Singh, *et al*, 2006). Comparando la eficiencia de los inhibidores APA y DFMO, se adicionó hasta 10 mM de este último compuesto a los promastigotes, sin observar disminución en el crecimiento, corroborando que para este tipo de infecciones APA es mejor inhibidor (Singh, *et al*, 2006).

El protozooario *Plasmodium falciparum* es el causante de la enfermedad conocida como Malaria, y el desarrollo intraeritrocitario de este parásito está relacionado con el aumento de los niveles de las PAs en los glóbulos rojos infectados. Debido a esto, se han probado diversos fármacos para inhibir la proliferación del protozooario, dentro de los cuales se encuentra APA. Este inhibidor disminuye los niveles de Put y Spd, bloqueando el desarrollo de la etapa de trofozoito del parásito. Este efecto se atribuye a la disminución en las concentraciones de las PAs, sin embargo, al ser un inhibidor competitivo, este efecto es revertido si se adiciona Put. Esto es importante ya que se ha reportado que la Put es capaz de penetrar los glóbulos rojos que están infectados, por lo cual hay que tomar en cuenta que esta absorción puede disminuir la eficacia de este inhibidor, si es empleado como un fármaco contra esta enfermedad (Das Gupta, *et al*, 2005).

## 2. ANTECEDENTES

Los agentes prooxidantes o especies reactivas son moléculas que tienen un electrón no apareado en el orbital externo, que impulsa a que exista una alta tendencia a reaccionar con otras moléculas biológicas e inducir daño (Lozada, *et al*, 2009). En el caso de las ROS, son una cadena de intermediarios redox activos formados por la reducción parcial química, fotoquímica o bioquímica del O<sub>2</sub> (Yu, 1994; Paradies, *et al*, 2002; Bergamini, *et al*, 2004).

Un antioxidante es una sustancia sintética o natural capaz de retrasar, prevenir o eliminar la oxidación de un sustrato oxidable como lípidos, ADN, proteínas, etc. (Corrales, *et al*, 2012). Las células tienen un sistema de defensa contra las ROS, denominados mecanismos antioxidantes tales como las enzimas antioxidantes (superóxido dismutasa, catalasa y peroxidasas) (Paradies, *et al*, 2002; Corrales, *et al*, 2012; Sharma, *et al*, 2012). Por otro lado, podemos encontrar los antioxidantes no enzimáticos como son: la vitamina C, vitamina A, vitamina E, el glutatión, el β-caroteno, algunos compuestos fenólicos como el resveratrol contenido en el vino tinto y flavonoides, etc. (Galleano, *et al*, 2010).

Un cambio en el equilibrio entre las diversas ROS, RNOS y agentes antioxidantes, presentes en las células, origina el estrés oxidante. Cuando éste persiste o se incrementa, se promueve la oxidación de lípidos de membrana, proteínas y ácidos nucleicos, lo cual provoca un mal funcionamiento de la célula (Bailey, *et al*, 2005; Fu, *et al*, 2012).

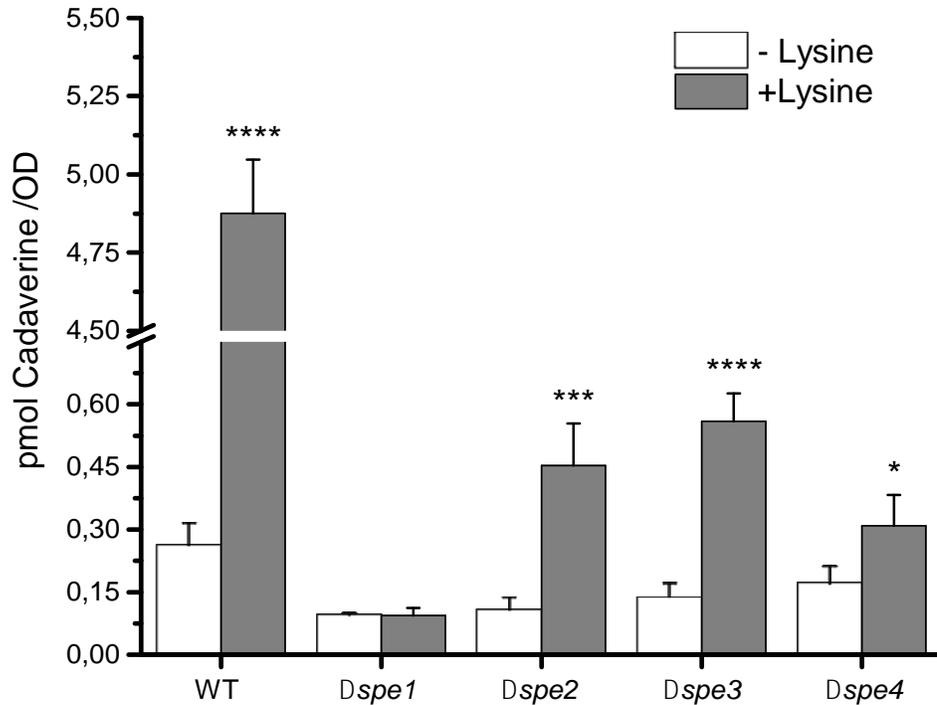
Se ha encontrado un aumento en la expresión de varios genes, entre los cuales se encuentran algunos que son responsables de la defensa contra las ROS. Las PAs son conocidas por estar relacionadas con la respuesta al estrés (demostrado en plantas) (Alcázar, *et al*, 2006). En los hongos, las PAs han sido objetivo de diversas investigaciones, lo que ha llevado a obtener mutantes con alteraciones en el metabolismo de estas moléculas, lo que se ha realizado con el fin de determinar la función de las PAs en la respuesta y protección al estrés (Rhee, *et al*, 2007; Krüger, *et al*, 2013). La eliminación de ROS se puede dar por acción de las PAs, ya que son policatiónicas cuando se encuentran a un pH fisiológico. Se ha demostrado, en estudios *in vitro*, que utilizando concentraciones fisiológicas de PAs, éstas

pueden funcionar como captadores de radicales alquilo,  $\text{OH}^\bullet$  y  $\text{ROO}^\bullet$  (por Cad, Put, Spd y Spm) y  $\text{O}_2^-$  (por Spd y Spm). Uno de los antioxidantes más eficientes de ROS es la Spm, la cual es muy eficaz para proteger el ADN del estrés oxidativo (Miller-Fleming, *et al*, 2015).

En un estudio previo se identificó, a partir de una colección de cepas knockout de *S. cerevisiae* expuestas a 1.25 mM de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , que comparadas con las células wild-type, las células KO del transportador de PAs *TPO1* ( $\Delta tpo1$ ), eran capaces de adaptarse más rápidamente al estrés generado por el oxidante y continuar con su crecimiento (Krüger, *et al*, 2013). Esto sugería que este transportador podría tener una función en la respuesta al estrés oxidante. En este trabajo se concluyó que el transportador *TPO1* controla las concentraciones de Spd y Spm durante incubaciones con  $\text{H}_2\text{O}_2$ , así como la inducción de proteínas antioxidantes como Hsp70, Hsp90, Hsp104 y Sod1 (Krüger, *et al*, 2013).

En un estudio posterior, se determinó a partir de un análisis proteómico de la respuesta a estrés por  $\text{H}_2\text{O}_2$  en *S. cerevisiae* que, en ausencia del transportador *TPO1*, las enzimas de la vía de síntesis de Lys: amino adipato reductasa (Lys2p), sacaropina deshidrogenasa (Lys9p) y homoisocitrato deshidrogenasa (Lys12p), aumentaban su expresión en respuesta al oxidante, sugiriendo una relación entre el metabolismo de la Lys y el de las PAs (Olin-Sandoval, *et al*, enviado).

*S. cerevisiae*, no cuenta con un gen que codifique a LDC, como ya se mencionó anteriormente, por lo cual se propuso a la Spe1p como aquella enzima capaz de descarboxilar a la Lys y convertirla en Cad, esto como parte de una ruta alternativa de la producción de Put (Olin-Sandoval, *et al*, enviado). Lo anterior se demostró creciendo a las diferentes cepas KO de la vía de síntesis de Spm (KO de Spe1p ( $\Delta spe1$ )), KO de AdoMetDC ( $\Delta spe2$ ), KO de SpdS ( $\Delta spe3$ ) y KO de SpmS ( $\Delta spe4$ )), en medio mínimo en presencia y ausencia de Lys. Los resultados de estos experimentos mostraron que las células  $\Delta spe2$ ,  $\Delta spe3$  y  $\Delta spe4$  fueron capaces de sintetizar Cad, contrario a lo obtenido con  $\Delta spe1$ , demostrando así que la Spe1p es la responsable de sintetizar esta PA (Figura 7) (Olin-Sandoval, *et al*, enviado).



**Figura 7. Determinación de la enzima responsable de sintetizar Cad en *S. cerevisiae*.** Se muestran las diferentes cepas (WT, *Δspe1*, *Δspe2*, *Δspe3* y *Δspe4*) que crecieron en medio mínimo sin Lys y suplementado con Lys durante toda la noche. Posteriormente se determinó la presencia de Cad por HPLC-MS/MS, donde se encontró que la enzima Spe1p es la responsable de la descarboxilación de Lys en *S. cerevisiae* (Olin-Sandoval, *et al*, enviado).

A continuación, en este mismo trabajo se clonó, expresó, purificó y se determinaron los parámetros cinéticos de la Spe1p recombinante, en donde se observó que la enzima es 100 veces más afín por Orn que por Lys ( $K_m$  de 0.0318 y 3.178 mM, respectivamente), además de tener una eficiencia catalítica mayor por su sustrato canónico (Orn = 88.9 mL/min\*mg vs Lys = 0.095 mL/min\*mg). Por lo tanto, a igual concentración de estos aminoácidos, la enzima va a descarboxilar preferentemente a Orn. Sin embargo, en los medios suplementados con Lys, se encontró que la concentración de Lys intracelular aumenta 71.2 y 42.5 veces en las células wt y *Δtpo1*, respectivamente, alcanzando niveles de Lys que la Spe1p puede detectar y descarboxilar a Cad. Por lo tanto, los datos cinéticos corroboraron lo observado en las células suplementadas con Lys (Olin-Sandoval, *et al*, enviado).

Con esta información se pudo concluir, que la Spe1p cataliza la conversión de Lys a Cad que, en condiciones de estrés oxidante, sugiere una adaptación y/o reprogramación del

metabolismo de este aminoácido para evitar la acumulación de Lys (Olin-Sandoval, *et al*, enviado).

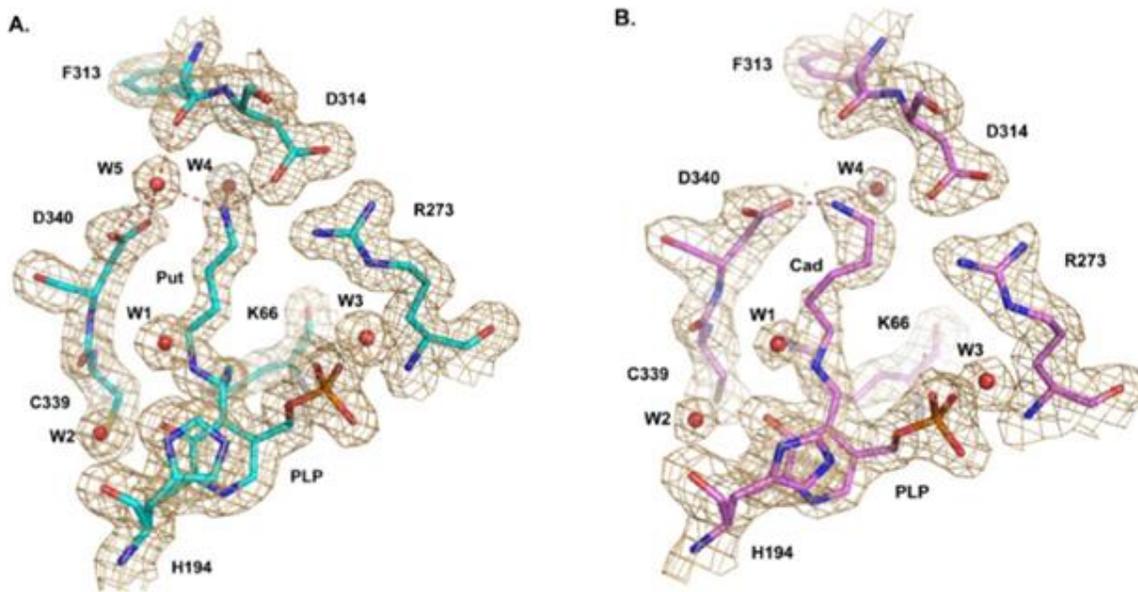
Sin embargo, a pesar de que la Spe1p ha sido ampliamente estudiada aún no se cuenta con su estructura cristalográfica con la cual se pueda proponer el mecanismo de catálisis de la enzima. Por otro lado, la ODC al ser considerada un blanco terapéutico, ha sido estudiada mediante biología estructural, por lo que se han obtenido estructuras cristalográficas de diversos organismos (Tabla 1).

Tabla 1. Estructuras cristalográficas de ODC en diferentes organismos con diferentes ligandos.

Organismo	Ligando	Resolución	Referencia
<i>Trypanosoma brucei</i>	DFMO	2.0 Å	Grishin, <i>et al</i> , 1999
<i>Homo sapiens</i>	Put	2.1 Å	Almrud, <i>et al</i> , 2000
<i>Homo sapiens/ Leishmania donovani</i>	APA/ Cad	3.0 Å	Dufe, <i>et al</i> , 2007
<i>Mus musculus</i>	L-Orn	1.6 Å	Kern, <i>et al</i> , 1999
<i>Entamoeba histolytica</i>	DFMO	2.87 Å	Satya Tapas, <i>et al</i> , 2013
<i>Lactobacillus 30a</i>	Put	3.0 Å	Momany, <i>et al</i> , 1995
<i>Selenomonas ruminantium</i>	Cad	2.5 Å	Sagong, <i>et al</i> , 2016
<i>Vibrio vulnificus</i>	Put	1.7 Å	Lee, <i>et al</i> , 2007
	Cad	2.14 Å	

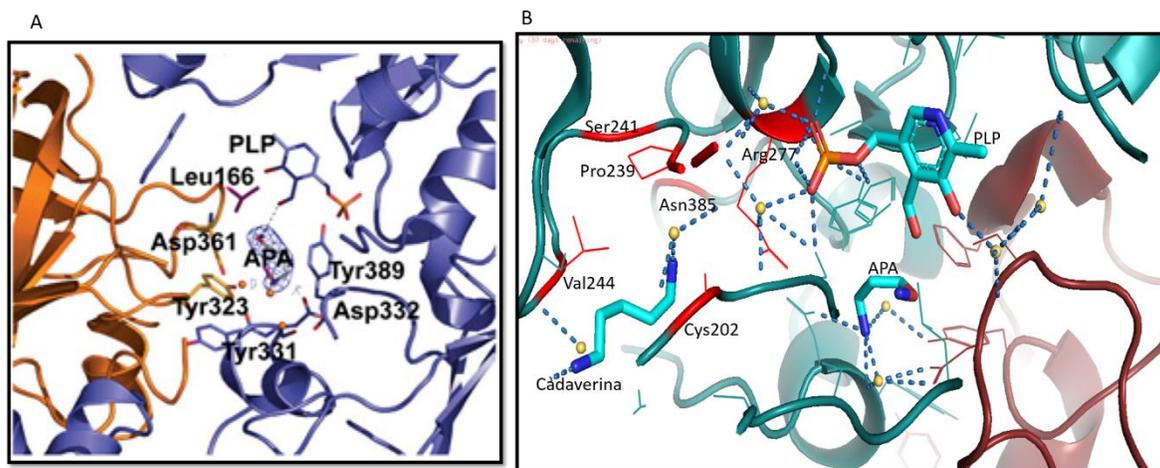
Las estructuras atómicas de ODC eucariontes y procariontes se han resuelto mediante cristalografía de rayos X. Las enzimas de *T. brucei* (Grishin, *et al*, 1999) y *E. histolytica* (Satya Tapas, *et al*, 2013) fueron obtenidas con DFMO debido a la importancia de este inhibidor para ser empleado como un fármaco contra las infecciones causadas por estos parásitos. También, se han descrito las estructuras de *Homo sapiens* (Almrud, *et al*, 2000; Dufe, *et al*, 2007) y *Mus musculus* (Kern, *et al*, 1999). La primera fue cristalizada con Put y APA en conjunto con Cad, y la segunda con L-Orn. Éstas son las únicas estructuras de mamíferos que se han obtenido. También se cuenta con las estructuras de los organismos procariontes *Lactobacillus 30a* (Momany, *et al*, 1995), *Selenomonas ruminantium* (Sagong, *et al*, 2016) y *Vibrio vulnificus* (Lee, *et al*, 2007). En las primeras dos estructuras el ligando empleado fue Put y Cad, respectivamente, la última se obtuvo con los dos ligandos anteriores, ambos ligandos se encuentran interactuando con dos residuos de ácidos aspárticos (D314 y D340), siendo ésta la única estructura obtenida hasta el momento con ambos ligandos (Lee, *et al*, 2007).

Lee y colaboradores, 2007 realizaron un análisis filogenético de enzimas descarboxilasas donde sugieren que diversas especies bacterianas también incluyen enzimas de tipo ODC y LDC. Sin embargo, en comparación con las ODC eucariontes, las diferencias de aminoácidos que se identificaron en la secuencia, forman un elemento clave en la especificidad del sitio activo, lo cual sugiere que podrían funcionar con sustratos nuevos. Se caracterizaron las descarboxilasas putativas de una variedad filogenéticamente diversa de bacterias para determinar su preferencia de sustrato. Las enzimas de especies dentro de los géneros Methanosarcina, Pseudomonas, Bartonella, Nitrosomonas, Thermotoga, y Aquifex mostraron una fuerte preferencia por Orn, mientras que la enzima de *Vibrio vulnificus* tiene especificidad dual tanto para Orn ( $K_m = 1.7$  mM) como Lys ( $K_m = 5.8$  mM). Estos resultados se comprobaron con la estructura atómica de *Vibrio vulnificus* que se resolvió en presencia de los ligandos Put y Cad, mostrando que ambas PAs se unen al mismo sitio (Figura 8) (Lee, *et al*, 2007).



**Figura 8. Mapas de densidad de electrones de la ODC de *Vibrio vulnificus*.** Sección A. Se muestran los aminoácidos con los que interactúa la Put. Sección B. Se observan los aminoácidos con los que interactúa Cad (Lee, *et al*, 2007).

Otra de las estructuras analizadas en la literatura, es la ODC de humano con APA, PLP (Figura 9, sección A) y Cad, la cual se empleó como aditivo para la cristalización (Figura 9, sección B) (Dufe, *et al*, 2007).



**Figura 9. Estructura terciaria de la ODC humana con PLP, APA y Cad.** Sección A. Se muestran los aminoácidos de la proteína que interactúan con PLP y APA. Sección B. Se muestran los aminoácidos de la proteína que interactúan con PLP, APA y Cad (Dufe, *et al*, 2007).

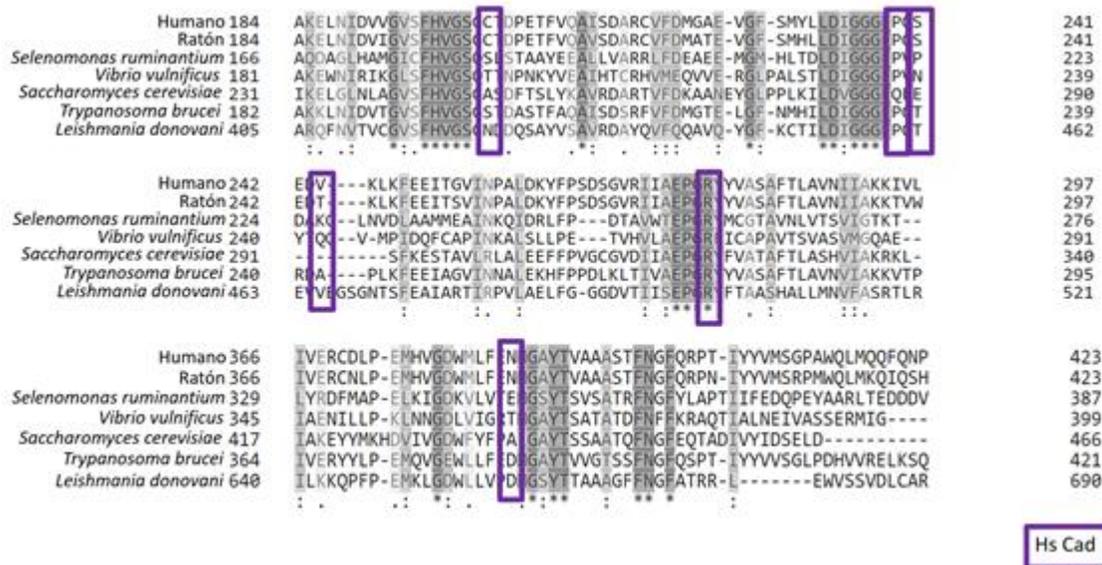
La estructura muestra que APA está unido al sitio de Orn muy cerca del PLP (Dufe, *et al*, 2007). La Cad, que se usó como un aditivo en la cristalización, se unió a la superficie





**Figura 11. Alineación múltiple de las secuencias de ODC en la región del sitio activo reportado para Humano.** Las secuencias de las ODC eucariontes (Ratón, *T. brucei*, Humano, *S. cerevisiae* y *L. donovani*) y procariontes (*V. vulnificus* y *S. ruminantium*) se muestran marcados en verde los aminoácidos L166, Y323, Y331, D332, D361 y Y389 que interactúan con APA, siendo el sitio de interacción de Orn, realizado en: UniProt Consortium (<https://www.uniprot.org/>).

La comparación muestra que al igual que el sitio activo de *Vibrio vulnificus*, los aminoácidos que interactúan con APA están ampliamente conservados. En la misma estructura de ODC humana, se reportan los aminoácidos que interactúan con Cad, por lo cual, se realizó también una alineación comparando estos aminoácidos (Figura 12).



**Figura 12. Alineación múltiple de las secuencias de ODC en el sitio de interacción con Cad reportado para Humano.** Las secuencias de las ODC eucariontes (Ratón, *T. brucei*, Humano, *S. cerevisiae* y *L. donovani*) y procariontes (*V. vulnificus* y *S. ruminantium*) se muestran marcados en morado los aminoácidos C202, P239, S241, V244, R277 y N385 que interactúan con Cad, realizado en: UniProt Consortium (<https://www.uniprot.org/>).

Comparando los sitios de unión a Cad, se muestra que no están conservados. Lo que sugiere que la unión de Cad en esta estructura es muy probablemente inespecífica, aseveración que ellos mismos hacen en el artículo que describe la estructura (Dufe, *et al*, 2007).

Los sitios activos en *V. vulnificus*, para Cad y Put, y de Humano, para APA u Orn, son notablemente similares, están ampliamente conservados sin importar si son células procariontes o eucariontes, por lo que al no estar conservado el sitio con el que interactúa la Cad en la ODC de humano es muy probable que esta interacción sea inespecífica, es decir, que solo se trate de un artefacto de la cristalización.

### 3. JUSTIFICACIÓN

A pesar de que la Spe1p puede descarboxilar a más de un sustrato en condiciones fisiológicas, no existe un estudio estructural que describa el mecanismo de la actividad dual de esta enzima. Debido a esto, es necesario identificar las condiciones para obtener cristales de la Spe1p recombinante con ambos sustratos, con buena calidad de difracción. En estudios posteriores, con estos cristales, se podrá analizar la estructura atómica de la proteína mediante cristalografía de rayos-X.

### 4. HIPÓTESIS

Es posible encontrar las condiciones óptimas para obtener cristales de la Spe1p recombinante con un patrón de difracción adecuado para posteriormente determinar la estructura atómica de esta enzima con los ligandos propuestos.

### 5. OBJETIVOS

#### 5.1 Objetivo general

Generar cristales de la Ornitina descarboxilasa recombinante de *Saccharomyces cerevisiae* (Spe1p) a partir de la búsqueda de las condiciones óptimas de cristalización.

#### 5.2 Objetivos particulares

- Generar en *Escherichia coli*, el sistema recombinante necesario para la sobreexpresión de la Ornitina descarboxilasa de *Saccharomyces cerevisiae*.
- Obtener a la Ornitina descarboxilasa recombinante de *Saccharomyces cerevisiae* (Spe1p) purificada.
- Establecer las condiciones de cristalización de la Spe1p apropiadas para el crecimiento de cristales con calidad de difracción.
- Evaluar la actividad dual de la Spe1p recombinante *in vitro*.

## 6. MATERIAL Y MÉTODOS

Para poder cumplir los objetivos propuestos, el gen de la Spe1p se amplificó a partir del ADN genómico de la levadura cepa W303 $\alpha$ . Posteriormente, se clonó y sobre-expresó en la bacteria *E. coli*. Después, se purificó mediante técnicas cromatográficas en un Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC). Finalmente, se indujeron cristales de la proteína purificada optimizando las condiciones de cristalización. Posteriormente la difracción de estos cristales se llevó a cabo en un difractómetro de laboratorio y en el sincrotrón (Laboratorio Nacional de Argonne) en la ciudad de Chicago, Illinois, USA. También se llevó a cabo la medición de la actividad de la Spe1p, por espectrometría de masas y espectrofotometría.

### 6.1 Método químico para generar células competentes

Se utilizaron las cepas Top10 y/o SoluBL21 de *E. coli*, las cuales se inocularon independientemente en placas con agar Luria Bertani (LB, Sigma) (2 % de LB), dejando incubar durante 18 h a 37 °C. Posteriormente, se tomaron 5 colonias de la placa y se colocaron en un tubo cónico (uno por cepa) con 20 mL de medio SOB (2 % de triptona, 0.5 % de extracto de levadura, 10 mM de NaCl, 2.5 de mM KCl), y se incubaron a 37 °C toda la noche. Se agregó el pre-cultivo a matraces Erlenmeyer de 500 mL estériles, con 250 mL de medio SOB++ (se suplementa el medio con 10 mM de MgCl<sub>2</sub> y 10 mM de MgSO<sub>4</sub>). Se incubó a temperatura ambiente (T. Amb.) hasta alcanzar una absorbancia a 600 nm (Abs600) entre 0.3-0.6 unidades. Posteriormente, se incubaron en hielo de 30 a 60 min y se centrifugaron a 3,000 rpm durante 10 min a 4 °C en el rotor JA-14. Una vez que se obtuvo la pastilla celular, ésta se resuspendió en 27 mL de solución amortiguadora CCMB80 (10 mM de CH<sub>3</sub>COOK pH 7.0, 80 mM de CaCl<sub>2</sub>, 20 mM de MnCl<sub>2</sub>, 10 mM de MgCl<sub>2</sub>, 10% de glicerol) por cada 250 mL de células. Se incubó nuevamente en hielo por 20 min y se centrifugó a 3,000 rpm durante 10 min a 4 °C en el rotor JA-14. Se resuspendió la pastilla en 4 ó 5 mL de solución amortiguadora CCMB80. Se midió la Abs600 de la solución de células, mezclando 800  $\mu$ L de medio SOC (preparar SOB y adicionar 20 mM de glucosa) y 200  $\mu$ L de la suspensión de células, ajustando a 1.0 y 1.5 de unidades, con solución amortiguadora CCMB80. Se

realizaron alícuotas de 100  $\mu\text{L}$  en tubos eppendorf de 0.6 mL que se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Para probar la competencia de las células, se tomó una alícuota de 100  $\mu\text{L}$  de células competentes y se transformó adicionando 10 pg del plásmido pUC19. Posteriormente, como control negativo, se tomó otra alícuota de 100  $\mu\text{L}$  de células y se transformó adicionando 10  $\mu\text{L}$  de agua estéril. La transformación se llevó a cabo mediante choque térmico, la cual se describe más adelante. Una vez que se concluyó la transformación se tomaron 4 cajas de agar LB con ampicilina (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), en una se sembraron 50  $\mu\text{L}$  del control negativo; en las 3 cajas faltantes, se adicionaron 10, 25 y 50  $\mu\text{L}$  de las células con pUC19 y se incubaron a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  toda la noche.

## 6.2 Transformación de células competentes por choque térmico.

Esta técnica se utiliza para insertar el ADN plasmídico en células bacterianas. Se basa en la permeabilización temporal de la membrana celular lo que permite la incorporación de material genético exógeno (Chen & Dubnau, 2004). Se agregaron 0.5-1.5  $\mu\text{g}$  de plásmido a 50  $\mu\text{L}$  de células competentes, después se mezcló y se incubó en hielo durante 30 min. Posteriormente, se incubó a  $42\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 35 s, e inmediatamente se colocó en hielo y se incubó por 2 min. A continuación, se adicionaron 400  $\mu\text{L}$  de medio SOB sin antibiótico y se incubó a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 1 h con agitación constante. Posteriormente, se centrifugó a 14,000 rpm por 5 min y se desechó el sobrenadante. Por último, se resuspendió la pastilla en aproximadamente 25  $\mu\text{L}$  de medio y se extendió en una placa de agar LB con ampicilina (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), se incubó toda la noche a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

## 6.3 Extracción de ADN genómico de levadura

El ADN genómico de la levadura se obtuvo creciendo las levaduras (cepa W303 $\alpha$ ) en 2 mL de medio YPD (1 % de extracto de levadura, 2 % de triptona y 2 % de glucosa) en baño de agua a T. Amb toda la noche. Se tomaron 1.5 mL del cultivo y se centrifugó a 14,000 rpm durante 1 min, la pastilla se resuspendió en 200  $\mu\text{L}$  de solución amortiguadora de lisis (2 % de triton X-100, 1 % de SDS, 100 mM de NaCl, 10 mM Tris con HCl pH 8.0, 1 mM de ácido

etilendiaminotetraacético (EDTA) pH 8.0). La suspensión de células se congeló en nitrógeno líquido durante 2 min, posteriormente se incubó en un baño de agua a 95 °C durante 1 min. Los dos pasos anteriores se repitieron y se agitó por 30 s vigorosamente. Después, se añadieron 200 µL de cloroformo y se mezcló por 2 min en vortex, seguido por una centrifugación a 14,000 rpm durante 3 min a T. Amb. Posteriormente, se tomó la fase acuosa y se transfirió a otro tubo con 400 µL de etanol absoluto previamente enfriado en hielo. Se dejó reposar 5 min a T. Amb. y se centrifugó nuevamente a 14,000 rpm durante 5 min, se retiró el sobrenadante, la pastilla se lavó con 0.5 mL de etanol al 70% y se dejó secar a T. Amb. durante 5-10 min. Finalmente, se resuspendió la pastilla de ADN genómico en 50 µL de solución amortiguadora TE (10 mM de Tris pH 8.0, 1 mM de EDTA pH 8.0) (Harju, *et al*, 2004). La cuantificación de ADN se llevó a cabo mediante el uso del espectrofotómetro NanoDrop Lite de Thermo Fisher Scientific, utilizando 2 µL de muestra de ADN.

#### 6.4 Electroforesis en gel de agarosa

En este trabajo se utilizaron geles de agarosa (Invitrogen) al 0.8 % w/v (8 g/L) disueltos en solución amortiguadora TBE 1x (89.2 mM de Tris, 89 mM de ácido bórico, 2.57 mM de EDTA). Durante la polimerización del gel se agregó SYBR Safe DNA Gel Stain a una concentración final de 0.01 % v/v. Las muestras se mezclaron directamente con solución amortiguadora de carga 10x (Invitrogen) justo antes de cargarlas en el gel. La electroforesis se llevó a cabo a 80 V durante 1 h en la solución amortiguadora TBE 1x. Los geles se observaron en un transiluminador UV Accuris con una longitud de onda UV de 302 nm, usando un filtro de 535 nm, se observaron las bandas de color verde. Se usó un marcador de pesos moleculares producido en el laboratorio de 100 pb. En el laboratorio se producen dos marcadores de pesos moleculares, empleando los plásmidos pPSU1 y pPSU2, cuando éstos se digieren con *Pst*I o *Eco*RV se producen marcadores de 100 pb y 1 kb. Éstos presentan una ventaja económica con respecto a los comerciales y son de más alta calidad que otros marcadores producidos en los laboratorios (Henrici, *et al*, 2017).

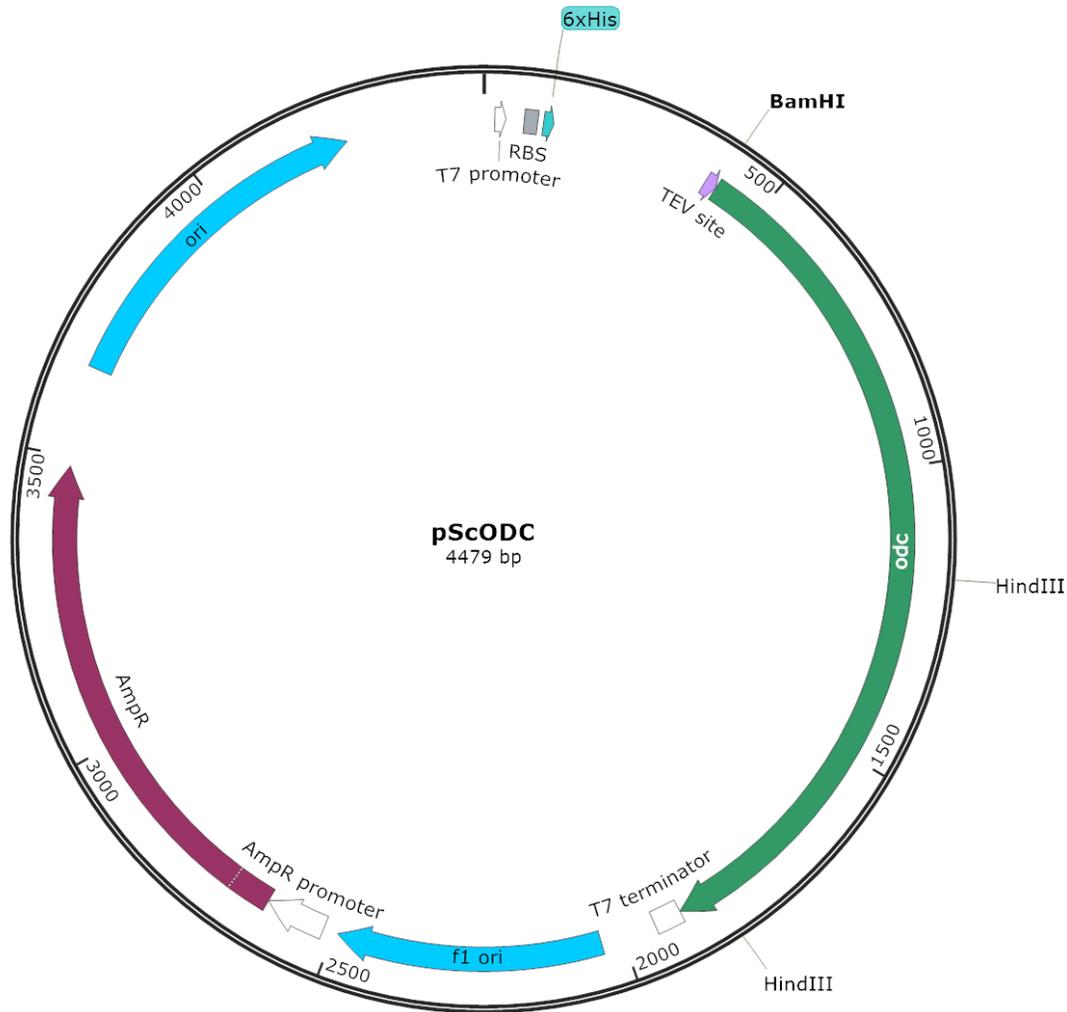
## 6.5 Extracción de ADN plasmídico por lisis alcalina

Para poder obtener el ADN de naturaleza plasmídica, las células de *E. coli* Top10 previamente transformadas con 0.5-1.5 µg del plásmido de interés, se crecieron en placas de agar LB con ampicilina (100 µg/mL) y se incubaron toda la noche a 37 °C. Después, se tomaron 5 colonias de la placa y se inocularon 3 mL de medio LB con ampicilina (100 µg/mL) y se incubaron a 37 °C toda la noche en agitación. Posteriormente, se tomaron 1.4 mL del cultivo bacteriano, se incubaron en tubos de 1.5 mL en hielo por 30 min y se centrifugaron a 14,000 rpm durante 1 min. Se eliminó el sobrenadante y se resuspendió la pastilla en 100 µL de solución alcalina I (50 mM de glucosa, 25 mM de Tris-HCl pH 8.0, 10 mM de EDTA pH 8.0) se mezcló vigorosamente. Posteriormente se añadieron 200 µL de solución alcalina II (0.2 N de NaOH, 1 % de SDS), se preparó al momento, se mezcló invirtiendo el tubo suavemente 5 veces. Los tubos se mantuvieron en hielo, y se adicionaron 150 µL de solución alcalina III (3 M de CH<sub>3</sub>COOK, 2 M de ácido acético glacial), se mezcló invirtiendo el tubo hasta la aparición de un precipitado blanquecino insoluble. Posteriormente, se incubó en hielo de 3 a 5 min y se centrifugó a 14,000 rpm durante 5 min. El sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo, cuidando de no resuspender la pastilla. Se añadió un volumen de fenol-cloroformo y se mezclaron las fases vigorosamente. Se centrifugó 2 min a 14,000 rpm y la fase acuosa se transfirió a un tubo nuevo, seguido de la adición de un volumen de isopropanol, los cuales se mezclaron e incubaron a T. Amb. por 2 min. Se centrifugó a 14,000 rpm durante 5 min, se retiró el sobrenadante y se colocó el tubo en posición invertida con el fin de evaporar el isopropanol. Se adicionó 1 mL de etanol al 70%, se centrifugó a 14,000 rpm durante 2 min, se retiró el sobrenadante y se dejó evaporar el remanente de etanol durante 5-10 min (se observó una pastilla de color blanco). Una vez que se evaporó todo el etanol, el ADN se resuspendió en 50 µL de solución amortiguadora TE o en agua milliQ estéril. El ADN plasmídico se almacenó a -20 °C.

## 6.6 Amplificación de ADN por PCR

Para clonar el gen de la Spe1p utilizamos el vector pRSET (Figura 13) el cual cuenta con un promotor T7, el cual es útil para una mayor expresión de la proteína de interés; un sitio de unión a ribosomas y un codón de inicio, los cuales son esenciales para la síntesis de

proteínas; una secuencia que codifica para una etiqueta de His en el N-terminal, la cual es útil para purificar a la proteína por cromatografía de afinidad con resina quelante de níquel (Life Technologies Corporation, 2010); y una secuencia que codifica para el sitio de corte para la enzima proteasa del virus del tabaco (TEV, del inglés Tobacco Etch Virus (TEV)) (Carrington & Dougherty, 1988; Phan, *et al*, 2002), la cual es una proteasa necesaria para retirar la etiqueta de His. También cuenta con un gen que le confiere resistencia a ampicilina (100 µg/mL) a la bacteria. El vector pRSET (Figura 13) permite la sobre-expresión de proteínas en la cepa SoluBL21 de *E. coli*. Esta bacteria es una variante genética (no caracterizada) de la cepa BL21 (DE3). Esta última cepa es capaz de expresar proteínas, sin embargo, una gran cantidad de estas proteínas no se pliegan correctamente, lo cual afectaría su actividad bioquímica, y no permitiría su estudio. Debido a esto surgió la necesidad de sobre-expresar proteínas recombinantes solubles y no tóxicas para el huésped. Llevando a cabo una evolución dirigida de la cepa BL21 (DE3) hasta obtener la cepa SoluBL21, la cual aumenta la probabilidad de obtener las proteínas recombinantes en forma soluble. Comparando las células BL21 (DE3) y SoluBL21, en estas últimas se puede observar que son capaces de resistir los efectos tóxicos causados por la proteína recombinante. Sin embargo, este mecanismo (aún desconocido) no está relacionado con el bloqueo de la expresión de la proteína recombinante, ya que hay un aumento significativo en la expresión de la proteína (Genlantis, 2017).



**Figura 13.** Mapa del plásmido pRSET con el gen de Spe1p (pScODC). Se muestran los componentes del plásmido y el gen de Spe1p (gen se muestra en color verde). Creado con Snap Gene.

Como ya se explicó anteriormente, se aisló el ADN genómico de *S. cerevisiae* y el plásmido pRSET, el cual provino de una biblioteca de plásmidos de nuestro laboratorio. Tanto el gen de Spe1p como el plásmido, se amplificaron por PCR usando las secuencias de oligonucleótidos que se muestran en la tabla 2.

Tabla 2. Oligonucleótidos utilizados para llevar a cabo la amplificación del gen de Spe1p y el vector pRSET. Se encuentran en sentido de 5' → 3'.

Nombre	Secuencia
FScO	GTGGATCCATGTCTAGTACTCAA
RScO	CAAGCTTTCAATCGAGTTCAGAG
FPIScO	CGATTGAAAGCTTGATCCGGCTG
RPIScO	CTAGACATGGATCCACCCTGGAAG

Utilizamos como templado 240 ng del ADN genómico extraído de *S. cerevisiae* para la realización del PCR utilizando el kit Phusion High-Fidelity (PCR Master Mix with HF Buffer, New England Biolabs). Para la amplificación del vector pRSET, se utilizaron 217 ng del ADN plasmídico. La mezcla de reacción se usó como indica el proveedor y el protocolo de amplificación se muestra en la tabla 3.

Tabla 3. Condiciones utilizadas para la amplificación del inserto y del vector.

Paso	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	98 °C	30 s	1
Desnaturalización Alineamiento Extensión	98 °C	10 s	35
	Gradiente 50, 62 y 70 °C	30 s	
	72 °C	30 s/kb	
Extensión final	72 °C	10 min	1

La enzima Phusion High-Fidelity es de muy alta fidelidad, debido a esta característica evita errores de apareamiento entre bases durante la amplificación, gracias a que posee un dominio que mejora la eficacia, aumenta la fidelidad y la velocidad. Tiene una tasa de error 50 veces menor que la Taq DNA polimerasa (New England BioLabs, 2018).

## 6.7 Ensamble *in vivo*

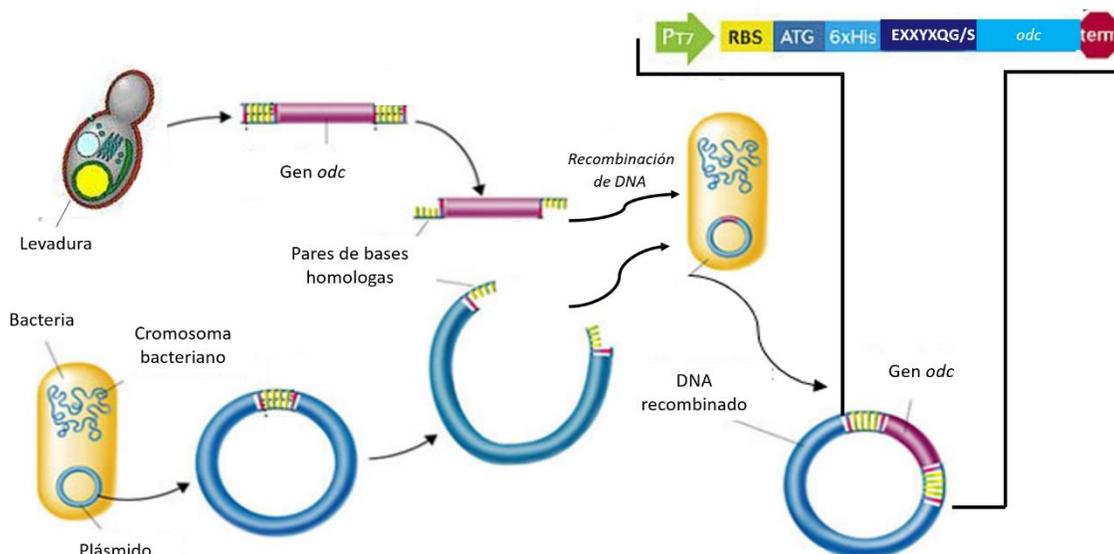
Para clonar el gen de la SpeI<sub>p</sub> en este plásmido, utilizamos la técnica de ensamble *in vivo* (Figura 14). Esta técnica consiste en la recombinación homóloga de los fragmentos de ADN, del vector con el inserto, donde el huésped bacteriano (*E. coli*) realiza la fusión de este ADN. Para esto no es necesario emplear cepas especializadas, se ha encontrado que es una ruta ubicua en esta bacteria, aunque el mecanismo de recombinación es aún desconocido. Esta técnica elimina la necesidad del uso de enzimas de restricción y de ligación, reduciendo el tiempo y el costo, es muy eficiente, ininterrumpida y no requiere de ningún kit especial (García-Nafría, *et al*, 2016).

En los pasos anteriores se obtuvo el amplificado del inserto y del vector, cada uno por separado. Para poder realizar el ensamble *in vivo* se llevó a cabo una digestión del ADN metilado que proviene de la bacteria, con la enzima *DpnI*, la cual reconoce el ADN metilado, cortándolo de manera inespecífica (New England BioLabs, 2018). Es importante llevar a cabo esta reacción ya que el ADN que se empleó como templado en la amplificación por PCR del vector fue obtenido de una bacteria, por lo que está metilado, y se requirió de esta digestión para que se lleve a cabo el ensamble *in vivo*. Al producto del PCR del vector se le adicionaron 0.3 µL de enzima, además de 5 µL de solución amortiguadora CutSmart 10x, para un volumen final 50 µL, esta mezcla de reacción se incubó a 37 °C por 1 h, y finalmente se detuvo la reacción incubando a 80 °C por 20 min.

Posteriormente, se realizó la transformación de células de la cepa Top10 de *E. coli* mediante la técnica de choque térmico, con las siguientes relaciones 1:1, 1:2, 1:5 y 1:10 del plásmido y del gen respectivamente.

Con la finalidad de corroborar que las colonias que crecieron en las placas contenían el vector con el inserto, se realizó la amplificación por PCR del gen de SpeI<sub>p</sub>, empleando los oligonucleótidos mencionados en la tabla 2, se usó como templado el plásmido extraído de estas colonias que se obtuvieron. El protocolo de amplificación que se utilizó es el que se

encuentra en la tabla 3, utilizando una temperatura de 50 °C para el alineamiento. La construcción final fue denominada pScODC (Figura 13).



**Figura 14. Ensamblaje *in vivo*.** A partir de las células de levadura de *S. cerevisiae* se extrajo el ADN genómico a partir del cual se obtuvo el gen de SpeI que se amplificó por PCR con pares de bases homólogas. Por otro lado, el plásmido pRSET se obtuvo de la bacteria *E. coli*, el cual también se amplificó por PCR que cuenta con pares de bases homólogas, pero complementarias al gen de SpeI. Ambos amplificados se introdujeron en células competentes de *E. coli* (Top10) por medio de una transformación por choque térmico. Posteriormente se obtuvo el plásmido pScODC el cual cuenta con un promotor, sitio de unión a ribosoma, codón de inicio, etiqueta de histidinas, un sitio de corte para TEV, el gen de SpeI y el codón de término. Modificada de Medelian Genetics. Recuperado de: <https://rhspreib.weebly.com/mendelian-genetics.html>

## 6.8 Perfiles de expresión

Células competentes SoluBL21 se transformaron con el plásmido pScODC. Al siguiente día, se tomaron 5 colonias de la placa, se inocularon en 1 mL de medio LB con ampicilina (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), cada una de manera independiente y se incubaron a 37 °C toda la noche en agitación. Para cada uno de los cultivos, se tomaron 10  $\mu\text{L}$  y se colocaron en 5 tubos con 1 mL de medio 2xYT (1.6 % de triptona, 1 % de extracto de levadura, 85 mM de NaCl) con ampicilina (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Los 5 tubos se incubaron durante 3 h con 30 min a 37° y se agregó 1 mM de Isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) a todos los tubos excepto al tubo 1, el cual sirvió como control negativo. Después, se incubó a la temperatura y tiempo correspondiente, en agitación de acuerdo a la tabla 4. Una vez terminado el tiempo de incubación, las células se centrifugaron a 14,000 rpm durante 2 min y se desechó el sobrenadante. Se agregaron 50  $\mu\text{L}$  de solución amortiguadora de la muestra (NüPAGE,

Invitrogen) con 10 mM de DTT para resuspender la pastilla, y se incubó a 95 °C durante 5 min. Por último, la muestra se analizó mediante un gel de acrilamida desnaturalizante.

Tabla 4. Condiciones de tiempo y temperatura para la incubación de las bacterias en los perfiles de expresión.

Tubo	Temperatura	Tiempo
1 (Control)	37 °C	Toda la noche
2	T. Amb.	3 h
3	T. Amb.	Toda la noche
4	37 °C	3 h
5	37 °C	Toda la noche

## 6.9 Electroforesis en gel de acrilamida

Esta técnica se empleó para visualizar la sobre-expresión de la Spe1p. Se utilizaron geles de acrilamida al 8% (Tabla 5). Las muestras de cada experimento se resuspendieron en solución amortiguadora de muestra (NüPAGE, Invitrogen) con DTT y se cargaron en los diferentes pozos en los geles de acrilamida. La electroforesis se llevó a cabo con un voltaje constante de 140 V durante 1 h, utilizando solución amortiguadora de ánodo (200 mM de Tris pH 8.4) y solución amortiguadora de cátodo (100 mM de Tris pH 8.25, 0.1 % de SDS, 100 mM de Tricina) (Schägger & Von Jagow, 1987). Al finalizar la electroforesis, el gel se tiñó con azul de Coomassie (3 mM de azul brillante de Coomassie, 45 % de metanol, 1.74 M de ácido acético glacial), durante 30 min con agitación constante. Se retiró la solución de tinción y se incubó en solución desteñidora (20 % de metanol, 15 % de ácido acético) durante 30 min con agitación constante o hasta la decoloración del gel. Finalmente se realizó la digitalización del gel.

Tabla 5. Soluciones para realizar geles de acrilamida.

Porcentaje de acrilamida	8 separador	4 concentrador
Acrilamida	1.6 mL	0.533 mL
Solución amortiguadora gel	2 mL	1 mL
Glicerol 80%	0.8 mL	-----
Agua	1.6 mL	2.466 mL
PSA 10%	30 $\mu$ L	40 $\mu$ L
TEMED	3 $\mu$ L	4 $\mu$ L

## 6.10 Sobreexpresión y purificación de la Spe1p

Células competentes SoluBL21 se transformaron con el plásmido pScODC, se tomaron 5 colonias de la placa y se inocularon en 10 mL de medio LB con ampicilina (100  $\mu$ g/mL), se incubaron a 37 °C toda la noche en agitación. Se añadieron los 10 mL de cultivo inicial en 500 mL de medio 2xYT con ampicilina (100  $\mu$ g/mL). Dicho cultivo se incubó a 37 °C con agitación constante hasta alcanzar una Abs600 0.6-0.8 unidades. A continuación, se agregaron 500 mL de medio 2xYT con ampicilina (100  $\mu$ g/mL), 1 mM de MgSO<sub>4</sub> y 1 mM de IPTG. Se incubó toda la noche a 37 °C con agitación constante. Posteriormente, el cultivo se centrifugó a 4,000 rpm por 30 min a 4 °C en un rotor JLA 8-1000. Se decantó el sobrenadante y la pastilla se almacenó a -80 °C para su posterior uso.

La pastilla obtenida se resuspendió en 12.5 mL de solución amortiguadora A (10 % de solución amortiguadora de lisis 10x (300 mM de Tris pH 7.5, 2 M de NaCl, 20 mM de MgCl<sub>2</sub>), 10 mM de imidazol pH 7.0, 2 mM de benzamidina, 800  $\mu$ M de fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF), 3.46 mM de  $\beta$ -mercaptoetanol), por cada litro de cultivo (las células se mantuvieron en hielo). A continuación, las células se lisaron mecánicamente usando un sonicador con 10 pulsos de 7 s por 35 s de descanso, incubando en un baño de hielo. El lisado se centrifugó en un rotor 70 Ti a 40,000 rpm por 30 min a 4 °C. La pastilla se desechó y el sobrenadante (clarificado celular) se filtró con una membrana de poro de 0.22  $\mu$ m (Millex-GV PVDF) y se inyectó a columnas IMAC con 12 mL de resina HisTrap (níquel; GE Healthcare) (4 columnas, 2 de 5 mL y 2 de 1 mL), se equilibraron previamente con

solución amortiguadora A con un flujo de 3 mL/min. El soporte de las columnas consiste en perlas de agarosa que actúa como quelante de los iones de níquel divalente ( $\text{Ni}^{2+}$ ). De esta forma los iones de  $\text{Ni}^{2+}$  quedan unidos por 4 enlaces a la columna, haciendo muy difícil su desprendimiento. A través de los dos enlaces restantes, se unió la etiqueta de His de la proteína (GE Healthcare Life Sciences, 2018).

Posteriormente, las columnas se lavaron con solución amortiguadora A, hasta que la absorbancia a 280 nm se estabilizó. Para eluir la proteína se utilizó imidazol, el cual compete por la unión al níquel, que se encuentra en la resina de las columnas, logrando así que se desprendiera la etiqueta de His, con lo cual se separó la Spe1p de las otras proteínas que se encontraban contenidas en el clarificado celular. Para esta elución, se empleó la solución amortiguadora B (10 % de solución amortiguadora de lisis 10x, 500 mM de imidazol pH 7.0, 2 mM de benzamidina, 800  $\mu\text{M}$  de PMSF, 3.46 mM de  $\beta$ -mercaptoetanol) realizando un gradiente de 5.5 volúmenes de columna del 0 % al 100 % de solución amortiguadora B. Se colectaron fracciones de 3 mL cada una desde el inicio del gradiente. Las fracciones se analizaron mediante un gel de poliacrilamida al 8 % y se logró identificar en cuales se eluyó la proteína Spe1p. Las fracciones con la proteína se juntaron y se eliminó el imidazol, ya que este compuesto inhibe la actividad de la enzima TEV, que es el siguiente paso de la purificación. Para eliminar el imidazol, se llevó a cabo un cambio de solución amortiguadora por concentración, el cual consistió en centrifugar la muestra con un Filtro Amicon Ultra-15 (con un corte de 30 kDa). Este procedimiento se realizó 3 veces, hasta que se obtuvo un volumen entre 500-1000  $\mu\text{L}$ . A la proteína resultante se le adicionaron 25 mL de solución amortiguadora TEV (20 % de solución amortiguadora TEV 5x (50 % de glicerol, 750 mM de KCl, 100 mM de Tris pH 7.5), 1 mM de DTT) y 100  $\mu\text{L}$  de enzima TEV (4 mg/mL), incubando toda la noche a 4 °C. La enzima TEV es una proteasa que se encarga de remover la etiqueta de 6 His presente en el N-terminal de la Spe1p. Su sitio de reconocimiento se encuentra entre la Spe1p y la etiqueta de 6 His. La enzima TEV se purificó en el laboratorio con el protocolo que se describe en el siguiente capítulo. Para identificar que toda la proteína Spe1p esté escindida de la etiqueta de histidinas, posterior a la incubación con la enzima TEV, la muestra se analizó mediante un gel de poliacrilamida 8 %. En caso de no ser así, se agregaron 25  $\mu\text{L}$  extra de enzima TEV (4 mg/mL) por cada litro de cultivo y se incubó por 2

h a T. Amb, se analizó nuevamente mediante un gel de poliacrilamida al 8 %. Una vez que la enzima ya no contó con la etiqueta de His, se inyectó nuevamente a una columna HisTrap a un flujo de 3 mL/min y se colectaron fracciones de 6 mL con la finalidad de separar la enzima Spe1p de la TEV, ya que ésta última, también contenía una etiqueta de 6 His lo que hizo posible la separación por cromatografía de afinidad. Después, se realizó una identificación de las fracciones que contenían la proteína de interés, haciendo una medición cualitativa usando el método de Bradford (Biorad). Las fracciones que contenían la Spe1p se concentraron realizando una filtración por centrifugación a través de un Amicon Ultra-15 (con un corte de 30 kDa) hasta que se obtuvo un volumen entre 500-1000  $\mu$ L.

Finalmente, la proteína concentrada se purificó por una cromatografía de exclusión molecular y fue inyectada a una columna Superdex200 Increase (10/300 mm; GE Healthcare) se pre-equilibró con solución amortiguadora TEV, a un flujo de 0.5 mL/min y se colectaron fracciones de 0.5 mL. Éstas se analizaron mediante un gel de poliacrilamida al 8 %. Se concentraron las fracciones con la proteína pura, a través de un Amicon Ultra-15 (con un corte de 30 kDa). Por último, se cuantificó la concentración de proteína por el método de Bradford, haciendo alícuotas de (50  $\mu$ L) a 10 ó 20 mg/mL y almacenándolas a -80 °C.

## 6.11 Purificación de la proteína TEV

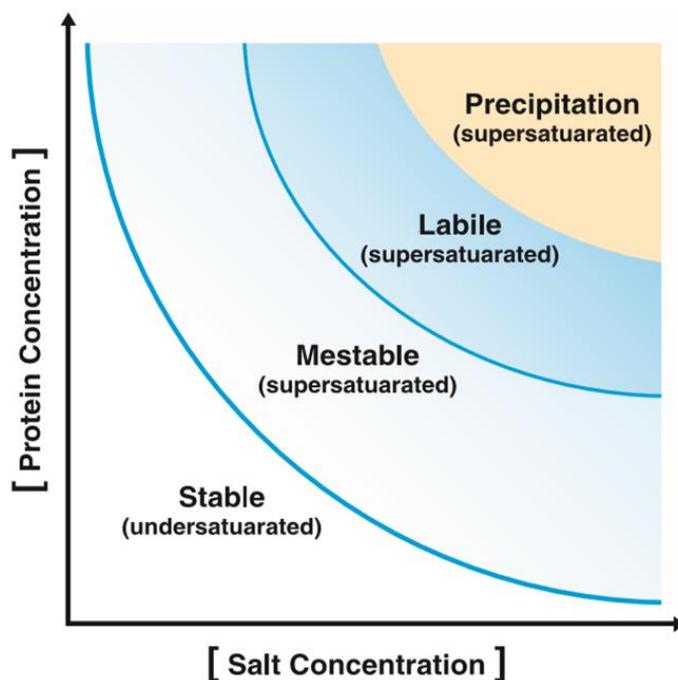
Células competentes SoluBL21 se transformaron con el plásmido pTEV, se tomaron 5 colonias de la placa y se inocularon en 10 mL de medio LB con ampicilina (100  $\mu$ g/mL), incubando a 37 °C toda la noche en agitación. Se añadieron los 10 mL de cultivo inicial en 500 mL de medio 2xYT con ampicilina (100  $\mu$ g/mL). Dicho cultivo se incubó a 37 °C con agitación constante hasta que se alcanzó una Abs<sub>600</sub> 0.6-0.8 unidades. A continuación, se agregó 500 mL de medio 2xYT con ampicilina (100  $\mu$ g/mL), 1 mM de MgSO<sub>4</sub> y 1 mM de IPTG. Se incubó toda la noche a 37 °C con agitación constante. Posteriormente, el cultivo se centrifugó a 4,000 rpm por 30 min a 4 °C en un rotor JLA 8-1000. Se decantó el sobrenadante y la pastilla se almacenó a -80° para su uso posterior.

La pastilla de las células se resuspendió en 12.5 mL de solución amortiguadora TGI (20 % de TGI 5x (100 mM de Tris, 100 mM de imidazol, 50 % de glicerol, a un pH 7.5), 1 mM de PMSF, 2 mM de benzamidina, 10 mM de  $\beta$ -mercaptoetanol), por cada litro de cultivo (las células se mantuvieron en hielo). A continuación, las células se lisaron mecánicamente usando un sonicador con 10 pulsos de 7 s por 35 s de descanso, se incubaron en un baño de hielo. Posteriormente, se adicionó NaCl (250 mM) y sulfato de amonio (25 % ó 1 M) hasta que se solubilizó completamente en agitación constante en un baño de hielo y se incubó durante 15 min. El lisado se centrifugó en un rotor 70 Ti a 40,000 rpm por 30 min a 4 °C. Se desechó la pastilla y el clarificado celular se filtró con una membrana con poro de 0.22  $\mu$ m (Millex-GV PVDF) y se inyectó a columnas IMAC de HisTrap (níquel; GE Healthcare) (4 columnas, 2 de 5 mL y 2 de 1 mL) (se equilibraron previamente con solución amortiguadora A (20 % de TGI 5x, 250 mM de NaCl, 10 mM de  $\beta$ -mercaptoetanol)) usando un flujo de 1 mL/min. Posteriormente, se lavaron las columnas con solución amortiguadora A, sin cambiar el flujo, hasta que la absorbancia fue estable a 280 nm. Para eluir la proteína se empleó un sistema isocrático con la solución amortiguadora B (20 % de TGI 5x, 500 mM de imidazol, 5 mM de  $\beta$ -mercaptoetanol, se ajustó el pH a 7.5) con un flujo de 3 mL/min. Se colectaron las fracciones cada min desde que se comenzó a eluir con la solución amortiguadora B, la última fracción se colectó por aproximadamente 2 min. Para identificar qué fracciones tenían la proteína de interés, se realizó un gel de poliacrilamida al 8 %. Las fracciones con la proteína se concentraron con la solución amortiguadora de diálisis (20 mM de Tris pH 7.4, 10 % de glicerol, 250 mM de NaCl, 5 mM de  $\beta$ -mercaptoetanol), a través de un Amicon Ultra-15 (con un corte de 30 kDa). La concentración de proteína se cuantificó por el método de Bradford. La proteína se almacenó a una concentración de 4 mg/mL a -80 °C.

## 6.12 Cristalización

La cristalización de proteínas, ácidos nucleicos y grandes complejos biológicos, como los virus, depende de la preparación de una solución sobresaturada de la macromolécula, en condiciones que no perturben significativamente su estado natural. La sobresaturación se produce mediante la deshidratación gracias a la adición de agentes precipitantes suaves tales como sales neutras o polímeros (Figura 15), y mediante la manipulación de diversos

parámetros que incluyen temperatura, fuerza iónica y pH. También son importantes en el proceso de cristalización los factores que pueden afectar el estado estructural de la macromolécula, tales como iones metálicos, inhibidores, cofactores u otras moléculas pequeñas convencionales. Se han desarrollado una variedad de enfoques que combinan el espectro de factores que afectan y promueven la cristalización, y entre los más utilizados se encuentran la difusión de vapor, la diálisis y la difusión líquido-líquido (McPherson & Gavira, 2013). En este trabajo se utilizaron dos técnicas del método de difusión de vapor, ‘microbatch’ y gota colgante; sin embargo, microbatch, fue la única que indujo la formación de cristales de buen tamaño de la Spe1p. Los éxitos en la cristalización macromolecular se han multiplicado rápidamente en los últimos años debido al uso de kits de cribado prácticos y fáciles de usar y gracias a la aplicación de la robótica de laboratorio (McPherson & Gavira, 2013).



**Figura 15. Diagrama de fases de cristalización de una macromolécula.** Se divide en 2 regiones, una de saturación y otra de sobresaturación. En la región de saturación o zona estable, las moléculas están en equilibrio entre la existencia de la fase sólida y la fase libre de la molécula. La región de sobresaturación se divide en 3 zonas metaestable, lábil y de precipitación. En la zona de precipitación o sobresaturación muy alta, las moléculas forman agregados amorfos. En la zona lábil o de sobresaturación media, ocurre la nucleación y crecimiento de pequeños cristales. En la zona metaestable o de sobresaturación baja, hay crecimiento de cristales con baja o nula formación de nucleación.

En la actualidad, una de las técnicas que puede producir mapas de densidad electrónica a resolución atómica de macromoléculas biológicas, es la difracción de rayos X. Como su nombre lo sugiere, la aplicación de la cristalografía de rayos X es absolutamente dependiente de los cristales de la macromolécula, de tamaño y calidad suficientes para permitir la recolección de intensidades de difracción precisas. La calidad de la imagen estructural final está directamente determinada por la calidad de la difracción, es decir, el tamaño y las propiedades físicas de la muestra cristalina; por lo tanto, el cristal se convierte en el eje de todo el proceso y el determinante final de su éxito (McPherson & Gavira, 2013).

El primer paso para cristalizar la proteína purificada es llevar a cabo la técnica de Microbatch con 2500 condiciones al azar, las cuales se preparan manualmente. Una vez que en alguna de estas condiciones se obtiene por lo menos un cristal, se toma esta condición para comenzar la optimización de los cristales.

#### 6.12.1 Preparación del licor madre

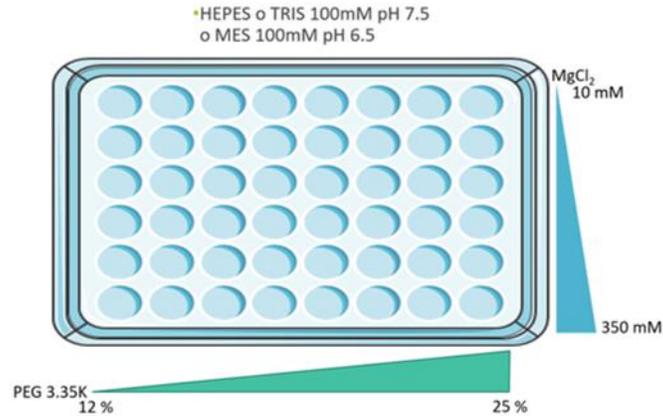
Las diferentes condiciones se diseñaron en la página web de Hampton Research ([https://hamptonresearch.com/make\\_tray.aspx](https://hamptonresearch.com/make_tray.aspx)). Una vez que se realizó el diseño, se prepararon manualmente las mezclas en placas de poliestireno con 96 pozos de 2 mL cada uno. En esta placa se prepararon 500  $\mu$ L de cada una de las soluciones con los componentes del licor madre (Tabla 6). Las cajas se almacenaron a 4 °C.

Tabla 6. Placas de licor madre, componentes y rango de concentraciones.

Licor madre	Solución amortiguadora (mM)			MgCl <sub>2</sub> (mM)	CaCl <sub>2</sub> (mM)	SrCl <sub>2</sub> (mM)	PEG (%)						
	HEPES pH 7.5	Tris pH 7.5	MES pH 6.5				200	400	1 K	2 K	2 K MME	3.35 K	
Placa 1	100	---	---	10—250	---	---	---	---	---	---	---	---	15-25
Placa 2	---	100	---	10 – 250	---	---	---	---	---	---	---	---	15-25
Placa 3	---	100	---	120 – 275	---	---	---	---	---	---	---	---	14-21
Placa 4	---	100	---	220 – 350	---	---	---	---	---	---	---	---	12 – 17
Placa 5	---	---	100	10 – 250	---	---	---	---	---	---	---	---	15-25
Placa 6	---	---	100	5 – 250	---	---	5-30	---	---	---	---	---	---
Placa 7	---	---	100	5 – 250	---	---	---	5-30	---	---	---	---	---
Placa 8	---	---	100	5 – 250	---	---	---	---	5-30	---	---	---	---
Placa 9	---	---	100	5 – 250	---	---	---	---	---	5-30	---	---	---
Placa 10	---	---	100	5 – 250	---	---	---	---	---	---	5-30	---	---
Placa 11	---	---	100	---	5 – 250	---	---	---	---	---	---	---	5-30
Placa 12	---	---	100	---	---	5 – 250	---	---	---	---	---	---	5-30
Placa 13	---	---	100	25-210	---	---	---	---	---	---	---	---	11-17.5
Placa 14	---	---	100	10 – 100	---	---	---	---	---	---	---	---	15-20

### 6.12.2 Microbatch

Para las pruebas de ‘microbatch’ se utilizaron placas de poliestireno de 60 pozos (Figura 16). La capacidad de cada uno de los pozos es de 9  $\mu$ L, donde se colocó la proteína (10 ó 20 mg/mL) y el agente precipitante en una relación 1:1 (1  $\mu$ L). Posteriormente se recubrió con una gota de aceite de parafina cada uno de los pozos y se adicionaron 2.5 mL de este mismo aceite en toda la placa. La temperatura se mantuvo fija a 18 °C.



**Figura 16. Placas de 60 pozos.** Caricatura de la placa y la forma en la cual se adicionó el licor madre de acuerdo con su composición (Imagen representativa).

### 6.13 Medición de la actividad de SpeIp por espectrometría de masas

La espectrometría de masas es una técnica de análisis que permite obtener iones a partir de moléculas orgánicas. Estos iones van a ser separados de acuerdo a su masa y su carga ( $m/z$ ). Esta técnica desempeña un papel importante en la identificación y monitoreo de biomarcadores, fármacos, proteínas, lípidos, etc. La sensibilidad y velocidad en espectrometría de masas es muy alta, siendo capaz de detectar bajas concentraciones en diferentes tipos de muestras. Este equipo cuenta con tres componentes principales: 1) fuente de ionización, 2) analizador de masas y 3) detector. Existen fuentes de ionización diferentes como ionización por electrospray (ESI), ionización química por presión atmosférica (APCI) y desorción/ionización láser asistida por matriz (MALDI). Cuenta con diferentes analizadores entre los que se encuentran resonancia del ciclotrón del ion mediante las transformadas de Fourier (FT-ICR), cuádruplo, tiempo de vuelo entre otros (Glish & Vachet, 2003). En este caso se empleó un equipo que cuenta con una fuente de ionización ESI y triple cuádruplo. El ESI es una técnica de ionización en la que, mediante la aplicación de un campo eléctrico, se produce la nebulización de una solución que contiene el analito. Los cuádruplos son sistemas multipolares que consisten en cuatro barras paralelas separadas entre sí; se les aplica un potencial combinado de corriente continua y de radiofrecuencia que crean en su interior un campo denominado cuádrupolar (Abián, *et al*, 2008). Debido a las ventajas analíticas, alta resolución y precisión de esta técnica, es que la hacen una herramienta

poderosa para la medición de diferentes analitos (Glish & Vachet, 2003) como los productos formados por Spe1p después de la descarboxilación de Orn y de Lys.

Se intentó determinar la actividad de la Spe1p midiendo la producción de Cad (PM = 102.2 g/mol) o Put (PM = 88.2 g/mol) por espectrometría de masas para lo cual fue necesario la preparación de una curva patrón de ambas PAs. A partir de una solución 500  $\mu$ M de cada PA (Put o Cad) se preparó un stock para cada concentración con el objetivo de agregar el mismo volumen en las soluciones que componen la curva patrón, y se disolvieron en 40 mM de HEPES a pH 7.5 o en agua MilliQ. Posteriormente, la curva patrón se preparó utilizando las siguientes concentraciones: 0.2, 0.4, 0.8, 1.6, 3.12, 6.25, 12.5 y 25  $\mu$ M en una mezcla, 80 % de metanol y 0.1% de ácido fórmico. La muestra se inyectó directamente en un ESI ionization 3200 Q-TRAP MS/MS (AB SYSTEM) en donde las PAs se detectaron en modo positivo.

Para la determinación de la actividad de ODC/LDC se preparó un medio de reacción que contenía: 40 mM de HEPES, 10 mM de Orn o Lys, 0.1 mM de EDTA, 0.1 mM de PLP. La reacción se inició adicionando 0.1 mg/mL de Spe1p recombinante. Se tomaron 40  $\mu$ L de la reacción cada minuto por 4 min y se añadió metanol frío para detener la reacción. Las muestras se incubaron en hielo seco durante 20 min y luego se centrifugaron a 14,000 rpm durante 10 min. Posteriormente se agregó 0.1 % de ácido fórmico. Por último, la muestra se inyectó directamente en un ESI ionization 3200 Q-TRAP MS/MS (AB SYSTEM).

## 6.14 Medición de la actividad de Spe1p por espectrofotómetro

La actividad de la Spe1p se determinó monitoreando la producción de dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ), mediante la reacción ácido-base entre el ácido carbónico formado por la disolución del  $\text{CO}_2$  en  $\text{H}_2\text{O}$ , y el rojo de fenol (Correa, 2002; Winum, *et al*, 2009; Díaz, 2018), espectrofotométricamente (Gene Quant 1300) a 557 nm (Winum, *et al*, 2009). El rojo de fenol tiene color rojo a un pH superior a 8.4, por debajo de este valor y hasta 6.8 el color que presenta es naranja-rojizo y vira a color amarillo a valores menores de 6.8 (Correa, 2002).

Para la determinación de la actividad de Spe1p por este método, se preparó 1 mL de mezcla de reacción, la cual contenía: 40 mM de HEPES pH 7.4, 1 ó 10 mM de Orn o 10 mM de Lys, 0.1 mM de EDTA, 0.1 mM de PLP y 0.02 mM de rojo de fenol. La reacción se inició mediante la adición de la Spe1p recombinante 0.5 y 1 mg/mL. La aparición de CO<sub>2</sub> se monitoreo durante 10 ó 20 min, tomando lecturas cada 10 s (Winum, *et al*, 2009).

## 7.0 RESULTADOS

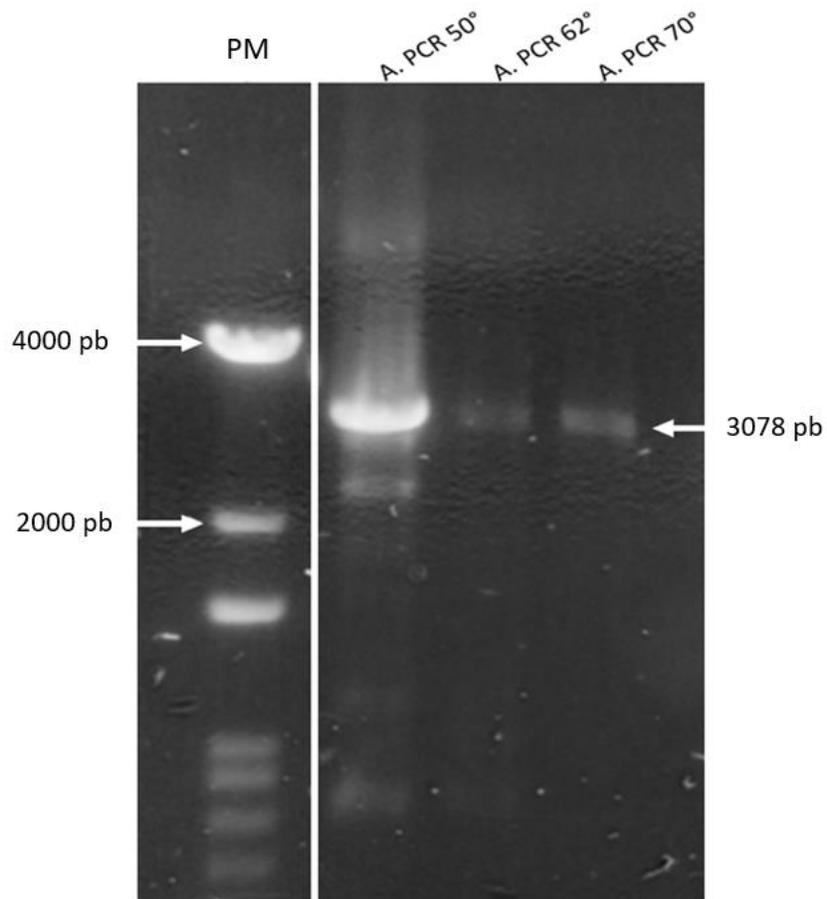
### 7.1 Extracción de ADN

Para poder realizar la amplificación del gen de Spe1p fue necesario extraer el ADN genómico de la levadura *S. cerevisiae* cepa W303 $\alpha$  (la cual fue donada por el Dr. Samuel Zinker Ruzal, del Departamento de Genética y Biología Molecular, del CINVESTAV-Zacatenco). La concentración del material aislado fue de 1615.8 ng/ $\mu$ L. El rendimiento de la extracción fue de 80.79  $\mu$ g por 1.5 mL de cultivo.

### 7.2 Clonación por ensamble *in vivo*

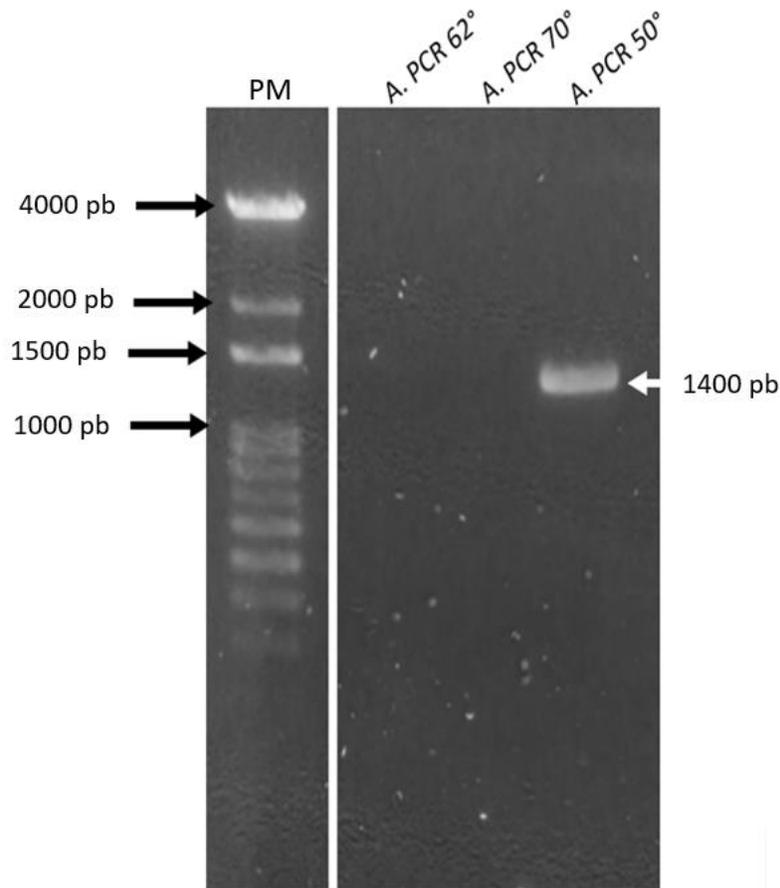
Esta técnica consistió en amplificar independientemente tanto el vector pRSET, como el gen de la Spe1p con secuencias homólogas que se ligaron dentro de la célula hospedero, en este caso la cepa Top10 de *E. coli*. El vector pRSET se amplificó a partir del ADN plasmídico, proveniente de *E. coli*, obtenido de una biblioteca de plásmidos en el laboratorio, empleando los oligonucleótidos FPlScO y RplScO. Se realizó un PCR con gradiente de temperatura de alineamiento con lo que se determinó la temperatura adecuada para lograr la

amplificación más eficiente. Se observó que la mejor temperatura de alineamiento fue de 50 °C (Figura 17).



**Figura 17. Productos de PCR del vector pRSET.** Electroforesis en un gel de agarosa al 0.8 %. En el carril izquierdo se muestran los marcadores de peso molecular para ADN de 100 pb, seguido de los productos amplificados por PCR a las temperaturas de alineamiento de 50, 62 y 70 °C, la flecha blanca de la derecha muestra las pb del vector.

Por otro lado, se realizó un PCR de gradiente para determinar la temperatura adecuada para el alineamiento de los cebadores y con ello lograr la amplificación más eficiente. El gen de la *Spe1p* se amplificó con una temperatura de alineamiento de 50 °C (Figura 18).



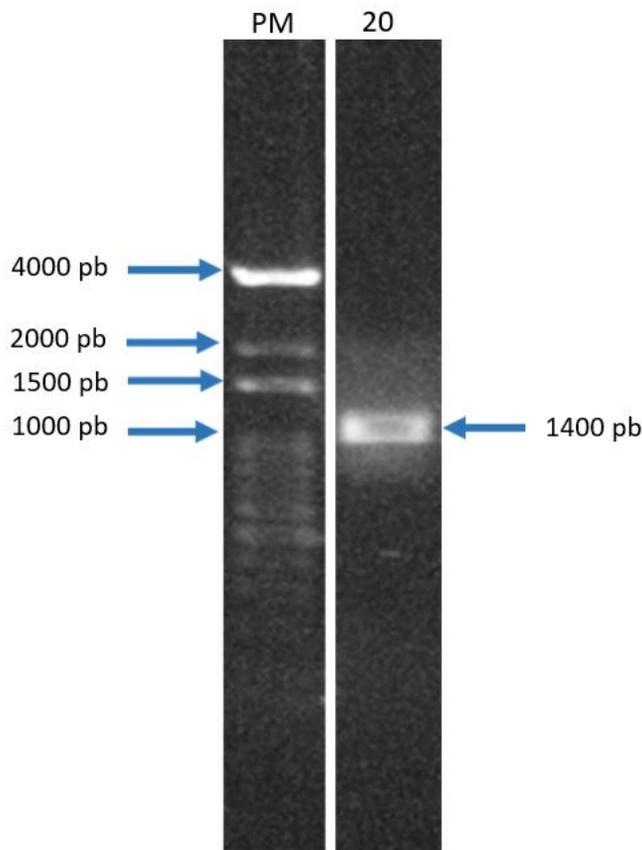
**Figura 18. Producto de PCR del inserto correspondiente al gen de *Spe1p*.** Se muestra un gel de agarosa al 0.8 %. En el carril izquierdo se muestran los marcadores de peso molecular para ADN de 100 pb, seguido de los amplificados por PCR a las temperaturas de alineamiento: 50, 62 y 70 °C. La flecha blanca de la derecha muestra las pb del inserto.

Una vez obtenido el amplificado del vector se realizó la digestión con *DpnI* para hidrolizar el ADN templado. Se cuantificó la concentración del ADN de ambos amplificados y posteriormente se realizó el ensamble *in vivo*.

Para esto, se transformaron células competentes de *E. coli* de la cepa Top10, con diferentes relaciones vector: inserto, 1:1, 1:2 y 1:5 (en  $\mu\text{L}$ ). De esta transformación se obtuvo el crecimiento de colonias en las tres diferentes cajas. Posteriormente, se seleccionaron 21 clonas de las tres cajas y se extrajo el plásmido de las 21 clonas.

Para determinar si todas las colonias contenían el inserto, se realizó un PCR empleando los plásmidos aislados por la técnica de miniprep y los oligonucleótidos que

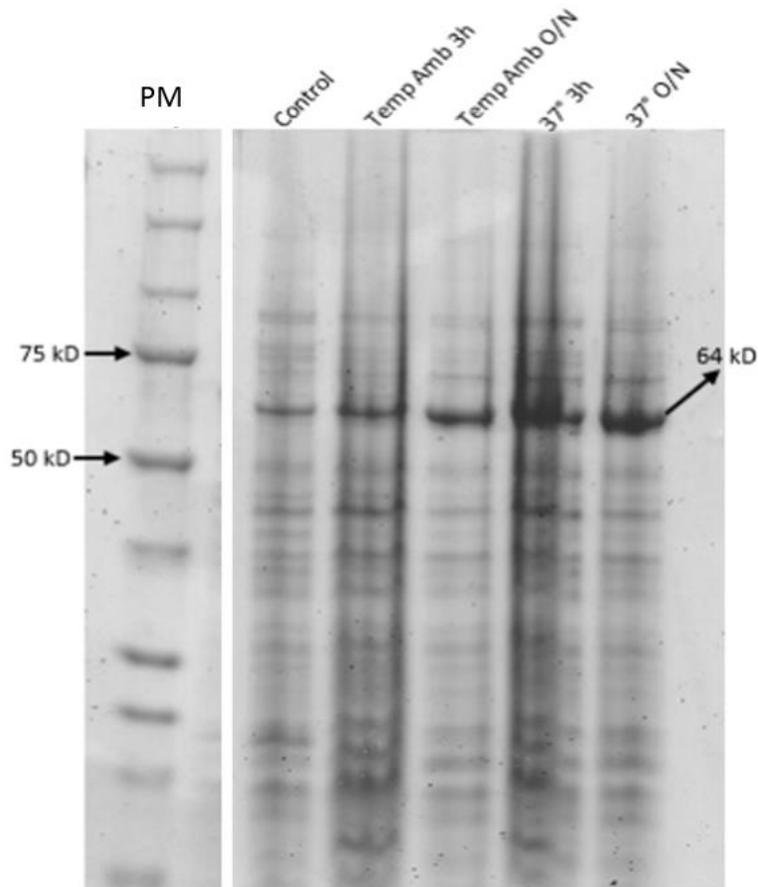
permiten amplificar el gen de *Spe1p*. En la figura 19, podemos observar la presencia de una banda de aproximadamente 1.4 kb, correspondiente al tamaño del inserto clonado. De las 21 clonas analizadas, 20 resultaron positivas a la amplificación del gen *SPE1*.



**Figura 19. Producto de PCR del inserto correspondiente al gen de *Spe1p*.** Se muestra un gel de agarosa al 0.8 %. En el carril izquierdo los marcadores de peso molecular para ADN de 100 pb, seguidos de una clona que cuenta con el inserto del gen de *Spe1p*. La flecha azul de la derecha muestra las pb del inserto (Imagen representativa).

### 7.3 Perfiles de expresión de la proteína *Spe1p*

La expresión de la proteína recombinante se realizó a T. Amb y a 37 °C. Para inducir la expresión de la proteína, se añadió IPTG (inductor de la síntesis de proteínas) y se incubó durante 3 h o toda la noche con agitación constante. Las células se cosecharon después de la incubación con IPTG y, mediante una electroforesis en un gel desnaturalizante de poliacrilamida al 8 %, se observó la síntesis de la proteína recombinante en el lisado celular total (Figura 20). Se observó la expresión de la proteína en forma cualitativa, ya que en cada carril se cargaron 10 µL de la muestra.



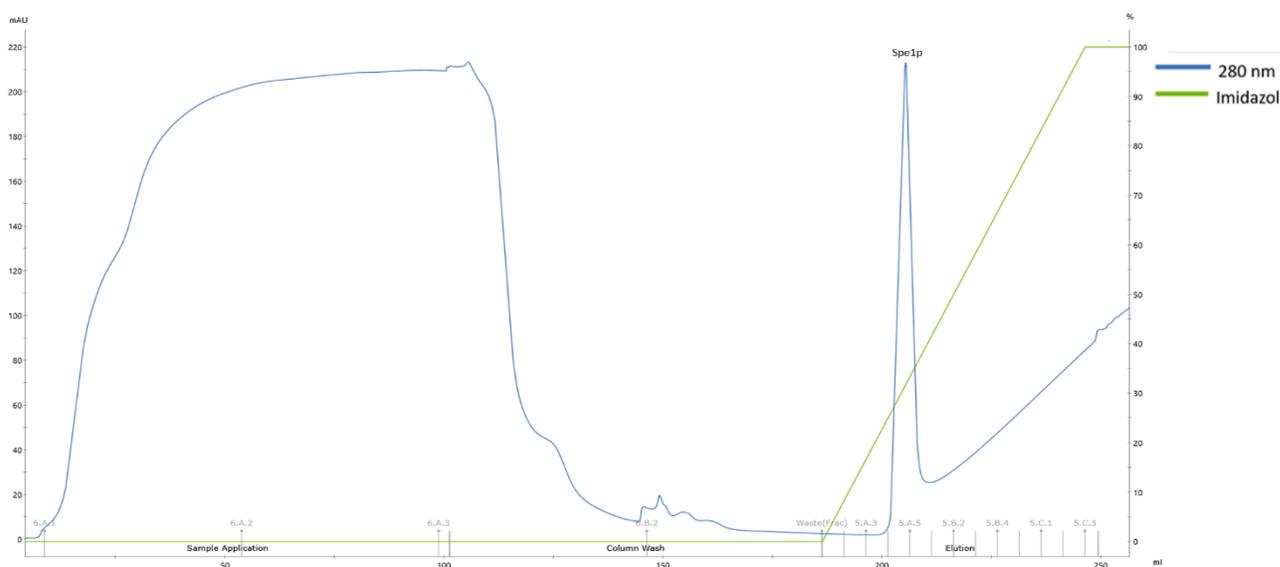
**Figura 20. Perfiles de expresión de la Spe1p recombinante.** En el primer carril de la izquierda se muestran los marcadores de peso molecular, seguido de la muestra control sin estímulo de IPTG; los siguientes 4 carriles contiene muestras de células que fueron estimuladas con IPTG. En el tercer y cuarto carril se indujo la proteína a temperatura ambiente 3 h y toda la noche, respectivamente; en el quinto y sexto carril la proteína se indujo a 37 °C 3 h y toda la noche, respectivamente. La flecha negra de la derecha muestra el peso molecular de la proteína Spe1p (Imagen representativa).

Se observó que la construcción de la Spe1p con la etiqueta de histidinas y el sitio de corte de la enzima TEV (64 kDa), se expresó en las cuatro condiciones, sin embargo, el tiempo y temperatura óptimos de inducción fue de 37 °C toda la noche. Posteriormente, se realizó la sobreexpresión de estas proteínas en cultivos bacterianos de 1 L de medio para posteriormente purificar la proteína.

#### 7.4 Purificación de la proteína Spe1p

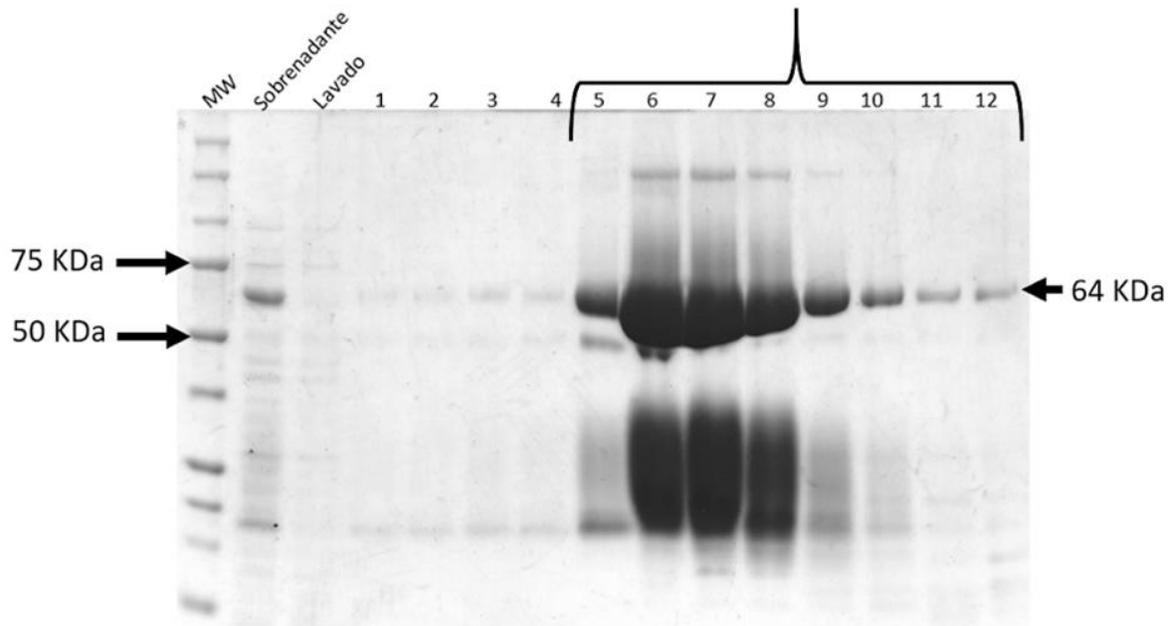
Se purificó a la Spe1p recombinante a partir de 4 litros de cultivo bacteriano, mediante una cromatografía de afinidad, empleando columnas acopladas a níquel (IMAC) y eluyendo

a la enzima mediante un gradiente continuo de imidazol de 10-500 mM. Esto se observa en el cromatograma de purificación (Figura 21), donde se analizó la absorbancia a 280 nm de los diferentes pasos de la purificación. Se muestra el pico (Spe1p) que corresponde a la señal de la proteína Spe1p (línea azul), cuya elución es dependiente de la concentración de imidazol (línea verde). Por otro lado, se muestra que la absorbancia a 280 nm no disminuyó por completo, es decir, no llegó a la línea basal. Este aumento se debe a que el imidazol en su estructura tiene dobles enlaces conjugados los cuales absorben a 280 nm, proporcionando la señal mostrada.



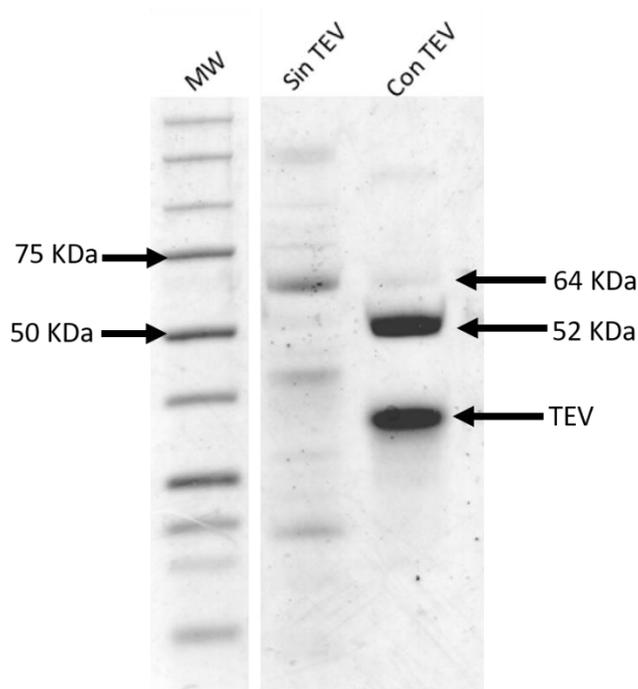
**Figura 21. Cromatograma del proceso de purificación por cromatografía de afinidad de la proteína recombinante Spe1p.** Para realizar la purificación, se inyecta la muestra en las columnas de afinidad (IMAC) y se obtienen una señal correspondiente a todas las proteínas que no se están adhiriendo a la columna (0-125 mL), una vez que se aplica el clarificado celular, se continúa el lavado de la columna (126-190 mL) con la solución amortiguadora A hasta que se estabiliza la señal, posteriormente se comienza el gradiente de imidazol (190-275 mL), obteniéndose el pico correspondiente a la proteína Spe1p (250 mM aproximadamente de imidazol). La línea azul corresponde a las unidades de absorbancia medidas a una longitud de onda de 280 nm, la línea verde corresponde al gradiente de imidazol que se realizó (0 y 100 % corresponden a 10 y 500 mM, respectivamente de Imidazol) (Imagen representativa).

Para determinar qué fracciones contienen a la Spe1p, se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes al 8 %, esto se muestra en la figura 22, donde están las doce fracciones obtenidas durante la purificación, de las cuales se concentraron las fracciones 5 a 12, ya que son las fracciones que contienen a la proteína Spe1p.



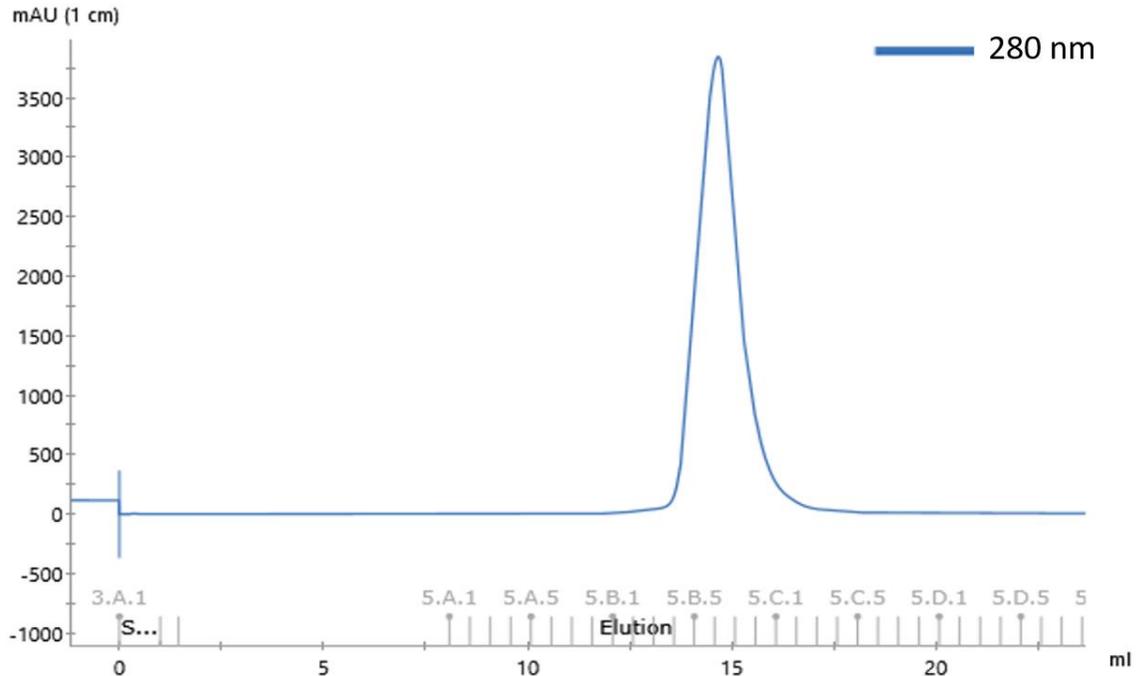
**Figura 22. Purificación de la Spe1p recombinante por cromatografía de afinidad.** En el primer carril de la izquierda se muestran los marcadores de peso molecular, seguido del sobrenadante o clarificado celular. Posteriormente, se encuentra el lavado (fracción que se obtiene antes de comenzar la elución), a continuación, están las 12 fracciones obtenidas de la elución. La flecha negra de la derecha muestra el peso molecular de la proteína Spe1p (Imagen representativa).

Se combinaron las fracciones 5 a la 12, y se cambió a la solución amortiguadora TEV. Posteriormente, estas fracciones se incubaron con la enzima TEV durante toda la noche a 8 °C para retirar la etiqueta de His de la Spe1p. En la figura 23 se muestra la digestión de la etiqueta de His por la enzima TEV en un gel de poliacrilamida al 8%.



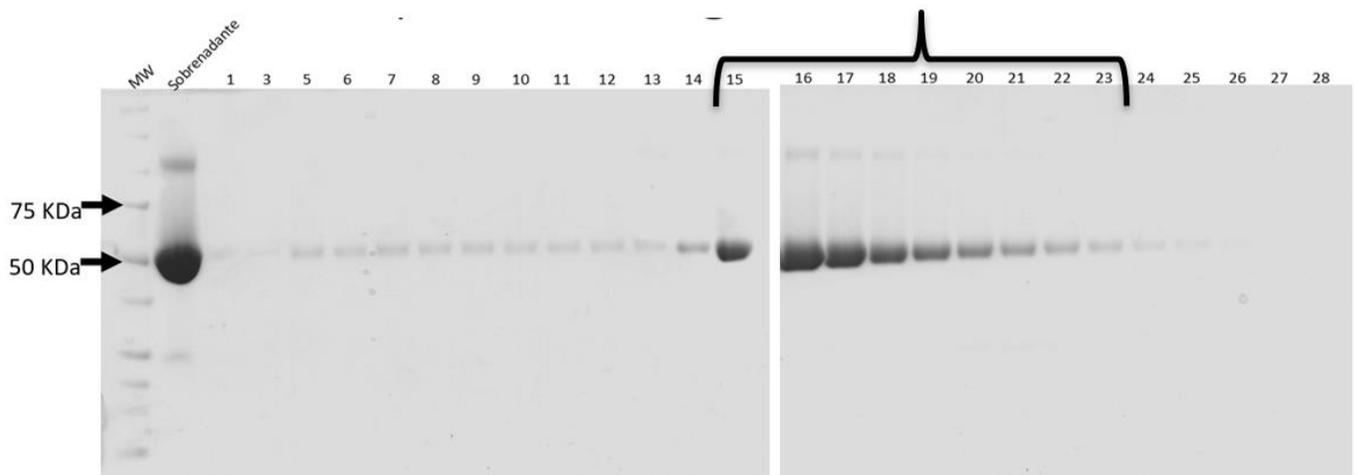
**Figura 23. Digestión de la proteína Spe1p empleando la enzima TEV.** En el primer carril de la izquierda se muestran los marcadores de peso molecular, seguido de la proteína Spe1p antes de ser sometida a la digestión, el siguiente carril corresponde a la enzima Spe1p una vez realizada la digestión (pierde 12 KDa). Las flechas negras de la derecha muestran a la enzima TEV, el peso molecular de la proteína Spe1p antes y después de la digestión (Imagen representativa).

Una vez que se cortó la mayor parte de la etiqueta de His de la Spe1p, se realizó una cromatografía de afinidad, empleando columnas con níquel (IMAC), para separar a la enzima TEV (la cual cuenta con una etiqueta de His) de la Spe1p. Posteriormente a la cromatografía de afinidad, las fracciones con enzima libre de etiqueta de His se concentraron de 500 a 1000  $\mu$ L, posteriormente realizamos una cromatografía de exclusión molecular. En la figura 24 se muestra el cromatograma de elución de la cromatografía de filtración en gel utilizando la columna Superdex 200 Increase (GE), donde se analizó la absorbancia a 280 nm de las fracciones de purificación mostrándose un solo pico que corresponde a la enzima Spe1p.



**Figura 24. Cromatograma del proceso de purificación por cromatografía de exclusión molecular de la proteína recombinante Spe1p.** Se inyecta la muestra en el equipo y posteriormente se comienza la separación de la proteína Spe1p por peso molecular. La línea azul corresponde a las unidades de absorbancia a 280 nm (Imagen representativa).

Posteriormente a la cromatografía de exclusión molecular, se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida al 8% para determinar las fracciones que contenían a la Spe1p (Figura 25).

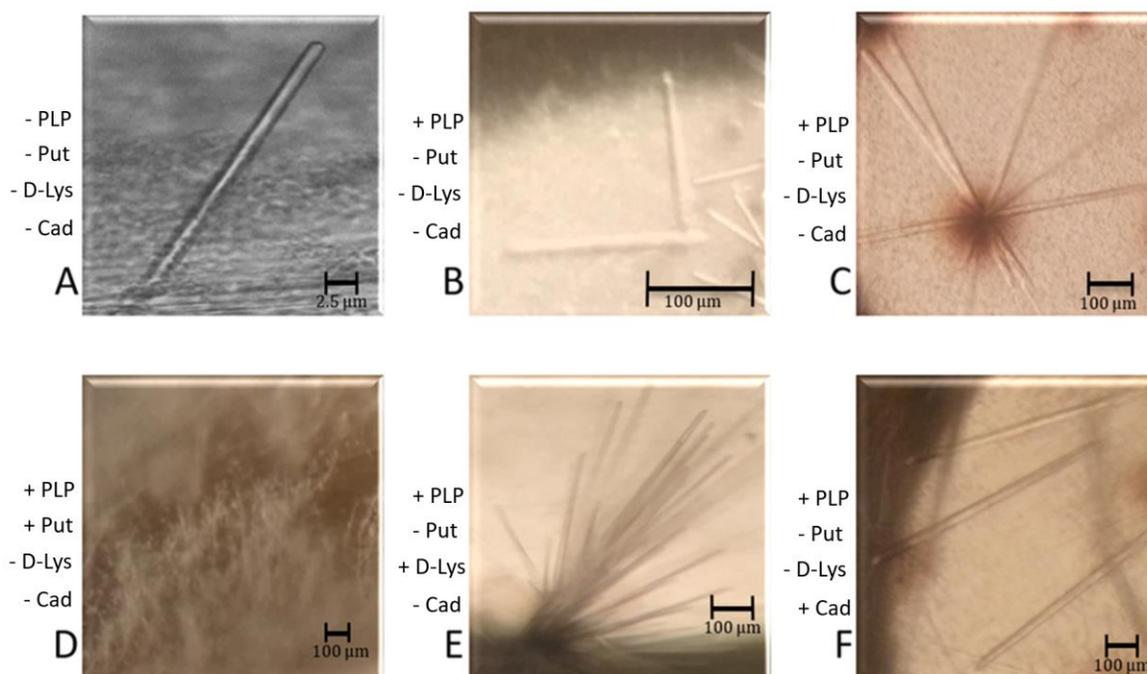


**Figura 25. Purificación de la Spe1p recombinante por cromatografía de exclusión molecular.** En el primer carril de la izquierda se muestran los marcadores de peso molecular, seguido de las fracciones obtenidas de la proteína Spe1p con un peso molecular de 52 KDa (Imagen representativa).

Posteriormente, las fracciones 15-23 se concentraron mediante una filtración por centrifugación hasta tenerla a una concentración entre 10 ó 20 mg/mL. La proteína se cuantificó utilizando la técnica de Bradford. El rendimiento de la purificación fue de 0.3 a 3 mg de proteína Spe1p por litro de cultivo (22 purificaciones).

## 7.5 Cristalización de la Spe1p por microbatch

Los cristales de la proteína Spe1p se obtuvieron utilizando la técnica de Microbatch (ver metodología). La cristalización se llevó a cabo, en presencia y ausencia de la coenzima PLP, así como de diversos ligandos de la enzima (Figura 26).



**Figura 26. Cristales de Spe1p obtenidos por el método de microbatch a diferentes condiciones de cristalización.** En la sección A, C, D, E, F la concentración de la proteína Spe1p es de 10 mg/mL; en la sección B la concentración de la Spe1p es de 20 mg/mL. - PLP no contiene PLP; + PLP contiene 0.2 mM de PLP; - Put no contiene Put; + Put contiene 20 mM de Put; - D-Lys no contiene D-Lys; + D-Lys contiene 25 mM de D-Lys; - Cad no contiene Cad; + Cad contiene 25 mM de Cad (Imágenes representativas).

Los cristales obtenidos fueron de forma prismática hexagonal. El tamaño y grosor de éstos varió dependiendo de las diferentes soluciones de precipitación y el ligando. Las mejores condiciones de cristalización hasta el momento fueron MES 100 mM pH 6.5, MgCl<sub>2</sub> 62 mM, PEG 3.35K 16.054 %, PLP 0.2 mM y Cad 25 mM (Figura 26, sección F).

## 7.6 Determinación de la actividad de Spe1p

### 7.6.1 Cuantificación de Cadaverina y Putrescina por espectrometría de masas

Se utilizó espectrometría de masas para medir la actividad de la Spe1p mediante la cuantificación de sus productos de descarboxilación, Put y Cad. Para esto fue necesario primero optimizar y determinar el patrón de fragmentación de cada una de las moléculas, de manera independiente, como se describe en la metodología. La muestra del estándar de PA resuspendido en agua, se inyectó directamente en el espectrómetro de masas y se realizó un escaneo de iones en modo positivo de las moléculas presentes en la muestra (Figura 27 y 28).

+Q1: 10 MCA scans from Sample 8 (Cad 25 Q1POS) of 20180307.wiff (Turbo Spray)

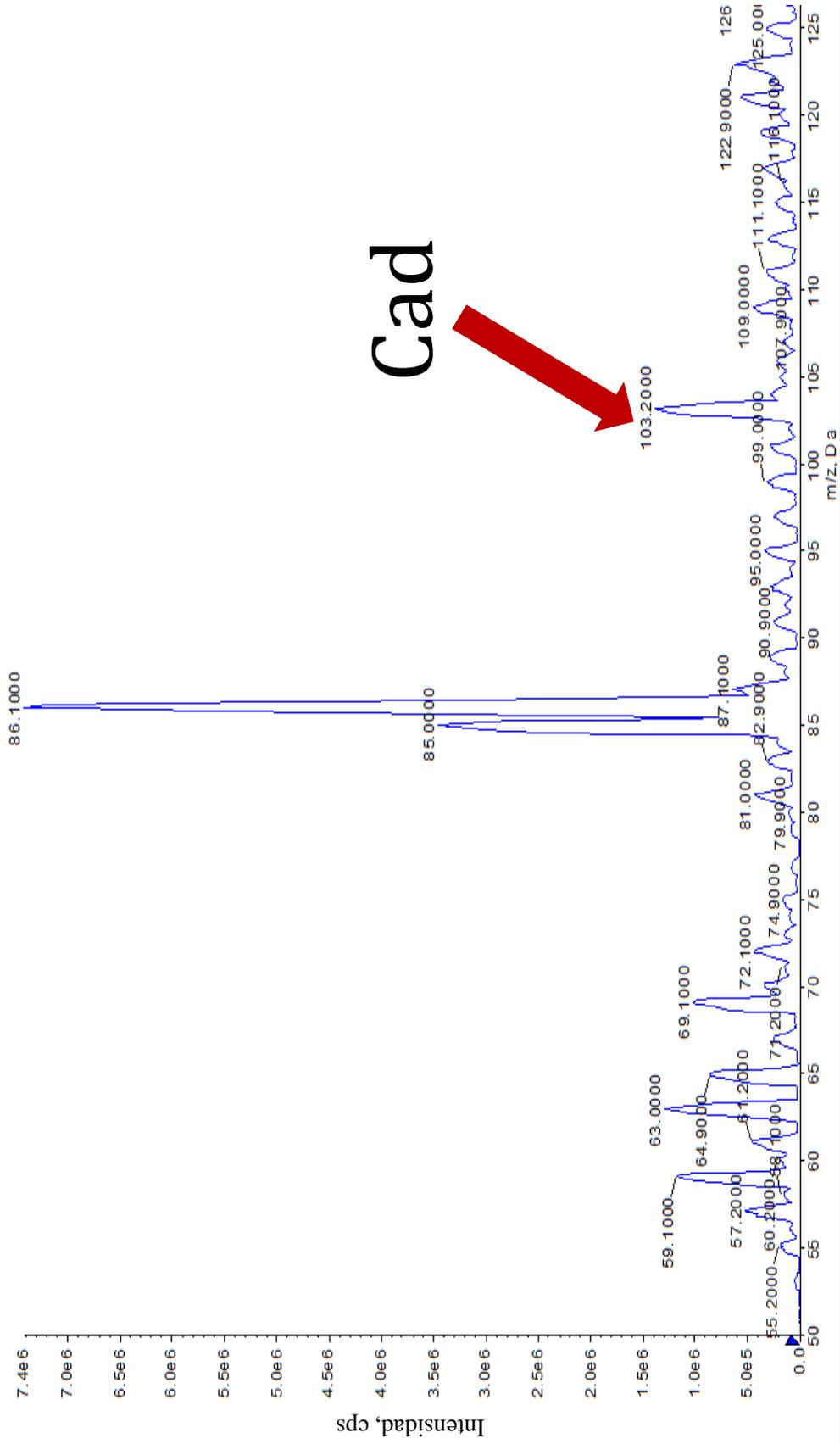
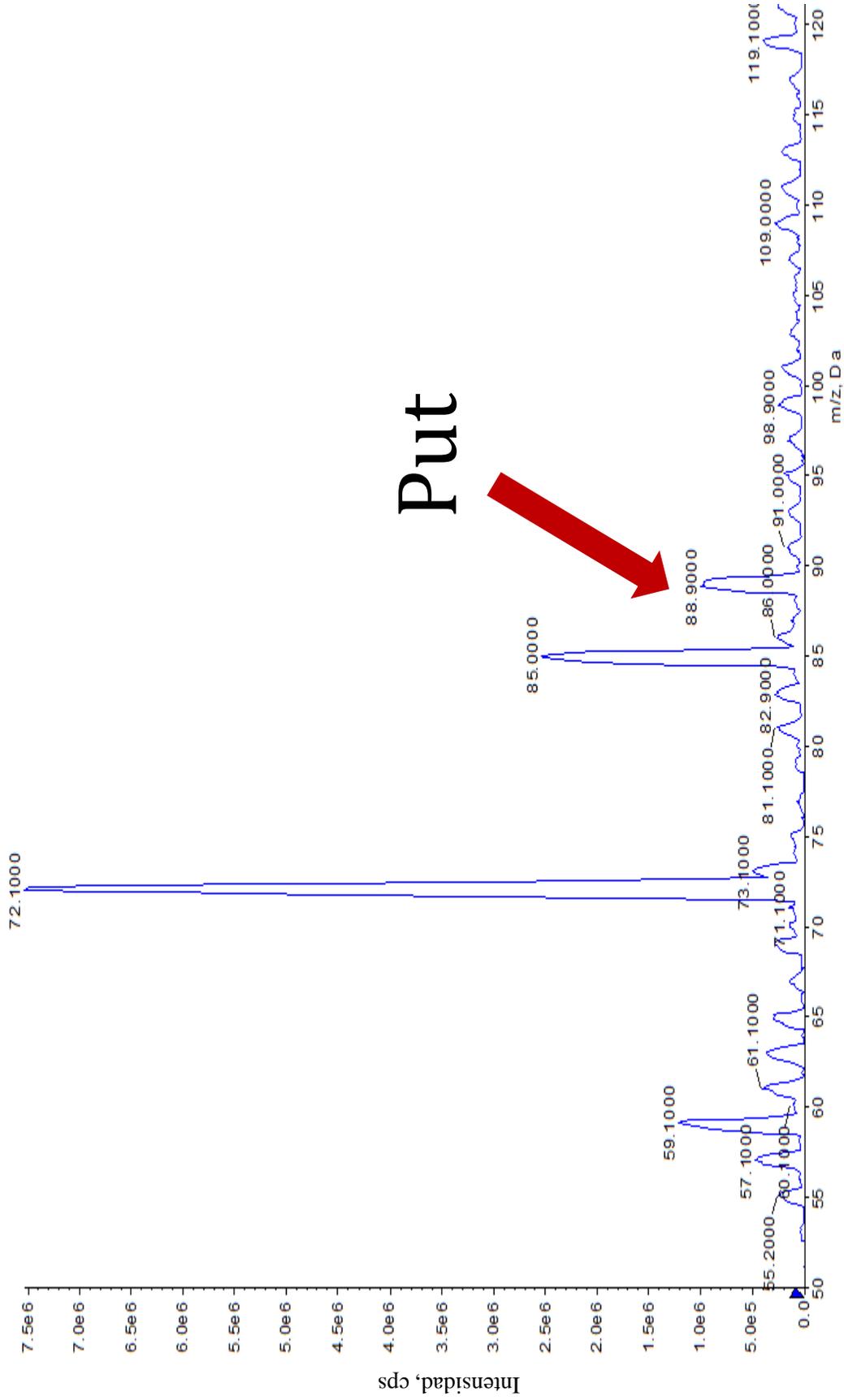


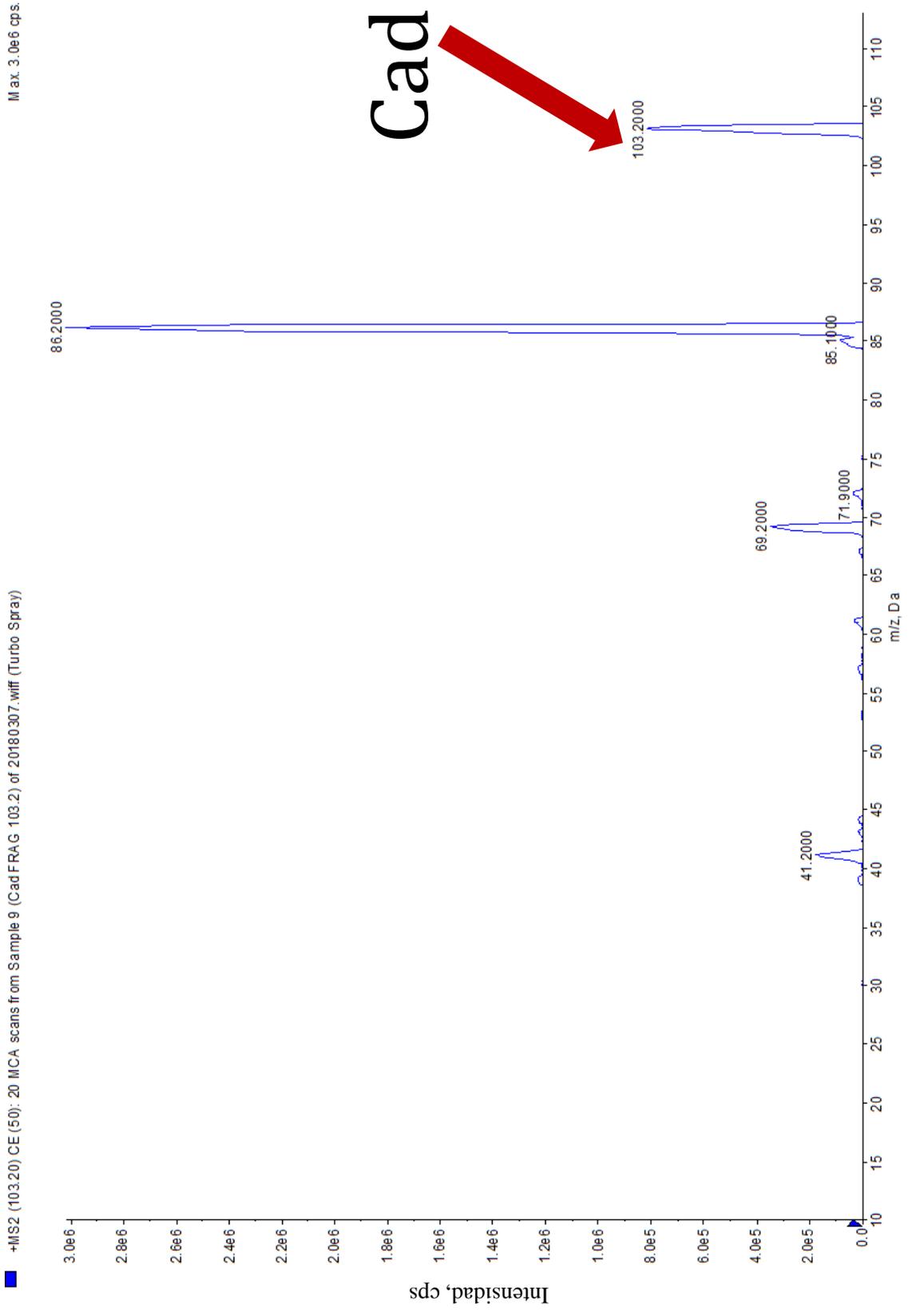
Figura 27. Espectro de masas de la Cad a una concentración de 25  $\mu\text{M}$ . Escaneo de iones obtenido en modo positivo, para determinar cuál de las señales pertenece al ion específico de Cad (Imagen representativa).

+Q1: 10 MCA scans from Sample 24 (Put 25 Q.1POS) of 20180307.wiff (Turbo Spray)

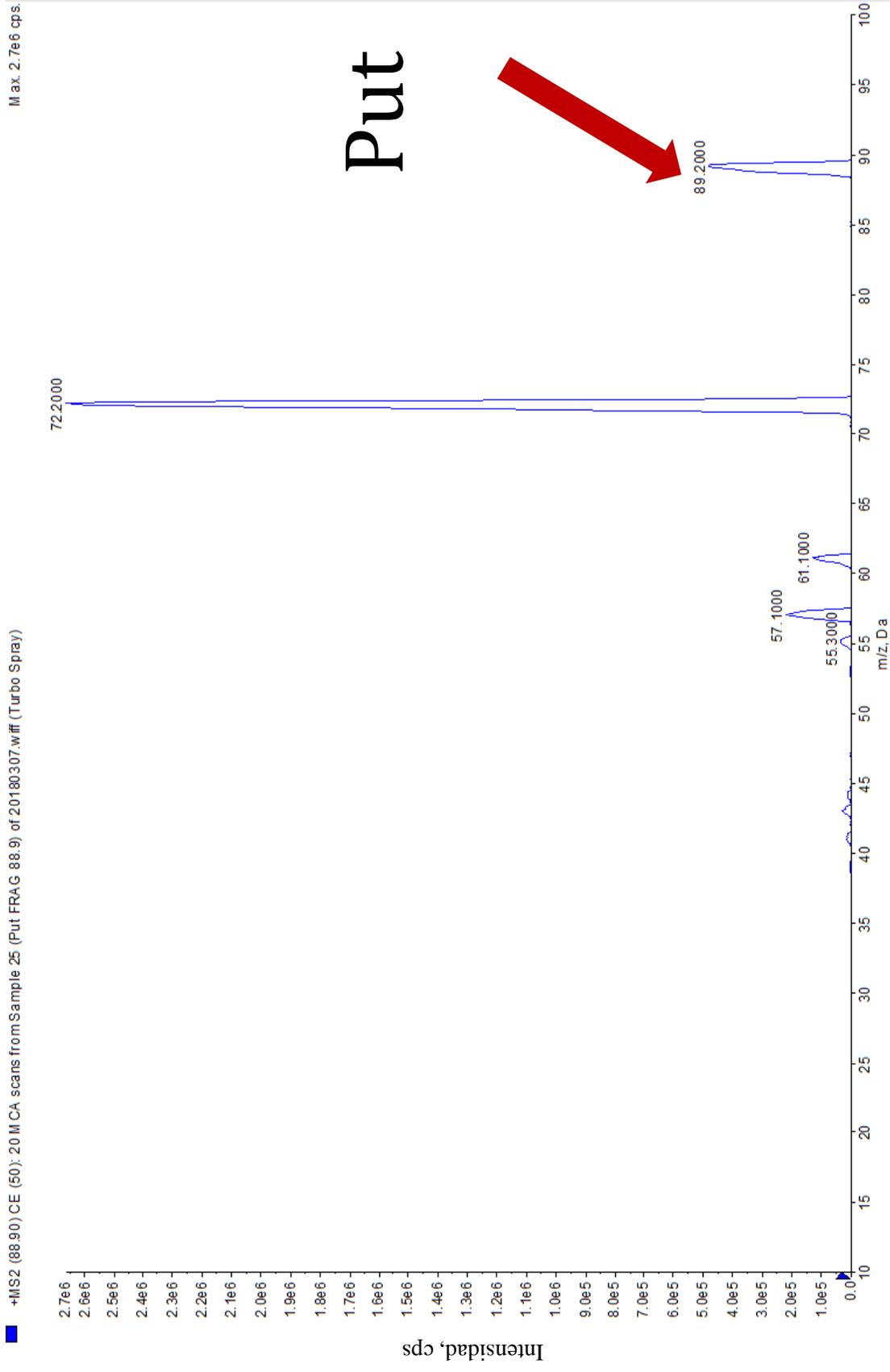


**Figura 28. Espectro de masas de Put a una concentración de 25  $\mu$ M.** Escaneo de iones obtenido en modo positivo, para determinar cuál de las señales pertenece al ion específico de Put (Imagen representativa).

Una vez que se identificaron los iones específicos de Cad y Put en modo positivo, se realizó la fragmentación de estos iones (Figura 29 y 30), lo que nos permitió identificar el fragmento mayoritario de la Cad o Put. De ambas moléculas se determinó que el patrón de fragmentación para Put era:  $m/z = 88.9 \rightarrow 72.1$  y para Cad:  $m/z = 103.2 \rightarrow 86.2$ .



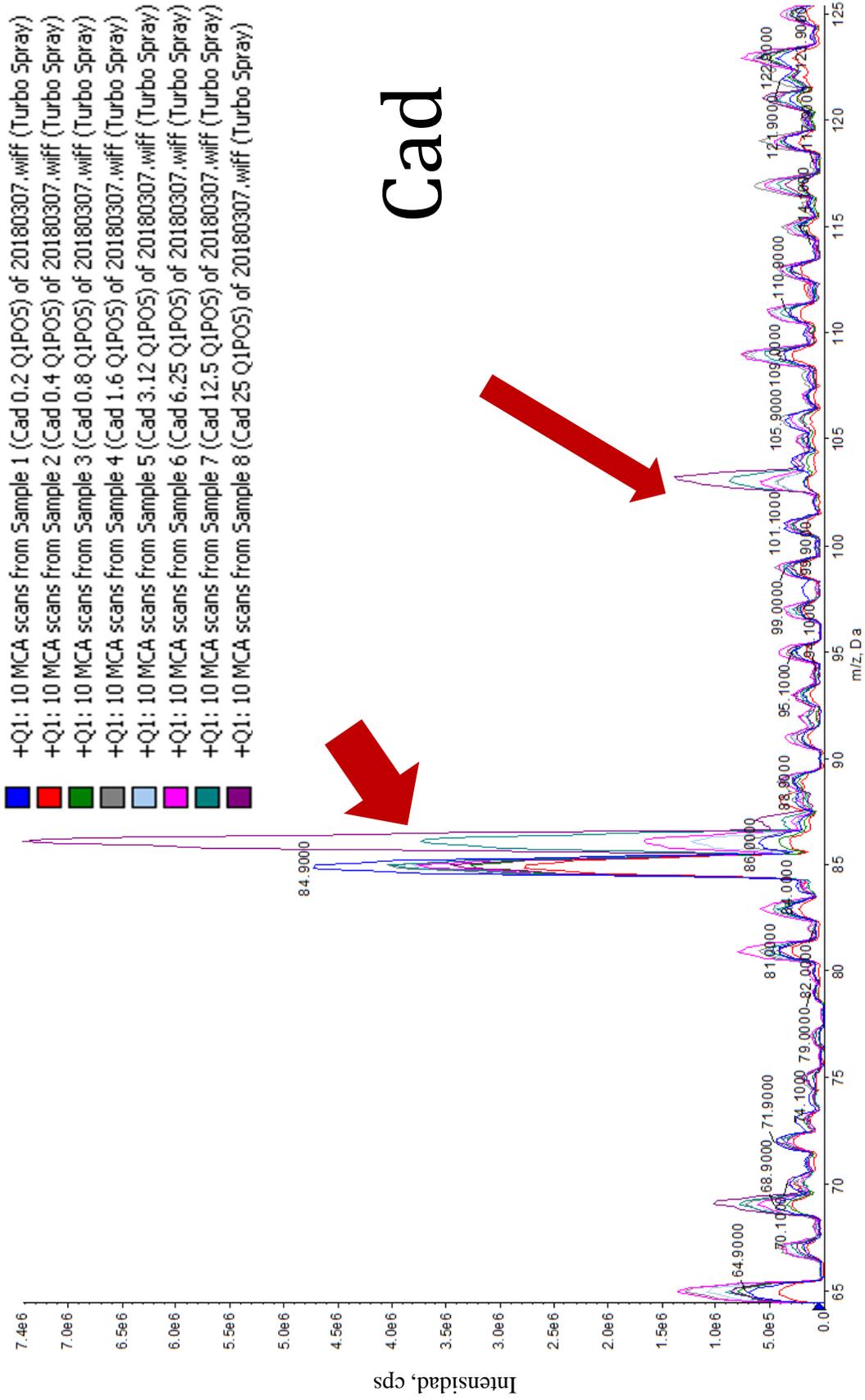
**Figura 29. Espectro de masas de la fragmentación de Cad a una concentración de 25  $\mu$ M.** Fragmentación del ion específico de Cad ( $m/z$  103.2), obtenido en modo positivo, se muestra la señal de un fragmento con una relación masa carga de 86.2 Da.



88 **Figura 30. Espectro de masas de la fragmentación de Put a una concentración de 25  $\mu$ M.** Fragmentación del ion específico de Put ( $m/z$  89.2), obtenido en modo positivo, se muestra la señal de un fragmento con una relación masa carga de 72.2 Da.

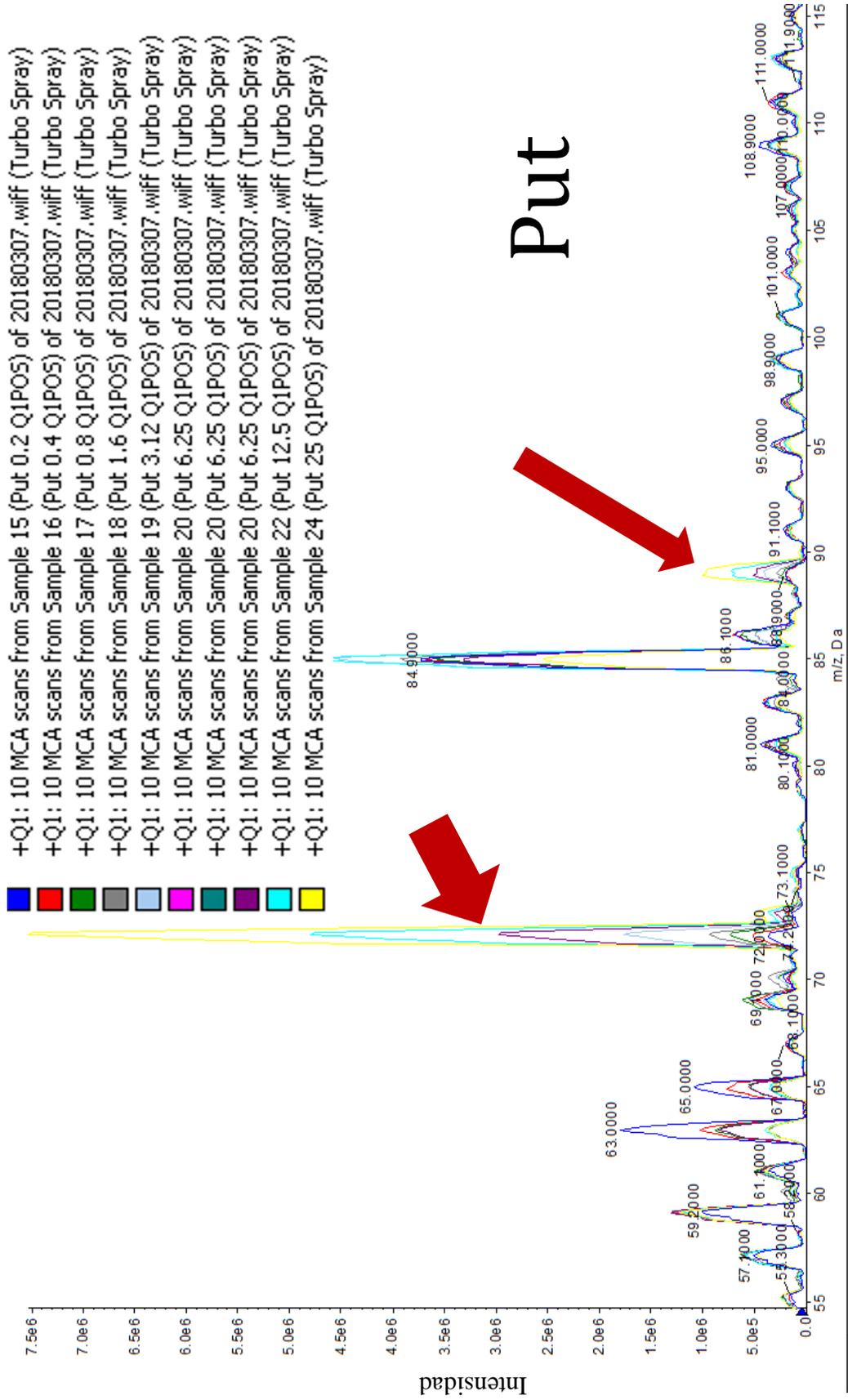
Posteriormente, conociendo el patrón de fragmentación de cada PA, se inyectaron diferentes concentraciones de los estándares de Put y Cad obteniéndose un espectro para cada concentración, con lo que se pudo observar que la cuenta de iones aumentaba de manera proporcional a la concentración y por lo tanto no existía ninguna interferencia de algún otro componente presente en la muestra. (Figura 31 y 32).

- +Q1: 10 MCA scans from Sample 1 (Cad 0.2 Q1POS) of 20180307.wiff (Turbo Spray)
- +Q1: 10 MCA scans from Sample 2 (Cad 0.4 Q1POS) of 20180307.wiff (Turbo Spray)
- +Q1: 10 MCA scans from Sample 3 (Cad 0.8 Q1POS) of 20180307.wiff (Turbo Spray)
- +Q1: 10 MCA scans from Sample 4 (Cad 1.6 Q1POS) of 20180307.wiff (Turbo Spray)
- +Q1: 10 MCA scans from Sample 5 (Cad 3.12 Q1POS) of 20180307.wiff (Turbo Spray)
- +Q1: 10 MCA scans from Sample 6 (Cad 6.25 Q1POS) of 20180307.wiff (Turbo Spray)
- +Q1: 10 MCA scans from Sample 7 (Cad 12.5 Q1POS) of 20180307.wiff (Turbo Spray)
- +Q1: 10 MCA scans from Sample 8 (Cad 25 Q1POS) of 20180307.wiff (Turbo Spray)



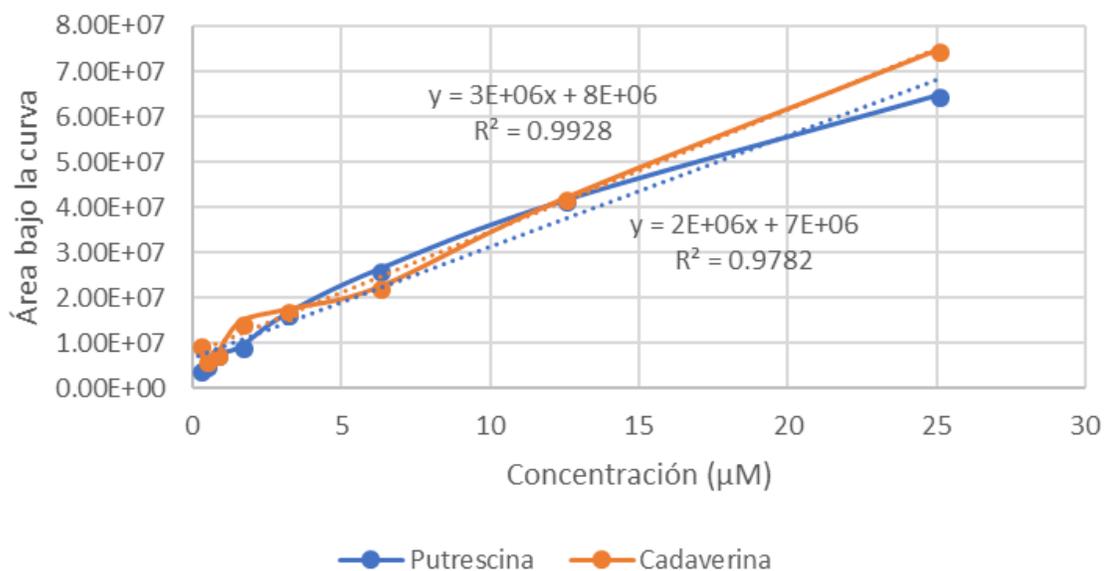
**Figura 31. Espectros de masas de la Cad a diferentes concentraciones.** Superposición de los espectros de masas obtenidos en modo positivo de los escaneos de iones para observar el aumento de la intensidad de los dos iones específicos de Cad ( $m/z = 103.2 \rightarrow 86.2$ ).

+Q1: 10 MCA scans from Sample 15 (Put 0.2 Q1POS) of 20180307.wiff (Turbo Spray)



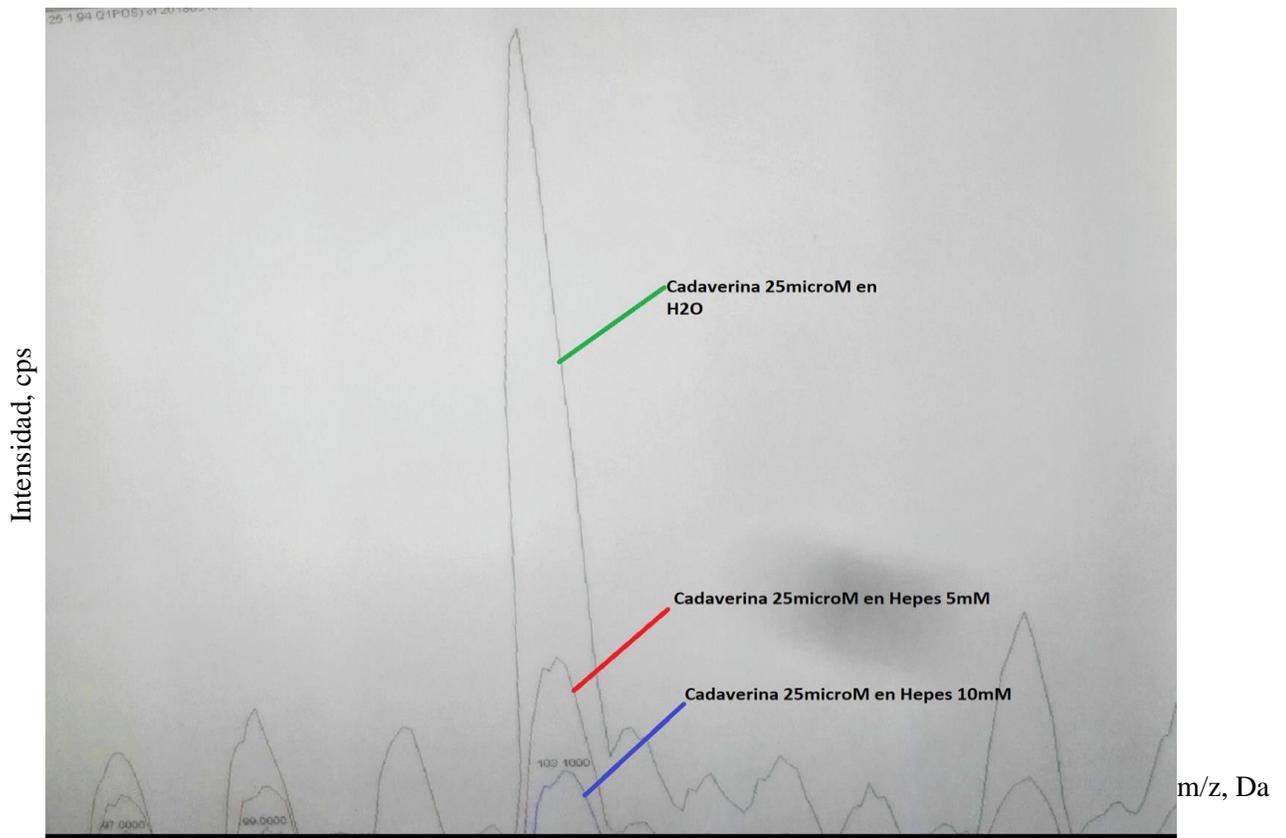
**Figura 32. Espectros de masas de Put a diferentes concentraciones.** Superposición de los espectros de masas obtenidos en modo positivo de los escaneos de iones para observar el aumento de la intensidad de los dos iones específicos de Put ( $m/z = 88.9 \rightarrow 72.2$ ).

A partir de estos espectros se pudo obtener el área bajo la curva de las diferentes concentraciones de Put ( $m/z = 88.9 \rightarrow 72.2$ ) y Cad ( $m/z = 103.2 \rightarrow 86.2$ ) y se construyó una curva patrón (Gráfica 1) para la cuantificación de las PAs producidas por la Spe1p.



**Gráfica 1. Curva de concentración de Put o Cad vs área bajo la curva.** Se muestra el área bajo la curva obtenida de los espectros de masas. Las líneas continuas de color azul y naranja corresponden a las curvas obtenidas de los datos experimentales de Put y Cad, respectivamente. Las líneas discontinuas de color azul y naranja corresponden a la linealización de los datos obtenidos de Put y Cad, respectivamente. La  $R^2 = 0.9928$  y  $0.9782$  corresponden a las ecuaciones de las curvas de Put y Cad, respectivamente.

Las curvas de concentración vs área bajo la curva de cada PA se prepararon usando agua como disolvente. Sin embargo, la reacción de enzimática se llevaría a cabo en la solución amortiguadora HEPES por lo cual se preparó una curva patrón en presencia de esta solución amortiguadora a una concentración de 40 mM. La cuenta de iones que se obtuvo con las PAs disueltas en 40 mM de HEPES, disminuyó de manera importante en comparación con las obtenidas con las PAs disueltas en agua. Para tratar de disminuir este efecto de matriz, se probaron dos concentraciones diferentes de solución amortiguadora HEPES, 5 y 10 mM a pH 7.5. Empleando ambas concentraciones, la solución amortiguadora HEPES disminuyó significativamente la señal de la concentración de Cad más alta (25 µM) (Figura 33). Este resultado imposibilitó la medición de la actividad por esta técnica, tomando en cuenta que la concentración del metabolito después de la reacción enzimática de la Spe1p sería de aproximadamente 1.4 µM por min.



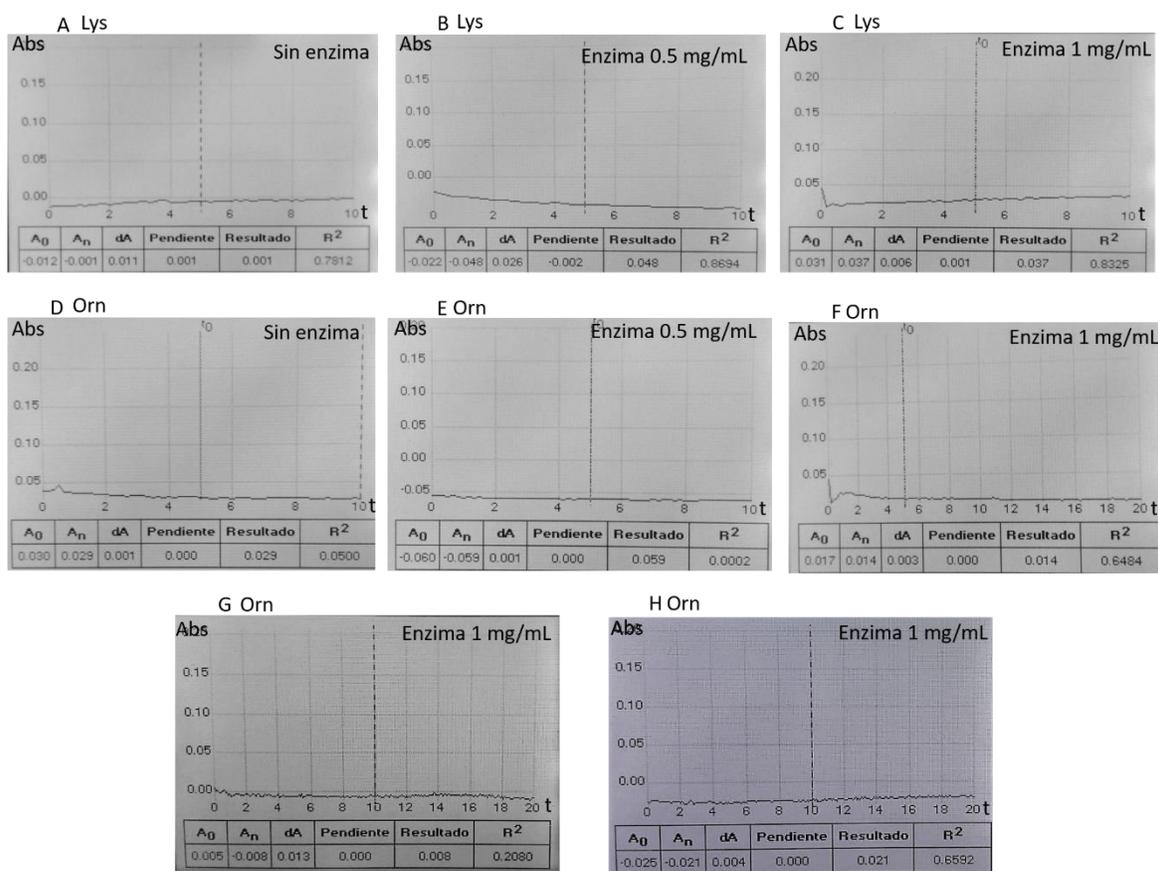
**Figura 33. Superposición de los espectros de masas obtenidos en modo positivo con diferentes concentraciones de solución amortiguadora HEPES.** Se muestran las señales de uno de los iones específicos de Cad ( $m/z = 103.1$ ) con agua (pico verde), HEPES 5 (pico rojo) y 10 mM (pico azul).

### 7.6.2 Cuantificación de $\text{CO}_2$ por espectrofotometría

Debido a la interferencia de la solución amortiguadora, no fue posible medir la actividad empleando espectrometría de masas, entonces se decidió emplear un método espectrofotométrico para medir la cinética de la formación de  $\text{CO}_2$ . Para esto se midió la reacción ácido-base entre el rojo de fenol y el ácido carbónico que se forma por la interacción del agua y el  $\text{CO}_2$ , este último formado por la descarboxilación de la Orn y Lys.

Esta reacción se realizó empleando como sustrato Lys con dos concentraciones diferentes de enzima 0.5 mg/mL y 1 mg/mL, esto para realizar dos cinéticas de formación de  $\text{CO}_2$  y compararla. Sin embargo, no se observó ningún cambio en la absorbancia al llevar a cabo la reacción (Figura 34 sección A, B y C).

Al emplearse Lys como sustrato no se observó el comportamiento cinético esperado, lo cual podría ser debido a la baja tasa de formación de CO<sub>2</sub> con este aminoácido. Por lo tanto, se intentó medir la cinética de la Spe1p empleando Orn 10 y 1 mM, ya que al ser mayor la tasa de formación de CO<sub>2</sub> con este sustrato, se esperaba ver la actividad de descarboxilación de la enzima (Figura 34 sección D, E, F, G y H). Sin embargo, tampoco logramos observar ningún cambio en la absorbancia por lo que no pudimos determinar la actividad de esta enzima por esta metodología.



**Figura 34. Cinética de formación de CO<sub>2</sub> de la enzima Spe1p.** Sección A Se muestra el control sin adición de Spe1p y con Lys 10 mM. Sección B contiene una concentración de 0.5 mg/mL de Spe1p y Lys a 10 mM. Sección C se adició una concentración de 1 mg/mL de Spe1p y Lys a 10 mM. Sección D está el control sin adición de enzima y con 10 mM de Orn. Sección E contiene una concentración de 0.5 mg/mL de Spe1p y Orn a 10 mM. Sección F se empleó una concentración de 1 mg/mL de enzima y Orn a 10 mM. En todas las secciones anteriores se usó 40 mM de HEPES. Sección G se adició una concentración de 5 mM de HEPES, 10 mM de Orn y 1 mg/mL de Spe1p. Sección H se adició una concentración de 5 mM de HEPES 1 mM de Orn y 1 mg/mL de Spe1p.

## 8.0 DISCUSIÓN

La ruta de síntesis de Put, Spd y Spm inicia con la ODC, la cual es la enzima más regulada de la vía y se ha visto involucrada en diversos procesos biológicos, incluyendo el desarrollo de enfermedades tales como el cáncer (Russell & Snyder, 1968). Las levaduras, especialmente *S. cerevisiae*, son organismos modelo de las células eucariontes, por lo cual se han estudiado ampliamente (Miller-Fleming, *et al*, 2015). Una de las investigaciones más recientes sobre esta levadura, dio como resultado la relación del metabolismo de la Lys y el de las PAs, donde se encontró que la Spe1p es capaz de descarboxilar tanto a la Orn como a la Lys (Olin-Sandoval, *et al*, enviado). Sin embargo, a pesar de esta recién descubierta actividad dual, el mecanismo atómico de catálisis no ha sido obtenido. Por ello es importante caracterizar estructuralmente a la Spe1p.

Para este proyecto fue necesario obtener la proteína recombinante. Para esto, extrajimos el ADN genómico de la levadura. Las formas convencionales para aislar ADN genómico de este organismo utilizan perlas de vidrio o digestión enzimática para romper la pared celular. El uso de las perlas de vidrio lleva mucho tiempo, mientras que la digestión enzimática de las células es costosa (Harju, *et al*, 2004). Por lo tanto, en este trabajo realizamos dos ciclos de congelación - descongelación de las células en una solución amortiguadora de lisis que se utilizó para romper la pared celular y liberar el ADN, sin necesidad de usar enzimas o perlas de vidrio. La lisis celular fue seguida de la extracción con cloroformo y precipitación con etanol (Harju, *et al*, 2004). Empleando esta técnica se obtuvieron 80.79 µg de ADN por 1.5 mL de cultivo lo que lo vuelve un protocolo muy eficiente ya que, utilizando las perlas de vidrio y la digestión enzimática, se obtienen entre 2-4 µg de ADN por 10 mL de cultivo (Hoffman & Winston, 1987) y 50 mg de peso húmedo de levadura (Merck KGaA, 2018), respectivamente.

Una vez que se aisló el ADN genómico de levadura, se realizó la amplificación del gen de Spe1p y se clonó en el plásmido de expresión en *E. coli* pRSET, utilizando la técnica de ensamble *in vivo*. Esta técnica se basa en la recombinación homóloga del ADN amplificado, tanto del gen a expresar, como del plásmido, que será el vector de expresión,

dentro del huésped *E. coli*. Esta técnica presenta como ventaja la reducción del tiempo y costos, ya que no requiere emplear algún kit comercial (García-Nafría, *et al*, 2016).

Para poder obtener la mayor producción de proteína recombinante, fue necesario realizar perfiles de expresión en la cepa SoluBL21 de *E. coli* transformada con el pScODC, con los cuales se determinaron la temperatura y tiempo de inducción óptimos para la sobre-expresión. Debido a que el plásmido contiene un promotor T7, utilizamos IPTG para la inducción. Esta molécula es un isómero de lactosa, que actuó como un análogo no hidrolizable de ésta última y permitió la sobreexpresión de la proteína codificada por el vector. El IPTG a diferencia de la lactosa es el inductor más empleado, ya que no es metabolizado por la bacteria (Hansen, *et al*, 1998). Obtuvimos la mayor expresión de proteína a 37 °C incubando toda la noche después del estímulo con IPTG. Se han reportado diferentes condiciones de tiempo y temperatura para la sobre-expresión de la Spe1p, lo cual sugiere que cada proteína presenta condiciones particulares debidas al organismo del que proviene (Dufe, *et al*, 2007; Lee, *et al*, 2007).

Después de que obtuvimos las condiciones óptimas de expresión, se realizaron macrocultivos y posteriormente llevamos a cabo la purificación de una cantidad de proteína suficiente para cristalizar. La etiqueta de His presente en la proteína recombinante facilita su purificación, debido a que interactúa con el Ni<sup>2+</sup> que se encuentra unido al grupo quelante que contiene la agarosa que se encuentra en las columnas (HisTrap HP, GE Healthcare Life Sciences, 2018). Es importante retirar la etiqueta de His, debido a que la proteína expresada no la contiene de manera natural. Además, al momento de cristalizar, dificulta la formación de cristales ya que en general, le confiere mayor movilidad a la proteína, impidiendo su estabilización (Bergfords, 2009; Dale, *et al*, 2003).

Fue necesario obtener a la proteína con un alto grado de pureza, para poder inducir la formación de cristales. Para ello se llevó a cabo una cromatografía de exclusión molecular como paso final de la purificación (Kandiah, *et al*, 2016), lo cual nos permitió separar a la proteína en su estado oligomérico nativo, de un estado de agregación no fisiológico. Al finalizar la cromatografía, se purificó entre 3 - 0.3 mg de proteína por litro de cultivo bacteriano, siendo esta una gran cantidad de proteína comparada con la que se obtendría de

la *S. cerevisiae*. Se ha reportado que el 45 % del peso seco de la levadura es proteína (Gutiérrez & Gómez, 2008). De esta cantidad el 0.0001 % del total de proteína celular es Spe1p (Heby & Persson, 1990), lo que nos dejaría con muy poca cantidad de la enzima de interés. Siendo mucho más eficiente la obtención de proteína recombinante. Una vez purificada la proteína se concentró a 10 mg/mL y 20 mg/mL. La primera concentración se ocupó de manera inicial para la inducción de cristales (Bergfords, 2009) y la segunda fue reportada para la cristalización de la ODC (*Homo sapiens*) en presencia de la solución amortiguadora Tris (Almrud, *et al*, 2000; Grishin, *et al*, 1999). Esto último, es importante ya que la ODC de humano es la que tiene el mayor porcentaje de identidad (26 %) con la Spe1p.

Para establecer el mecanismo de catálisis de esta enzima con Orn y Lys, se realizaron varios intentos de cristalización con resultados parcialmente exitosos como se puede notar en la figura 26. Para obtener cristales adecuados, a menudo se buscan cristales de un gran tamaño, lo cual implica gran dificultad (McPherson & Gavira, 2013). Los cristales de proteína deben ser cultivados en solución acuosa, denominada licor madre (McPherson & Gavira, 2013). Este licor madre presenta características particulares (iones, ligandos, sustrato, coenzimas, inhibidores, fármacos u otras moléculas efectoras) para la cristalización, donde generalmente el contenido no altera la estructura de las macromoléculas individuales (McPherson & Gavira, 2013).

En este trabajo se empleó el método de Microbatch para obtener cristales de Spe1p. La ventaja de emplear esta técnica es el uso reducido de muestra debido a que se trabaja con bajos volúmenes ( $\mu\text{L}$ ) (Bergfors, 2009). Además de esta ventaja es importante resaltar que en un ensayo (placa de microbatch) se pueden probar varias condiciones que involucran diferentes licores madre. Se realizaron varias pruebas con diversas soluciones amortiguadoras (HEPES, Tris y MES) y diferentes concentraciones tanto de  $\text{MgCl}_2$  como de PEG 3.35K (revisar tabla 8) al igual que la adición de diversos ligandos como D-Lys, Put y Cad. Los primeros cristales obtenidos fueron con la proteína sin ligandos, ni PLP, en presencia de la solución amortiguadora HEPES, sin embargo, éstos eran muy pequeños (Figura 26 sección A). Posteriormente, se obtuvieron cristales de un mayor tamaño, donde el PLP estaba presente (Figura 26 sección B). Esto se logró por un cambio de solución amortiguadora (Tris en lugar de HEPES) y un aumento en la concentración de la proteína (20

mg/mL). Asimismo, se realizó otro cambio de solución amortiguadora (en este caso se usó MES), donde se obtuvieron cristales de mayor tamaño con respecto a los anteriores (Figura 26 sección C). Se usó solución amortiguadora MES a pH 6.5 debido a que la estructura de ODC de humano se obtuvo empleando esta solución amortiguadora (Dufe, *et al*, 2007). Otra modificación fue la adición de los ligandos. Los cristales obtenidos adicionando Put (20 mM) y D-Lys (25 mM) al licor madre (Figura 26 sección D y E, respectivamente), en lugar de presentar alguna mejora, fueron cristales más pequeños y menos definidos. Los mejores cristales fueron obtenidos en presencia de 25 mM de Cad, 100 mM de solución amortiguadora MES pH 6.5, 62 mM de MgCl<sub>2</sub>, 16.054 % de PEG 3.35K y 0.2 mM de PLP (Figura 26 sección F). Estas modificaciones fueron incluidas ya que la estructura de ODC de *V. vulnificus* se obtuvo empleando Tris al igual que 20 mM de Put (Lee, *et al*, 2007), en la de *T. brucei* se empleó 25 mM de D-Orn (en nuestro caso se empleó D-Lys) (Jackson, *et al*, 2003) en la estructura de LDC de *E. coli* se empleó 30 mM de Cad (en nuestro caso fue 25 mM) (Kanjee, *et al*, 2011). La sustitución de la solución amortiguadora afectó positivamente la estabilidad de la Spe1p promoviendo su cristalización (McPherson & Gavira, 2013). El cambio en la concentración de la proteína empleada para la cristalización es dependiente de las condiciones del licor madre que se esté empleando (Bergfors, 2009). Por otro lado, también se probó el uso de PEG de cadena más corta (ver tabla 6), debido a que se reporta que mejora las características de los cristales (Van Driessche, *et al*, 2018), sin embargo, en este caso no promovió ningún cambio que representara una mejora en los cristales.

La obtención del patrón de difracción depende principalmente de 2 factores, el primero es la calidad del cristal (McPherson & Gavira, 2013) (que sólo se puede verificar con la obtención de este patrón) y el segundo es la potencia del rayo del equipo que se emplea. El primer paso para la obtención de la estructura cristalográfica fue el uso de un difractor presente en el Laboratorio Nacional de Estructura de Biomacromoléculas (LANEM) (Instituto de Química, UNAM). Sin embargo, no se pudo obtener un patrón de difracción, por lo que se optó por utilizar la radiación sincrotrón (Laboratorio Nacional de Argonne, Chicago, IL.). El resultado que pudimos rescatar del uso del difractor de laboratorio es que se trataba de cristales de proteína, ya que los cristales de sales, independientemente de la sal que sea, tienen un patrón de difracción muy característico, en el cual no se observan

reflexiones en el centro, y generalmente es de alta resolución. Por otra parte, a pesar de las capacidades de la radiación, tampoco se pudo obtener un patrón de difracción en el sincrotrón. Algunas sustancias, pueden liberar el solvente con el que están interactuando, lo cual rompe con el equilibrio y comienza la pérdida de la estructura cristalina. Este fenómeno se puede observar cuando el cristal ha sido expuesto demasiado al aire. Lo anterior, y el que la calidad del cristal no fuera la óptima, son las razones por las cuales no se obtuvo un patrón de difracción. Por lo tanto, para mejorar la calidad del cristal, sería conveniente probar otras técnicas de cristalización como micro y macro seeding. El cambio de la técnica de cristalización en ocasiones ayuda a mejorar los cristales obtenidos (Bergfors, 2009). También se recomienda el cambio de la sal que se emplea por las sales de los compuestos químicos de la misma familia (Bergfors, 2009). En este caso, de acuerdo con la tabla 6, se probaron diversas sales en las soluciones de licor madre, sin embargo, los cristales obtenidos fueron más pequeños que los conseguidos anteriormente con  $MgCl_2$ . Debido a lo anterior y de acuerdo con la tabla 6 la única sal que nos falta probar es  $BaCl_2$ , que podría ayudarnos a mejorar los cristales.

Por otro lado, continuamos con la determinación de la actividad de la Spe1p. Inicialmente decidimos medirla monitoreando la aparición de sus productos (Put o Cad) por espectrometría de masas, debido a que es una técnica altamente selectiva y sensible (Glish & Vachet, 2003). Fuimos capaces de determinar el patrón de fragmentación de los estándares (Put y Cad) disueltos en agua, y con esto se construyó una curva patrón (Put,  $R = 0.9782$  y Cad,  $R = 0.9928$ ). Sin embargo, cuando éstos se encontraban en presencia de HEPES, las cuentas de los iones específicos de Cad y Put disminuyeron de manera muy importante. Este fenómeno ocurre porque hay un efecto de la matriz, que es común cuando se utilizan fuentes de ionización por ESI (Li & Huang, 2014; Khoury, *et al*, 2016). Esta supresión es debida a los componentes de la matriz o a la presencia de compuestos potencialmente ionizables en las muestras (Bonfiglio, *et al*, 1999; Li & Huang, 2014; Khoury, *et al*, 2016). Las interferencias están comúnmente asociadas con el grado de ionización del analito. En este contexto, la ionización se refiere a los dos procesos que conducen a la formación de iones en fase gas muestreados por el espectrómetro de masas: 1) transferencia del analito a la fase gaseosa y 2) la adición de una carga para formar un ion. Por lo tanto, la señal de una

determinada concentración del analito puede cambiar de acuerdo a los componentes de la matriz (Bonfiglio, *et al*, 1999). Este efecto de supresión se puede disminuir utilizando un HPLC acoplado a masas, ya que los componentes de la muestra se van a separar de acuerdo a la interacción de estos con la columna presentando así diversos tiempos de retención logrando tener la señal de nuestro analito libre de la matriz (Burtis, *et al*, 1970; Thermo Fisher Scientific, 2012).

Debido a esta interferencia no fue posible medir, por este método, si la enzima Spe1p recombinante era activa, ya que la actividad de producto que esperábamos era de 1.4  $\mu\text{M}$  por min y se encontraría en la línea basal de detección. Por lo tanto, se buscó utilizar un método espectrofotométrico basado en una reacción ácido-base entre el rojo de fenol y el ácido carbónico que se forma por la interacción del agua y el  $\text{CO}_2$  que se desprende después de la descarboxilación de la Orn ó Lys. Sin embargo, tampoco pudimos detectar actividad de la Spe1p, probablemente debido a que la reacción enzimática no produce el  $\text{CO}_2$  suficiente para formar una concentración de ácido carbónico capaz de romper el sistema de amortiguamiento de la solución amortiguadora de reacción utilizado por lo que no se observó un cambio en la absorbancia del rojo de fenol. Otra razón, podría ser que el ácido carbónico que reacciona con el indicador es muy poco y el equipo no es capaz de detectar el cambio. Sin embargo, en un trabajo donde miden la actividad de la anhidrasa carbónica (*Homo sapiens*), usaron una solución amortiguadora con una concentración de 10 mM de HEPES (Winum, *et al*, 2009). Inicialmente empleamos una concentración de 40 mM de la misma solución amortiguadora, ya que se usó esta concentración para medir la actividad de la Spe1p mediante LC-MS/MS (Olin-Sandoval, *et al*, enviado), lo cual influyó en nuestros resultados. No obstante, también se usó 5 mM de HEPES obteniendo el mismo resultado, con lo cual podemos decir, que efectivamente el ácido carbónico que se forma es poco. Otra técnica que pudiera ayudar a resolver si se trata de una enzima activa, es cuantificando Put y Cad derivatizadas con cloruro de dansilo por HPLC acoplado a un detector de fluorescencia. Este agente se emplea para derivatizar aminoácidos, PAs, péptidos y proteínas pequeñas. Esta molécula es capaz de reaccionar con aminas primarias y secundarias produciendo derivados fluorescentes (Sigma-Aldrich, 2018).

## 9.0 CONCLUSIONES

A través del ensamble *in vivo* se logró clonar la proteína Spe1p de *Saccharomyces cerevisiae*.

El proceso de purificación de Spe1p fue efectivo para lograr obtener la proteína en cantidad y con la pureza necesaria para llevar a cabo la cristalización.

Después de probar diversas condiciones de optimización, se logró una condición con MES, MgCl<sub>2</sub>, PEG 3.35 K, PLP y Cad que permitió obtener los cristales de mayor tamaño.

A pesar de haber obtenido cristales de un tamaño adecuado, estos no fueron de la calidad necesaria para obtener un patrón de difracción.

La cuantificación de los productos de Spe1p, Put y Cad por espectrómetro de masas no fue posible debido al efecto de matriz causado por el medio de reacción.

No fue posible cuantificar la producción de CO<sub>2</sub>, de Spe1p, espectrofotométricamente utilizando rojo de fenol.

## 10.0 PERSPECTIVAS

- Medir la actividad de la Spe1p por HPLC acoplado a un detector de Fluorescencia derivatizando a las PAs con cloruro de dansilo.
- Continuar la optimización de cristales modificando los componentes del licor madre, de igual forma incubar con Putrescina, D-Lisina y/o Cadaverina.
- Analizar la difracción de nuestros cristales con luz de sincrotrón.
- Establecer mecanismo de actividad dual.

## 11.0 REFERENCIAS

- Aaij, C., & Borst, P. (1972). The gel electrophoresis of DNA. *Biochimica et Biophysica acta*, 269 (2): 192-200.
- Abián, J., Carrascal, M., & Gay, M. (2008). Introducción a la espectrometría de masas para la caracterización de péptidos y proteínas en proteómica. *Proteómica*, 2, 16-64.
- Accuris Instruments. (2017). *Accuris Instruments*. Recuperado el 26 de Septiembre de 2018, de <http://www.accuris-usa.com/Products/uv-transilluminator/>
- Alcázar, R., Marco, F., Cuevas, J. C., Patron, M., Ferrando, A., Carrasco, P., . . . Altabella, T. (2006). Involvement of polyamines in plant response to abiotic stress. *Biotechnol Lett*, 28, 1867-1876.
- Almud, J. J., Oliveira, M. A., Kern, A. D., Grishin, N. V., & Phillips, M. A. (2000). Crystal structure of human ornithine decarboxylase at 2.1 Å resolution: structural insights to antizyme binding. *Journal Molecular Biology*, 295, 7-16.
- Anehus, S., Pohjanpelto, P., Baldetorp, B., Långström, E., & Heby, O. (1984). Polyamine starvation prolongs the S and G2 phases of polyamine-dependent (arginase-deficient) CHO cells. *Mol. Cell. Biol.*, 4, 915-922.
- Aouida, M., Leduc, A., Poulin, R., & Ramotar, D. (2005). AGP2 encodes the major permease for high affinity polyamine import in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.*, 280, 24267-24276.
- Bachrach, U. (2010). The early history of polyamine research. *Plant Physiol. Biochem.*, 48, 490-495.
- Bailey, S., Landar, A., & Darleyusmar, V. (2005). Mitochondrial proteomics in free radical research. *Free Radical Biology and Medicine*, 38, 175-188.
- Balasundaram, D., & Tyagi, A. K. (1991). Polyamine--DNA nexus: structural ramifications and biological implications. *Mol Cell Biochem*, 100 (2), 129-140.
- Balasundaram, D., Tabor, C. W., & Tabor, H. (1991). Spermidine or spermine is essential for the aerobic growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 88, 5872-5876.
- Bale, S., & Ealick, A. E. (2010). Structural biology of S-adenosylmethionine decarboxylase. *Amino acids*, 38, 451-460.
- Bergamini, C., Gambetti, S., Dondi, A., & Cervellati, C. (2004). Oxygen, reactive oxygen species and tissue damage. *Current Pharmaceutical Design*, 14, 1611-1626.
- Bergfords, T. E. (2009). *Protein crystallization*. California: International University Line.

- Bonfiglio, R., King, R. C., Olah, T. V., & Merkle, K. (1999). The effects of sample preparation methods on the variability of the electrospray ionization response for model drug compounds. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 13,, 1175-1185.
- BRENDA professional. (July de 2018). *BRENDA. The comprehensive Enzyme Information System*. Obtenido de <https://www.brenda-enzymes.org/index.php>
- Burtis, A. C., Munk, M. N., & MacDonald, F. R. (1970). Rapid separation of the components of nucleic acids and urine by High-resolution liquid chromatography. *Clinical chemistry*, 16, 667-676.
- Canellakis, E. S., Kyriakidis, D. A., Rinehart, C. A., Huang, S. C., Panagiotidis, C., & Wong, W. F. (1985). Regulation of polyamine biosynthesis by antizyme and some recent developments relating the induction of polyamine biosynthesis to cell growth. *Biosci. Rep*, 5, 189-204.
- Carrillo, C., Cejas, S., González, N. S., & Algranati, I. D. (1999). Trypanosoma cruzi epimastigotes lack ornithine decarboxylase but can express a foreign gene encoding this enzyme. *FEBS Lett.*, 454, 192-196.
- Carrington, J. C., & Dougherty, W. G. (1988). A viral cleavage site cassette: Identification of amino acid sequences requires for tobacco etch virus polyprotein processing. *Biochemistry*, 85, 3391-3395.
- Casero, R. A., Mank, A. R., Xiao, L., Smith, J., Bergeron, R. J., & Celano, P. Steady-State messenger RNA and activity correlates with sensitivity to N<sup>1</sup>,N<sup>12</sup>-Bis(ethyl)spermine in human cell lines representing the major forms of lung cancer. *Cancer Research*, 52, 5359-5363.
- Chattopadhyay, M. K., Tabor, C. W., & Tabor, H. (2002). Absolute requirement of spermidine for growth and cell cycle progression of fission yeast (*Schizosaccharomyces pombe*). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 99, 10330-10334.
- Cheetham, B. (1983). An inhibitor of polyamine synthesis arrests cells at earlier stage of G1 than does calcium deprivation. *Mol. Cell. Biol.*, 3, 480-483.
- Chen, I., & Dubnau, D. (2004). DNA uptake during bacterial transformation. *Nature reviews microbiology*, 2, 241-249.
- Childs, A. C., Mehta, D. J., & Gerner, E. W. (2003). Polyamine-dependent gene expression. *Cell. Mol. Life Sci.*, 60, 1394-1406.
- Corrales, L., & Muñoz-Ariza, M. (2012). Estrés oxidativo: origen, evolución y consecuencias de la toxicidad del oxígeno. *Nova- Publicación científica en Ciencias Biomédicas*, 18, 135-250.
- Correa, C. A. (2002). *Fenómenos químicos*. (Primera edición). Medellín: Fondo editorial Universidad Eafit.

- Cunningham-Rundles, S., & Maas, W. K. (1975). Isolation, characterization, and mapping of *Escherichia coli* mutants blocked in the synthesis of Ornithine Decarboxylase. *J. Bacteriol.*, *124*, 791-799.
- Dale, E. G., Oefner, C., & D'Arcy, A. (2003). The protein as a variable in protein crystallization. *Journal of structural biology*, *142*, 88-97.
- Das Gupta, R., Krause-Ihle, T., Bergmann, B., Müller, I. B., Khomutov, A. R., Müller, S., . . . Lüersen, K. (2005). 3-Aminooxy-1-Aminopropane and derivatives have an antiproliferative effect on cultured *Plasmodium falciparum* by decreasing intracellular polyamine concentrations. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, *49*, 2857-2864.
- Dayoub, R., Thasler, W. E., Bosserhoff, A. K., Singer, T., Jauch, K.-W., Schlitt, H. J., & Weiss, T. S. (2006). Regulation of polyamine synthesis in human hepatocytes by hepatotrophic factor augments liver regeneration. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *345*, 181-187.
- Díaz, R. (2018). *Lifeder*. Obtenido de <https://www.lifeder.com/acido-carbonico/>
- Don, S., & Bachrach, U. (1975). Polyamine metabolism in normal and in virus-transformed chick embryo fibroblasts. *Cancer Res.*, *35*, 3618-3622.
- Dufe, V. T., Ingner, D., Khomutov, A. R., Heby, O., Persson, L., & Al-Karadaghi, S. (2007). A structural insight into the inhibition of human *Leishmania donovani* ornithine decarboxylases by 3-aminooxy-1-aminopropane. *Biochem. J.*, *405*, 261-268.
- Eisenberg, T., Knauer, H., Schauer, A., Büttner, S., Ruckenstuhl, C., Carmona-Gutierrez, D., . . . Heeren, G. (2009). Induction of autophagy by spermidine promotes longevity. *Nat. Cell Biol.*, *11*, 1305-1314.
- Erales, J., & Coffino, P. (2014). Ubiquitin-independent proteasomal degradation. *Biochim. Biophys. Acta*, *1843*, 216-221.
- Fozard, J. R., & Part, M. L. (1983). Methods for the study of the experimental interruption of pregnancy by ODC inhibitors: effects of DL-DFMO. *Methods in Enzymology*, *213-216*.
- Fu, P., Xia, Q., Sun, X., & Yu, H. (2012). Phototoxicity and environmental transformation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs)-light-induced reactive oxygen species, lipid peroxidation, and DNA damage. *Journal of Environmental Science and Health*, *30*, 1-41.
- Fujita, M., & Shinozaki, K. (2012). Identification of Polyamine transporters in plants: Paraquat transport provides crucial clues. *Plant and cell physiology*, *55*, 855-861.
- Galleano, M., Verstraeten, S. V., Oteiza, P. I., & Fraga, C. G. (2010). Antioxidant actions of flavonoids: Thermodynamic and kinetic analysis. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *501*, 23-30.

- García-Nafria, J., Watson, J. F., & Greger, I. H. (2016). IVA cloning: A single-tube universal cloning system exploiting bacterial In vivo assembly. *Scientific reports*, 6, 27459.
- Gazdar, A. F., Stull, H. B., Kilton, L. J., & Bachrach, U. (1976). Increased ornithine decarboxylase activity in murine sarcoma virus infected cells. *Nature*, 262, 696-698.
- GE Healthcare Life Sciences. (2018). *GE Healthcare Life Sciences, México*. Obtenido de <https://www.gelifesciences.com/en/mx/shop/chromatography/prepacked-columns/affinity-specific-groups/hiprep-imac-ff-columns-p-05394>
- Genlantis. (2017). *amsbio*. Recuperado el 10 de Octubre de 2018, de <http://www.amsbio.com/downloads/genlantis/SoluBL21%20Chemically%20Competent.pdf>
- Glish, G. L., & Vachet, R. W. (2003). The basics of mass spectrometry in the twenty-first century. *Nat. Rev. Drug Discov.*, 2, 140-150.
- Gödderz, D., Schäfer, E., Palanimurugan, R., & Dohmen, R. J. (2011). The N-terminal unstructured domain of yeast ODC functions as a transplantable and replaceable ubiquitin-independent degran. *J. Mol. Biol.*, 407, 354-367.
- Grillo, M. A. (1985). Metabolism and function of polyamines. *Int. J. Biochem.* 17, 943-948.
- Grishin, N. V., Osterman, A. L., Brooks, H. B., Phillips, M. A., & Goldsmith, E. J. (1999). X-ray structure of ornithine decarboxylase from *Trypanosoma brucei*: The native structure and the structure in complex with alpha-Difluoromethylornithine. *Biochemistry*, 38, 15174-15184.
- Gupta, V. K., Scheunemann, L., Eisenberg, T., Mertel, S., Bhukel, A., Koemans, T., . . . Madeo, F. (2003). Restoring polyamines protects from age-induced memory impairment in an autophagy-dependent manner. *Nat. Neurosci.*, 16, 1453-1460.
- Gutiérrez, L. A., & Gómez, A. J. (2008). Determinación de la proteína total de *Candida utilis* y *Saccharomyces cerevisiae* en bagazo de caña. *Revista Lasallista de Investigación*, 5, 61-64.
- Hanfrey, C., Sommer, S., Mayer, M. J., Burtin, D., & Michael, A. J. (2001). Arabidopsis polyamine biosynthesis: absence of ornithine decarboxylase and the mechanism of arginine decarboxylase activity. *Plant J.*, 27, 551-560.
- Hansen, L., Knudsen, S., & Sorensen, S. (1998). The effect of the lacY gene on the induction of IPTG inducible promoters, studied in *Escherichia coli* and *Pseudomonas fluorescens*. *Current Microbiology*, 36, 341-347.
- Harju, S., Fedosyuk, H., & Peterson, K. R. (2004). Rapid isolation of yeast genomic DNA: Bust n'Grab. *BMC Biotechnology*, 4, .

- Hasne, M.-P., & Ullman, B. (2005). Identification and characterization of a polyamine permease from the protozoan parasite *Leishmania major*. *The Journal of Biological Chemistry*, 280, 15188-15194.
- Hasne, M.-P., Coppens, I., Soysa, R., & Ullman, B. (2010). A high-affinity putrescine-cadaverine transporter from *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Microbiol.*, 76, 78-91.
- Heby, O. (1981). Role of polyamine in the control of cell proliferation and differentiation. *Differentiation*, 19, 1-20.
- Heby, O. (1986). Putrescine, spermidine and spermine. *News Physiol. Sci.* 1, 12-15.
- Heby, O., & Persson, L. (1990). Molecular genetics of polyamine synthesis in eukaryotic cells. *TIBS*, 15, 153-158.
- Heby, O., Gray, J. W., Lind, P. A., Marton, L. J., & Wilson, C. B. (1976). Changes in L-Ornithine decarboxylase activity during the cell cycle. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 71, 99-105.
- Heby, O., Sarna, G. P., Marton, L. J., Omine, M., Perry, S., & Russell, D. H. (1973). Polyamine content of AKR leukemic cells in relation to the cell cycle. *Cancer Res.*, 33, 2959-2964.
- Heller, J. S., Fong, W. F., & Canellakis, E. S. (1976). Induction of a protein inhibitor to ornithine decarboxylase by the end products of its reaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 73, 1858-1862.
- Henrici, R. C., Pecen, T. J., Johnston, J. L., & Tan, S. (2017). The pPSU plasmids for generating DNA molecular weight markers. *Scientific Reports.*, 7, 2438.
- Hicks Gómez, J. J., & Díaz Zagoya, J. (1988). *Bioquímica e Inmunología*. Ciudad de México, México: UNAM.
- Higashi, K., Ishigure, H., Demizu, R., Uemura, T., Nishino, K., Yamaguchi, A., & al, e. (2008). Identification of spermidine escretion protein complex (MdtJI) in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 190, 872-878.
- Hoffman, C. S., & Winston, F. (1987). A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*. *Gene*, 57, 267-272.
- Igarashi, K., & Kashiwagi. (2010). Characteristics of cellular polyamine transport in prokaryotes in eukaryotes. *Plant Physiol. Biochem.*, 48, 506-512.
- Igarashi, K., & Kashiwagi, K. (1999). Polyamine transport in bacteria and yeast. *Biochem. J.*, 344, 633-642.
- Igarashi, K., Ito, K., & Kashiwagi, K. (2001). Polyamine uptake systems in *Escherichia coli*. *Res. Microbiol.*, 152, 271-278.

- Iwami, K., Wang, J-Y., & Jain, R. (1990). Intestinal ornithine decarboxylase: half-life and regulation by putrescine. *American Journal of Physiology*, 258, G308-G315.
- Jackson, L. K., Brooks, H. B., Osterman, A. L., Goldsmith, E. J., & Phillips, M. A. (2000). Altering the reaction specificity of eukaryotic ornithine decarboxylase. *Biochemistry*, 39, 11247-11257.
- Jackson, L. K., Goldsmith, E. J., & Phillips, M. A. (2003). A-ray structure determination of *Trypanosoma brucei* ornithine decarboxylase bound to D-ornithine and G418. *The journal of biological chemistry*, 278, 22037-22043.
- Jänne, J., Poso, H., & Raina, A. (1978). Polyamines in rapid growth and cancer. *Biochem. Biophys. Acta*, 473, 241-293.
- Kandiah, E., Carriel, D., Perard, J., Malet, H., Bacia, M., Liu, K., . . . Gutsche, I. (2016). Structural insights into the *Escherichia coli* lysine decarboxylases and molecular determinants of interaction with the AAA+ ATPase RavA. *Scientific reports*, 6: 23601.
- Kanjee, U., Gutsche, I., Alexopoulos, E., Zhao, B., Bakkouri, M. E., Thibault, G., Liu, K., Ramachandran, S., Snider, J., Pai, E. F., & Houry W. A. (2011). Linkage between the bacterial acid stress and stringent responses: the structure of the inducible lysine decarboxylase. *The EMBO Journal*, 30, 931-944.
- Kashiwagi, K., Miyamoto, S., Nukui, E., Kobayashi, H., & Igarashi, K. (1993). Functions of PotA and PotD proteins in spermidine-preferential uptake system in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, 268, 19358-19363.
- Kashiwagi, K., Shibuya, S., Tomitori, H., Kuraishi, A., & Igarashi, K. (1997). Excretion and uptake of putrescine by the PotE protein in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, 272, 6318-6323.
- Kay, J. E., & Lindsay, V. J. (1973). Control of ornithine decarboxylase activity in stimulated human lymphocytes by putrescine and spermidine. *Biochem. J.*, 132, 791-796.
- Kern, A. D., Oliveira, M. A., Coffino, P., & Hackert, M. L. (1999). Structure of mammalian ornithine decarboxylase at 1.6 Å resolution: stereochemical implications of PLP-dependent amino acid decarboxylases. *Structure*, 7, 567-581.
- Khomutov, R. M., Hyvönen, T., Karvonen, E., Kauppinen, L., Paalanen, T., Paulin, L., . . . Pösö, H. (1985). 1-Aminoxy-3-aminopropane, a new and potent inhibitor of polyamine biosynthesis that inhibits ornithine decarboxylase, adenosylmethionine decarboxylase and spermidine synthase. *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, 130 (2), 596-602.
- Khomutov, R., Hyvönen, T., Karvonen, E., Kauppinen, L., Paalanen, T., Paulin, L., . . . Pösö, H. (1985). 1-Aminoxy-3-aminopropano, a new and potent inhibitor of polyamine biosynthesis that inhibits ornithine decarboxylase, adenosylmethionine

- decarboxylase and spermidine synthase. *Biochemical and biophysical research communications*, 130 (2), 596-602.
- Khoury, S., El Banna, N., Tfaili, S., & Chaminade, P. (2016). A study of inter-species ion suppression in electrospray ionization-mass spectrometry of some phospholipid classes. *Anal Bioanal Chem*, 408, 1453-1465.
- Kihara, H., & Esmond, E. S. (1957). Spermine and related polyamines as growth stimulants for *Lactobacillus casei*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A*, 43, 867-871.
- Kramer, D. L., Vujcic, S., Diegelman, P., Alderfer, J., Miller, J. T., & Black, J. D. (1999). Polyamine analogue induction of the p53-p21 WAF1/CIP1-Rb pathway and G1 arrest in human melanoma cells. *Cancer Res.*, 59, 1278-1286.
- Krüger, A., Vowinckel, J., Mülleder, M., Grote, P., Capuano, F., Bluemlein, K., & al., e. (2013). Tpo1-mediated spermine and spermidine export controls cell cycle delay and times antioxidant protein expression during the oxidative stress response. *EMBO Rep.*, 14, 1113-1119.
- Kusano, T., Berberich, T., Tateda, C., & Takahashi, Y. (2008). Polyamines: essential factors for growth and survival. *Planta*, 228, 367-381.
- Kusunoki, S., & Yasumasu, I. (1976). Cyclic change in polyamine concentrations in sea urchin eggs related with cleavage cycle. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 68, 881-885.
- Kusunoki, S., & Yasumasu, I. (1978). Inhibitory effect of alpha-hydrazinoornithine on egg cleavage in sea urchin eggs. *Dev. Biol.*, 67, 336-345.
- Lam, K., Zhang, L., Bewick, M., & Lafrenie, R. M. (2005). HSG Cells differentiated by culture on extracellular matrix involves induction of S-Adenosylmethione decarboxylase and Ornithine decarboxylase. *Journal of cellular physiology*, 203, 353-361.
- Landry, J., & Sternglanz, R. (2003). Yeast Fms1 is a FAD-utilizing polyamine oxidase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 303, 771-776.
- Le Quesne, S. A., & Fairlamb, A. H. (1996). Regulation of high-affinity diamine transport system in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *Biochem. J.*, 316, 481-486.
- Lee, J., Michael, A. J., Martynowski, D., & Goldsmith, E. J. (2007). Phylogenetic Diversity and the Structural Basis of Substrate Specificity in the  $\beta/\alpha$ -Barrel Fold Basic Amino Acid Decarboxylases. *Journal of Biological Chemistry*, 282, 27115-27125.
- Li, G., & Huang, G. (2014). Alleviation of ion suppression effect in sonic sprayer ionization with induced alternating current voltage. *J. Mass Spectrom.* 49, 639-645.
- Life Technologies Corporation. (28 de Junio de 2010). *Thermo Fisher Scientific*. Recuperado el 10 de Octubre de 2018, de <https://www.thermofisher.com/document->

connect/document-connect.html?url=https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/prset\_man.pdf&title=pRSET%20A,%20B,%20C

- Lozada, S., & García, L. (2009). Estrés oxidativo y antioxidantes: cómo mantener el equilibrio . *Revista Asociación Colombiana de Dermatología*, 17, 172-179.
- Luk, G. D., & Baylin, S. B. (1984). Ornithine decarboxylase as a biologic marker in familial colonic polyposis. *The new England Journal of Medicine*, 311, 80-83.
- Luk, G., & Yang, P. (1987). Polyamines in intestinal and pancreatic adaptation. *Gut*, 28, 95-101.
- Mamont, P. S., Duchesne, M. C., Grove, J., & Bey, P. (1978). Antiproliferative properties of DL, alpha difluoromethylornithine in cultured cells. A consequence of the irreversible inhibition of ornithine decarboxylase. *Biochem. Biophys. Res. Commun*, 81, 58-66.
- Marton, L. J. (1981). Polyamines and brain tumors: relation ship to patient monitoring and therapy. *Cancer Treat Rep.*, 65 (2), 107-109.
- Marton, L. J., & Feverstein, B. G. (1986). Polyamine DNA interactions: Possible site of new cancer chemotherapeutic intervention. *Pharm. Res.*, 3, 311-317.
- Marx, M., Townsend, C. M., Barranco, S. C., Glass, E. J., & Thompson, J. C. (1987). Treatment of hamster pancreatic cancer with alpha-difluoromethylornithine, an inhibitor of polyamine biosynthesis. *JNCI*, 79, 543-548.
- McPherson, A., & Gavira, J. A. (2013). Introduction to protein crystallization. *Acta Crystallographica; Structural Biology Communications*, F70,, 2-20.
- Medical Biochemistry*. (19 de Febrero de 2018). Obtenido de Medical Biochemistry: <http://www.medbiochemistry.com/integration-between-urea-cycle-and-tca-cycle/linked-urea-cycle/>
- Mendez, J. D., & Hicks, J. J. (1982). Las poliaminas y el sistema reproductor de la hembra. *Ginec. Obstet. Mex.*, 302, 157-164.
- Mendez, J. D., & Hicks, J. J. (1984). Metabolismo de las poliaminas en diferentes condiciones fisiologicas de la mujer. *Ginec. Obstet. Mex.*, 325, 135-138.
- Merck KGaA. (2018). *Sigma-Aldrich*. Obtenido de <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/protocols/biology/plant-fungi-dna-isolation-kit.html>
- Metcalf, B. W., Bey, P., Danzin, C., Jung, M. J., Casara, P., & Vevert, J. P. (1978). Catalytic irreversible inhibition of mammalian ornithine decarboxilase (E. C. 4.1.1.17) by substrate and product analogues. *J. Am. Chem. Soc.*, 100, 2551-2553.
- Miller-Fleming, L., Olin-Sandoval, V., Campbell, K., & Ralser, M. (2015). Remaining Mysteries of Molecular Biology: The Role of Polyamines in the Cell. *Journal Molecular Biology*, 427, 3389–3406.

- Milord, F., Pépin, J., Loko, L., Ethier, B., & Mpia, B. (1992). Efficacy and toxicity of eflornithine for treatment of *Trypanosoma brucei gambiense* sleeping sickness. *Lancet*, *340*, 652-655.
- Miyazaki, Y., Matsufuji, S., & Hayashi, S. (1992). Cloning and characterization of a rat gene encoding ornithine decarboxylase antizyme. *Gene*, *113*, 191-197.
- Momany, C., Ernst, S., Ghosh, R., Chang, N.-L., & Hackert, M. L. (1995). Crystallographic structure of a PLP-dependent ornithine decarboxylase from *Lactobacillus 30a* to 3.0 Å resolution. *J. Mol. Biol.*, *252*, 643-655.
- Murakami, Y., Matsufuji, S., Kameji, T., Hayashi, S., Igarashi, K., Tamura, T., & al, e. (1992). Ornithine decarboxylase is degraded by the 26S proteasome without ubiquitination, . *Nature*, *360*, 597-599.
- Murray-Stewart, T., Wang, Y., Devereux, W., & Casero, R. A. (2002). Cloning and characterization of multiple human polyamine oxidase splice variants that code for isoenzymes with different biochemical characteristics. *Biochem. J.*, *368*, 673-677.
- Nasizadeh, S., & Persson, L. (2003). Extremely rapid turnover of S-adenosylmethionine decarboxylase in *Crithidia fasciculata*. *FEBS Letters*, *553*, 131-134.
- New England BioLabs. (2018). *New England BioLabs*. Obtenido de <https://www.neb.com/products/m0530-phusion-high-fidelity-dna-polymerase#Product%20Information>
- New England BioLabs. (2018). *New England BioLabs*. Obtenido de <https://international.neb.com/products/r0176-dpni#Product%20Information>
- Nigro, N. D., Bull, A. W., & Boyd, M. E. (1986). Inhibition of intestinal carcinogenesis in rats: effect of difluoromethylornithine with piroxicam or fish oil. *J. Natl. Cancer Inst.*, *77*, 1309-1313.
- Nishimura, K., Okudaira, H., Ochiai, E., Higashi, K., Kaneko, M., Ishii, I., . . . Igarashi, K. (2009). Identification of proteins whose synthesis is preferentially enhanced by polyamines at the level of translation in mammalian cells. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.*, *41*, 2251-2261.
- Nowotarski, S. L., Woster, P. M., & Casero, R. A. (2013). Polyamines and cancer: implications for chemotherapy and chemoprevention. *Expert Rev. Mol. Med.*, *15*, e3.
- Odenlund, M., Holmqvist, B., Baldetorp, B., Hellstrand, P., & Nilsson, B.-O. (2009). Polyamine synthesis inhibition induces S phase cell cycle arrest in vascular smooth muscle cells. *Amino Acids*, *36*, 273-282.
- Olin-Sandoval, V., Miller-Fleming, L., Haas, R., Alam, M., Vowinckel, J., Méndez-Lucio, O., & Ralser, M. (2019). 'Lysine harvesting' gives rise to an underground polyamine pathway and is a new cellular antioxidant strategy. *Nature*, enviado.

- Paradies, G., Petrosillo, G., Pistolese, M., & Ruggiero, F. (2002). Reactive oxygen species affect mitochondrial electron transport complex I activity through oxidative cardiolipin damage. *Gene*, 286, 135-141.
- Patchett, S. E., Katelaris, P. H., Zhang, Z. W., Alstead, E. M., Domizio, P., & Farthing, M. J. (1996). Ornithine decarboxylase activity is a marker of premalignancy in longstanding *Helicobacter pylori* infection. *Gut*, 39, 807-810.
- Pegg, A. E. (1986). Recent advances in the biochemistry of polyamines in eukaryotes. *Biochem. J.*, 234, 249-262.
- Pegg, A. E. (1988). Polyamine metabolism and its importance in neoplastic growth and a target for chemotherapy. *Cancer Res.*, 48, 759-774.
- Pegg, A. E. (2006). Regulation of ornithine decarboxylase. *J. Biol. Chem.*, 281, 14529-14532.
- Pegg, A. E. (2009). Mammalian polyamine metabolism and function. *IUBMB Life*, 61, 880-894.
- Pegg, A. E. (2009). S-Adenosylmethionine decarboxylase. *Essays in Biochemistry*, 46, 25-46.
- Pegg, A. E., McGovern, K. A., & Wiest, L. (1987). Decarboxylation of alpha-difluoromethylornithine by ornithine decarboxylase. *Biochem. J.*, 241, 305-307.
- Persson, L., Wallström, E. L., Nasizadeh, S., Dartsh, C., Jeppsson, A., Wendt, A., & Holmgren, J. (1998). Regulation of mammalian ornithine decarboxylase. *Biochem. Soc. Trans.* 26 (4), 575-579.
- Phan, J., Zdanov, A., Evdokimov, A. G., Tropea, J. E., Peters, H. K., Kapust, R. B., . . . Waugh, D. S. (2002). Structural basis for the substrate specificity of Tobacco Etch Virus protease. *The Journal of Biological Chemistry*, 277, 50564-50572.
- Pillai, R. B., Tolia, V., Rabah, R., Simpson, P. M., Vijesurier, R., & Lin, C.-H. (1999). Increased colonic ornithine decarboxylase activity in inflammatory bowel disease in children. *Digestive diseases an sciences*, 44, 1565-1570.
- Pitkin, J., & Davis, R. H. (1990). The Genetics of Polyamine synthesis in *Neurospora crassa*. *Arch. Biochem. Biophys.*, 278, 386-391.
- Poulin, R., Casero, R. A., & Soulet, D. (2012). Recent advances in the molecular biology of metazoan polyamine transport. *Amino acids*, 42, 711-723.
- Poulin, R., Lu, L., Ackermann, B., Bey, P., & Pegg, A. E. (1992). Mechanism of the irreversible inactivation of mouse ornithine decarboxylase by alpha-Difluoromethylornithine. *J. Biol. Chem.*, 267, 150-158.

- Qin, C., Samudio, I., Ngwenya, S., & Safe, S. (2004). Estrogen-dependent regulation of ornithine decarboxylase in breast cancer cells through activation of nongenomic cAMP-dependent pathways. *Mol. Carcinog.*, *40*, 160-170.
- Rajam, M., Kumria, R., & Singh, S. (2004). Molecular biology and genetic engineering of polyamines in plants. En S. P. N. A., & S. S, *Plant Biotechnology and molecular markers* (págs. 60-77). New Delhi, India: Anamaya Publishers.
- Ray, R. M., Viar, M. J., Yuan, Q., & Johnson, L. R. (2000). Polyamine depletion delays apoptosis of rat intestinal epithelial cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, *278*, C480-C489.
- Ray, R. M., Zimmerman, B. J., McCormack, S. A., Patel, T. B., & Johnson, L. R. (1999). Polyamine depletion arrests cell cycle and induces inhibitors p21 (Waf1/Cip1), p27 (Kip1), and p53 in IEC-6 cells. *Am. J. Physiol.*, *276*, C684-C691.
- Rhee, H. J., Kim, E.-J., & Lee, J. K. (2007). Physiological polyamines: simple primordial stress molecules. *J. Cell. Mol. Med.*, *11*, 685-703.
- Romijn, J. C., Verkoelen, C., & Splinter, T. A. (1987). Problems of pharmacokinetic studies on alpha-difluoromethylornithine in mice. *Cancer Chemoter*, *19*, 30-34.
- Royal Society of Chemistry. (2015). *ChemSpider*. Obtenido de <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.11216943.html>
- Russel, D. H. (1983). Clinical relevance of polyamines. *CRC Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.*, *18*, 261.
- Russell, D., & Snyder, S. H. (1968). Amine synthesis in rapidly growing tissues: ornithine decarboxylase activity in regenerating rat liver, chick embryo, and various tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, *60*, 1420-1427.
- Russell, D. H. & Snyder S. H. (1969). Amine synthesis in regeneration rat liver: Extremely rapid turnover of ornithine decarboxylase. *Mol. Pharmacol.* *5*, 253-262.
- Sagong, H.-Y., Son, H. F., Kim, S., Kim, Y.-H., Kim, I.-K., & Kim, K.-J. (2016). Crystal structure and pyridoxal 5-Phosphate binding property of lysine decarboxylase from *Selenomonas ruminantium*. *PLoS ONE*, *11*, e0166667.
- Satya Tapas, P., Kumar, P., Madhubala, R., & Tomar, S. (2013). Structural insight into DFMO resistant ornithine decarboxylase from *Entamoeba histolytica*: An inkling to adaptive evolution. *PLoS ONE*, *8*, e53397.
- Schägger, H., & Von Jagow, G. (1987). Tricine-Sodium dodecyl Sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Analytical Biochemistry*, *166*, 368-379.
- Seiler, N. (1987). Functions of polyamine acetylation. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, *65*, 2024-2035.

- Shah, P., & Swiatlo, E. (2008). A multifaceted role for polyamines in bacterial pathogens. *Mol. Microbiol.*, *68*, 4-16.
- Shantz, L. M., & Pegg, A. E. (1999). Translational regulation of ornithine decarboxylase and other enzymes of the polyamine pathway. *Int. J. Biochem. Cell Bio.* *31*, 107-122.
- Shao, D., Xiao, L., Ha, H-C., Casero, R. A. (1996) Isolation of a polyamine transport deficient cell line from the human non-small cell lung carcinoma line NCI H157. *Journal of Cellular Physiology.*, *166*, 43-48.
- Sharma, V., Anderson, D., & Dhawan, A. (2012). Zinc oxide nanoparticles induce oxidative DNA damage and ROS-triggered mitochondria mediated apoptosis in human liver cells (HepG2). *Apoptosis*, *17*, 852-870.
- Sharp, P. A., Sugden, B., & Sambrook, J. (1973). Detection of two restriction endonuclease activities in *Haemophilus parainfluenzae* using analytical agarose-ethidium bromide electrophoresis. *Biochemistry*, *12*, 3055-3063.
- Singh, S., Mukherjee, A., Khomutov, A. R., Persson, L., Heby, O., Chatterjee, M., & Madhubala, R. (2006). Antileishmanial effect of 3-Aminooxy-1-Aminopropane is due to polyamine depletion. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, *51*, 528-534.
- Sjöholm, A. (1993). Role polyamines in the regulation of proliferation and hormone production by insulin-secreting cells. *Am. Physiol. Soc.*, *264*, C501-C518.
- Soksawatmaekhin, W., Kuraishi, A., Sakata, K., Kashiwagi, K., & Igarashi, K. (2004). Excretion and uptake of cadaverine by CadB and its physiological functions in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.*, *51*, 1401-1412.
- Sunkara, P. S., Ramakrishna, S., Nishioka, K., & Rao, P. N. (1981). The relationship between levels and rates of synthesis of polyamines during mammalian cell cycle. *Life Sci.*, *28*, 1497-1506.
- Svensson, F., & Persson, L. (1995). Regulation of mammalian S-adenosylmethionine decarboxylase as studied in a transient expression system. *Biochimica et Biophysica Acta.*, *1260*, 21-26.
- Tabor, C. W., & Tabor, H. (1985). Polyamines in Microorganisms. *Microbiol. Rev.*, *49*, 81-99.
- Tabor, H., & Tabor, C. W. (1964). Spermidine, spermine and related amines. *Pharmacol Rev*, *16*, , 245-300.
- Tachihara, K., Uemura, T., Kashiwagi, K., & Igarashi, K. (2005). Excretion of putrescine and spermidine by the protein encoded by YKL174c (TPO5) in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.*, *280*, 12637-12642.
- Terui, Y., Higashi, K., Taniguchi, S., Shigemasa, A., Nishimura, K., Yamamoto, K., . . . Igarashi, K. (2007). Enhancement of the synthesis of RpoN, Cra, and H-NS by

- polyamines at the level of translation in *Escherichia coli* cultured with glucose and glutamate. *J. Bacteriol.*, 189, 2359-2368.
- Thermo Fisher Scientific. (2012). *Thermo Fisher Scientific*. Obtenido de <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/CMD/brochures/TG-20666-Accucore-HPLC-Columns-TG20666-EN.pdf>
- Thermo Fisher Scientific. (2 de Febrero de 2016). *Thermo Fisher Scientific*. Recuperado el 26 de Septiembre de 2018, de [https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/sybr\\_safe\\_dna\\_gel\\_stain\\_man.pdf](https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/sybr_safe_dna_gel_stain_man.pdf)
- Thorne, H. V. (1967). Electrophoretic characterization and fractionation of polyoma virus DNA. *J. Mol. Biol.*, 24, 203-211.
- Tomas, T., & Kiang, D. T. (1987). Additive growth inhibitory effects of DL-difluoromethylornithine and antiestrogens in MCF breast cancer cell line. *Res. Commun.*, 143, 424-430.
- Tyagi, A. K., Tabor, C. W., & Tabor, H. (1981). Ornithine decarboxylase from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.*, 256, 12156-12163.
- Tyms, A. S., Rawal, B. K., Naim, H. M., & Williamson, J. D. (1986). The antiviral effect of inhibitors of polyamine metabolism. *Advances in polyamine Research*, 4, 507-517.
- Tyms, A. S., Williamson, J. D., & Bacchi, C. J. (1988). Polyamine inhibitors in antimicrobial chemotherapy. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, 22, 403-427.
- Uemura, T., Kashiwagi, K., & Igarashi, K. (2005). Uptake of putrescine and spermidine by Gap1p on the plasma membrane in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 328, 1028-1033.
- Uemura, T., Kashiwagi, K., & Igarashi, K. (2007). Polyamine uptake by DUR3 and SAM3 in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.*, 282, 7733-7741.
- Uemura, T., Tomonari, Y., Kashiwagi, K., & Igarashi, K. (2004). Uptake of GABA and putrescine by UGA4 on the vacuolar membrane in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 315, 1082-1087.
- UniProt Consortium. (10 de 03 de 2018). *UniProt*. Obtenido de <https://www.uniprot.org/>
- Valdés-Santiago, L., & Ruiz-Herrera, J. (2014). Stress and polyamine metabolism in fungi. *Front. Chem.*, 1, 42.
- Van Driessche, A. E., Van Gerven, N., Bomans, P. H., Joosten, R. R., Friedrich, H., Gil-Carton, D., . . . Sleutel, M. (2018). Molecular nucleation mechanisms and control strategies for crystal polymorph selection. *Nature*, 556, 89-94.
- Vivó, M., de Vera, N., Cortés, R., Mengod, G., Camón, L., & E., M. (2001). Polyamines in the basal ganglia of human brain. Influence of aging and degenerative movement disorders. *Neurosci. Lett.*, 304, 107-111.

- Wagner, A. J., Meyers, C., Laimins, L. A., & Hay, N. (1993). c-Myc induces the expression and activity of ornithine decarboxylase, . *Cell Growth Differ.*, 4, 879-883.
- Wallace, H. M., Duthie, J., Evans, D. M., Lamond, S., Nicoll, K. M., & Heys, D. (2000). Alterations in Polyamine catabolic enzymes in human breast cancer tissue. *Clinical Cancer Research*, 6, 3657-3661.
- Wang, Y., Devereux, W., Stewart, T. M., & Casero, R. A. (2001). Characterization of the interaction between the transcription factors human polyamine modulated factor (PMF-1) and NF-E2-related factor 2 (Nrf-2) in the transcriptional regulation of the spermidine/spermine N1-acetyltransferase (SSAT) gene. *Biochemical Journal*, 355, 45-49.
- Wang, Y., Xiao, L., Thiagalingam, A., Nelkin, B. D., & Casero, R. A. (1998). The Identification of a Cis-element and a Trans-acting Factor Involved in the Response to Polyamines and Polyamine Analogues in the Regulation of the Human Spermidine/Spermine N1-Acetyltransferase Gene Transcription. *The Journal of Biological Chemistry*, 273, 34623-34630.
- Weeks, C. E., Herrmann, A. L., Nelson, F. R., & Slaga, T. J. (1982). alpha-difluoromethylornithine, an irreversible inhibitor of ornithine decarboxylase, inhibits tumor promoter-induced polyamine accumulation and carcinogenesis in mouse skin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 79, 6028-6032.
- Winum, J.-Y., Innocenti, A., Scozzafava, A., Montero, J.-L., & Supuran, C. T. (2009). Carbonic anhydrase inhibitors. Inhibition of the human cytosolic isoforms I and II and transmembrane, tumor-associated isoforms IX. *Bioorganic and medicinal chemistry*, 17, 3649-3652.
- Wu, D. H., Kaan, H. Y., Zheng, X., Tang, X., He, Y., Vanessa Tan, Q., . . . Song, H. (2015). Structural basis of ornithine decarboxylase inactivation and accelerated degradation by polyamine sensor antizyme1. *Sci. Rep.*, 5, 14738.
- Wu, T., Yankovskaya, V., & McIntire, W. S. (2003). Cloning, Sequencing, and Heterologous Expression of the Murine Peroxisomal Flavoprotein, N1-Acetylated Polyamine Oxidase. *The Journal of Biological Chemistry*, 278, 20514-20525.
- Xie, Q. W., Tabor, C. W., & Tabor, H. (1993). Deletion mutations in the speED operon: spermidine is not essential for the growth of Escherichia coli. *Gene*, 126, 115-117.
- Yerlikaya, A., & Stanley, B. A. (2004). S-Adenosylmethionine decarboxylase degradation by the 26 S proteasome is accelerated by substrate-mediated transamination. *The journal of biological chemistry*, 279, 12469-12478.
- Yu, B. (1994). Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiological reviews*, 75, 139-162.