



UNIVERSIDAD DE MURCIA

FACULTAD DE MEDICINA

**Estructura, Expresión y Aspectos
Funcionales del Inhibidor de Antizimas 2
(AZIN2)**

D. Bruno Ramos Molina

2013

El trabajo experimental presentado en esta Tesis Doctoral ha sido financiado por el Ministerio de Economía y Competitividad, y por la Fundación Séneca (Comunidad Autónoma Región de Murcia), con cargo a los proyectos SAF2008-03638 y SAF2011-29051, y 08681/PI/08, respectivamente, y con fondos FEDER de la Comunidad Europea.

Bruno Ramos Molina ha disfrutado de una beca del Programa de Formación de Profesorado Universitario del Ministerio de Educación y Ciencia (2009-2013) y de una beca para estancias breves de la Federación Europea de Sociedades Bioquímicas (FEBS).

Algunos de los resultados obtenidos han sido incluidos en las siguientes publicaciones y comunicaciones a congresos:

PUBLICACIONES:

1. López-Contreras AJ, **Ramos-Molina B**, Cremades A, Peñafiel R (2010) Antizyme inhibitor 2: molecular, cellular and physiological aspects. *Amino Acids*, 38: 603-611.
2. **Ramos-Molina B**, López-Contreras AJ, Cremades A, Peñafiel R (2012) Differential expression of ornithine decarboxylase antizyme inhibitors and antizymes in rodent tissues and human cell lines. *Amino Acids*, 42: 539-47.
3. **Ramos-Molina B**, Lambertos A, López-Contreras AJ, Peñafiel R (2013) Mutational analysis of the antizyme-binding element reveals critical residues for the function of ornithine decarboxylase. *Biochim. Biophys. Acta*, 1830: 5157-5165.
4. **Ramos-Molina B**, López-Contreras AJ, Lambertos A, Kasprzak JM, Czerwoniec A, Bujnicki JM, Cremades A, Peñafiel R (2013) Structural and functional aspects of ornithine decarboxylase antizyme inhibitor 2. *FEBS Journal* (submitted)

COMUNICACIONES A CONGRESOS:

1. **Ramos-Molina B**, Martínez de la Torre M, A.J. López-Contreras, Cremades A, Peñafiel R. "Implicación de la proteína inhibidora de la antizima de ornitina descarboxilasa (AZIN2) en la espermatogénesis de ratón". XXX Meeting of the Spanish Society for Biochemistry and Molecular Biology. Málaga, SPAIN (2007).

2. López-Contreras AJ, **Ramos-Molina B**, Cremades A, Peñafiel R. "Influence of antizyme inhibitor 2 (AZIN2/ODCp) on polyamine uptake by mammalian cells". International Congress on Biogenic Amines: Biological and Clinical Significance. Catania, ITALY (2007).
3. López-Contreras AJ, **Ramos-Molina B**, Cremades A, Peñafiel R. "Antizyme inhibitor 2 (ODC-like): another player in polyamine metabolism". 10th International Congress on Amino Acids and Proteins (ICAAP). Kallithea, GREECE (2007).
4. **Ramos-Molina B**, López-Contreras AJ, De la Morena E, Cremades A, Peñafiel R. "Caracterización del elemento de unión a antizimas (AZBE) de la proteína inhibidora 2 de antizimas (AZIN2)". XXX Meeting of the Spanish Society for Biochemistry and Molecular Biology. Bilbao, SPAIN (2008).
5. **Ramos-Molina B**, López-Contreras AJ, Cremades A, Peñafiel R. "Functional aspects and expression of mouse antizyme inhibitor 2 in brain and testis". 2010 International Polyamine Conference. Gotemba, JAPAN (2010).
6. **Ramos-Molina B**, López-Contreras AJ, Cremades A, Peñafiel R. "Ornithine decarboxylase antizyme inhibitors: expression and role in putrescine and agmatine uptake". 2nd International Conference on the Role of Polyamines and their analogs in cancer and other diseases. Tivoli, ITALY (2010).
7. **Ramos-Molina B**, López-Contreras AJ, Lambertos A, Cremades A, Peñafiel R. "Relevance of polyamine metabolism in steroidogenic tissues". Biogenic Amines and COST 922: Health implications of dietary amines. Trento, ITALY (2011).
8. **Ramos-Molina B**, López-Contreras AJ, Lambertos A, Cremades A, Peñafiel R. "*Antizyme inhibitor 2: functional and structural aspects*". Polyamines Gordon Research Conference. New Hampshire, USA (2011).
9. **Ramos-Molina B**, Lambertos A, López-Contreras AJ, Cremades A, Peñafiel R. "Regulatory and functional aspects of antizyme inhibitor 2". Polyamines: Biological and Clinical Perspectives. Istanbul, TURKEY (2012).

10. **Ramos-Molina B**, Lambertos A, López-Contreras AJ, Cremades A, Peñafiel R. "Antizyme binding element of ornithine decarboxylase: analysis of critical residues". 22nd IUBMB & 37th FEBS Congress: From Single Molecules to Systems Biology. Seville, SPAIN (2012).

11. **Ramos-Molina B**, López-Contreras AJ, Lambertos A, Kasprzak JM, Czerwoniec A, Bujnicki JM, Peñafiel R. "Structural and mutational analyses of the ornithine decarboxylase antizyme inhibitor 2 reveal a monomeric state in solution and conserved residues critical for the interaction with antizymes". Polyamines Gordon Research Conference. New Hampshire, USA (2013).

12. Peñafiel R., **Ramos-Molina B**, Lambertos A., López-Contreras AJ, López-García C, Cremades A. "Antizyme inhibitor 2: a novel player in polyamine metabolism". 38th FEBS Congress: *Mechanism in Biology*. St. Petersburg, RUSSIA (2013).

Otras publicaciones cuyos resultados no se incluyen en el presente trabajo:

1. López-Contreras AJ, **Ramos-Molina B**, Cremades A, Peñafiel R (2008) Antizyme inhibitor 2 (AZIN2/ODCp) stimulates polyamine uptake by mammalian cells. *J. Biol. Chem.*, 238: 20761-69.

2. López-Contreras AJ, **Ramos-Molina B**, Martínez de la Torre M, Peñafiel-Verdú C, Puelles L, Cremades A, Peñafiel R (2009) Expression of antizyme inhibitor 2 in male haploid germinal cells suggest a role in spermiogenesis. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.*, 41: 1070-78.

3. López-Contreras AJ, Sánchez-Laorden BL, **Ramos-Molina B**, de la Morena ME, Cremades A, Peñafiel R (2009) Subcellular localization of antizyme inhibitor 2 in mammalian cells: Influence of intrinsic sequences and interaction with antizymes. *J. Cell. Biochem.*, 107: 732-40.

4. Levillain O, **Ramos-Molina B**, Forcheron F, Peñafiel R (2012) Expression and distribution of genes encoding for polyamine-metabolizing enzymes in the different zones of male and female mouse kidneys. *Amino Acids*, 43: 2153-63.

5. López-García C, **Ramos-Molina B**, Lambertos A, López-Contreras AJ, Cremades A, Peñafiel R (2013) Antizyme Inhibitor 2 Hypomorphic Mice. *New Patterns of Expression in*

Pancreas and Adrenal Glands Suggest a Role in Secretory Processes. PLoS One, 8(7): e69188.

6. López-Contreras AJ, de la Morena ME, **Ramos-Molina B**, Lambertos A, Cremades A, Peñafiel R (2013) The induction of cardiac ornithine decarboxylase by β 2-adrenergic agents is associated with calcium channels and phosphorylation of ERK1/2. J. Cell. Biochem., 114: 1978-86.

AGRADECIMIENTOS

A mis directores de Tesis, Rafa y Andrés, por todo lo que he aprendido de ellos y por su valor humano.

A Asunción, por ser una fuente inagotable de conocimiento, por su colaboración en los experimentos con animales y por ser tan buena gente.

A todos los miembros del Departamento, pasados y presentes, por su amistad y ayuda en todo momento.

Al grupo de Inmunología por su cariño extremo y los buenos momentos.

A mis amigos químicos, Paco, Fabio y Guzmán, por soportarme día tras día a la hora de la comida.

A mi familia, sobre todo a mi madre, por sus esfuerzos para permitirme estudiar y dedicarme a lo que me gusta.

Al amor de mi vida, Tony, por hacerme la persona más feliz de mundo y por apoyarme tanto durante estos años.

ABREVIATURAS	1
INTRODUCCIÓN	3
1. Generalidades de las poliaminas	5
1.1. Funciones de las poliaminas	6
1.1.1. Regulación de la expresión génica	6
1.1.2. Efecto sobre las rutas de señalización y otras funciones celulares	7
1.1.3. Activación del factor de iniciación de la traducción eIF5A mediante hipusinación	8
1.1.4. Regulación de canales iónicos	8
1.1.5. Autofagia y longevidad	9
1.2. Metabolismo de poliaminas	9
1.2.1. Ruta biosintética	9
1.2.2. Ruta de retroconversión	10
1.2.3. Ruta catabólica	11
1.3. Transporte de poliaminas	12
1.4. Regulación de los niveles de poliaminas	13
2. Regulación de ODC	14
2.1. Regulación transcripcional de ODC	14
2.2. Regulación traduccional de ODC	14
2.3. Regulación post-traduccional de ODC: Antizimas	15
3. Antizimas de ODC	17
3.1. Síntesis y degradación de las antizimas	17
3.2. Isoformas de la AZ	19
3.3. Antizima 1 (AZ1)	20
4. Inhibidores de antizimas	21
4.1. Inhibidor de antizimas 1 (AZIN1)	21
4.2. Inhibidor de antizimas 2 (AZIN2)	24
4.2.1. Estructura génica y secuencia proteica de AZIN2	24
4.2.2. Características funcionales de AZIN2	24
4.2.3. Estabilidad de la proteína AZIN2	25
4.2.4. Expresión tisular de AZIN2	26
4.2.5. Localización subcelular de AZIN2	26

5. Fisiología de AZIN2	27
5.1. AZIN2 en el sistema reproductor	27
5.2. AZIN2 en el sistema nervioso central (SNC)	28
5.3. AZIN2 en gránulos secretores de mastocitos (MCs)	29
ANTECEDENTES Y OBJETIVOS	31
MATERIALES Y MÉTODOS	37
1. Reactivos	39
2. Líneas celulares	40
3. Transfecciones transitorias	40
4. Construcciones génicas	41
5. Mutagénesis dirigida	41
6. SDS-PAGE y transferencia Western	42
7. Reacción de cross-linking	43
8. Cromatografía de exclusión por tamaño	43
9. Co-inmunoprecipitación	44
10. Predicción de la estructura 3D de proteínas mediante modelado comparativo	44
11. Determinación de la actividad ODC	45
12. Ensayo de captación de poliaminas	46
13. Animales	46
13.1. Manipulación, obtención de tejidos	46
13.2. Tratamientos	47
14. Extracción de ARN total y síntesis de ADNc	47
15. RT-PCR a tiempo real	48
16. Síntesis de [¹⁴ C]-agmatina	49
17. Análisis estadístico	49
RESULTADOS	51
Capítulo 1:	
Expresión de antizimas e inhibidores de antizimas en tejidos de roedores y líneas celulares humanas	53
Capítulo 2:	
Expresión de AZIN2 en testículo de ratón: factores reguladores	63

Capítulo 3:

Transporte de agmatina en células de mamíferos. Influencia de AZIN2 y otras proteínas relacionadas con el metabolismo de poliaminas 77

Capítulo 4:

Análisis de la estructura terciaria y cuaternaria del inhibidor de antizimas 2 y de su interacción con las antizimas 93

Capítulo 5:

Análisis mutacional de aminoácidos conservados en el elemento de unión a antizimas de ornitina descarboxilasa 109

Capítulo 6:

Degradación y estabilidad de AZIN2. Influencia de la interacción con AZs 121

DISCUSIÓN GENERAL 133

CONCLUSIONES 143

ENGLISH SUMMARY 147

BIBLIOGRAFÍA 159

APÉNDICE 183

β-Act: β -Actina	DFMO: α -difluorometilornitina
β-ME: β -mercaptoetanol	DMEM: medio mínimo esencial de Dulbecco
ADC: arginina descarboxilasa	dNTP: desoxinucleótidos trifosfato
ADN: ácido desoxirribonucleico	dpm: desintegraciones por minuto
ADNc: ADN complementario	DTT: ditioneitol
Agm: agmatina	EDTA: ácido etilendiamino tetraacético
AMPA: ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico	EGTA: ácido etilenglicol tetraacético
AMPc: adenosina 3',5'-monofosfato cíclico	ERGIC: compartimento retículo endoplásmico-Golgi
APAO: acetilpoliamino oxidasa	FLUT: flutamida
ARN: ácido ribonucleico	FSH: hormona folículo estimulante
ARNm: ARN mensajero	Gapdh: gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa
ATM: quinasa mutada en ataxia-telangiectasia	GFP: proteína fluorescente verde
ATP: adenosin 5'-trifosfato	HA: epítipo de hemaglutinina humana
ATR: quinasa relacionada con ATM y Rad3	HRP: peroxidasa de rábano
AZ: antizima	IP: inmunoprecipitación
AZBE: elemento de unión a antizimas	IRE: sitio interno de unión a ribosomas
AZIN: inhibidor de antizimas	Kb: kilobase
BCA: ácido bicinconónico	KDa: kilodalton
BSA: albúmina de suero bovino	Km: constante de Michaelis-Menten
14C: carbono 14	LH: hormona luteinizante
Chx: cicloheximida	MAZ: antizima mutada
Ct: ciclo umbral	MAT: metionina adenosil transferasa
Cyp11A1: citocromo P450 _{scc}	MC: mastocito
Cyp17A1: citocromo P450 hidroxilasa	NMDA: N-metil-D-aspartato
DAO: diamino oxidasa	

ODC: ornitina descarboxilasa	SEM: error estándar de la media
ODCp: parólogo de ODC	SNC: sistema nervioso central
ORF: pauta abierta de lectura	SNP: polimorfismo de un solo nucleótido
PA: poliaminas	Spd: espermidina
PAGE: electroforesis en gel de poliacrilamida	SpdST: espermidina sintasa
PBS: tampón fosfato salino	Spm: espermina
PBS-T: PBS con Tween al 0.1%	SMO: espermina oxidasa
pb: pares de base	SpmST: espermina sintasa
PCR: reacción en cadena de la polimerasa	SSAT: espermidina/espermina N1-acetiltransferasa
PLP: fosfato de piridoxal	Star: proteína reguladora de la esteroidogénesis aguda
PMA: acetato de forbol miristato	TAE: tampón acético-EDTA
POPOP: 2',2'p-fenil bis (4-metil-5-feniloxazol)	TEMED: N,N,N,N'-tetrametilendiamina
PPO: 2,5-difeniloxazol	TGN: red trans-Golgi
PRE: elemento de respuesta a poliaminas	Tm: temperatura de fusión
Prm2: protamina 2	Tris: tris(hidroximetil)aminometano
Put: putrescina	UTR: regiones no traducidas
qPCR: PCR cuantitativa	Vm: velocidad máxima
rpm: revoluciones por minuto	WB: Western blot
RT-PCR: reacción en cadena de la polimerasa acoplada a transcripción reversa.	Wt: wild type
SAM: S-adenosilmetionina	
SAMDC: S-adenosilmetionina decarboxilasa	
SBF: suero bovino fetal	
SDS: dodecil sulfato sódico	

INTRODUCCIÓN

1. Generalidades de las poliaminas.

Las poliaminas son pequeñas moléculas básicas esenciales para la célula, ya que regulan ciertos procesos vitales para el mantenimiento y crecimiento celular. Se han llevado a cabo múltiples estudios sobre las poliaminas en distintos organismos, desde microorganismos a especies superiores, demostrándose su importancia en cada caso. Las principales poliaminas sintetizadas en células de mamíferos son putrescina, espermidina y espermina. No obstante existen otras poliaminas minoritarias como agmatina que no son sintetizadas por las células de mamíferos pero están presentes en ellas. El origen de esta amina podría ser la dieta o la flora intestinal, pues sí se sintetiza por plantas y bacterias. En la Fig. 1 se pueden comparar las estructuras químicas de cada una de las poliaminas mayoritarias.

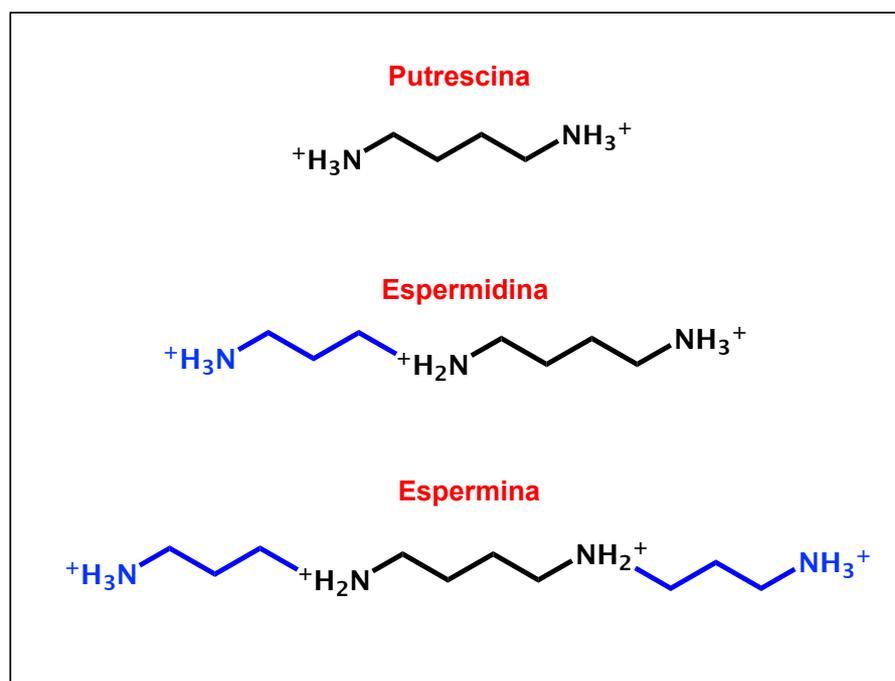


FIGURA 1. Estructura química de las poliaminas mayoritarias

En general los tejidos con gran potencial proliferativo poseen una mayor concentración de poliaminas (Jänne et al., 1978). Se ha comprobado que el uso de inhibidores de la síntesis de poliaminas produce un importante descenso del crecimiento celular (Pegg, 1988; Bardocz et al., 1995). Además de la función que ejercen las poliaminas sobre la tasa de crecimiento celular, ciertos experimentos han demostrado que estas moléculas también están implicadas en diversos procesos de diferenciación celular (Oka & Borellini, 1989) así como en muerte celular por apoptosis (Seiler & Raul, 2005).

1.1. Funciones de las poliaminas.

A pH fisiológico los grupos amino de las poliaminas se encuentran protonados y por tanto son moléculas policatiónicas, por lo que son capaces de interactuar electrostáticamente con diversos componentes celulares cargados negativamente como ácidos nucleicos, proteínas o fosfolípidos. En la mayoría de las células estudiadas las concentraciones de espermidina y espermina son del orden de mM, mientras que las de putrescina suelen ser un orden de magnitud menor (Cohen, 1998). Además, la mayor parte de las poliaminas se encuentran unidas a algún tipo de macromolécula, siendo la fracción libre minoritaria.

Las principales funciones de las poliaminas se resumen en la Fig. 2. Las poliaminas afectan a procesos claves como la transcripción y la traducción de ARNm, y están implicadas en la regulación de canales iónicos, interacciones célula-célula, la integridad del citoesqueleto, la modulación de ciertas vías de señalización, la activación del factor de iniciación de la traducción eIF5A mediante hipusinación (mecanismo que se describe posteriormente) y el aumento de la longevidad mediada por autofagia.

1.1.1. Regulación de la expresión génica.

Dado que las poliaminas se encuentran cargadas positivamente a pH fisiológico, éstas se unen electrostáticamente a macromoléculas con cargas negativas como proteínas, ácidos nucleicos y fosfolípidos de la membrana (Pegg, 1988; Childs et al., 2003; Sarkar et al., 2009). Aunque es difícil dilucidar el significado biológico de estas interacciones, lo que es claro es que las poliaminas afectan a la estructura del ADN y ARN, a las funciones de los ribosomas y a la actividad de muchas enzimas como quinasas y fosfatasas. Además, se han identificado elementos de respuesta a poliaminas (PRE) en algunos genes (Childs et al., 2003; Casero Jr & Marton, 2007) y se ha descrito que la transcripción de muchos genes está influenciada por los niveles de poliaminas (Pegg, 1986; Pegg 1988; Wallace et al., 2003; Childs et al., 2003; Jänne et al., 2004; Gerner & Meyskens, 2004). Entre estos genes se incluyen factores transcripcionales como c-Myc y c-Jun (Liu et al., 2006; Xiao et al., 2007a), que pueden conducir a rutas de señalización adicionales. De manera similar, las poliaminas influyen selectivamente sobre la traducción de muchos ARNm de genes relacionados con su propio metabolismo, como los de antizima (AZ), S-adenosilmetionina descarboxilasa (SAMDC) o espermidina/espermina N1-acetiltransferasa (SSAT).

Mientras que los efectos de las poliaminas sobre la transcripción de genes podrían ser debidos a la alteración de los niveles de factores de transcripción (Zhou et al., 2008; Xiao et al., 2007b), los efectos sobre la traducción de genes podrían ocurrir a

través de una interacción directa con el ARNm diana en el ribosoma o a través de cambios en las proteínas que afectan selectivamente a la traducción.

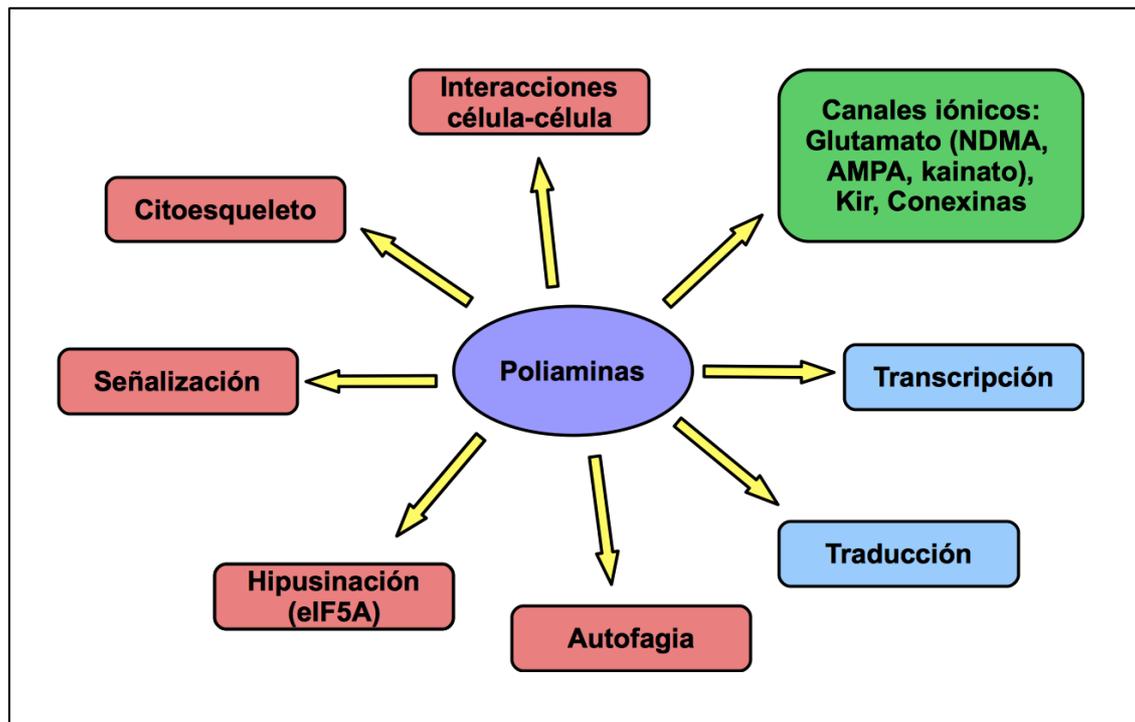


FIGURA 2. Principales funciones de las poliaminas (figura modificada de Pegg, 2009).

1.1.2. Efecto sobre las rutas de señalización y otras funciones celulares.

Existe un amplio conocimiento acerca de los efectos de las poliaminas sobre las rutas de señalización. En muchos de los experimentos realizados se utilizó α -difluorometilornitina (DFMO), un inhibidor de la ruta biosintética, para alterar los niveles de poliaminas, comparándose una ruta de señalización determinada en estas condiciones y en otras en las que se adicionaron poliaminas exógenas para invertir los efectos del inhibidor. De esta manera, la alteración del contenido intracelular de poliaminas puede afectar los niveles o la fosforilación de proteínas reguladoras importantes, tales como importina- α 1, Akt/protein quinasa B, GSK-3 β , Src, cdk-4, p21Cip1, p53, Mdm2 y EGFR (Nilsson et al., 2005; Xiao et al., 2007; Vaidya et al., 2006; Ray et al., 2007a; Zhou et al., 2008; Bhattacharya et al., 2007; Koomoa et al., 2008; Bhattacharya et al., 2009; Rounbehler et al., 2009; Kucharzewska et al., 2009).

Las poliaminas también han sido implicadas en las interacciones célula-célula mediadas por cadherinas (Liu et al., 2009) o receptores tipo Toll (Chen et al., 2007). También afectan al citoesqueleto a través de su acción sobre el ensamblaje de microtúbulos (Mechulam et al., 2009; Savarin et al., 2010), o mediante cambios en la

actividad de proteínas G como Rac1 y RhoA (Vaidya et al., 2005; Ray et al., 2007b; Mäkitie et al., 2009a).

1.1.3. Activación del factor de iniciación de la traducción eIF5A mediante hipusinación.

Por otro lado, la espermidina tiene un papel esencial como sustrato en la hipusinación del factor de iniciación eIF5A (Park, 2006; Park et al., 2010). Esta proteína requiere la modificación post-traducciona de una lisina hasta hipusina para su actividad. La formación del residuo de hipusina consiste en la unión de la lisina y la espermidina a través del grupo aminobutilo, y posterior hidroxilación. La forma madura (hipusinada) de eIF5A es esencial para el crecimiento y la síntesis proteica en levaduras (Childs et al., 2003; Chattopadhyay et al., 2008; Chatterjee et al., 2006), y es bastante probable que también lo sea en mamíferos. La función exacta de eIF5A no se conoce con exactitud, si bien se le ha asignado un papel en la síntesis ribosomal de proteínas (Childs et al., 2003; Hyvonen et al., 2007; Jao & Chen 2006; Dias et al., 2008), el transporte de ARN y la estabilidad de ARNm (Schrader et al., 2006), y la replicación viral (Schafer et al., 2006). Recientemente, se ha puesto de manifiesto que el efecto negativo de la depleción de los niveles de poliaminas o la adición de ciertos análogos de las mismas afectan sobre el crecimiento celular podría estar mediado por inhibición de la hipusinación de eIF5A (Landau et al., 2010; Hyvönen et al., 2012). Además, se ha demostrado que la enzima SSAT, una enzima de la ruta de retroconversión de las poliaminas (ver más adelante), es capaz de inactivar eIF5A a través de la acetilación específica del residuo de hipusina (Lee et al., 2011).

1.1.4. Regulación de canales iónicos.

Las poliaminas también tienen un papel clave en la modulación de determinados receptores y canales iónicos. Algunos de estos canales se expresan abundantemente a nivel cerebral, lo que ha incrementado el interés sobre el metabolismo de poliaminas en el SNC. Se conoce que las poliaminas actúan regulando receptores de glutamato, como el NMDA, AMPA o de kainato, que median la transmisión sináptica excitatoria en el cerebro de los mamíferos, y los canales rectificadores de potasio (Kir), que controlan el potencial de membrana y la homeostasis de potasio en muchos tipos celulares (Dingledine et al., 1999; Stanfield & Sutcliffe 2003; Weiger & Hermann, 2009). Además, las poliaminas son capaces de regular ciertos poros unidos a conexina y otros canales que afectan a la señalización del calcio intracelular o al transporte de sodio (Lin & Veenstra, 2007; Fleidervish et al., 2008). Por otro lado, es interesante destacar que

diversos trabajos han indicado que la agmatina podría actuar como neurotransmisor en el SNC (Li et al., 1994; Reis & Regunathan, 1999; Reis & Regunathan, 2000; Raasch et al., 2001; Bence et al, 2003; Halaris & Piletz, 2007; Uzbay, 2012).

1.1.5. Autofagia y longevidad.

Existen un número creciente de estudios que relacionan el proceso de autofagia con la longevidad de diversos organismos. La autofagia es el mecanismo responsable de la degradación de macromoléculas y organelas intracelulares, y es una función esencial en el desarrollo y supervivencia, ya que se encarga de degradar las moléculas no deseadas formadas durante diversos tipos de estrés, envejecimiento o patologías. Además la autofagia supone una fuente importante de energía, y globalmente es indispensable para una adecuada homeostasis celular.

Recientemente se ha demostrado que la adición de espermidina aumenta la longevidad de ciertos organismos sencillos tales como levaduras, nemátodos y moscas, y de células humanas del sistema inmune en cultivo (Morselli et al., 2009), y parece ser que el mecanismo a través del cual la espermidina produce estos efectos beneficiosos podría ser la activación de la autofagia, a través de la inhibición de la histona acetilasa (Eisenberg et al., 2009). De hecho, el proceso de acetilación/desacetilación de histonas ha sido reconocido como un importante regulador epigenético que puede modular la longevidad (Dang et al., 2009; Kawahara et al., 2009). En mamíferos se ha comprobado que las poliaminas también poseen efectos “anti-envejecimiento”, ya que el aporte extra de poliaminas a modelos de ratones de vida corta reduce las patologías relacionadas con la edad y extiende el periodo de supervivencia (Soda et al., 2009). Por otro lado varios estudios han demostrado que los niveles de poliaminas disminuyen en cerebros envejecidos de moscas, roedores y humanos (Das & Kanungo, 1982; Vivó et al., 2001; Gupta et al., 2013). Además, se ha constatado que en moscas este descenso está relacionado con alteraciones de memoria asociadas con la edad, y que la administración oral de poliaminas o el aumento en síntesis de poliaminas a nivel cerebral, mediante la expresión de ODC, contrarrestan eficientemente estas alteraciones de memoria a través del aumento del proceso de autofagia (Gupta et al., 2013).

1.2. Metabolismo de poliaminas.

1.2.1. Ruta biosintética.

La ruta biosintética (Fig. 3) comienza con la transformación de ornitina, un aminoácido no proteico procedente de arginina, en putrescina por acción de la enzima

ornitina descarboxilasa (ODC). A continuación, la putrescina se transforma en espermidina y espermina por la adición de uno o dos grupos aminopropilo a ambos extremos de la molécula. Las reacciones son sucesivas, produciéndose en primer lugar la condensación de un grupo aminopropilo con un grupo amino de la putrescina produciéndose espermidina, proceso catalizado por la enzima espermidina sintasa (SpdST). En una etapa posterior se produce la condensación de un segundo aminopropilo con el grupo amino del otro extremo de la molécula generándose la espermina, proceso catalizado por la espermina sintasa (SpmST). Los grupos aminopropilo necesarios para la síntesis de las poliaminas superiores proceden de S-adenosilmetionina (SAM) descarboxilada, molécula generada a partir de SAM por la acción de S-adenosilmetionina descarboxilasa (SAMDC).

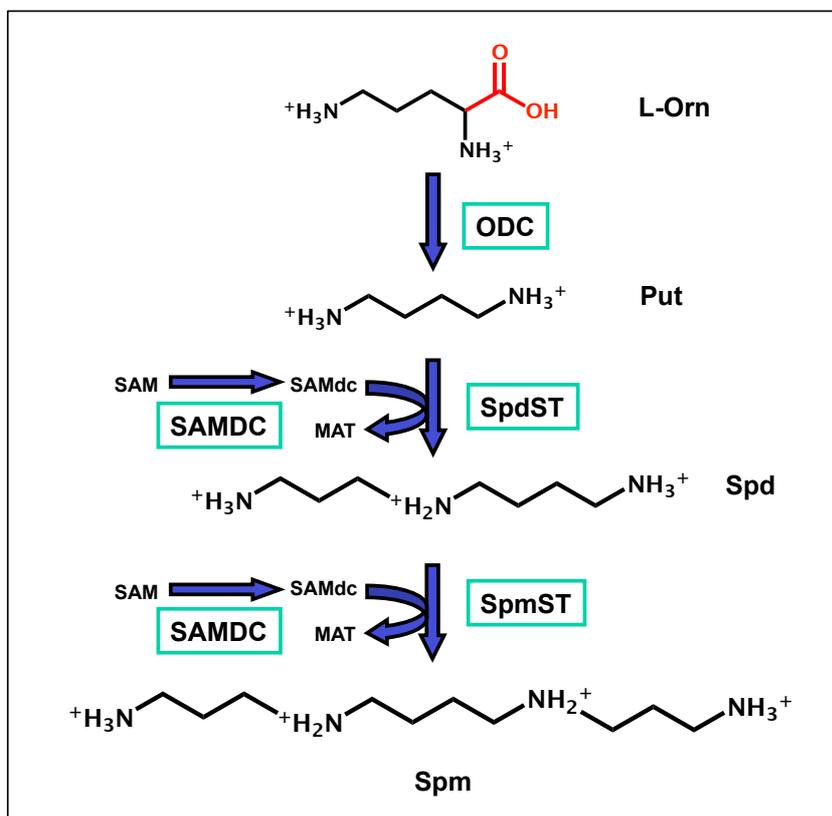


FIGURA 3. Ruta biosintética de las poliaminas

1.2.2. Ruta de retronversión.

En la ruta de retroconversión (Fig. 4) las diferentes poliaminas se transforman en sus precursoras inmediatas. En primer lugar las poliaminas espermidina o espermina son acetiladas por la acción de la espermidina/espermina N1-acetiltransferasa (SSAT). Esta enzima actúa acetilando el grupo amino primario del brazo aminopropilo de la

poliamina a partir de acetilCoA, dando lugar a la formación de N1-acetilespermidina o N1-acetilespermina (Casero & Pegg, 1993). A continuación las poliaminas acetiladas son transformadas en su precursor inmediato por la acción de la acetilpoliamino oxidasa (APAO), que rompe la molécula y libera la poliamina menor junto con H_2O_2 y 3-acetamidopropanal (Holtta, 1977; Bolkenius & Seiler, 1981). La espermina también puede transformarse directamente en espermidina sin acetilación previa por la acción de la espermina oxidasa (SMO) (Vujcic et al., 2002).

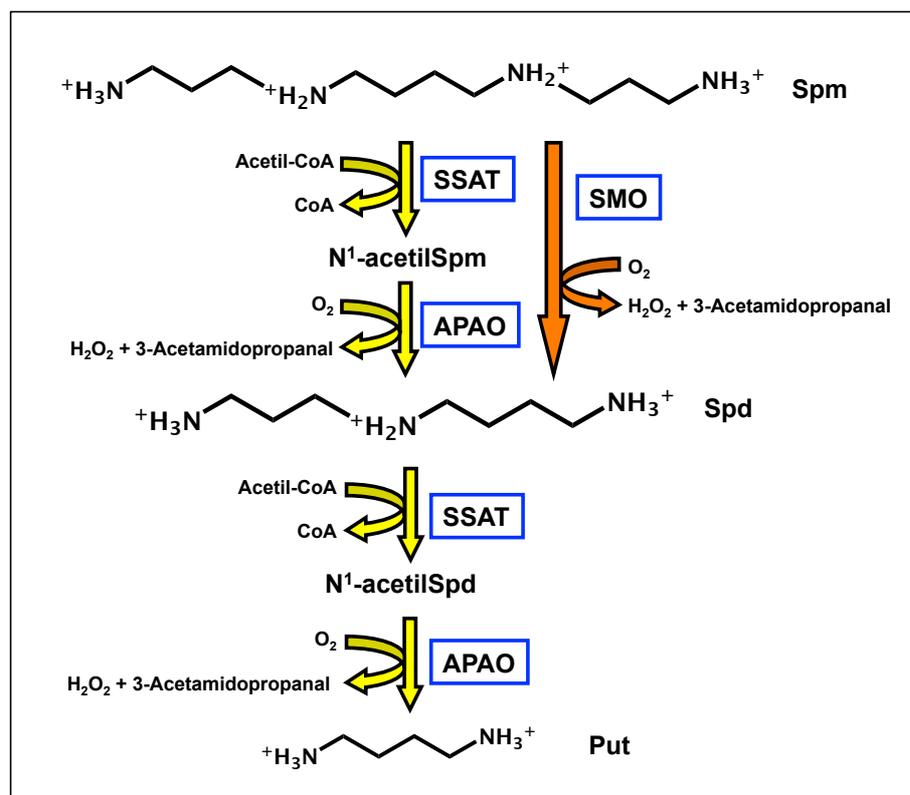


FIGURA 4. Ruta de retroconversión de poliaminas.

1.2.3. Ruta catabólica.

En mamíferos la principal enzima implicada en el catabolismo de poliaminas es la diamino oxidasa (DAO), que cataliza la desaminación oxidativa de putrescina, entre otros sustratos, liberándose productos como H_2O_2 y los correspondientes aminoaldehídos (Seiler et al., 1983). Otras enzimas implicadas en el catabolismo de poliaminas son las amino oxidasas séricas, y transferasas como espermidina N⁸-acetiltransferasa y N⁸-acetilespermidina desacetilasa (Seiler, 2004).

1.3. Transporte de poliaminas.

Mientras que en bacterias, levaduras y ciertos protozoos se han caracterizado los sistemas transportadores de poliaminas (Igarashi & Kashiwagi, 1999; Reguera et al., 2005), en células de mamíferos aunque se ha estudiado de manera intensiva los procesos de captación y excreción de poliaminas, actualmente siguen sin estar caracterizados a nivel molecular. Pese a ello, se han desarrollado inhibidores potentes del transporte de poliaminas que han sido administrados junto con inhibidores de la ruta biosintética como tratamiento anti-canceroso (Burns et al., 2009; Samal et al., 2013). El sistema transportador de poliaminas no es totalmente específico de estas moléculas, pues se ha descrito que compuestos relacionados como el insecticida paraquat, la mepacrina y drogas sintéticas conjugadas con poliaminas atraviesan la membrana a través del mismo (Rossi et al., 2008; Kaur et al., 2008). El transporte de poliaminas es bloqueado por antizimas (AZs), proteínas cuya síntesis es dependiente de los niveles intracelulares de las poliaminas (Pegg, 2006), aunque se desconoce el mecanismo a través del cual producen tal efecto.

Por otra parte, determinados estudios que utilizaron poliaminas fluorescentes han demostrado que las poliaminas también pueden acceder a la célula mediante endocitosis, localizándose en vesículas en el interior celular (Soulet et al., 2004). Además, se ha descrito que ciertos proteoglicanos de la superficie celular podrían estar implicados en la internalización de espermina (Belting et al., 2003). Recientemente, se ha descrito un modelo en el que las poliaminas entrarían por endocitosis a través de regiones ricas en caveolinas (Uemura et al., 2010). Podemos encontrar una revisión completa y actualizada sobre estos modelos en el trabajo de Poulin y col. (2012).

Estudios recientes han identificado un sistema de excreción de putrescina compuesto por las proteínas y+ LAT y Slc3a2, que forma parte del transportador de aminoácidos catiónicos (Uemura et al., 2008). Se ha descrito que a través de este sistema se produciría la captación de arginina y la excreción de putrescina, por lo que podría actuar como un intercambiador arginina/putrescina. Además, la enzima SSAT colocaliza e interacciona con Slc3a2 por lo que este sistema podría estar relacionado con la acetilación de poliaminas. Asimismo, se ha demostrado que Slc3a2 es capaz de aumentar la captación de Put al interior celular cuando los niveles de poliaminas disminuyen tras el tratamiento con DFMO (Uemura et al., 2010). En la Fig. 5 se muestra un resumen de los sistemas transportadores de poliaminas anteriormente mencionados.

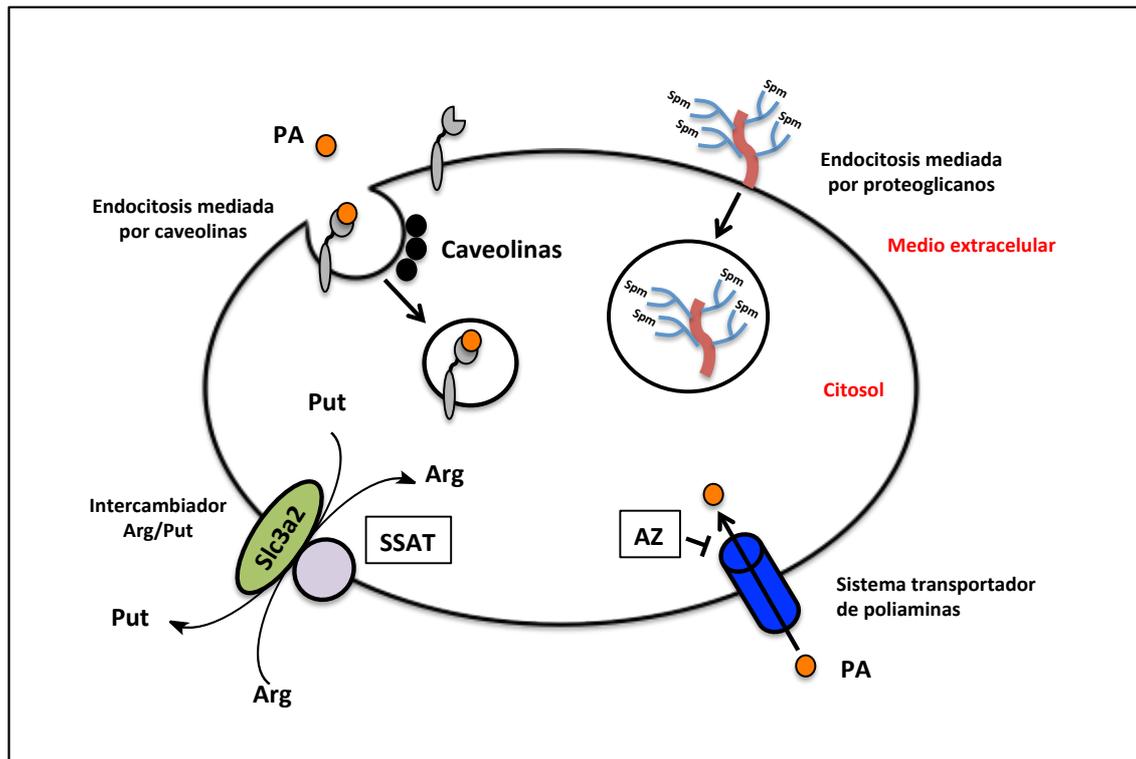


FIGURA 5. Sistemas de transporte de poliaminas descritos en células de mamífero. Diversos estudios han descrito que las poliaminas pueden entrar en la célula a través transportador de poliaminas tipo “carrier”, mediante endocitosis o a través un intercambiador Arg/Put (Slc3a2). Además, tanto SSAT como AZ han sido directamente asociadas con la captación de poliaminas a través de alguno de estos sistemas transportadores presentes en la membrana plasmática.

1.4. Regulación de los niveles de poliaminas.

Los niveles intracelulares de poliaminas se encuentran muy controlados, pues en la célula existen distintos mecanismos para su precisa regulación. El control de la concentración de estas moléculas se ejerce tanto sobre su metabolismo, ya sea sobre su biosíntesis, degradación o retroconversión, como sobre el sistema de transporte. Existen ciertas enzimas altamente reguladas implicadas en la biosíntesis (ODC y SAMDC) y en la ruta de retroconversión (SSAT).

2. Regulación de ODC.

ODC es una descarboxilasa dependiente de fosfato de piridoxal (PLP) que es enzimáticamente activa cuando se encuentra en forma de homodímeros (Solano et al., 1985; Pegg, 2006). Cada homodímero posee dos centros activos formados por residuos procedentes de ambas subunidades (Coleman et al., 1994). ODC es una enzima altamente regulada, y su actividad enzimática varía en respuesta a numerosos y diversos estímulos. Estas alteraciones de actividad son producidas principalmente por cambios en la cantidad de proteína ODC, que se renueva muy rápidamente. La degradación de ODC es controlada por unas proteínas denominadas antizimas (AZs), que se regulan en función de la concentración de poliaminas. ODC también se regula a nivel transcripcional, siendo el gen ODC una de las dianas del factor de transcripción Myc/Max, y a nivel traduccional. La regulación de la transcripción y traducción de ODC, así como la modulación de los niveles de proteína ODC a nivel post-traduccional se detallan a continuación.

2.1. Regulación transcripcional de ODC.

Se han descrito multitud de estímulos que aumentan los niveles de ARNm de ODC, como determinados factores de crecimiento (Feinstein et al., 1985; Greenberg et al., 1985), la testosterona en el riñón (Sánchez-Capelo et al., 1994; Tovar et al., 1995; Sánchez-Capelo et al., 1999) o agonistas β -adrenérgicos en el corazón (Shantz et al., 2001). La región promotora del gen *Odc* contiene secuencias tales como el elemento de respuesta a AMPc (CRE), motivos CAAT y LSF, sitios AP-1 y AP-2, caja TATA y sitios de unión Sp1 ricos en GC. Es interesante destacar que la síntesis de ARNm de ODC se estimula por el oncogen *c-Myc* (Bello-Fernandez et al., 1993). El promotor del gen *Odc* contiene dos cajas "E" que están ocupadas con el complejo Mnt/Max inactivo en células quiescentes y activadas por el factor de transcripción Myc/Max cuando los niveles de *c-Myc* están aumentados (Nilsson et al., 2004). Además, el oncogén *Ras* también es capaz de regular ODC a nivel transcripcional (Shantz et al., 2004), aumentando sus niveles de mensajero posiblemente a través de la ruta Raf/MEK/ERK (Origanti & Shantz, 2007).

2.2. Regulación traduccional de ODC.

La regulación traduccional de la síntesis de ODC es también un factor importante que contribuye a los niveles de ODC. ODC posee un 5'-UTR de gran longitud que participa en la mayoría de mecanismos de regulación traduccional, ya sean dependientes de caperuza o a través de sitios internos de unión a ribosomas (IREs)

(Pyronnet et al., 2005; Origanti & Shantz, 2007). El factor transcripcional eIF4E (factor de iniciación 4F) juega un papel importante en la traducción del ARNm de ODC, tanto el dependiente de caperuza como el mediado por IREs. Se ha descrito que niveles elevados de eIF4E aumentan la traducción dependiente de caperuza, presumiblemente por modular las estructuras secundarias presentes en la región 5'-UTR (Gingras et al., 1999; Pestova et al., 2001). Por otro lado, se ha descrito que el oncogén Ras aumenta la traducción del ARNm mediado por IREs a través de la defosforilación de eIF4E, probablemente por aumentar la disponibilidad de factores de iniciación de la traducción como eIF4G o eIF4A (Origanti & Shantz, 2007).

2.3. Regulación post-traducciona de ODC: Antizimas.

El rápido recambio de ODC en el interior celular se produce como consecuencia de una rápida degradación mediada por el proteasoma 26S. Hay que destacar que esta degradación, a diferencia de lo descrito para la mayoría de las proteínas, ocurre a través de un mecanismo *independiente* de ubiquitinación. La degradación de ODC se produce por la unión de pequeñas proteínas denominadas antizimas (AZ), las cuales se unen a ODC no covalentemente y lo dirigen al proteasoma (Fig. 6) (Hayashi & Murakami, 1995; Coffino, 2001a). Las antizimas inducen la degradación de ODC por activar su interacción con el proteasoma aunque no aumenta la velocidad del proceso proteasomal (Zhang et al., 2003). Se ha sugerido que la antizima no se degrada conjuntamente con ODC, liberándose del complejo ODC-AZ en el proteasoma una vez ODC comienza a degradarse (Gandre et al., 2002). Asimismo, la región C-terminal de ODC es crucial para el reconocimiento y posterior degradación en el proteasoma y se ha determinado que la delección de los últimos 37 residuos del C-terminal estabilizan la proteína incluso en presencia de la AZ (Ghoda et al., 1989; Rosenberg-Hasson et al., 1991). Destaca el hecho de que la proteína ODC del parásito *T. brucei* sea estable, debido a que su región C-terminal difiere considerablemente de la de mamíferos (Ghoda et al., 1990). Además, la adición de estos residuos a proteína estables provoca su degradación rápida (Zhang et al., 2003). Estudios más detallados demostraron que el residuo Cys441 localizado en la secuencia del C-terminal es clave para la estabilidad de ODC, pues su mutación por Ser o Ala estabiliza completamente la proteína incluso en presencia de la AZ (Hayashi & Murakami, 1995; Zhang et al., 2003). La delección de los cinco últimos residuos también produce una estabilización de la proteína, si bien en menor grado que la eliminación de los 37 residuos o la mutación de la Cys441 (Zhang et al., 2003).

En un primer momento, la molécula de AZ se describió como un inhibidor no competitivo de ODC cuya síntesis aumentaba en respuesta al contenido intracelular de

poliaminas (Heller et al., 1976). Esta inhibición se producía como consecuencia de la unión de la AZ al monómero de ODC, formándose un heterodímero ODC-AZ carente de actividad enzimática, pues la interacción entre subunidades de ODC para formar el homodímero activo es relativamente débil. Estudios posteriores demostraron que la inducción de la AZ conducía a una caída de proteína ODC debido al aumento de su degradación por el proteasoma (Hayashi & Murakami, 1995; Coffino, 2001; Mangold, 2005).

Para la degradación de ODC es necesario que el proteasoma reconozca la región C-terminal de la proteína. Parece ser que durante la interacción con las AZs, ODC sufre un cambio conformacional que provoca que la región C-terminal sea accesible para la maquinaria proteasomal y se produzca la degradación de la proteína (Li & Coffino, 1993; Pegg, 2006). Debido a que la ODC de *T. brucei* es una proteína estable e incapaz de interactuar con las AZs, se llevaron a cabo estudios en los que usando proteínas quiméricas ratón-tripanosoma de ODC se demostró que la región implicada en la interacción con la AZ se localizaba entre los residuos 117-140 (Li & Coffino, 1992). Esta región, denominada elemento de unión a AZs (AZBE), se incluye en una superficie helicoidal formada por barriles α/β donde además se une el cofactor PLP (Almud et al., 2000). La región AZBE es rica en residuos básicos que podrían interactuar con residuos de glutamato altamente conservados localizados en la región de la AZ implicada en la interacción con ODC (Hoffman et al., 2005). Por otro lado, la delección de la región AZBE en ODC estabiliza la proteína (Li & Coffino, 1992). Un análisis detallado mediante cristalografía de la estructura de ODC humana extendió la superficie electropositiva del AZBE desde el residuo K92 hasta el R144 (Almud et al., 2000).

Los estudios iniciales sobre la interacción ODC-AZ mostraron que de los 226 aminoácidos que componen la AZ1 de rata, la región necesaria para la unión con ODC se encontraba entre los residuos 106 y 212, siendo además necesaria una región adicional localizada entre los residuos 55 y 106 para inducir su degradación proteasomal (Li & Coffino, 1994; Coffino, 2001b). Las regiones necesarias para la unión e inhibición de ODC se encuentran entre los residuos 122-144 y 211-218, y la región clave para la desestabilización de ODC se delimita entre los residuos 88 y 118 (Ichiba et al., 1994). Recientemente, se ha demostrado que la región de AZ1 delimitada entre los residuos 95-176 es el mínimo péptido necesario para la interacción con ODC (Hsieh et al., 2011).

Por otro lado, existen proteínas homólogas a ODC carentes de actividad enzimática que bloquean los efectos negativos de la AZ sobre ODC (Fig. 6). Estas proteínas, denominadas inhibidores de antizimas (AZIN), se unen a las AZs con mayor afinidad que ODC, por lo que son capaces de liberar a ODC de su complejo con la AZ

(Murakami et al., 1996). Aunque la importancia fisiológica de los AZIN no está completamente establecida, parece claro su papel como reguladores de la homeostasis de poliaminas. El ARNm de AZIN aumenta rápidamente cuando el crecimiento celular es inducido, apoyando la hipótesis de que esta proteína pueda tener un papel fisiológico en la regulación de los niveles de ODC (Nilsson et al., 2000).

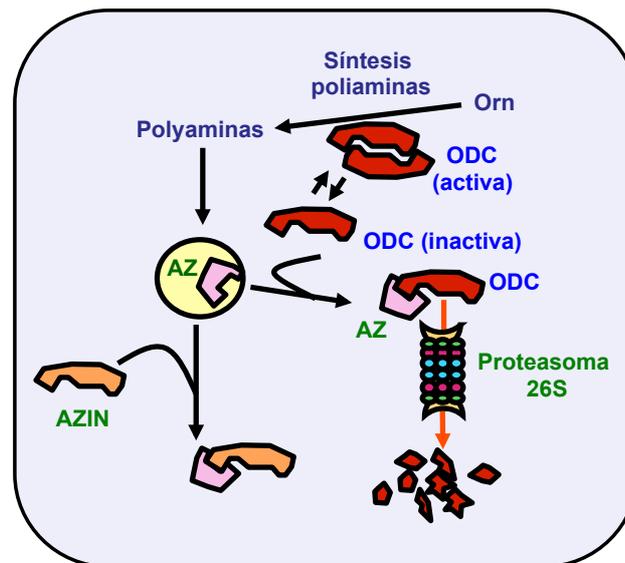


FIGURA 6. Mecanismo de regulación post-traduccional de ODC. Un aumento de los niveles de poliaminas induce la síntesis de la AZ, la cual se une al monómero de ODC, inhibiendo su actividad, y lo dirige al proteasoma 26S, donde es degradado finalmente. Se cree que la molécula de AZ se recicla y vuelve a actuar sobre nuevos monómeros de ODC. AZIN impide la acción de AZ sobre ODC.

3. Antizimas de ODC.

3.1. Síntesis y degradación de las antizimas.

La síntesis de las antizimas se regula a través de un mecanismo exclusivo dependiente de poliaminas denominado *frameshifting* (Rom & Kahana, 1994; Matsufuji et al., 1995; Hayashi & Murakami, 1995; Ivanov et al., 2000a). El ARNm de las antizimas contiene dos marcos abiertos de lectura (ORF) superpuestos, uno corto, denominado ORF1, y otro largo, denominado ORF2. La pauta de lectura del ORF2 es +1 respecto al ORF1 y carece de codón de iniciación. Por lo tanto, la síntesis de este segundo ORF requiere que el ribosoma no finalice en el ORF1, para lo que es necesario que se produzca un cambio de la pauta de lectura +1 al llegar al codón de terminación del ORF1. Este proceso por el cual el ribosoma cambia la pauta de lectura se denomina *frameshifting* y se estimula en presencia de poliaminas (Fig. 7). En resumen, cuando los niveles basales de poliaminas son bajos se sintetiza una proteína AZ incompleta e

inactiva y cuando son elevados se produce el proceso de *frameshifting* +1 y se sintetiza la proteína completa. La síntesis de antizimas se controla principalmente por este proceso, aunque se ha postulado que podría existir una regulación a nivel transcripcional por poliaminas, ya que la depleción de poliaminas mediante DFMO produce una reducción del ARNm de la AZ (Nilsson et al., 1997).

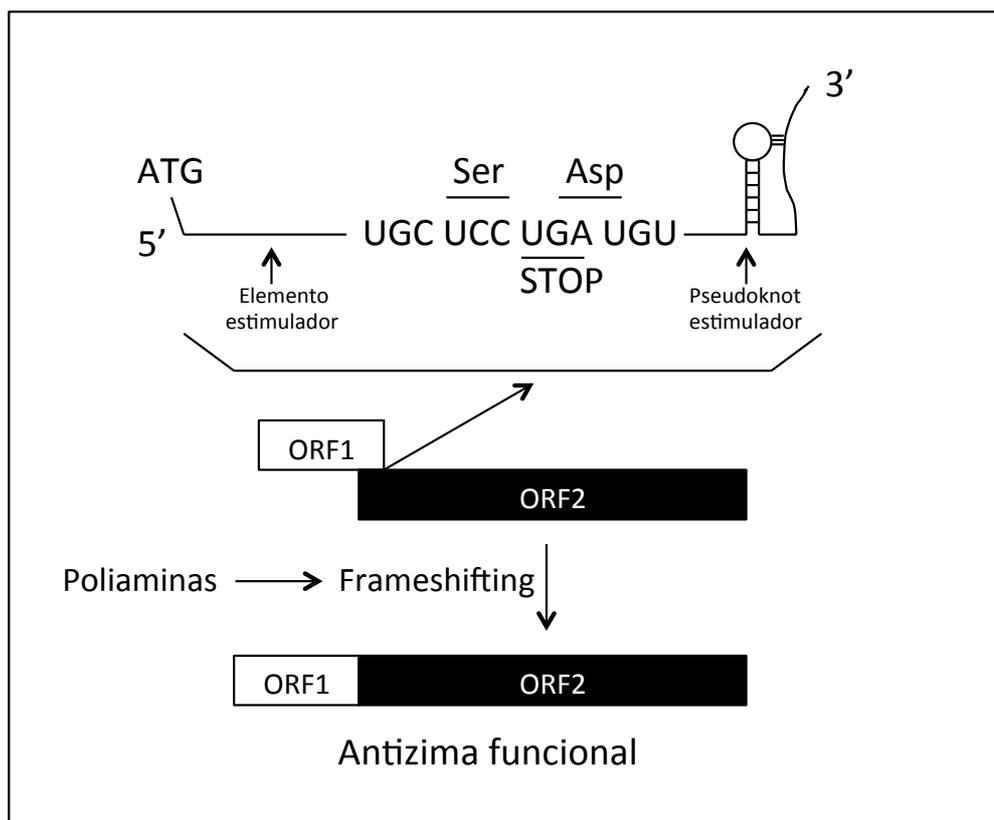


FIGURA 7. Síntesis de la antizima vía *frameshifting* estimulado por poliaminas (figura modificada de Kahana, 2009).

La degradación de las antizimas se produce a nivel proteasomal, requiere ubiquitinación previa y se inhibe por poliaminas (Kahana et al., 2005; Palanimurugan et al., 2004). De este modo, unos niveles elevados de poliaminas aumentan el contenido de AZ mediante la inducción de su síntesis y la reducción de su degradación. La espermidina y la espermina son más efectivas que la putrescina sobre la estimulación de la traducción del ARNm de la AZ. Además, se ha comprobado que una gran variedad de análogos de poliaminas, entre los que se incluyen la agmatina y algunos compuestos sintéticos (bis)etilados usados como agentes antitumorales, también son capaces de inducir de manera efectiva la síntesis de la AZ, presumiblemente por la inducción del proceso de *frameshifting* (Mitchell et al., 2002). Es interesante destacar que la proteína

priónica de levadura [PSI⁺] y el interferón también estimulan el mecanismo de *frameshifting* (Le Roy et al., 2005; Namy et al., 2008).

El proceso de *frameshifting* ha sido ampliamente estudiado mediante la realización de diversos experimentos y comparando la región clave para el cambio en la pauta de lectura y las regiones cercanas en distintas especies. El codón de terminación del ORF1 es siempre UGA y existe un elemento conservado localizado aguas arriba implicado en el efecto de las poliaminas. Tanto en mamíferos como en otros organismos existe otra secuencia crítica inmediatamente después del UGA que forma un tipo de estructura secundaria denominada *pseudoknot* que también estimula el *frameshifting* (Ivanov et al., 2000a; Petros et al., 2005).

Recientemente, se ha propuesto un mecanismo alternativo para el proceso de *frameshifting* en levaduras. En este caso el polipéptido de AZ naciente es el sensor de poliaminas que regularía negativamente “aguas arriba” del primer codón STOP, donde el ARNm está siendo traducido. Cuando los niveles de poliaminas son bajos, el polipéptido emergente impide completar su propia síntesis por causar un atascamiento de ribosomas en el ARNm, mientras que las poliaminas actuarían uniéndose al polipéptido permitiendo completar la síntesis (Kurian et al., 2011).

3.2. Isoformas de la AZ.

En mamíferos la familia de las AZs está compuesta por tres miembros: AZ1, AZ2 y AZ3. AZ1 es la isoforma mejor caracterizada y más abundante de las tres antizimas, y se encuentra ampliamente distribuida en diversos tipos celulares. La distribución de AZ2 es similar a la de AZ1, si bien es menos abundante. Por su parte, AZ3 tiene una distribución restringida a las células germinales haploides del testículo donde podría tener un papel importante en el proceso de espermatogénesis (Ivanov et al., 2000b; Tosaka et al., 2000; Ike et al., 2004; Zhang et al., 2005).

Todos los miembros son capaces de unirse a ODC e inhibir su actividad (Mangold, 2005). Sin embargo, mientras que se ha demostrado que AZ1 es capaz de inducir la degradación de ODC a nivel proteasomal, no está claro si AZ2 y AZ3 son capaces de llevar a cabo este efecto. De hecho ciertos estudios *in vitro* parecen indicar que AZ2 y AZ3 no estimulan la degradación de ODC (Chen et al., 2002; Snapir et al., 2009). Por otro lado, los tres miembros de la familia de las AZs son capaces de inhibir directamente el sistema transportador de poliaminas tipo “carrier” (Mitchell et al., 1994; Suzuki, et al., 1994; Murai et al., 2009; Snapir et al., 2009), aunque actualmente se desconoce el mecanismo a través del cual ejercen esta acción.

3.3. Antizima 1 (AZ1).

AZ1 es predominantemente citosólica, pero se acumula en el núcleo tras la administración de inhibidores del transporte nuclear como leptomicina B (Murai et al., 2003). De hecho AZ1 contiene dos señales de localización nuclear, una localizada en los primeros doce aminoácidos del N-terminal y otro en los residuos 114-134. La presencia de dos codones de iniciación en AZ1 da lugar a dos formas de 29 y 24.5 KDa. La forma predominante es la de 24.5 KDa, la cual carece de una de las señales putativas de localización nuclear y se sintetiza en grandes cantidades (Feith et al., 2001; Gandre et al., 2003; Hoshino et al., 2005). La forma de 29 KDa se encuentra únicamente en la mitocondria, posiblemente por la presencia de una secuencia implicada en la localización mitocondrial presente en los 33 aminoácidos adicionales (Gandre et al., 2003; Hoshino et al., 2005). Recientemente se ha demostrado que una fracción importante de la AZ1 nuclear se encuentra en los centrosomas durante la interfase, donde estaría relacionada con la duplicación de los mismos (Mangold et al., 2008). Un estudio más reciente ha demostrado que AZ1 ejerce su función en los centrosomas a través de la supresión de Mps1, una quinasa implicada en la duplicación centrosomal (Kasbek et al., 2010).

La fina regulación de la síntesis de AZ1 por poliaminas, junto con la habilidad de AZ1 de regular los niveles intracelulares de estas moléculas, sugiere que esta proteína podría exhibir un efecto antiproliferativo exclusivamente a través de la regulación del metabolismo de poliaminas. Sin embargo, ciertos estudios proponen que AZ1 podría también inhibir la proliferación celular por inducir la degradación independiente de ubiquitinación de proteínas reguladoras del crecimiento celular que no pertenecen a la ruta metabólica de las poliaminas. Entre estas proteínas se incluyen el modulador transcripcional Smad1 (Gruendler et al., 2001; Lin et al., 2002; Wang, 2003), reguladores del ciclo celular como ciclina D1 y la quinasa Aurora-A (Newman et al., 2004; Lim & Gopalan, 2007) y la forma truncada en N-terminal de la proteína antiapoptótica p73 ($\Delta Np73$) (Dulloo et al., 2010). Sin embargo, más recientemente se ha puesto en duda estos resultados, proponiéndose que AZ1 ejerce su efecto antiproliferativo únicamente a través de la regulación del metabolismo de poliaminas (Bercovich et al., 2011).

Además de su efecto sobre la regulación de la homeostasis de poliaminas y la proliferación celular, AZ1 ha sido también asociada con otras funciones celulares tales como la modulación de la duplicación centrosomal, como se describió anteriormente (Mangold et al., 2008), la hipometilación del ADN genómico y la inducción del mecanismo de reparación del ADN en células humanas de cáncer oral (Tsuji et al.,

2001; Tsuji et al., 2007; Yamamoto et al., 2010), y la diferenciación de células tumorales pancreáticas en células productoras de glucagón (Suzuki et al., 2009). Además, AZ1 ha sido descrito como un supresor tumoral efectivo en numerosos modelos animales (Feith et al., 2001; Fong et al., 2003; Tang et al., 2004; Feith et al., 2006; Feith et al., 2007; Feith et al., 2013), y sus niveles de ARNm están disminuidos en distintos tipos de tumores (mamario, pulmonar, ovárico y prostático) en comparación con tejido sano (Olsen and Zetter, 2011).

4. Inhibidores de antizimas.

El complejo mecanismo de regulación post-traducciona l de ODC incluye proteínas homólogas a ODC sin actividad enzimática pero con gran afinidad de la unión a las antizimas denominadas inhibidores de antizimas (AZIN). Estas proteínas regulan positivamente la biosíntesis de poliaminas, rescatando a ODC de la inhibición y degradación mediada por antizimas. Actualmente la familia de los AZIN está compuesta por 2 miembros: AZIN1 y AZIN2. Mientras AZIN1 es una proteína ubicua que estimula la proliferación celular, AZIN2 tiene una expresión muy específica de tejido y su función es menos conocida.

4.1. Inhibidor de antizimas 1 (AZIN1).

El descubrimiento de AZIN1 se produjo hace 30 años en extractos de hígado de rata (Fujita et al., 1982). Inicialmente se describió como un “factor macromolecula r” capaz de unirse a AZ1. Los estudios posteriores observaron que se trataba de una proteína de tamaño similar a ODC y que poseía mayor capacidad de interacción con AZ1 que la propia ODC, por lo que se denominó inhibidor de antizimas, AZI o AZIN. Durante casi 20 años ha sido el único inhibidor de AZs conocido, si bien en 2001 se descubrió un nuevo gen parálogo de ODC humano, denominado ODCp (Pitkanen et al., 2001), que después se descubrió que actuaba como inhibidor de antizimas (López-Contreras et al., 2006). Debido al hallazgo de esta segunda isoforma, denominada AZIN2, AZIN se renombró como AZIN1.

Pese a su homología con ODC, la proteína AZIN1 carece de actividad descarboxilasa de ornitina, probablemente por la ausencia de varios residuos clave para la actividad enzimática y por su incapacidad de formar homodímeros (Albeck et al., 2008). No obstante, AZIN1 es capaz de regular los niveles de poliaminas por evitar el efecto negativo que las AZs ejercen sobre ODC y el transportador de poliaminas (Mitchell et al., 2004; Keren-Paz et al., 2006). Aunque se ha comprobado que AZIN1 es capaz de interactuar con los tres tipos de AZs conocidas mediante experimentos de

doble híbrido de levaduras, no se ha demostrado su capacidad de contrarrestar los efectos funcionales de cada isoforma (Mangold & Leberer, 2005). Al igual que ODC, AZIN1 es una proteína de rápido recambio metabólico, si bien es degradada a nivel proteasomal por un mecanismo dependiente de ubiquitinación (Bercovich & Kahana, 2004; Kahana, 2007). Además, se ha demostrado que las AZs estabilizan a AZIN1 al evitar su ubiquitinación y posterior degradación proteasomal por la formación del complejo AZIN1-AZ (Bercovich & Kahana, 2004).

A nivel de mensajero, se ha observado una expresión ubicua de AZIN1 en distintos tejidos de rata (Murakami et al., 1996) y ratón (Tang et al., 2009). Además, se han detectado distintas isoformas del ARNm tanto en humano como en roedores, si bien el ORF permanece inalterado (Koguchi et al., 1997; Murakami et al., 1996; Nilsson et al., 2000; Murakami et al., 2013). Es de destacar, que tanto ODC como AZIN1 se expresan ubicuamente, si bien los niveles de mensajero de ODC son bastante mayores que los de AZIN1 tanto en células como en tejidos murinos (Nilsson et al., 2000; Murakami et al., 2010). Paralelamente a ODC, la expresión de AZIN1 parece estar relacionada con el crecimiento celular, pues su expresión se induce rápidamente en fibroblastos en estado proliferativo (Nilsson et al., 2000). Es interesante destacar que los niveles de AZIN1 se encuentran elevados en ciertos tumores humanos (Jung et al., 2000; Olsen & Zetter, 2011; Olsen et al., 2012) y que se ha asociado una amplificación en la región cromosómica en la que se incluye AZIN1 con cáncer de ovario y próstata (Jung et al. 2000; Schaner et al. 2005; van Duin et al. 2005). Además, la expresión de AZIN1 es elevada en macrófagos alveolares procedentes de ratas infectadas con el patógeno *Pneumocystis* (Liao et al., 2009).

Existen diversos trabajos que ponen de manifiesto el papel de AZIN1 en la regulación del crecimiento y proliferación celular, si bien tales efectos son independientes de su interacción con las AZs (Kim et al., 2006). AZIN1, al igual que AZ1, se ha encontrado en los centrosomas, donde aparentemente contribuye a la regulación de los mismos (Mangold et al., 2008). Más recientemente se ha descrito que mientras AZIN1 está presente en el citoplasma durante la interfase, éste se localiza junto a AZ1 en los centrosomas durante la mitosis (Murakami et al., 2009). Durante el ciclo celular AZIN1 se acumula principalmente en la fase G1 temprana, probablemente para aumentar la actividad ODC, y en la fase G2/M, y su supresión causa un incremento en el número de células binucleadas (Murakami et al., 2009). Estos resultados podrían sugerir un papel importante de AZIN1 durante la progresión del ciclo celular y el proceso de división celular. AZIN1 ha sido también asociado con la transformación de células normales en tumorales, encontrándose además que la inyección de células con

expresión elevada de AZIN1 en ratones inmunodeficientes aumentaba la incidencia de aparición de tumores (Keren-Paz et al., 2006). Por su parte, la supresión de AZIN1 reprimía la proliferación de ciertas líneas celulares de cáncer de pulmón y próstata (Choi et al., 2005; Olsen et al., 2012).

La importancia de AZIN1 *in vivo* ha sido demostrada a través de la generación y posterior análisis de ratones mutantes *knockout* para este gen (Tang et al., 2009). En estos estudios se confirmó que AZIN1 es necesario para el desarrollo del animal, ya que los ratones homocigotos morían prematuramente. Además, la supresión de AZIN1 en estos animales provocó una caída en la actividad ODC y los niveles de poliaminas. Los análisis histológicos de ratones homocigotos revelaron anomalías hepáticas en comparación con animales controles. Estas anomalías se asociaron con la baja actividad ODC encontrada en el hígado, lo que podría ser crítico para el correcto desarrollo del órgano. La depleción de AZIN1 también reduce la expresión de β -caseína e inhibe los cambios morfológicos que se inducen normalmente por las hormonas lactogénicas (Murakami et al., 2010). Puesto que la estimulación de células endoteliales capilares con factores angiogénicos induce la expresión de AZIN1, se ha propuesto que este gen podría tener algún papel en la angiogénesis (Takahashi et al., 2005). AZIN1 ha sido también relacionado con el proceso apoptótico, ya que su supresión en macrófagos disminuye la tasa de muerte celular (Liao et al., 2009).

Por otro lado, se ha detectado un polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) en el gen AZIN1 de un alto porcentaje de pacientes caucásicos con hepatitis C crónica y fibrosis hepática (Huang et al., 2007). Aunque el SNP no altera la secuencia primaria de la proteína, se encuentra localizado cerca del sitio de *splicing* del exón 12, lo que sugiere que podría afectar el proceso de *splicing* del pre-ARNm de AZIN1. De hecho, estudios recientes han demostrado que este SNP da lugar a una nueva variante de AZIN1 incapaz de interactuar con las AZs y que reduce la expresión de genes fibrogénicos en células estrelladas hepáticas a través de una ruta independiente de poliaminas (Paris et al., 2011). Recientemente, un análisis de la secuenciación del transcriptoma de muestras humanas de carcinoma hepatocelular ha revelado que en el 50% de los tumores primarios existe la edición de adenosina a inosina (A→I) en el ARN de AZIN1, lo que resulta en el cambio del residuo de serina 367 a glicina (Chen et al., 2013). Este AZIN1 “editado” se acumula principalmente en el núcleo y posee mayor afinidad hacia AZ1 que la proteína *wild type*, probablemente debido a un cambio conformacional, y como consecuencia neutraliza más eficientemente la degradación de ODC y ciclina D1 mediada por antizimas, incrementando la progresión tumoral.

4.2. Inhibidor de antizimas 2 (AZIN2).

En 2001 se caracterizó un nuevo gen parálogo de ODC que se denominó ODCp (parálogo de ODC) u ODC-like, si bien su función no se estableció inicialmente (Pitkanen et al., 2001). Posteriormente, se demostró que el gen ODCp murino codificaba una proteína carente de actividad enzimática que actuaba como un nuevo inhibidor de antizimas, por lo que se denominó inhibidor de antizimas 2, AZIN2 (López-Contreras et al., 2006).

4.2.1. Estructura génica y secuencia proteica de AZIN2.

El gen AZIN2 (también presente en las bases de datos como ODCp, Azi2 y ADC) se localiza en el cromosoma 1 en humano y en el cromosoma 4 del ratón. La estructura del gen AZIN2 es básicamente similar al de AZIN1 y ODC, conteniendo 11 exones y 10 intrones de longitud variable, tanto en humanos como en ratón. Los primeros dos exones de AZIN2 no son codificantes, por lo que el ORF comienza en el exón 3 y se extiende hasta el exón 11. En humanos, la región codificante posee una identidad del 60% y 54% con la de ODC y AZIN1 respectivamente, y los exones son de tamaño similar a los de ODC y AZIN1. Sin embargo, el tamaño de los intrones es bastante mayor en AZIN2 (39,3 kb) que en ODC (7,9 kb). Por otra parte, se han detectado ocho formas de *splicing* alternativo mediante amplificación por PCR de librerías de ADNc de cerebro y testículo humano (Pitkanen et al., 2001). Sin embargo, no se han realizado estudios adicionales sobre la expresión o el posible significado de estas formas de *splicing*.

El ORF de AZIN2 codifica para una proteína de aproximadamente 50 kDa. Las secuencias proteicas de ratón y humano poseen un 86% de identidad y un 92% de similitud. En humano la identidad entre la proteínas AZIN2 y ODC es del 54% y la similitud del 75% (en el ratón, 48 y 69% respectivamente). Los valores correspondientes para AZIN2 y AZIN1 son 45 y 66% en humanos, y 44 y 66% en ratón. Las secuencias codificantes de los tres parálogos presentan mayores divergencias en la región N- y C-terminal, en contraste con la mayor conservación (86% similitud) encontrada en la región implicada en la unión a las AZs (AZBE).

4.2.2. Características funcionales de AZIN2.

La función molecular de AZIN2 se ha determinado tanto *in vivo*, utilizando diferentes sistemas celulares, como *in vitro*. Tales estudios demostraron la capacidad de AZIN2 de interaccionar con cualquiera de las tres AZs, contrarrestando la acción de estas proteínas sobre la inhibición de la actividad y estabilidad de ODC y la captación de

poliaminas (López-Contreras et al., 2006; López-Contreras et al., 2008; Kanerva et al., 2008; Snapir et al., 2008).

La función de la ODCp murina como inhibidor de antizimas se demostró por primera vez mediante experimentos de co-transfección y técnicas de inmunoprecipitación, sugiriéndose por ello el nombre de AZIN2 (López-Contreras et al., 2006; López-Contreras et al., 2008). Estos resultados fueron posteriormente confirmados para la AZIN2 humana mediante la técnica del doble híbrido de levaduras y ensayos de unión *in vitro* (Kanerva et al., 2008; Snapir et al., 2008). Aunque algunos experimentos que utilizaron células transfectadas o sistemas *in vitro* revelaron que AZIN2 era tan efectiva como AZIN1 impidiendo los efectos de las AZs (López-Contreras et al., 2006; Kanerva et al., 2008; López-Contreras et al., 2008), otro estudio ha sugerido que AZIN2 podría proteger a ODC de la degradación mediada por AZs menos eficientemente que AZIN1 debido a su menor afinidad hacia AZ1 (Snapir et al., 2008).

Recientemente se ha descrito que la sobre-expresión de AZIN2 estimula el crecimiento celular de la línea NIH-3T3 (Snapir et al., 2008) de manera similar a AZIN1 (Keren-Paz et al., 2006; Kim et al., 2006), probablemente por aumentar los niveles de poliaminas. Sin embargo, el hallazgo de que una forma mutante de AZIN1 sin la región implicada en la unión a AZs (AZBE) todavía retiene la capacidad de inducir proliferación celular, sugiere una nueva función de los AZINs en el crecimiento celular independiente de AZs (Kim et al., 2006).

Por otro lado, diversos experimentos han demostrado claramente que AZIN2 carece de actividad descarboxilasa de ornitina y arginina (Coleman et al., 2004; Kanerva et al., 2008; López-Contreras et al., 2006; López-Contreras et al., 2008; Pitkanen et al., 2001), contradiciendo los resultados previos que afirmaban que ODCp/AZIN2 poseía actividad arginina descarboxilasa (Zhu et al., 2004). La carencia de actividad descarboxilasa de ornitina no es sorprendente, ya que AZIN2 posee cambios sustanciales en algunos residuos que son críticos para la actividad ODC.

4.2.3. Estabilidad de la proteína AZIN2.

AZIN2, como sus homólogos AZIN1 y ODC, es una proteína lábil que se degrada a nivel proteasomal. Como en el caso de AZIN1, AZIN2 se degrada a través de un mecanismo dependiente de ubiquitinación (Kanerva et al., 2008; Snapir et al., 2008). Además, la degradación de AZIN2 por el proteasoma no se estimula por las AZs, como ocurre para ODC, si no que incluso se inhibe por la unión con AZ1 o AZ3 (López-Contreras et al., 2009a; Snapir et al., 2008). El hecho de que al co-transfectar AZIN2 y AZ3 la cantidad de AZ3 aumente considerablemente respecto a la encontrada en la

transfección simple de AZ3, sugiere fuertemente que la interacción de AZIN2 con AZ3 podría también proteger AZ3 de la degradación por el proteasoma (López-Contreras et al., 2009a).

4.2.4. Expresión tisular de AZIN2.

El patrón de expresión del ARNm de ODCp/AZIN2 en tejidos humanos fue estudiado inicialmente mediante experimentos de hibridación dot-blot, detectándose una elevada expresión de ODCp en el testículo y en diferentes áreas de cerebro adulto (Pitkanen et al., 2001). El análisis posterior mediante RT-PCR de varios tejidos de ratón adulto reveló que el mensajero de AZIN2 se expresaba específicamente en cerebro y testículo, no detectando señal en otros tejidos como riñón, hígado, corazón, pulmón, ovario, placenta y glándula adrenal (López-Contreras et al., 2006). Estos datos muestran que el patrón de expresión de AZIN2 parece estar conservado en humano y ratón. Hay que señalar que pese a que AZIN2 posee un patrón de expresión más restrictivo que AZIN1, en los tejidos donde se expresa mayoritariamente, tales como cerebro y testículo, la expresión de AZIN2 fue muy superior a la de AZIN1 (6 y 23 veces respectivamente) (López-Contreras et al., 2008).

4.2.5. Localización subcelular de AZIN2.

A nivel celular, AZIN2 se localiza principalmente en la fracción particulada cuando se transfecta en células HEK 293T o COS7 (López-Contreras et al., 2006). Análisis detallados mediante microscopía confocal revelaron que AZIN2 se localiza principalmente en el compartimento retículo endoplásmico-Golgi (ERGIC) y en la red cis-Golgi (López-Contreras et al., 2009b). Esta localización subcelular contrasta con la de sus proteínas homólogas ODC y AZIN1, que se localizan principalmente en el citosol y el núcleo, respectivamente. Estudios que utilizaron distintas delecciones de AZIN2 identificaron que la región de la proteína responsable para su acumulación en el ERGIC estaba compuesta por los primeros 113 residuos del N-terminal de AZIN2. La sustitución de la región N-terminal de ODC por la de AZIN2, provocó un cambio de localización subcelular de citosol a ERGIC (López-Contreras et al., 2009b). Debe señalarse que aunque no existen estudios sobre la localización precisa de AZIN2 en células germinales haploides del testículo, los experimentos de fraccionamiento celular de extractos de testículo revelaron que esta proteína se localiza principalmente en estructuras membranosas que podrían corresponder a la red ERGIC (López-Contreras et al., 2009a).

Otro estudio más reciente obtuvo resultados similares sobre la localización

subcelular de AZIN2 en ciertas líneas celulares, utilizando anticuerpos específicos para determinar la proteína endógena (Kanerva et al., 2010). En este caso AZIN2 se localizó en compartimentos vesiculares de la ruta secretora, sobre todo en la red trans-Golgi (TGN). Estos hallazgos se correlacionaron con otros estudios recientes que, utilizando el mismo anticuerpo frente a AZIN2, mostraron que AZIN2 poseía una localización vesicular en mastocitos y en neuronas de origen humano (Kanerva et al., 2009; Mäkitie et al., 2009b). Además, este trabajo mostró evidencias que sugieren que AZIN2 participa en el tráfico vesicular a través de la regulación de los niveles de poliaminas endógenas, ya que tanto el silenciamiento parcial de AZIN2 como la depleción de los niveles de poliaminas con DFMO producían la desestructuración de la red trans-Golgi y la inhibición del tráfico vesicular (Kanerva et al., 2010). Además, estudios previos sobre la localización de ODC y AZ1 mostraron que una parte de estas proteínas podría localizarse en ciertas vesículas citoplasmáticas del área perinuclear (Schipper et al., 2004), por lo que podrían estar también relacionadas con vesículas del complejo de Golgi y del TGN.

Por otro lado, la co-expresión con cualquiera de las tres antizimas afectó a la localización de AZIN2, pues se producía una traslocación desde el ERGIC hacia el citosol (López-Contreras et al., 2009b). De hecho, para la localización citosólica de AZIN2 era necesario una interacción directa con las AZs, pues la proteína con la región AZBE delecionada permanecía en el ERGIC en presencia de AZs.

5. Fisiología de AZIN2

5.1. AZIN2 en el sistema reproductor.

Los estudios sobre la expresión y el papel de las AZs en la espermatogénesis fueron casi inexistentes hasta el descubrimiento de la antizima 3 (AZ3), cuya expresión es específica de testículo (Ivanov et al., 2000b; Tosaka et al., 2000). El mensajero de AZ3 se expresa exclusivamente en las células germinales haploides, aumentando su transcripción durante el comienzo de la espermiogénesis y finalizando con la formación de las espermátidas (Ivanov et al., 2000b). Ya que la expresión de AZ3 durante la primera onda de espermatogénesis es posterior al pico de expresión de ODC durante las fases tempranas de la espermatogénesis, se postuló que el papel fisiológico de AZ3 era abolir la actividad ODC para evitar los efectos de putrescina en fases posteriores (Coffino, 2000; Ivanov et al., 2000b). La detección de ARNm de AZIN2 en el testículo reforzó la idea de la necesidad de un fuerte control de los niveles de poliaminas en las células testiculares. La expresión de AZIN2 en el testículo de ratón presenta un patrón

muy bien definido, tanto temporal como espacial. Experimentos mediante hibridación “in situ” de ARN demostraron que el ARNm de AZIN2 está presente en la parte interior de los túbulos seminíferos, donde se localizan principalmente espermatidas y espermatozoides, lo que sugirió que la expresión de AZIN2 tiene lugar en las células germinales haploides (López-Contreras et al., 2009a). Estos resultados fueron corroborados mediante el estudio de la expresión postnatal de AZIN2 durante la primera onda de espermatogénesis. Los análisis por RT-PCR a tiempo real demostraron que la expresión de AZIN2 era muy baja durante las 3 primeras semanas de vida, periodo en el que los testículos murinos no contienen prácticamente células germinales haploides. Además, la expresión de AZIN2 y AZ3 en testículo se inició durante la cuarta semana postnatal, en correspondencia con el comienzo de la espermiogénesis (López-Contreras et al., 2009a). Destaca el hecho de que la expresión de AZ3 se produjo casi en paralelo a la de AZIN2 y posiblemente su ARNm se encuentra en el mismo tipo de células. Aunque distintos trabajos han demostrado que AZIN2 es capaz de interactuar con AZ3, afectando a la acción de la AZ sobre la actividad ODC y la captación de poliaminas (López-Contreras et al., 2008; López-Contreras et al., 2009a; Snapir et al., 2009), las diferencias observadas en el patrón de expresión espacial y temporal entre ODC y AZ3/AZIN2 en el testículo podrían indicar que la función de AZ3/AZIN2 podría estar relacionada con mecanismos diferentes a la regulación post-traducciona de ODC, como la regulación del flujo de poliaminas que tiene lugar durante la espermiogénesis (Quemener et al., 1992) o a través de otras proteínas no implicadas en la homeostasis de poliaminas.

Por otro lado, estudios realizados mediante inmunohistoquímica mostraron que en muestras de gónadas humanas la proteína AZIN2 se expresaba en las células de Leydig y germinales haploides del testículo y en las células del cuerpo lúteo y del hilus del ovario (Mäkitie et al., 2009c). Además, la localización de AZIN2 en ovario es similar a la de enzimas implicadas en la síntesis de andrógenos (Bachelot et al., 2005), por lo que se ha postulado que AZIN2 podría estar relacionada con la producción o secreción de hormonas esteroideas, particularmente andrógenos (Mäkitie et al., 2009c).

5.2. AZIN2 en el sistema nervioso central (SNC).

Las poliaminas y sus enzimas metabólicas están presentes en el SNC, donde poseen una distribución regional específica (Bernstein & Müller, 1999). Aparte de su función en el desarrollo cerebral, las poliaminas llevan a cabo distintas acciones sobre las células neuronales a través de su unión a determinados receptores de neurotransmisores (Igarashi & Kashiwagi, 2000) y canales de iones (Johnson, 1996;

Weiger & Hermann, 2009; Williams, 1997). Se han descrito alteraciones en la expresión y actividad de diferentes enzimas del metabolismo de poliaminas, así como variaciones de los niveles de poliaminas, asociadas a diferentes daños en el cerebro tales como isquemia cerebral (Li et al., 2007) y algunos desórdenes mentales (Fiori & Turecki, 2008).

Aunque AZIN2 se expresa en el cerebro, la función específica de AZIN2 en la fisiología cerebral no ha sido establecida. Como ya hemos comentado, los análisis mediante dot-blot revelaron la existencia de cantidades elevadas de ARNm de ODCp (AZIN2) en diferentes partes del cerebro humano adulto, tales como el cortex cerebral, lóbulos cerebrales, cerebelo, cuerpo caloso, núcleo basal, hipocampo, sustancia negra, tálamo y espina dorsal, mientras que las muestras de cerebro fetal se detectaron niveles bajos (Pitkanen et al., 2001). Aunque ODCp (AZIN2) también se expresa en cerebro de ratón (López-Contreras et al., 2006), los experimentos *in vivo* sobre la bioquímica y la fisiología de esta proteína en modelos animales son escasos. Teniendo en consideración su acción molecular como inhibidor de antizimas, es probable que su papel fisiológico esté relacionado con la regulación de los niveles de poliaminas en el cerebro (Kilpeläinen et al., 2000; Laitinen et al., 1986).

Recientemente, estudios inmunohistoquímicos de muestras de cerebro humano mostraron que AZIN2 se localizaba en zonas específicas como el neocortex, el hipocampo, el tálamo, el cerebelo y la médula oblongata (Mäkitie et al., 2009b). Además, AZIN2 se distribuía en estructuras de tipo vesicular o granular a lo largo de los axones y en el área somal de las neuronas. Por su parte, se observó co-localización entre AZIN2 y el receptor NMDA en las neuronas piramidales (Mäkitie et al., 2009b). Puesto que se ha demostrado que las poliaminas pueden unirse y regular el receptor NMDA (Araneda et al., 1999; Benveniste et al., 1993; Durand et al., 1993), AZIN2 podría influir sobre la señalización mediada por glutamato controlada por la síntesis local de poliaminas. Interesantemente, se encontró una acumulación de AZIN2 en muestras de pacientes con la enfermedad de Alzheimer, sobre todo en hipocampo y células de Purkinje, si bien no se determinó un aumento de AZIN2 en muestras con otros tipos de demencia (Mäkitie et al., 2009b).

5.3. AZIN2 en gránulos secretores de mastocitos (MCs).

Aparte de cerebro y gónadas, recientemente también se ha detectado proteína AZIN2 en MCs humanos mediante inmunohistoquímica, tanto en cultivos primarios como en líneas celulares establecidas (Kanerva et al., 2009). La expresión de AZIN2 en MCs muestra un patrón granular y se han encontrado cantidades mayores de AZIN2 en

MCs activados con PMA o el ionóforo de calcio A23187 respecto a MCs controles. El estudio inmunohistoquímico con marcadores de distintos tipos de gránulos mostró que AZIN2 co-localizaba con Vamp8, proteína tipo SNARE, y con serotonina, no mostrando co-localización con triptasa. Puesto que la mayoría de gránulos secretores de serotonina son Vamp8-positivos (Puri & Roche, 2008), se ha asociado a AZIN2 con este tipo de gránulos. Por otra parte, se ha demostrado que las poliaminas están presentes en los gránulos secretores de los MCs, siendo además importantes para su formación y homeostasis (García-Faroldi et al., 2010). Por otra parte, la depleción de poliaminas en MCs mediante tratamiento con DFMO impidió la liberación de serotonina, aunque no la exocitosis de β -hexosaminidasa e histamina (Kanerva et al., 2009). Por ello se ha postulado que AZIN2 actuaría modulando los niveles de poliaminas en los gránulos secretores de serotonina durante la activación de los MCs.

ANTEDECENTES Y OBJETIVOS

Como se comentó en la Introducción, las poliaminas son moléculas catiónicas ampliamente distribuidas en los organismos vivos que desempeñan funciones críticas en el funcionamiento y mantenimiento de la estructura celular. Se ha descrito en múltiples trabajos que las poliaminas tienen un papel clave en procesos tales como la proliferación, diferenciación y muerte celular, participando entre otros en la regulación de la expresión génica, canales iónicos, autofagia y distintas vías de señalización. Por ello, no es de extrañar que los niveles intracelulares de poliaminas estén altamente regulados a través de diferentes procesos y mecanismos, en los que las mismas poliaminas actúan como agentes controladores, afectando tanto a enzimas clave de su biosíntesis y catabolismo, como a los sistemas transportadores de las mismas. En este sentido, es bien conocido que existe una clara asociación entre la desregulación de la homeostasis de las poliaminas y ciertas patologías, en especial con el desarrollo del cáncer.

El control de la homeostasis de poliaminas en células de mamíferos, es ejercido a través de un sofisticado sistema en el que participan una serie de enzimas así como un conjunto de proteínas reguladoras, que en muchos casos presentan mecanismos singulares modulados por las propias poliaminas. Entre estas proteínas se encuentran las antizimas (AZs) y las proteínas inhibidoras de las antizimas (AZINs). Las AZs actúan regulando negativamente tanto la biosíntesis de poliaminas, a través de la inhibición de ornitina descarboxilasa (ODC) y la inducción de la degradación proteasomal de esta enzima, como la captación de poliaminas extracelulares. La acción de las AZs es dependiente de la concentración intracelular de poliaminas, ya que la síntesis de la proteína AZ funcional tiene lugar cuando los niveles intracelulares de poliaminas son elevados, activando la traducción de su ARNm mediante un mecanismo singular de *frameshifting* ribosomal. Los AZINs son proteínas homólogas a ODC, enzima clave en la biosíntesis de poliaminas, pero carentes de actividad enzimática, que se unen con gran eficiencia a las AZs y previenen la acción de las mismas sobre ODC y el transportador de poliaminas. Para mayor complejidad del circuito regulador, se han caracterizado distintas isoformas tanto de las AZs como de las AZINs, unas de expresión ubicua como AZ1, AZ2 y AZIN1, y otros de expresión específica de tejido como AZIN2 y AZ3.

El presente trabajo se ha centrado en el estudio de AZIN2, proteína caracterizada como tal en nuestro laboratorio (López-Contreras et al., 2006). El gen que codifica para esta proteína fue inicialmente denominado ODCp, dado la gran homología de secuencia con ODC (Pitkanen et al., 2001), y posteriormente ADC, ya que a la proteína codificada se le atribuyó actividad descarboxilante de arginina (Zhou et al., 2004). Sin embargo, estudios posteriores no corroboraron esta

posibilidad, tanto para el gen humano (Coleman et al., 2004; Kanerva et al., 2008) como el murino (López-Contreras et al., 2006). Este último trabajo, no solo descartó la carencia de actividad ADC, sino que vino a demostrar que dicha proteína se comporta como una proteína inhibidora de la acción de las antizimas, proponiéndose el nombre de AZIN2. Esta actividad fue posteriormente confirmada para el correspondiente ortólogo humano (Kanerva et al., 2008; Snapir et al., 2008).

Estudios posteriores de nuestro grupo, llevados a cabo en células transfectadas con AZIN2, vinieron a demostrar que AZIN2 estimula la captación de putrescina, espermidina y espermina (López-Contreras et al., 2008), aunque no se valoró la posible contribución de la proteína en el transporte de agmatina. A pesar de la analogía de secuencia con ODC y AZIN1, los estudios de fraccionamiento bioquímico y microscopia confocal vinieron a demostrar que AZIN2 se encuentra fundamentalmente asociada a las membranas del compartimento intermedio entre el retículo endoplásmico y el Golgi (ERGIC) y el cis-Golgi, pero que el aumento de los niveles de AZs inducía su translocación al citosol (López-Contreras et al., 2009b).

Los estudios iniciales sobre la distribución tisular de AZIN2 tanto en humano (Pitkanen et al., 2001) como en ratón (López-Contreras et al., 2008), basados en el análisis del ARNm mediante dot-blot o RT-PCR semi-cuantitativa, mostraron que entre los diferentes tejidos ensayados la expresión mayoritaria correspondía al testículo y cerebro. El patrón de expresión espacial y temporal de AZIN2 en testículo de ratón, analizado mediante hibridación *in situ* de ARN y RT-PCR cuantitativa, evidenció que el ARNm de AZIN2 abunda fundamentalmente en las células haploides, sugiriendo que AZIN2 podría desempeñar algún papel en el proceso de espermiogénesis (López-Contreras et al., 2009a). Sin embargo, el estudio de la expresión de AZIN2 en secciones de testículo humano utilizando anticuerpos generados frente a secuencias peptídicas de la proteína mostró un perfil de expresión diferente al de ratón, ya que la reactividad frente al anticuerpo fue localizada principalmente en las células intersticiales de Leydig (Mäkitie et al., 2009c). Aunque esta discrepancia pudiera deberse a diferencias entre especies, no se puede descartar que la misma pudiera estar también relacionada con la naturaleza de las técnicas utilizadas para el análisis de la expresión en cada caso. Es de destacar que Andersson y col., utilizando las técnicas inmunohistoquímicas empleadas para el análisis de AZIN2 testicular, mostraron que dicha proteína se expresa también en células esteroideogénicas del ovario (Mäkitie et al., 2009c), mastocitos (Kanerva et al., 2009) y determinados tipos de neuronas (Mäkitie et al., 2009b), lo que ampliaba de forma significativa el campo de expresión de AZIN2, y sugería un posible papel específico de dicha proteína en células especializadas. En

este sentido, es interesante mencionar que el silenciamiento de esta proteína en células de origen neuronal mediante tratamiento con ARNsi para AZIN2 estuvo asociado con la inhibición del tráfico vesicular y con la desestructuración del Golgi, sugiriendo que AZIN2 puede participar en la regulación del transporte de vesículas secretoras (Kanerva et al., 2010).

Si bien, como se comentaba anteriormente, es un tema controvertido que exista actividad ADC en tejidos de mamíferos, pero descartándose que AZIN2 posea actividad arginina descarboxilasa, es bien conocida la presencia de agmatina, el producto de descarboxilación de arginina, en diferentes tejidos de mamíferos incluido el cerebro (Raasch et al., 1995; Stickle et al., 1996), habiéndose postulado que dicha sustancia pudiera actuar como neurotransmisor (Reis & Regunathan, 1999; Reis & Regunathan, 2000). Aunque se ha descrito que el origen de la agmatina presente en esos tejidos pudiera ser los alimentos de la dieta o la flora bacteriana, poco se conoce acerca de cómo dicha sustancia es transportada desde el intestino a los diferentes tejidos, y cuáles pueden ser los sistemas transportadores a nivel celular. Comoquiera que AZIN2 se expresa en cerebro y otros tejidos donde está presente agmatina, y teniendo en cuenta el papel que AZIN2 ejerce sobre el transporte de las poliaminas (López-Contreras et al., 2008), existe la posibilidad de que AZIN2 pudiera desempeñar un cierto papel en la captación de agmatina.

Mientras que las estructuras tridimensionales de ODC y AZIN1 son bien conocidas (Kern et al., 1999; Almrud et al., 2000; Albeck et al., 2008) no existen datos publicados sobre la estructura de AZIN2, ya que hasta la fecha no se ha logrado cristalizar la proteína. Una característica que comparte AZIN2 con ODC y AZIN1 es su capacidad para unir a las tres AZs. Sin embargo, mientras que la unión de AZ1 a ODC estimula la degradación de la enzima, en el caso de las AZINs las protege frente a la degradación (Kahana et al., 2005; Kahana, 2009). Por otra parte, mientras que la secuencia de unión a AZ (AZBE) fue identificada en ODC mediante la comparación de las secuencias conocidas de la ODC murina con la de *T. brucei*, enzima protozoica que no une a AZ1 (Li & Coffino, 1992), la ampliación del conocimiento de las secuencias de decenas de ortólogos de ODC y de sus parálogos AZIN1 y AZIN2 que ha tenido lugar en los últimos años, permite establecer analogías y diferencias en dicha región y estudiar las implicaciones en cuanto a las propiedades de los distintos parálogos en relación a su unión a las AZs y otros aspectos funcionales.

Con estos antecedentes los objetivos del trabajo planteados, relacionados con la expresión, estructura, y función de AZIN2, fueron los siguientes:

- 1) Estudio de la expresión de AZIN2 y genes homólogos, así como la de las AZs en diferentes tejidos de ratón adulto mediante RT-PCR a tiempo real.
- 2) Expresión de AZIN2 en testículo de rata y en testículos de ratones con alteraciones en la espermatogénesis.
- 3) Influencia de AZIN2 y proteínas relacionadas con el metabolismo de poliaminas sobre el transporte de agmatina e influencia sobre el mismo de compuestos amino-guanidínicos.
- 4) Predicción de la estructura tridimensional de AZIN2 mediante modelado comparativo por homología, y estudio de la estructura cuaternaria de AZIN2 y de su capacidad de heterodimerización con ODC en células de mamíferos.
- 5) Análisis de la zona de unión a AZs (AZBE) en AZIN2 y sus parálogos, e influencia de los residuos conservados en las propiedades de las proteínas.
- 6) Estudio de la vida media de AZIN2 y sus parálogos en células HEK293T, y de su posible mecanismo de degradación.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Reactivos

Los reactivos utilizados en esta tesis fueron de grado analítico. Las disoluciones fueron preparadas con agua bidestilada previamente tratada con un sistema de deionización MilliQ-Plus de Waters-Millipore (Billerica, MA, USA) hasta alcanzar una resistividad de 18.2 M Ω .cm.

Agilent Technologies (Santa Clara, CA, USA): QuickChange XL Site-Directed Mutagenesis Kit.

American Radiolabeled Chemicals Inc. (St. Louis, MO, USA): L-[U-¹⁴C]- Arginina (308 mCi/mmol).

Amersham Biosciences/GE Healthcare (Little Chalfont, UK): ¹⁴C-Putrescina (107 mCi/mmol), ¹⁴C-Espermidina (112 mCi/mmol), ¹⁴C-Espermina (113 mCi/mmol).

Applied Biosystems (Warrington, UK): SYBR Green PCR Master Mix, 96-well PCR plates and plastic covers.

Bio-Rad (Richmond, VA, USA): Extra Thick Blot Paper Protean XL Size

Ilex Products Inc. (San Antonio, TX, USA): 2-difluorometilornitina (DFMO).

Invitrogen Corporation (Carlsbad, CA, USA): DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), suero bovino fetal, glutamina, penicilina/estreptomicina, tripsina/EDTA, Lipofectamina 2000.

Millipore (Billerica, MA, USA): Immobilon-P, anticuerpo secundario anti-IgG de conejo marcado con HRP, columnas con filtros 5000 NMWL.

Movarek Biochemicals Inc. (Brea, CA, USA): L-[1-¹⁴C]-Ornitina (58 mCi/mmol).

National Diagnostics (Atlanta, GA, USA): Líquido de centelleo Ecoscint-H, acrilamida/bisacrilamida.

PAA/GE Healthcare (Little Chalfont, UK): Material de plástico para cultivos celulares.

Panlab (Barcelona, Spain): Pienso estándar de mantenimiento (UAR A03) y deficiente en potasio (UAR 212K).

Sigma-Aldrich Co. (St Louis, MO, USA): agua libre de nucleasas, albúmina de suero bovino, anticuerpo monoclonal de ratón anti-HA conjugado con peroxidasa, anticuerpo anti-FLAG M2 conjugado con peroxidasa, anticuerpo anti-Actina de conejo, bis(sulfosuccinimidil) suberato (BS3), β -mercaptoetanol (β ME), ciclofosfamida (monohidrato), cicloheximida, cloruro sódico, cloruro potásico, dodecilsulfato sódico (SDS), EDTA, flutamida ((2-metil-N-(4-nitro-3-[trifluorometil]fenil)propanamida), fosfato de piridoxal, GenElute mammalian total RNA Miniprep Kit, Igepal CA-630, L-arginina, L-lisina, L-ornitina, L-arginina descarboxilasa de *E. coli.*, lactacistina, MG-132 (Z-Leu-Leu-Leu-al), MMLV transcriptasa reversa, N,N,N',N'-tetrametiletilenodiamina (TEMED),

persulfato amónico, poliaminas no radioactivas, resina de afinidad EZview Red anti-HA, resina de afinidad EZview anti-FLAG M2, RNAlater, Tris (Trizma® base), Sigma Genosys (Cambridge, UK): cebadores. Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA): PageRuler Prestained Protein Ladder, Pierce® ECL 2 Western Botting Substrate.

2. Líneas Celulares.

Todas las líneas celulares utilizadas en esta tesis se obtuvieron del Servicio de Cultivos Celulares de la Universidad de Murcia y se crecieron en medio de cultivo DMEM suplementado con 10% de suero bovino fetal previamente descomplementado (56°C/30min), glutamina 2 mM y penicilina/estreptomicina (100U/ml y 100 µg/ml, respectivamente). Este medio suplementado se denominó DMEM completo. Los cultivos celulares se realizaron a 37°C en una atmósfera saturada de humedad con un 5% de CO₂. Las líneas celulares renales HEK 293T (humano) y COS7 (simio) se eligieron por su gran eficacia de transfección. Las líneas celulares tumorales humanas (KELLY, NB69, U373, SH-SY5Y, CHP-212, JURKAT E6.1, U-937, Hep G2, HBL, CACO-2, HeLa, KATO-III y DMS 79) se utilizaron para la extracción de ARN y posteriores análisis por RT-PCR a tiempo real.

3. Transfecciones transitorias.

Para la transfección las células se subcultivaron en placas de 12 y 24 pocillos, dependiendo del experimento a realizar y se dejaron crecer hasta alcanzar un 80-90% de confluencia. Tanto las células HEK 293T como las COS7 se transfectaron con Lipofectamina 2000, si bien la cantidad de reactivo era diferente según el caso. Las células HEK 293T se sembraron en placas de 12 pocillos y cada pocillo se transfectó con 0.3 µg de plásmido y 1.5 µl de Lipofectamina. Las células COS7 se sembraron en placas de 24 pocillos y cada pocillos se transfectó con 0.15 µg de plásmido y 1 µl de Lipofectamina. En ambos casos la mezcla ADN-Lipofectamina se dejaba incubar durante 20-25 min y posteriormente se añadía a las células durante 6 horas. Tras este periodo se retiró el medio de transfección y se añadió DMEM completo fresco. Las células se dejaron expresando el plásmido durante 18-24 horas.

Tras la transfección, las células HEK 293T transfectadas se recogieron en PBS frío, previo lavado con el mismo tampón, y se centrifugaron a 6.000 rpm durante 10 min. Tras retirar el PBS, el pellet celular se rompió con tampón de solubilización celular mediante 1 min de vortex y se centrifugaron a 14.000 xg durante 20 min a 4°C. El sobrenadante se utilizó para los ensayos pertinentes y se guardó a -20°C durante no más de 1 semana para experimentos posteriores. La cantidad de proteína se cuantificó

por el método de BCA (ácido bicinonínico) utilizando BSA como estándar para la recta del calibrado. Las células COS7 transfectadas se utilizaron para ensayos de captación de poliaminas.

4. Construcciones Génicas.

Las regiones codificantes (ORFs) de los genes ODC, AZIN1, AZIN2, AZ1, AZ2 y AZ3 murinos, y de SSAT humana fueron clonadas en el plásmido de expresión pcDNA3 como se describe en trabajos anteriores (López-Contreras et al., 2006). Los clones de ODC, AZIN1 y AZIN2 fueron fusionados a la secuencia que codifica para el epítipo FLAG (péptido DYKDDDDK), mientras que los clones de las antizimas fueron fusionados al epítipo HA (hemaglutinina). En todos los casos el epítipo correspondiente se agregó en la región N-terminal, a excepción de AZIN1 que fue insertado en el C-terminal.

5. Mutagénesis dirigida.

La generación de los distintos mutantes se realizó usando el kit de mutagénesis dirigida QuickChange XL siguiendo el protocolo de la casa comercial. Para ello se diseñaron cuidadosamente los cebadores de tamaño y Tm adecuados que incluían el cambio de nucleótidos necesario para la mutación de un residuo dado. En algunos casos se llevó a cabo una doble o triple mutación en una misma reacción si la distancia entre residuos era lo suficientemente próxima. Las construcciones mutadas fueron ODC y AZIN2 marcadas con el epítipo FLAG. Las mutaciones generadas y los cebadores utilizados para ello se muestran a continuación:

Mutación	Primer Forward (5'-3')	Primer Reverse (5'-3')
ODC K115A	GGGTTATCTATGCAAATCCTTGTGC ACAAGTCTCTCAAATCAAGTATG	CATACTTGATTTGAGAGACTTGIG CACAAGGATTTGCATAGATAACCC
ODC A123S	TCTCAAATCAAGTATTCTGCCAGTA ACGGAGTCCAGATGATG	CATCATCTGGACTCCGTTACTGGC AGAATACTTGATTTGAGA
ODC E138A	GACTTTTGACAGTGAAATTGCATT GATGAAAGTCGCCAGAG	CTCTGGCGACTTTTCATCAATGCAA TTTCACTGTCAAAAAGTC
ODC L139A	GACTTTTGACAGTGAAATTGAAGC GATGAAAGTCGCCAGAG	CTCTGGCGACTTTTCATCGCTTCAA TTTCACTGTCAAAAAGTC
ODC L139S	GACTTTTGACAGTGAAATTGAATC GATGAAAGTCGCCAGAG	CTCTGGCGACTTTTCATCGATTCAAT TTCACTGTCAAAAAGTC
ODC K141A	AGTGAAGTTGAGTTGATGGCCGTC GCCAGAGCACATCCCAAAGCA	TGCTTTGGGATGTGCTCTGGCGAC GGCCATCAACTCAACTTCAC

ODC C360A	GCATCTGGGGACCAACAGTTGATG GCCTTGATCGGATCG	CGATCCGATCAAGGCCATCAACTG TTGGTCCCCAGATGC
ODC ΔCtODC	GATGGCACGCTGCCCATGTCTTGA GCCCAGGAGAGCGGGATG	CATCCCGCTCTCCTGGGCTCAAGA CATGGGCAGCGTGCCATC
AZIN2 K116A	GATCATCTGCGCCAACCCCTGTGC CCAAATTGCACAGATCAAATATG	CATATTTGATCTGTGCAATTTGGGC ACAGGGGTTGGCGCAGATGATC
AZIN2 A124S	GTTGCACAGATCAAGTATGCTTCCA AGCACGGGGTG	CACCCCGTGCTTGAAGCATACTT GATCTGTGCAAC
AZIN2 E139A	GACAATGAAGTGGCGCTGGCCAAG GTGGTCAAGAGCCAC	GTGGCTCTTGACCACCTTGGCCAG CGCCACTTCATTGTC
AZIN2 L140A	GACAATGAAGTGGAGGCGGCCAAG GTGGTCAAGAGCCAC	GTGGCTCTTGACCACCTTGGCCGC CTCCACTTCATTGTC
AZIN2 K142A	GAGATGGAGCTGGCCGCCGTGGTA AAGAGCCACCCC	GGGGTGGCTCTTTACCACGGCGG CCAGCTCCATCTC

Para conseguir la expresión de las formas completas y funcionales de las antizimas sin necesidad de que ocurra el mecanismo de *frameshifting* dependiente de la concentración de poliaminas, se generaron formas mutadas de los clones de AZs marcados con el epítipo HA (MAZ1-HA, MAZ2-HA y MAZ3-HA) con la delección del codón terminación prematuro como se describe en trabajos anteriores (López-Contreras et al., 2006).

6. SDS-PAGE y transferencia Western.

La electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) se realizó en condiciones desnaturizantes en la mayoría de los casos. En estos casos el gel y los tampones contenían el detergente dodecilsulfato sódico (SDS) y el tampón de carga contenía β-ME. Los geles de poliacrilamida se polimerizaron por la acción del TEMED y del persulfato amónico sobre una disolución de acrilamida y bisacrilamida. La concentración final de acrilamida en el gel hacinador fue del 4% mientras que en el gel separador fue del 10%. La muestra de lisado celular se diluyó en tampón de carga y se cargó un máximo de 30 μg de proteína total por pocillo. La intensidad de corriente aplicada durante la electroforesis fue 15 mA/gel hasta que la muestra entró en el gel separador y posteriormente de 25 mA/gel. Para la separación de proteínas en condiciones no desnaturizantes se prescindió del SDS en geles y tampones y del β-ME en el tampón de carga. En este caso electroforesis se llevo a cabo en frío y con una intensidad de corriente no superior a 20 mA/gel durante 2 horas.

Tras la electroforesis las proteínas se trasladaron a una membrana de PVDF mediante electrotransferencia (22V/1h). Posteriormente la membrana se bloqueó durante 1 h a temperatura ambiente con leche desnatada en polvo al 5% en PBS-T (0.1% Tween) y se incubó con el anticuerpo primario, α -FLAG o α -HA, marcado con peroxidasa de rábano (HRP) a dilución 1:10000 (PBS-T) durante 1 hora a temperatura ambiente o toda la noche a 4°C. Finalizada la incubación, se realizaron 3 lavados con PBS-T y se procedió al revelado.

Para el revelado de las membranas se utilizó el kit de quimioluminiscencia ECL Plus siguiendo las instrucciones del fabricante. La señal se registró en un sistema de adquisición de imágenes de experimentos quimioluminiscencia, Chemi Smart 3000 (Vilber Lourmat). El programa utilizado fue el Chemi-Capt. La posterior cuantificación de la cantidad de proteína obtenida se realizó con el programa de análisis de imágenes ImageJ.

El control de carga se realizó mediante incubación con el anticuerpo anti- β -actina previo "stripping" de la membrana. Este proceso consiste en un lavado de 10 min con NaOH 0.5 M y otro lavado de 10 min con agua destilada, ambos en agitación vigorosa. Una vez terminados los lavados, se vuelve a bloquear la membrana y se incuba con anti-Actina (1:5000 en PBS-T) durante toda la noche a 4°C. Tras tres lavados con PBS-T se incubó con un anticuerpo secundario anti-IgG de conejo marcado con HRP (1:10000 en PBS-T) durante 1 hora a temperatura ambiente. Se realizan tres nuevos lavados y se procedió al revelado como se indicó anteriormente.

7. Reacción de cross-linking.

Las células HEK 293T transfectadas con AZIN2-FLAG y diferentes construcciones de ODC-FLAG se lisaron en tampón de solubilización, y los lisados celulares se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente con el agente de cross-linking BS3 1 mM (disuelto en Tris-HCl 1 mM pH 7.5). La reacción se terminó mediante la adición de exceso de Tris-HCl pH 7.5 (1M), y las proteínas se analizaron por Western blotting e incubación con anticuerpo anti-FLAG.

8. Cromatografía de exclusión por tamaño

Las células HEK 293T transfectadas con ODC-FLAG o AZIN2-FLAG se lisaron en tampón de solubilización y centrifugaron a 14000xg durante 20 minutos, y el sobrenadante se inyectó directamente en una columna Zorbax Bio Series GF-250 (Agilent Technologies, CA, USA) previamente calibrada en un tampón que contenía Tris-HCl 50 mM, EDTA 1 mM, fosfato de piridoxal 4 mM e Igepal 0.1%. Tras la inyección se

recogieron sesenta fracciones de 100 μ l que se analizaron por Western blotting e incubación con anticuerpo anti-FLAG. Como estándar se utilizó albúmina de suero bovino (66 KDa), pero en este caso las fracciones se separaron por SDS-PAGE y el gel se tiñó con azul de Commasie.

9. Co-inmunoprecipitación.

Los experimentos de co-inmunoprecipitación se realizaron con el fin de determinar la interacción entre una proteína marcada con el epítipo FLAG y otra con el epítipo HA en células co-transfectadas con ambas proteínas. Para ello se utilizaron aproximadamente 1×10^6 células co-transfectadas, las cuales se lavaron con PBS y se lisaron en 100 μ l de tampón de solubilización. La inmunoprecipitación se llevó a cabo aplicando 90 μ l lisado celular (se guardan 10 μ l para el control de transfección o *input*) directamente en 20 μ l de resina de afinidad unida covalentemente a anti-FLAG EZview Red, previamente equilibrada con tampón de solubilización y bloqueada con BSA 1% durante 1 hora a 4°C. Tras 2-3 horas de incubación con agitación circular a 4°C, la muestra se centrifugó a 8200xg/30s y se retiró el sobrenadante. A continuación se realizaron 3 lavados en tampón de solubilización y la proteína inmunoprecipitada se eluyó en 20 μ l tampón de carga de electroforesis 4x con β -ME a temperatura ambiente durante 30 min (agitando mediante vortex cada 5 min). Finalmente, la muestra se centrifugó y el sobrenadante se cargó en un gel SDS-PAGE. Tras la separación de las proteínas y la electrotransferencia, membranas se incubaron con el anticuerpo anti-HA y se reveló como se indicó anteriormente.

10. Predicción de la estructura 3D de proteínas mediante modelado comparativo.

La secuencia de la proteína se enviaron al metaservidor GeneSilico, una puerta de entrada a un gran número de métodos que además facilita la comparación e interpretación de las predicciones realizadas por diferentes algoritmos (Kurowski and Bujnicki, 2003). En particular, el metaservidor se usó para la predicción de la estructura secundaria y para el alineamiento de la secuencia diana a proteínas con estructuras determinadas experimentalmente que pueden ser usadas como moldes para el modelado comparativo (proceso conocido como FR, por sus siglas en inglés “fold-recognition”). Estos alineamientos generados por métodos primarios fueron comparados, evaluados y clasificados por el método PCONS (Lundstrom et al., 2001). Una puntuación mediante el método PCONS >1 indica generalmente que el plegamiento de la proteína puede predecirse correctamente con los métodos FR. Sin embargo, las bajas puntuaciones no excluyen necesariamente que predicciones puedan ser

correctas, sobre todo en casos de proteínas con una fuerte divergencia de secuencia. En tales casos, un buen estimador de la calidad de la predicción es el número de veces que un plegamiento dado es clasificado en las mejores posiciones del ranking realizado por PCONS (Wallner & Elofsson, 2007). Los alineamientos FR de la proteína AZIN2 de ratón y los moldes mejor puntuados [Códigos PDB 7odc (ODC de ratón) y 3btn (AZIN1 de ratón)] fueron usados como punto de partida para el modelado de la estructura terciaria de AZIN2, proceso que comprende ciclos de construcción de modelos mediante Modeller (Sali and Blundell, 1993), evaluación por MetaMQAPII (Pawlowski et al., 2008) y realineamiento en regiones pobremente puntuadas siempre y cuando los cambios manuales de los alineamientos no mejoren la calidad el modelo. Las regiones inciertas (residuos 160-170, 296-312, 342-349 y 418-459) fueron modeladas *de novo* usando el programa Refiner (Boniecki et al., 2003), “congelando” para ello el resto de la estructura del modelo de AZIN2. Las coordenada del modelo se encuentran disponibles para su descarga desde el metaservidor (<ftp://genesilico.pl/iamb/models/AZIN2/>).

Para la evaluación de los modelos generados se usaron dos programas de evaluación de la calidad de modelos (MQAPs): MetaMQAPII (Pawlowski et al., 2008) y PROQ (Wallner et al., 2003). Debe destacarse que las puntuaciones obtenidas por los MQAPs solo predicen la desviación de un modelo respecto a la estructura real (la desviación real puede ser calculada únicamente por la comparación a la estructura real, la cual no está disponible). Así, las puntuaciones obtenidas en esta tesis que indican p.e. “modelos extremadamente buenos”, deben ser interpretados como estimaciones o predicciones de que nuestros modelos son “extremadamente buenos”, y no como la validación final de la calidad del modelo. Sin embargo, debe mencionarse que tanto PROQ como MetaMQAPII han sido descritos como muy buenos programas de predicción.

11. Determinación de la actividad ODC.

Para la determinación de la actividad ODC se utilizó el método de captura de CO₂ producido por la descarboxilación del sustrato L-[1-¹⁴C]-Ornitina (Russell & Snyder, 1968). Los tejidos fueron disgregados mediante un homogeneizador tipo Polytron en tampón A (composición disponible en el apéndice) y el extracto crudo obtenido se centrifugó a 12000xg/20min a 4°C, utilizando el sobrenadante (fracción citosólica) para la determinación de la actividad enzimática. Las células transfectadas se rompieron en tampón de solubilización y el lisado celular se centrifugó a 14000xg/20min a 4°C, usando de nuevo el sobrenadante para la medida enzimática.

La cantidad de muestra a ensayar se eligió dependiendo del tipo de tejido o de células transfectadas, completando hasta un máximo de 50 µl con tampón A. La

reacción se inició añadiendo 12.5 µl de la dilución de sustrato radiactivo. El tubo se cerró con un tapón de goma a cuya parte inferior se había fijado un alfiler con dos discos de papel Whatman 3MM de 0.6 cm. de diámetro impregnados con 20 µl de una disolución 1:1 de cloruro de benzetonio y metanol. La reacción enzimática se incubó a 37°C durante 30 min y se detuvo con la adición de 400 µl de ácido cítrico 2M a través del tapón de goma con una jeringa sin tocar los discos de papel. Los discos se introdujeron en tubos que contenían disolución de centelleo (15 g de PPO y 50 mg de dimetil-POPOP por litro de tolueno) y la radiactividad se midió en contador Tri-Carb 2900TR de centelleo líquido (Perkin Elmer, USA).

12. Ensayo de captación de poliaminas.

Las células fueron cultivadas en placas de 24 pocillos hasta alcanzar aproximadamente el 80% de confluencia. A continuación, las células fueron transfectadas o ensayadas directamente para la captación de poliaminas. Antes de añadir el sustrato radiactivo las células se lavaron con DMEM solo (sin suero), para eliminar las posibles trazas de suero, que pueden inhibir la captación de poliaminas. Tras el lavado inicial el ensayo se inició mediante la adición de poliaminas radioactivas (¹⁴C-putrescina, espermidina, espermina o agmatina) a una concentración de 2 µM en DMEM solo y las células se incubaron a 37°C durante 30-60 min. Las células fueron entonces lavadas 3 veces con PBS frío y se con tripsina durante 30 min a 37°C para conseguir la lisis celular. Por último, se adicionó 3 ml de solución de centelleo Ecoscint-H directamente sobre el lisado, se agitó vigorosamente y se midió en el contador. La acumulación no específica de poliaminas fue determinada mediante ensayos similares realizados a 0°C, valores que fueron restados a la acumulación total para calcular la captación específica de poliaminas. Los distintos derivados aminoguanidios, diguanidinos y diimidazolínicos utilizados en determinados ensayos de transporte de agmatina fueron proporcionados por el Dr. Christophe Dardonville (Instituto de Química Médica del Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid).

13. Animales.

13.1. Manipulación, obtención de tejidos.

Los ratones Swiss CD1 y las ratas Sprague Dawley utilizados para experimentos fueron proporcionadas por el Servicio de Animales de Laboratorio de la Universidad de Murcia. Los animales se alimentaron con pienso estándar y agua "ad libitum", manteniéndose a 22°C y una humedad relativa del 50% con ciclos de luz-oscuridad de 12 horas. Las dietas especiales y los tratamientos administrados en cada caso se

especifican en el apartado “Resultados”. Los testículos procedentes de ratones haploinsuficientes para ATR o Seckel, y los *knockout* para ATM fueron cedidos por el grupo de “Inestabilidad Genómica” del Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (Madrid).

Los animales fueron sacrificados mediante dislocación cervical, y los tejidos fueron rápidamente extraídos, pesados y procesados. Para manipular los tejidos el material quirúrgico se trató con RNase Zap (Ambion). Los tejidos no procesados inmediatamente se almacenaron a -20°C en RNAlater (Sigma) hasta el momento de la utilización. Todos los experimentos con animales cumplieron las normativas nacionales y europeas respecto al manejo de animales de experimentación y tuvieron el visto bueno del Comité de Bioética de la Universidad de Murcia (26012011).

13.2. Tratamientos.

La flutamida se disolvió en etanol (soluble hasta 50 mg/ml) y se inyectó intraperitonealmente (ip) a los ratones diariamente durante dos semanas. La flutamida se administró en dosis de 80 mg/kg de peso corporal y los ratones controles recibieron etanol como vehículo durante todo el periodo de tratamiento.

La deficiencia en potasio fue inducida mediante la cría de los ratones durante 30 días con un pienso de composición similar al normal pero que contenía 120 mg/kg de potasio (UAR 212K, Panlab). Los ratones controles se alimentaron con pienso estándar de mantenimiento que contenía 7.5 g/kg de potasio (UAR A03, Panlab). El restablecimiento del potasio se consiguió por la suplementación de la dieta baja en potasio con una solución de KCl 1% en el agua de bebida durante los últimos 10 días del tratamiento.

La ciclofosfamida se disolvió en PBS y se inyectó intraperitonealmente (ip) a los ratones una vez por semana durante un periodo de 5 semanas. El fármaco se administró en dosis de 200 mg/kg (8/10 del valor de LD50). Esta dosis equivale a la dosis terapéutica administrada en humanos (Freireich et al. 1966). Los ratones controles recibieron PBS como vehículo durante todo el experimento. Los animales fueron sacrificados tras la primera, quinta u octava semana de la última inyección.

14. Extracción de ARN total y síntesis de ADNc.

La extracción de ARN a partir de tejidos o líneas celulares se realizó mediante el GenElute mammalian total RNA Miniprep Kit (Sigma), siguiendo el protocolo de la casa comercial. Los tejidos se disgregaron en tampón de lisis con β -mercaptoetanol proporcionado por el kit con un homogeneizador tipo Polytron previamente tratado con inhibidor de RNasas. Las líneas celulares se lisaron en el mismo tampón mediante

vortex. Tras las etapas de filtración, lavados y dilución final en agua libre de nucleasas, el ARN se cuantificó con un espectrofotómetro Nanodrop 2000c (Thermo Fisher Scientific).

Para la síntesis de 20 μ l de ADN complementario se utilizó un molde de 5 μ g de ARN total a los que le añadió 1 μ l de oligodT 100 μ M, 1 μ l de dNTP Mix 10 mM y el agua libre de nucleasas requerida. La mezcla se calentó a 70°C durante 10 min y se enfrió en hielo antes de añadir 1 μ l de retrotranscriptasa MMLV y 2 μ l de tampón (10x). La mezcla de reacción se incubó a 37°C durante 1 hora, con una incubación final de 90°C/10 min para desactivar la enzima.

15. RT-PCR a tiempo real.

La reacción de PCR se realizó en placas de 96 pocillos en un equipo 7500 Real Time PCR de Applied Biosystems (Warrington, UK). La composición por pocillo es la siguiente: 0.5 μ l de ADNc, 4 μ l de mezcla de cebadores 5 μ M, 10 μ l de SYBR Green PCR Master Mix y 5.5 μ l de agua libre de nucleasas (volumen total 20 μ l). El protocolo usado para la PCR fue el siguiente: 1 ciclo a 95°C/10 min; 40 ciclos a 95°C/15 s y 60°C/1 min. La recogida de datos de fluorescencia se realizó en cada ciclo y el análisis de estos datos se efectuó con la aplicación 7500 SDS Software de Applied Biosystems.

La cuantificación de la expresión génica se realizó mediante el cálculo del ciclo de corte (Ct) para un umbral de fluorescencia dentro de la fase exponencial y su relación con el Ct de un gen control (β -actina). Para descartar posibles amplificaciones múltiples con las mismas parejas de cebadores se realizó una curva de disociación. La existencia de un solo pico en esta curva excluye la posibilidad de dos productos amplificados con distinta temperatura de fusión.

Los cebadores usados se diseñaron para amplificar secuencias de 100 pb aproximadamente situadas entre dos exones, hibridando el cebador “forward” en la zona de unión de dos exones para evitar la amplificación de un posible ADN genómico contaminante. La secuencia de los cebadores usados para RT-PCR a tiempo real en esta tesis se muestran en la siguiente tabla. Entre paréntesis la especie para la cual que se han diseñado la pareja de cebadores (m: ratón; r: rata; h: humano).

Gen	Primer Forward (5'-3')	Primer Reverse (5'-3')
β -actina (m, r)	GATTACTGCTCTGGCTCCTAGCA	GCTCAGGAGGAGCAATGATCTT
β -actina (h)	GATCACTGCCCTGGCACCCAGC	GCTCAGGAGGAGCAATGATCTT
ODC (m)	ATGGGTTCCAGAGGCCAAA	CTGCTTCATGAGTTGCCACATT
ODC (h)	ATGGCTTCCAGAGGCCGAC	TTGCTGCATGAGTTGCCACGCA

AZ1 (m)	GAGTTCGCAGAGGAGCAACT	CCAAGAAAGCTGAAGGTTCCG
AZ1 (h)	GGAGTTCGCTGAGGAGCAGC	CGAACCTTCAGCTTTTTGG
AZ2 (m)	AGTAAGTGTCCCCAGCTCCA	ATCTTCGACAGTGGGTGAGG
AZ2 (h)	GTAAGTGTCCCCAGCTCCAG	ATCTTCGACAGTGGGTGAGG
AZ3 (m)	CCAGGTGGGTAGGAGCACT	AAGCAGGGGGTCAGTTGATA
AZ3 (r)	CCAGGTGGGTAGGAGCACT	AAGCAGGGGGTCGGCTGATA
AZ3 (h)	CAGGAGGGCAAAAGCACC	GAGCAGGGGGTCAGTAGCCA
AZIN1 (m)	CTTTCCACGAACCATCTGCT	TTCCAGCATCTTGCATCTCA
AZIN1 (h)	CTTTCCATGAACCATCTGCT	TTCCAGCATCTTGCATCTCA
AZIN2 (m, r)	GCTTAGAGGGAGCCAAAGTG	CTCAGCAAGGA TGTCCACAC
AZIN2 (h)	GCCACCACGGACGAGGTA	TCACTATGGCACCAGGTCAG
Prm2 (m, r)	GGAGACACTCCTGCCGCCACA	CTGCACCTGCATCTCCTCC
Cyp17a1 (m)	ACAAGTAGCTCTGTGCTGAACTGG	CACCTCAGGATTGTGCACCA
Star (m)	AAGGAAAGCCAGCAGGAGAAC	CCACATCTGGCACCATCTTACTTA
Cyp11a1 (m)	TCCTCAAAGCCAGCATCAAGG	CGAAGCACCAGGTCATTAC

16. Síntesis de [¹⁴C]-agmatina.

L-[U-¹⁴C]-arginina 160 μM en acetato de sodio 0.3 M, pH 5.5 se incubó con arginina descarboxilasa de E. coli (1 I.U.) durante toda la noche a temperatura ambiente. Al día siguiente se volvió a añadir la enzima y se continuó con la incubación durante otra hora. La mezcla fue entonces purificada en columnas con filtros 5000 NMWL mediante centrifugación a 10000xg durante 20 minutos. La pureza de la ¹⁴C-agmatina se comprobó mediante cromatografía en capa fina.

17. Análisis estadístico.

Para comparar diferencias entre dos grupos se utilizó la prueba t de Student. Las comparaciones múltiples se realizaron usando el análisis de la varianza (ANOVA). Los datos se analizaron mediante la utilización del programa GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software, CA, USA). Se consideraron diferencias estadísticamente significativas a P<0.05.

RESULTADOS

- Capítulo 1 -

Expresión de antizimas e inhibidores de antizimas en tejidos de roedores y líneas celulares humanas

Como se ha mencionado anteriormente, se han encontrado distintas isoformas tanto para las antizimas como para los inhibidores de antizimas en numerosas especies. Mientras que para determinados miembros de ambas familias, como es el caso de AZ1, AZ2 y AZIN1, la expresión es ubicua, al menos en humano y ratón, la expresión de otros genes como AZ3 y AZIN2 parece restringida a ciertos tipos de tejidos. De hecho, AZ3 se expresa exclusivamente en las células haploides de testículo adulto (Ivanov et al., 2000b; Tosaka et al., 2000), y AZIN2 parece expresarse mayoritariamente en cerebro y testículo (Pitkanen et al., 2001; López-Contreras et al., 2006). Dado que en los estudios originales se determinó el patrón de expresión de todos estos genes mediante técnicas cualitativas como Northern Blot, Dot Blot o PCR, y que recientemente AZIN2 se ha detectado en otros tipos celulares y tejidos como mastocitos y ovarios (Kanerva et al., 2009; Mäkitie et al., 2009c), nos propusimos reanalizar la expresión de estos genes mediante una técnica cuantitativa como la RT-PCR a tiempo real. En este capítulo se analiza la expresión de AZs y AZINs en distintos tejidos de ratón adulto (Swiss CD1) y varias líneas celulares humanas de origen tumoral, y se compara con la de ODC.

4.1. Estudios de expresión de ODC, AZs y AZINs en diferentes tejidos de ratón adulto.

Como se puede observar en la Fig. 1A la expresión de AZIN2, analizada mediante RT-PCR a tiempo real, se detectó en otros tejidos murinos distintos a cerebro y testículo, como epidídimo, páncreas, glándula adrenal, pulmón, corazón, riñón e hígado. Los niveles más elevados de expresión se encontraron en testículo, siendo unas 30 veces mayor que los de cerebro. Por otra parte, se encontraron valores similares a los de cerebro en epidídimo y páncreas. Con relación a AZIN1 se pudo constatar que los niveles de su ARNm fueron más elevados en páncreas y testículo, seguidos de riñón e hígado, encontrándose niveles más bajos en otros tejidos (Fig. 1B). En general estos resultados están de acuerdo con trabajos previos que analizaron la expresión de AZIN1 en tejidos de rata mediante Northern Blot (Murakami et al., 1996) y de ratón por RT-PCR semicuantitativa (Tang et al., 2009). Al comparar los valores de ARN mensajero de ambos genes en cada uno de los tejidos analizados se pudo observar que AZIN2 se expresa más que AZIN1 en testículo, glándula adrenal, pulmón, cerebro y epidídimo,

llegando a ser incluso 10 veces mayor en el testículo, mientras que la expresión de AZIN1 fue considerablemente mayor que la de AZIN2 en riñón e hígado (Fig. 1C).

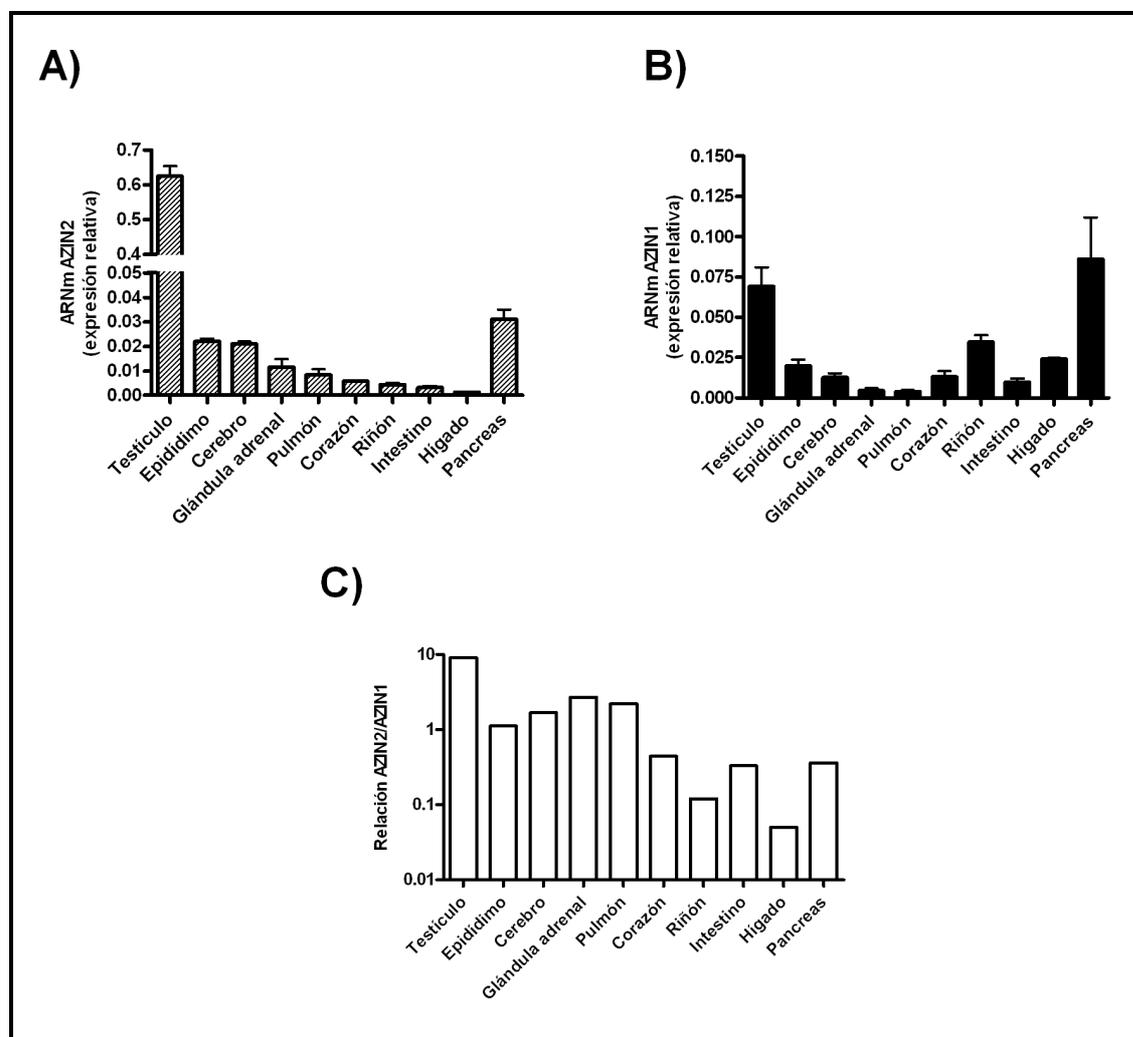


FIGURA 1. Análisis mediante RT-PCR a tiempo real de la expresión de AZIN1 y AZIN2 en distintos tejidos de ratón adulto. Los valores de ARNm de AZIN2 (A) y de AZIN1 (B) se normalizaron respecto a beta actina. Los resultados son la media \pm SEM de los valores de mensajero de 4-8 animales determinados por triplicado. (C) Relación AZIN2:AZIN1 calculada a partir de los valores mostrados en (A) y (B). Dicha relación se expresa en escala logarítmica de base 10.

Para comparar la expresión de los inhibidores de antizimas con la de su gen parálogo ODC, se determinaron los niveles de mensajero de ODC en los tejidos anteriores (Fig. 2A) y se calcularon los porcentajes de cada parálogo (Fig. 2B). En todos los tejidos estudiados, los niveles de ARNm de ODC fueron considerablemente mayores que los de AZIN1 y AZIN2, especialmente en pulmón, riñón, intestino y corazón (más del 80%). El mayor porcentaje de AZIN2 se observó en testículo (45%), seguido por cerebro (25%) y glándula adrenal (16%). Los tejidos que mostraron mayor proporción de ARNm de AZIN1 fueron el hígado, páncreas y cerebro (sobre un 15%).

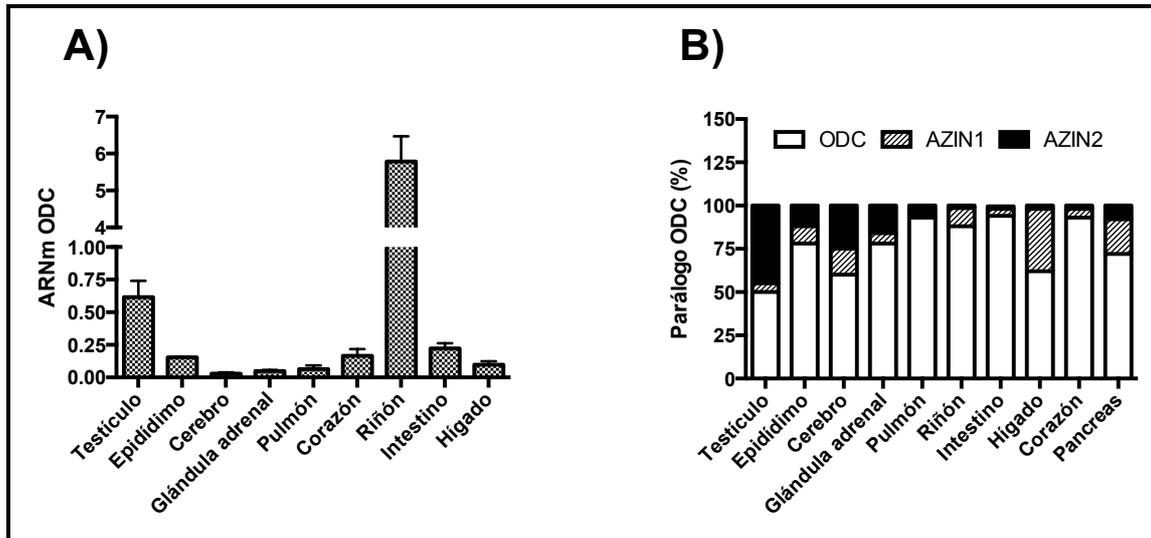


FIGURA 2. Análisis mediante RT-PCR a tiempo real de la expresión de ODC en distintos tejidos de ratón adulto. Los valores de ARNm de ODC (A) se normalizaron respecto a beta actina. Los resultados son la media \pm SEM de los valores de mensajero de 4-8 animales determinados por triplicado. (B) Expresión relativa de los tres parálogos de ODC en tejidos de ratón adulto. Se muestra el porcentaje de cada gen respecto a la expresión total.

Ya que tanto ODC como los AZINs están funcionalmente relacionados con las AZs, examinamos los niveles de transcritos de las tres antizimas en los distintos tejidos murinos. Los ARNm de AZ1 y AZ2 se detectaron en todos los tejidos estudiados, siendo sus valores absolutos (normalizados frente a beta actina) mucho mayores que los encontrados para los AZINs en el mismo tipo de tejido (Fig. 3A, 3B). AZ3 se expresó casi exclusivamente en testículo, lo que está de acuerdo con estudios previos (Ivanov et al., 2000b; Tosaka et al., 2000), siendo el valor relativo del ARNm de AZ3 con respecto al de beta-actina 4.63 ± 0.51 , siendo la isoforma mayoritaria en este tejido, representando un 85% del total de los AZs (Fig. 3C). La presencia de ARNm de AZ3 en epidídimo (alrededor de un 4%) puede ser debida a una expresión residual del gen en los espermatozoides almacenados en la región cauda del epidídimo. En los otros tejidos examinados el mensajero de AZ1 fue predominante, con valores por encima del 90% en la mayoría de ellos (Fig. 3C). La relación entre los valores de los ARNm de AZ1 y AZ2 oscilaron desde 2 (testículo) a 41 (pulmón). Estos datos están de acuerdo con resultados obtenidos mediante análisis dot-blot en tejidos humanos, en los que AZ1 fue unas 16 veces más abundante que AZ2 (Ivanov et al., 1998).

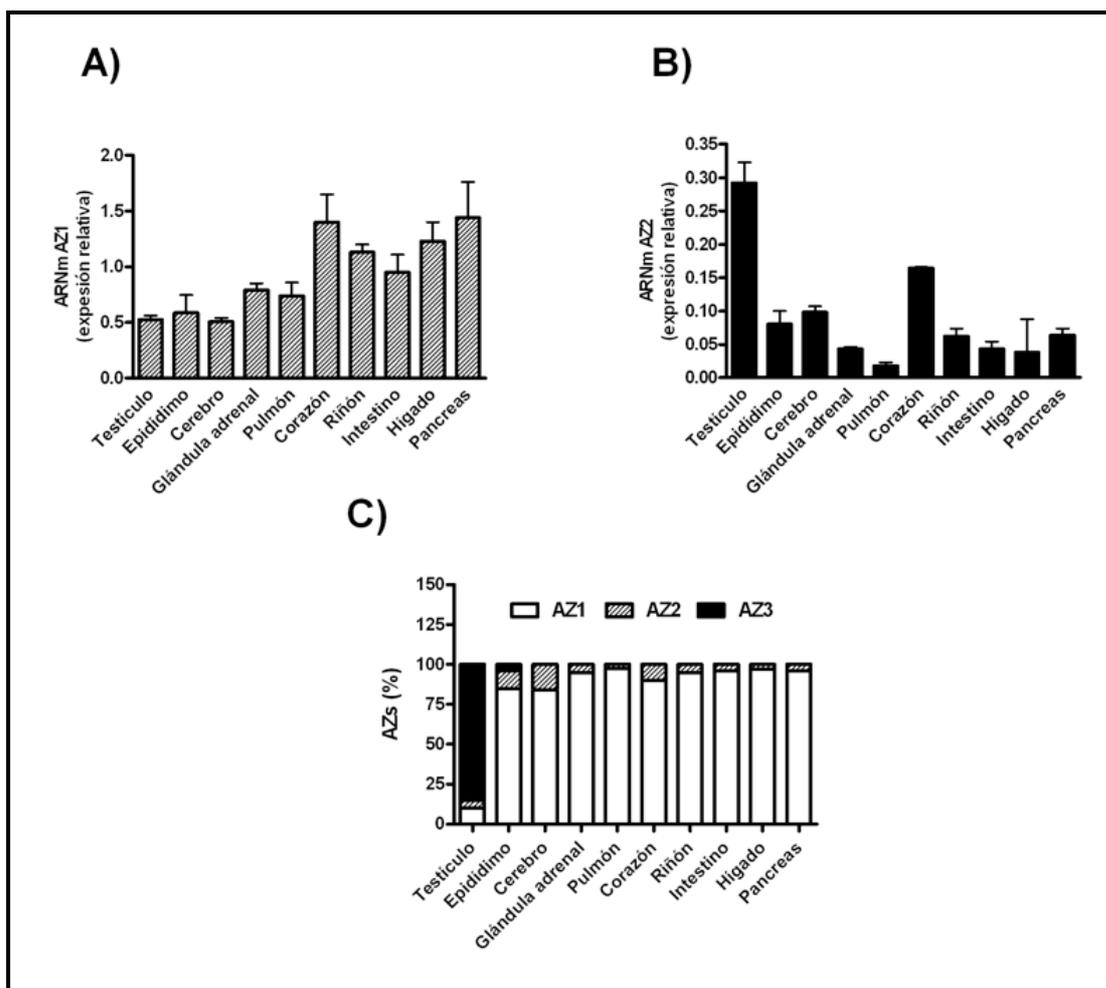


FIGURA 3. Análisis mediante RT-PCR a tiempo real de la expresión de AZ1 (A) y AZ2 (B) en distintos tejidos de ratón adulto. Los valores de ARNm se normalizaron respecto a beta actina. Los resultados son la media \pm SEM de los valores de mensajero de 4-8 animales determinados por triplicado. El valor medio de AZ3 en el testículo fue $4,63 \pm 0,51$ (C) Expresión relativa de los tres tipos de AZ en tejidos de ratón adulto. Se muestra el porcentaje de cada gen respecto a la expresión total.

Ya que la expresión de AZIN2 y AZ3 ha sido casi exclusivamente estudiada en testículos de humano y ratón (Ivanov et al., 2000b; Tosaka et al., 2000; López-Contreras et al., 2006), se analizó la expresión de ambos genes y la de sus correspondientes parálogos también en testículos de rata. Como se observa en la Fig. 4A, la expresión relativa de los parálogos de ODC en testículos de ratón y rata fue similar. El ARNm de AZIN2 fue más abundante que el de AZIN1, aunque en testículo de rata los dos AZINs se expresaron en conjunto mucho más que ODC, al contrario que en ratón. La Fig. 4B muestra que en testículo de rata el ARNm de AZ3 fue de nuevo el más abundante de las tres AZs. Al contrario que en testículo de ratón, los valores de ARNm de AZ2 en testículo de rata fueron mayores que los de AZ1.

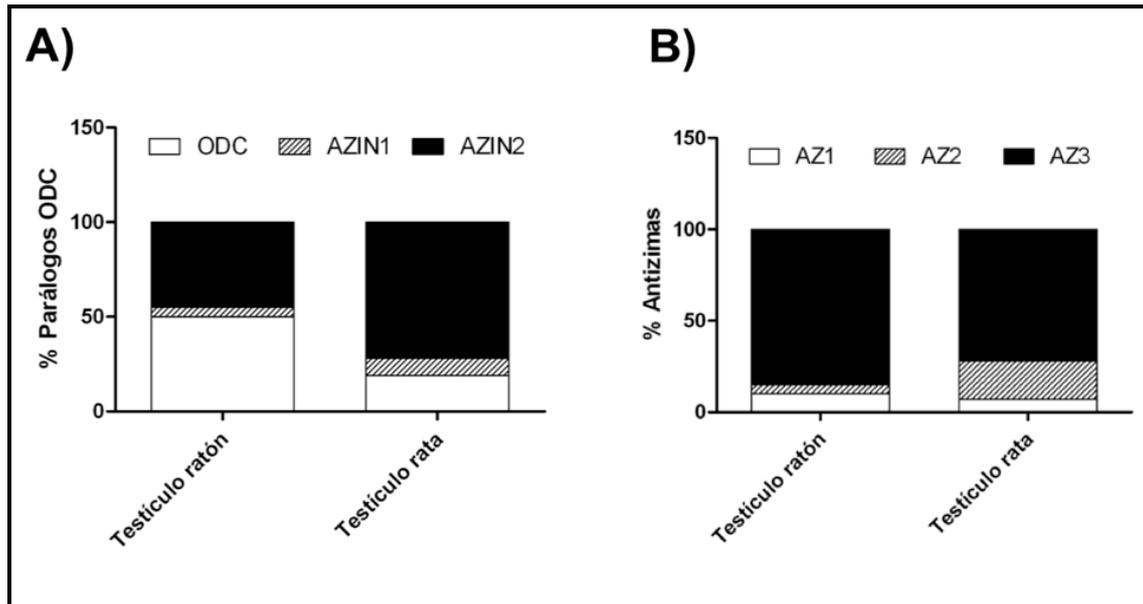


FIGURA 4. Comparación de la expresión de los parálogos de ODC y AZ en testículo de rata y ratón. (A) Porcentaje de expresión de ODC, AZIN1 y AZIN2 sobre el valor total. (B) Porcentaje de expresión de AZ1, AZ2 y AZ3. Los datos fueron media de tres testículos procedentes de ratones de 60 días y ratas de 80 días.

4.2. Estudios de expresión de ODC, AZs y AZINs en diferentes líneas celulares humanas derivadas de tumores.

Mientras que la expresión de ODC en células tumorales ha sido ampliamente estudiada (Shantz & Levin, 2007), los datos sobre la expresión de las AZs y los AZINs son escasos. Por ello, decidimos medir los niveles de ARNm tanto de las AZs como de los AZINs en diferentes líneas celulares tumorales humanas. La Fig. 5A muestra que en todos los tipos de células estudiadas ODC fue con mucha diferencia el parálogo más abundantemente expresado y que los niveles de ARNm de AZIN1 fueron superiores a los de AZIN2. En el caso de las AZs, mientras que no se detectó expresión significativa de AZ3 en ninguna de las líneas celulares tumorales, la expresión relativa de AZ1 y AZ2 fue dependiente del tipo de células examinadas (Fig. 5B). Hay que destacar que AZ2 se expresó predominantemente en células derivadas de neuroblastomas, tales como células Kelly, NB69, U373 o SH-SY5Y, y en las células U973 derivadas de linfoma histiocítico. Sin embargo, AZ1 se expresó mayoritariamente en células derivadas de carcinomas tales como HepG2 (carcinoma hepático), Caco-2 (carcinoma de colon), HeLa (carcinoma de cérvix), Kato III (carcinoma gástrico), HBL (melanoma) o DMS3 (carcinoma pulmonar de células pequeñas).

Estos resultados muestran claramente que la expresión de AZIN2 es muy inferior a la de ODC y AZIN1 en líneas tumorales, sugiriendo que AZIN2 probablemente no tenga un papel relevante en la proliferación celular. Por otro lado, aunque en tejidos

de ratón y en células derivadas de carcinoma el ARNm de AZ1 es el más abundante, AZ2 se expresó mucho más que AZ1 en la mayoría de líneas celulares derivadas de neuroblastomas. En este contexto, la alta expresión de AZ2 ha sido recientemente correlacionada con una mala prognosis en pacientes con neuroblastoma (Geerts et al., 2010).

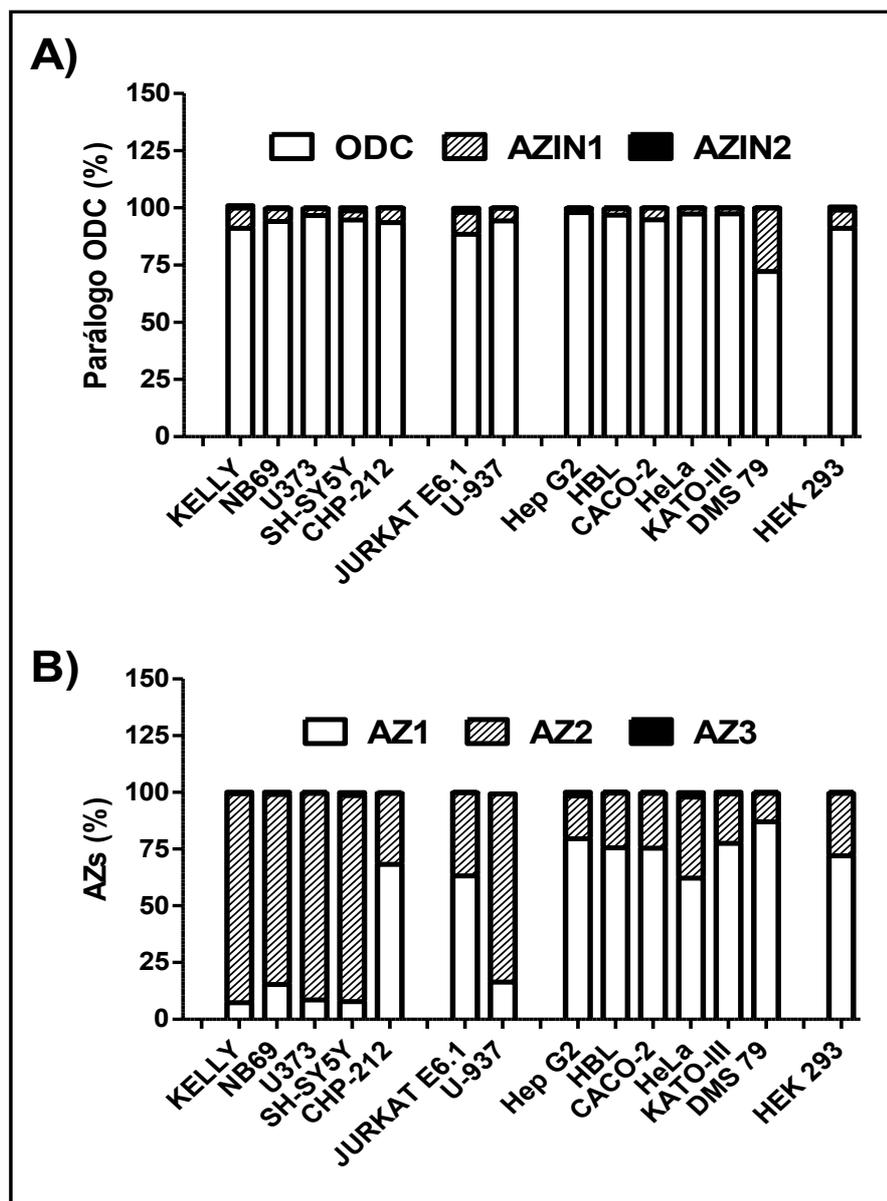


FIGURA 5. Análisis mediante RT-PCR a tiempo real de la expresión de los parálogos de ODC y AZ en células en cultivo derivadas de tumores humanos. La abundancia relativa de ODC, AZIN1 y AZIN2 (A) y de las antizimas (B) fue calculada a partir de los valores absolutos normalizados respecto a beta-actina. Los resultados son datos representativos de uno de dos experimentos independientes. El origen de cada línea celular se describe en el texto. Las células se crecieron hasta alcanzar aproximadamente el 80% de confluencia.

DISCUSIÓN

Aunque los niveles de proteína de ODC y AZ son claramente dependientes de mecanismo de control traduccionales, los niveles de ARNm también tienen una clara influencia sobre la cantidad de proteína sintetizada, y el análisis del ARNm puede dar información importante sobre la distribución tisular de los diferentes parálogos. Por este motivo decidimos realizar un análisis detallado de los niveles de ARNm de estos genes mediante RT-PCR a tiempo real, con el objetivo de conseguir una comparación cuantitativa de la expresión relativa de todos estos genes en tejidos de ratón y en ciertas líneas celulares derivadas de tumores humanos. Nuestros resultados indican claramente que el ARNm de ODC es mucho más abundante que el de sus correspondientes parálogos en la mayoría de tejidos y líneas celulares analizadas. Esto está de acuerdo con estudios en fibroblastos o glándulas mamarias de ratón, que mostraron que los niveles de ARNm de AZIN1 eran siempre menores que los de ODC (Nilsson et al., 2000; Murakami et al., 2010). En relación a AZIN2, la única excepción se encontró en testículo, donde los niveles de ARNm de AZIN2 fueron comparables a los de ODC. Estudios previos habían demostrado que AZIN2 se expresa principalmente en las células haploides testiculares, lo que sugiere que este gen podría estar implicado en la espermatogénesis (López-Contreras et al., 2009a). Por otro lado, y de acuerdo con estudios anteriores (Pitkanen et al., 2001; López-Contreras et al., 2006), el transcrito de AZIN2 también se encontró en el cerebro, pero sus niveles fueron unas 2 veces menores que los de ODC. Recientemente, se ha descrito que en cerebro humano, la proteína AZIN2 está presente en los axones de neuronas de la materia gris y blanca, y en el soma de neuronas piramidales corticales (Mäkitie et al., 2009b). Además, en el mismo trabajo, se determinó la acumulación de AZIN2 en cerebros afectados con la enfermedad de Alzheimer. Aunque se ha postulado que AZIN2 podría participar en la regulación del tráfico vesicular a nivel intracelular (Kanerva et al., 2010), el papel fisiológico de AZIN2 en el sistema nervioso central está lejos de ser completamente comprendido. Nuestros resultados también mostraron que los niveles de ARNm de AZIN2 en epidídimo, páncreas y glándula adrenal eran similares a los encontrados en cerebro, junto con el hecho de que en otros tejidos el mensajero de AZIN2 era también detectable, lo que indica que AZIN2 se expresa más ampliamente de lo que en un primer momento se había postulado. Además, la comparación con la expresión de AZIN1 muestra que AZIN2 está presente en los mismos tejidos que AZIN1, aunque la relación entre las cantidades de los dos mensajeros depende del tipo de tejido analizado. La mayor relación AZIN2:AZIN1 se encontró en testículo, mientras que la menor en riñón e hígado. Actualmente no se conoce si en un tejido dado AZIN1 y AZIN2 se expresan simultáneamente en el mismo tipo de células. Los hallazgos recientes que

mostraron que AZIN2 se expresa en mastocitos humanos, específicamente en gránulos almacenadores de serotonina (Kanerva et al., 2009), junto con la presencia de AZIN2 en las células haploides testiculares (López-Contreras et al., 2009a) y en grupos específicos de neuronas (Mäkitie et al., 2009b), apoyaría la hipótesis de que AZIN2 se expresa en células diferenciadas específicas. Sin embargo, esta posibilidad no excluye la co-expresión con AZIN1. De hecho, en ensayos funcionales en células HEK 293T transfectadas con AZIN1 y AZIN2, ambas proteínas exhibieron efectos similares sobre la actividad ODC y el transporte de poliaminas (López-Contreras et al., 2006; López-Contreras et al., 2008), siendo capaces de interactuar con las tres AZs (Mangold & Leberer, 2005; López-Contreras et al., 2006).

Un aspecto importante de los AZINs es su posible papel en los procesos de proliferación celular y tumorigénesis. En relación a AZIN1, se ha demostrado que la sobreexpresión de este gen activa la proliferación y la transformación celular (Keren-Paz et al., 2006). Además, el ARNm de AZIN1 se encuentra elevado en tumores gástricos en comparación con tejido normal adyacente (Jung et al., 2000), y el silenciamiento de la expresión de AZIN1 reduce la proliferación de células de carcinoma pulmonar (Choi et al., 2005). Por otro lado, fibroblastos de ratón establemente transfectados con AZIN2 también mostraron mayor crecimiento celular, pero a menor nivel que con AZIN1 (Snapir et al., 2008). En este capítulo nosotros demostramos que en líneas celulares humanas derivadas de tumores los niveles de ARNm de AZIN1 fueron mucho mayores que los de AZIN2, lo que sugiere que es improbable que AZIN2 pueda tener un papel importante en la proliferación de células tumorales.

De las tres AZs existentes en mamíferos, AZ1 y AZ2 tienen una amplia distribución tisular, mientras que AZ3 es específica de testículo (Ivanov et al., 2000b; Tosaka et al., 2000). Las estimaciones semicuantitativas iniciales de la abundancia del ARNm en distintos tejidos humanos indicaron que el ARNm de AZ1 es unas 16 veces más abundante que el de AZ2 (Shantz & Levin, 2007). Los resultados mostrados en este capítulo indican que aunque en tejidos de ratón el ARNm de AZ1 es mucho más abundante que el de AZ2, la proporción entre los mismos depende el tipo de tejido, variando desde una proporción de 2 en el testículo a 41 en el pulmón. Es interesante destacar que AZ2 se expresa mucho más que AZ1 en la mayoría de líneas celulares derivadas de neuroblastomas, mientras que se encontró lo contrario en el caso de células derivadas de carcinomas. En este contexto, se ha correlacionado una alta expresión de AZ2 con un aumento de la supervivencia en pacientes con neuroblastoma (Geerts et al., 2010). Aunque ambas AZs parecen compartir un papel en la regulación de la actividad ODC y el transporte de poliaminas, no se pueden descartar diferencias relacionadas con sus funciones fisiológicas. De hecho, ambas AZs exhiben diferente

localización subcelular (Murai et al., 2009) y, como se muestra aquí, tienen un patrón de expresión distinto. Nuestros resultados también corroboran que AZ3 es la isoforma expresada mayoritariamente en el testículo. Aunque el papel exacto de AZ3 en la fisiología testicular no ha sido exactamente definido, los ratones deficientes en AZ3 presentan espermatozoides anormales y son infértiles (Tokuhiro et al., 2009). La alta expresión de AZ3 y AZIN2 en el mismo tipo de células testiculares, y el paralelismo existente entre ambos genes en el testículo a lo largo de la ontogenia postnatal (Lopez-Contreras et al., 2009a), sugiere que son compañeros específicos que pueden ser requeridos para el control de los niveles de poliaminas durante la segunda mitad del proceso de espermatogénesis. El hallazgo de que los patrones de expresión de AZs y AZINs en testículo de rata y ratón son similares, y que en ambos casos AZ3 y AZIN2 se expresan principalmente en este tejido, refuerza la idea de que estas proteínas podrían tener un papel relevante en la reproducción masculina.

En general, nuestros resultados han revelado que, con excepción de AZ3, todos los AZs y AZINs se expresan en todos los tejidos estudiados, aunque la expresión de cada gen depende del tipo de tejido. La posible relevancia de un patrón de expresión particular de estos genes en la fisiología celular queda por esclarecer.

- Capítulo 2 -

Expresión de AZIN2 en testículo de ratón: factores reguladores

Es bien conocido que en la mayoría de células las poliaminas participan en los procesos de crecimiento, proliferación y diferenciación. Si bien en el testículo se producen todos estos procesos, se desconoce la función exacta de las poliaminas en este tejido. Distintos estudios sugieren que en el testículo el control de los niveles de poliaminas es fundamental para el proceso de espermatogénesis. Así, ratones transgénicos con sobreexpresión de actividad ODC testicular y elevados niveles de putrescina son infértiles, habiéndose demostrado que el exceso de putrescina causaba la inhibición de la síntesis de ADN durante la meiosis y, por lo tanto, interrumpía la generación de células germinales haploides (Hakovirta et al., 1993), lo que estaba de acuerdo con otros estudios previos que habían mostrado que la actividad ODC disminuye tras la división meiótica de las células germinales (Shubhada et al., 1989). Dado que en la mayoría de células la actividad ODC se encuentra altamente regulada a nivel post-traducciona por las antizimas y que AZ3 se expresa específicamente en las células haploides germinales, se sugirió que esta nueva proteína descubierta en el testículo podría tener un papel importante en la inhibición de ODC tras la meiosis (Ivanov et al., 2000b; Tosaka et al., 2000). De hecho, el patrón de expresión temporal y espacial del ARNm de AZ3 sugería que este gen podría participar en la diferenciación de las espermátidas haploides en espermatozoides maduros, proceso conocido como espermiogénesis (Coffino, 2001a). Asimismo, la generación y posterior análisis de ratones *knock-out* para AZ3 corroboraron la importancia de AZ3 en la formación de espermatozoides normales, ya que la unión de la cabeza con la cola en los espermatozoides de dichos ratones presentaba ciertas alteraciones, siendo estos animales infértiles (Tokuhiro et al., 2009). Sorprendentemente, la carencia de AZ3 no estaba asociada con ninguna alteración de los niveles de poliaminas testiculares, postulándose que AZ3 pudiera participar en el proceso de espermiogénesis de manera independiente de los niveles de poliaminas.

Sin embargo, los estudios de hibridación *in situ* sobre la localización del ARNm de AZIN2 en las espermátidas haploides, así como el perfil temporal de expresión de dicho gen en el testículo de ratón vinieron a sugerir que AZIN2 pudiera estar también implicado en el proceso de espermiogénesis (López-Contreras et al., 2009a). La coexpresión de AZIN2 y AZ3, proteínas teóricamente antagónicas, en las células haploides testiculares de ratón, parecía indicar la existencia de un mecanismo complejo del control de los niveles de poliaminas en dichas células. Este complejo escenario se

vio posteriormente complicado por los estudios inmunohistoquímicos llevados a cabo con secciones histológicas de testículos humanos utilizando anticuerpos generados frente a AZIN2, que detectaron una fuerte señal en el tejido intersticial entre los túbulos seminíferos, formado principalmente por células de Leydig, pero no en las células germinales (Mäkitie et al., 2009c). Ante esta manifiesta discrepancia de localización de AZIN2 entre el hombre y el ratón, se creyó conveniente estudiar la expresión de AZIN2 en el testículo de otra especie, la rata, y profundizar en el proceso de localización celular de AZIN2 en testículo de ratón utilizando aproximaciones farmacológicas que afectan a las células germinales. También se iniciaron otros estudios encaminados a profundizar en aspectos reguladores de la expresión de AZIN2 en testículo.

5.1. Ontogenia de la expresión de AZIN2 en testículo de rata.

El ARN extraído de testículos de ratas de diferentes edades fue analizado mediante RT-PCR a tiempo real utilizando cebadores específicos de los genes de rata estudiados. La Fig. 1 muestra la variación de AZIN2 y AZ3 durante el periodo postnatal. Se puede observar que durante las cuatro primeras semanas tras el nacimiento la expresión de AZIN2 y AZ3 fue despreciable, pero que entre la quinta y séptima semanas se produjo un aumento progresivo de la expresión de ambos genes. Es de destacar el comportamiento similar de la expresión de ambos genes, lo que sugiere que pudieran estar expresándose simultáneamente en el mismo tipo de células. Este perfil de expresión es similar al observado en ratón (Fig. 2), aunque en el caso de la rata existe un retraso en la expresión de ambos genes en comparación con el ratón, lo que pudiera estar relacionado con la mayor duración del primer ciclo espermatogénico en el testículo de la rata. Por otra parte el perfil de expresión de ambos genes, fue similar al de protamina 2 (Fig. 3), proteína que participa en la compactación del ADN durante el proceso de espermiogénesis, y que se expresa de manera específica en las células germinales haploides (O'Shaughnessy et al., 2008).

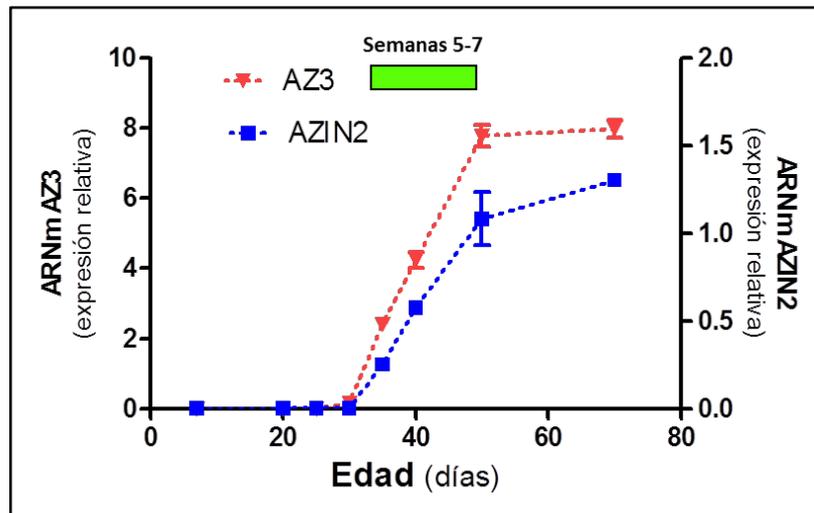


FIGURA 1. Patrón temporal de la expresión de AZIN2 y AZ3 en testículo de rata. El ARN extraído se analizó mediante RT-PCR cuantitativa utilizando parejas de cebadores específicas de AZIN2 y AZ3 de rata. Los resultados son la media±SEM de 2-4 animales por cada grupo de edad.

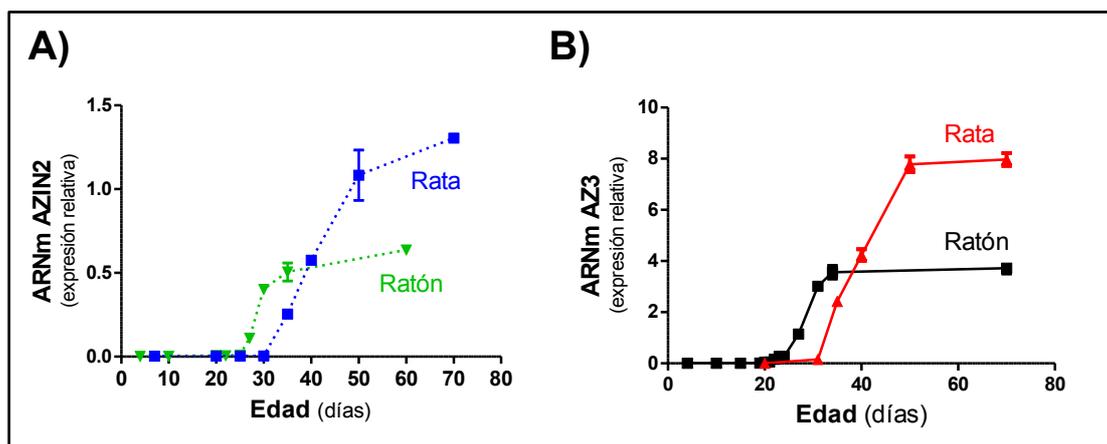


FIGURA 2. Comparación del patrón de expresión temporal de AZIN2 (A) y AZ3 (B) en testículos de rata y ratón. El ARN extraído se analizó mediante RT-PCR cuantitativa utilizando parejas de cebadores específicas de AZIN2 y AZ3 de ratón y rata. Los resultados son la media±SEM de 2-4 animales por cada grupo de edad.

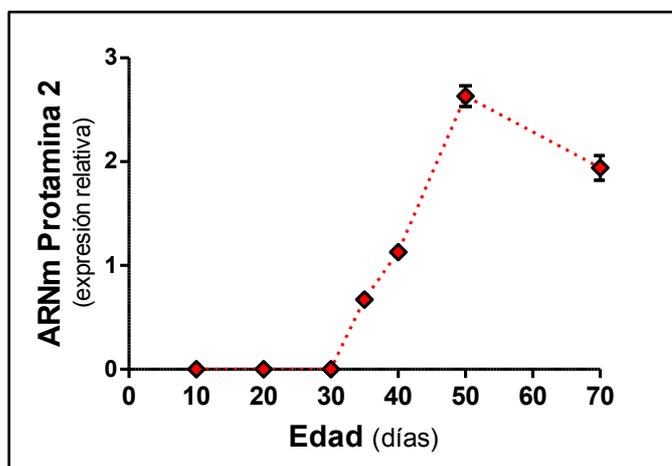


FIGURA 3. Patrón de expresión de protamina 2 en testículo de rata. El ARN extraído se analizó mediante RT-PCR cuantitativa utilizando parejas de cebadores específicos de protamina 2 de rata. Los resultados son la media±SEM de 2-4 animales por cada grupo de edad (los mismos animales utilizados en la figura 1).

5.2. Análisis de la expresión génica de AZIN2 en testículo de ratón tras la destrucción de células germinales mediante tratamiento crónico con ciclofosfamida.

La ciclofosfamida es un fármaco utilizado en ciertos tratamientos antineoplásicos y como agente inmunosupresor (Dollery, 1999) que puede ejercer efectos nocivos sobre células de división rápida como las germinales. Se ha descrito su toxicidad en el testículo murino, en el que se produce una destrucción de las células germinales y la consecuente infertilidad del animal (Elangovan et al., 2006). Para determinar la influencia del tratamiento con ciclofosfamida sobre genes de expresión testicular se utilizaron tanto ratones adultos como prepúberes en los que se comenzó el tratamiento a los 20 días de edad. La ciclofosfamida se disolvió en disolución de NaCl al 0.1%, y se inyectó en dosis de 200 mg/kg por vía intraperitoneal (ip) una vez por semana durante un total de 5 semanas. Los animales fueron sacrificados tras 1, 5 u 8 semanas de la última inyección de ciclofosfamida.

El análisis de la expresión de AZIN2 y otros genes en testículos de animales adultos tratados con ciclofosfamida se muestra en la Fig. 4. Se pudo comprobar que 1 semana después del tratamiento con ciclofosfamida, tanto los niveles de ARN mensajero de ODC, AZIN2, AZ3, y Prm2, como los pesos del testículo habían disminuido significativamente, especialmente en el caso de AZIN2, AZ3 y Prm2. A las 5 semanas después del tratamiento se apreció una recuperación parcial de algunos de estos parámetros, especialmente del ARNm de ODC mientras que en los otros mensajeros y en el peso testicular la recuperación no superaba el 50%. Sin embargo, a las 8 semanas del tratamiento la recuperación de los niveles de ARNm de los genes anteriores fue prácticamente total (Fig. 4A y 4B), aunque el peso testicular no recobró los valores previos al tratamiento (Fig. 4D). Estos resultados que muestran un comportamiento similar de AZIN2 con relación a los otros dos genes (AZ3 y Prm2) de expresión específica en células haploides testiculares, apoyan el concepto de que AZIN2 se expresa también mayoritariamente en este tipo de células, y que por tanto la destrucción de las mismas tras cinco semanas de tratamiento con ciclofosfamida está asociada a la drástica caída de los niveles de ARNm de estos genes. La recuperación de la expresión de estos genes parece estar asociada al reinicio del proceso espermatogénico. La Fig. 4C muestra la variación de los niveles de los ARNm de tres proteínas esteroideogénicas (Cyp17A1, la citocromo P450 hidroxilasa que participa en la conversión de pregnenolona y progesterona en dehidroepiandrosterona; Cyp11A1, citocromo P450scc que transforma el colesterol en pregnenolona; y Star que codifica la proteína reguladora de la esteroideogénesis aguda, StAR) que se expresan en las células de Leydig, responsables de la síntesis de testosterona por el testículo. Se puede

comprobar que el tratamiento no disminuyó en absoluto los niveles de los ARNm de estos genes esteroidogénicos. Este resultado, que sugiere que el tratamiento no parece destruir las células de Leydig, asociado a la drástica caída de AZIN2 no apoya una localización exclusiva de AZIN2 en las células de Leydig, como se ha postulado en humanos (Mäkitie et al., 2009c).

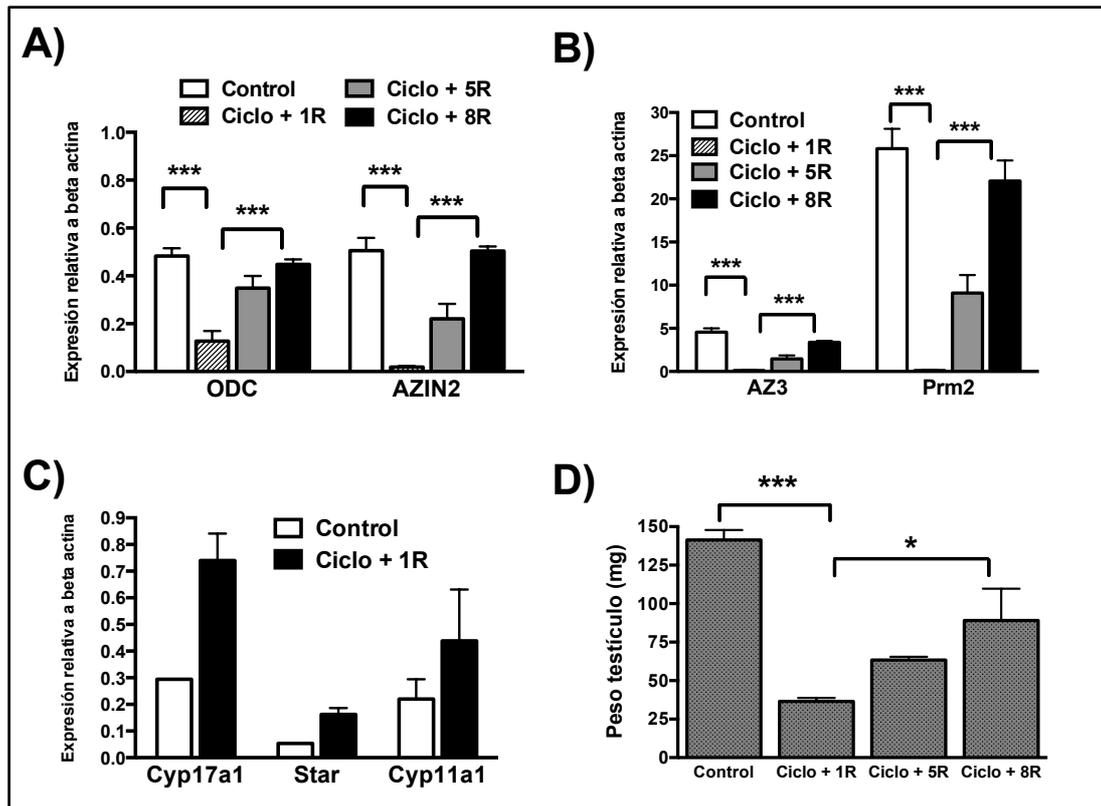


FIGURA 4. Efecto de la administración de ciclofosfamida sobre los niveles de ARN mensajero de (A) ODC, AZIN2, (B) AZ3, Prm2 y (C) genes relacionados con la ruta esteroidogénica, en testículos procedente de animales adultos. Los animales se sacrificaron tras una semana (1R), cinco semanas (5R) u ocho semanas (8R) después de la última dosis de ciclofosfamida (200 mg/kg, ip). El análisis de la expresión génica se realizó mediante RT-PCR a tiempo real. Los valores de ARNm mostrados representan la media \pm SEM de 3-4 animales por grupo y se normalizaron respecto a beta actina. (D) Comparación del peso de los testículos (mg) de los animales controles, de los tratados con ciclofosfamida más una semana de recuperación (1R), de los tratados más 5 semanas de recuperación y de los tratados más 8 semanas de recuperación. Significación estadística: (*) $P < 0.05$; (***) $P < 0.001$.

Es bien conocido que en ratón el proceso de espermatogénesis comienza a los pocos días del nacimiento teniendo lugar el proceso de formación y diferenciación de las espermátidas entre los días 20-40, periodo en el que en el testículo del ratón comienza la expresión de AZIN2 y AZ3. Con el fin de dilucidar si el tratamiento con ciclofosfamida, retrasa el proceso de espermatogénesis y por consiguiente la expresión de AZIN2, se trataron ratones prepuberales con ciclofosfamida, siguiendo el mismo esquema que en ratones adultos, pero comenzando el tratamiento a los 20 días de edad. La Fig. 5D

muestra el retraso en el desarrollo del peso testicular producido por el tratamiento, en relación con los ratones control de la misma edad. De igual forma, las Fig. 5A y 5B claramente indican un bloqueo prácticamente absoluto de la expresión tanto de AZIN2, AZ3 y Prm2, y una considerable disminución en los valores de ODC. Sin embargo, a las 5 semanas de finalizar el tratamiento, el peso testicular se acercó al de los correspondientes controles y la expresión de los genes mencionados anteriormente, alcanzó niveles similares al de los animales no tratados. Estos resultados indican que el tratamiento con ciclofosfamida en los ratones prepúberes impide la progresión de la primera onda de espermatogénesis, pero que el efecto no es irreversible, ya que a los 35 días del fin del tratamiento, el nivel de expresión de genes característicos de las células haploides alcanzó valores normales, lo que estaría de acuerdo con un restablecimiento de la espermatogénesis. El hecho de que este tratamiento no afectara los niveles de las enzimas esteroidogénicas que se expresan mayoritariamente en las células de Leydig (Fig. 5C), pero sí los de AZIN2, de nuevo refuerza la idea de que AZIN2, en testículo de ratón, se expresa mayoritariamente en las células haploides.

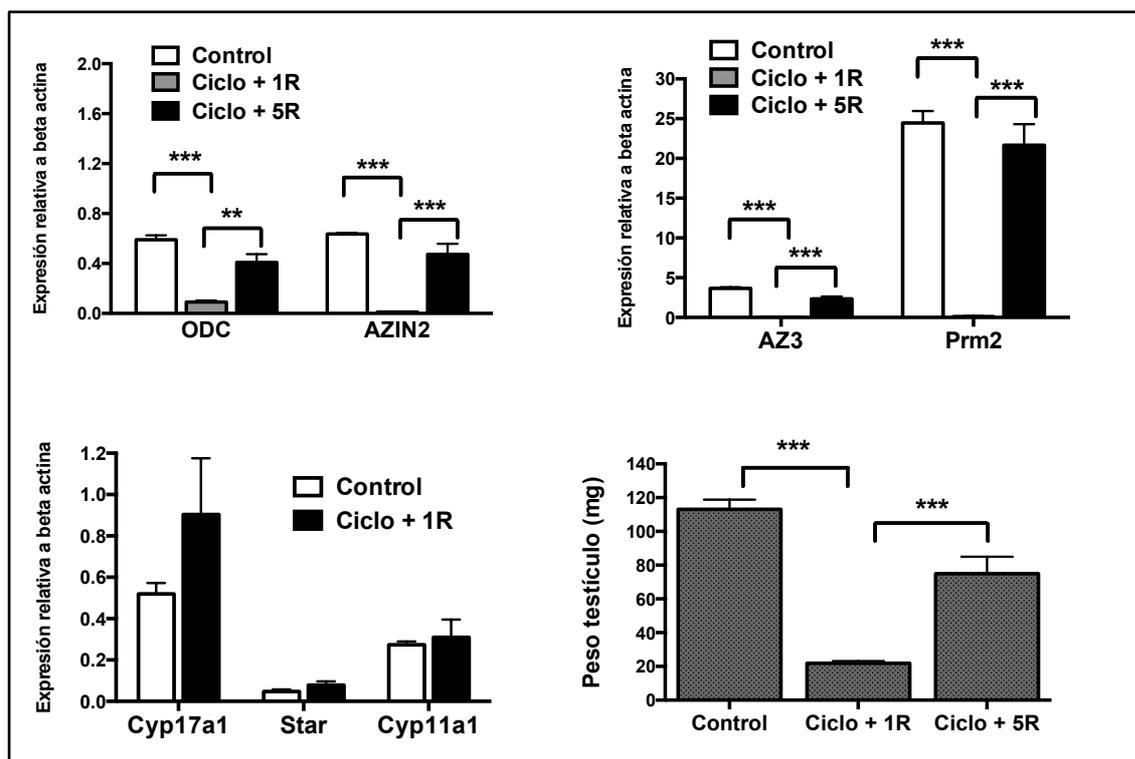


FIGURA 5. Efecto de la administración de ciclofosfamida a ratones prepúberes sobre los niveles testiculares de ARN mensajeros de (A) ODC, AZIN2, (B) AZ3, Prm2 y (C) genes relacionados con la ruta esteroidogénica. La primera inyección de ciclofosfamida (200 mg/kg, ip) se administró a los 20 días de edad, y fue seguida de cuatro inyecciones, una cada semana. Los animales se sacrificaron a la semana (1R) o a las 5 semanas (5R) de la última dosis de ciclofosfamida. El análisis de la expresión génica se realizó mediante RT-PCR a tiempo real. Los valores de ARNm son la media±SEM de 3-4 animales por grupo y se normalizaron respecto a beta actina. (D) Comparación del peso de los testículos de los animales controles con los tratados con ciclofosfamida más una semana de recuperación (1R) y de los tratados más 5 semanas de recuperación (5R). Significación estadística: (*) P < 0.05; (**) P < 0.01; (***) P < 0.001.

Por último, para reforzar la idea de que AZIN2 se encuentra localizado mayoritariamente en células germinales haploides, se analizaron testículos procedentes de ratones modificados genéticamente en los genes para las quinasas ATM y ATR, enzimas esenciales para la respuesta celular al daño en el ADN, y cuya ausencia causa infertilidad. Mientras que la esterilidad de los machos $ATM^{-/-}$ se debe a que la ausencia de ATM afecta negativamente el proceso meiótico y, por tanto, al desarrollo de las células germinales haploides (Takubo et al., 2006), en el caso los ratones ATR-Seckel (donde la expresión de la proteína ATR se reduce al 5%) la incapacidad reproductora es manifiesta, si bien se puede llevar a cabo la fecundación *in vitro* con espermatozoides de los ratones afectados (Murga et al., 2009). Como se puede observar en la Fig. 6A, los niveles de mensajeros de AZIN2 y AZ3 fueron prácticamente indetectables en los testículos procedentes de ratones $ATM^{-/-}$. El ARNm de ODC también sufrió un descenso notable, aunque no tan marcado como el de los genes anteriores. El análisis de algunos genes de la ruta esteroidogénica testicular no detectó ningún descenso en sus niveles de expresión (Fig. 6B), lo que sugiere la permanencia de células de Leydig en el testículo de estos ratones. En ratones Seckel, la expresión de AZIN2, ODC, AZ3 y Prm2 en testículo fue similar a la de los controles (Fig. 7A), lo que estaría de acuerdo con la formación de células haploides y la posibilidad de fecundación *in vitro*. Es de destacar la disminución en los testículos de estos ratones de los niveles de los ARNm de Cyp17a1 y Cyp11a1 (Fig. 7B), lo que pudiera afectar los niveles de testosterona.

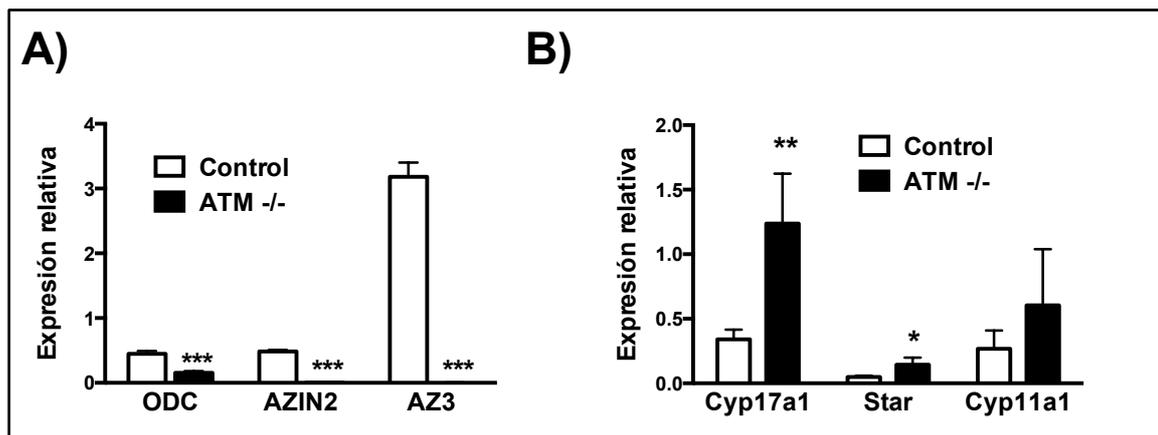


FIGURA 6. Comparación de los niveles de ARNm de (A) ODC, AZIN2 y AZ3 (B) enzimas esteroidogénicas en testículos de ratones wild type y $ATM^{-/-}$. Se analizaron los testículos procedentes de 8 animales controles ("wild type") y de 6 animales $ATM^{-/-}$. El análisis de la expresión génica se realizó mediante RT-PCR a tiempo real. Los valores de mensajero fueron la media \pm SEM y se normalizaron respecto a beta actina. Significación estadística: (*) $P < 0.05$ vs control; (**) $P < 0.01$ vs control; (***) $P < 0.001$ vs control.

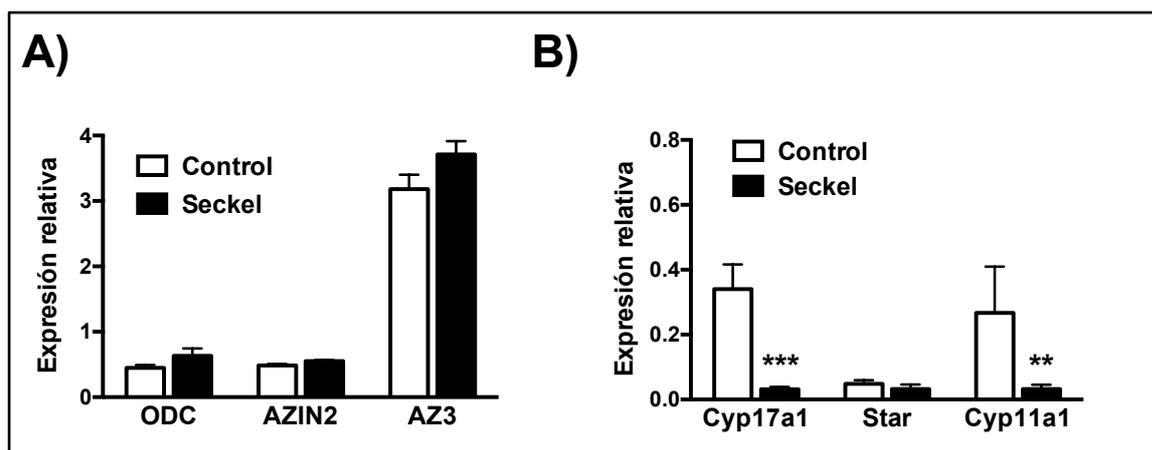


FIGURA 7. Comparación de los niveles de ARNm de (A) ODC, AZIN2, AZ3 y (B) enzimas esteroidogénicas en testículos de ratones wild type y Seckel. Se analizaron los testículos procedentes de 8 animales controles (“wild type”) y de 5 Seckel. El análisis de la expresión génica se realizó mediante RT-PCR a tiempo real. Los valores de mensajero fueron la media±SEM y se normalizaron respecto a beta actina. Significación estadística: (**) $P < 0.01$ vs control; (***) $P < 0.001$ vs control.

5.3. Influencia de hormonas sobre la expresión de AZIN2 en testículo de ratón.

Es sabido que la espermatogénesis está regulada por determinadas hormonas, aunque el mecanismo por el cual se lleva a cabo este control no se conoce de manera completa. Teniendo en cuenta los resultados anteriores sobre la localización de AZIN2 en células haploides, se decidió estudiar el posible efecto de las gonadotropinas y testosterona sobre los niveles de AZIN2 en testículo. Para ello se utilizaron dos aproximaciones experimentales. La primera consistió en utilizar el tratamiento crónico de los ratones con una dieta deficiente en potasio, que estudios previos llevados a cabo en nuestro laboratorio habían mostrado producir una marcada reducción de los niveles circulantes de la hormona luteinizante (LH) asociada a una considerable disminución de testosterona (Sánchez-Capelo et al., 1996). La segunda, el tratamiento con flutamida, fármaco antiandrogénico, para determinar la influencia de testosterona en la expresión de AZIN2.

En el primer caso, se trataron tanto ratones macho prepúberes de 23 días con una dieta deficiente en potasio durante 11 días, como animales adultos con dieta deficiente en potasio durante 30 días. Tras el sacrificio de los animales se extrajeron los testículos para el posterior análisis de expresión génica de AZIN2 mediante RT-PCR a tiempo real.

En el caso de los animales prepúberes, el tratamiento con la dieta deficiente en potasio durante el periodo en el que se produce un gran aumento de la expresión de AZIN2 testicular, mostró marcados efectos sobre el desarrollo corporal. Mientras que en el grupo control se produjo un aumento del peso corporal desde los 11.6 ± 1.3 g hasta los 26.9 ± 1.2 g, duplicando ampliamente el peso inicial, en los alimentados con la dieta

deficiente en potasio se produjo una drástica inhibición del crecimiento de los ratones, con una evolución desde los 12.2 ± 1.6 g hasta los 14.6 ± 2.2 g. Esta paralización del crecimiento corporal se vio también reflejada en el crecimiento de testículos y ausencia de desarrollo de las vesículas seminales (resultados no mostrados).

En la Fig. 8A se muestra el análisis de los niveles de ARNm de AZIN2, AZ3 y ODC en testículos de animales prepúberes controles y tratados con la dieta deficiente en potasio. Se observaron diferencias importantes en los niveles de mensajero entre los animales controles y tratados, encontrándose niveles de AZIN2 prácticamente indetectables en los tratados, así como niveles también muy bajos de ARNm de AZ3 y Prm2. Por lo tanto, el descenso de las gonadotropinas causado por la dieta deficiente en potasio parece retrasar de manera importante la expresión de genes específicos de testículo, como AZ3, AZIN2 y Prm2, y este efecto podría tener su origen en una espermatogénesis anormal que tuviera como consecuencia una caída drástica de células germinales haploides. Por otra parte, los niveles de ARNm de ODC no sufrieron apenas variación con este tratamiento. En la Fig. 8B se muestra el análisis mediante RT-PCR a tiempo real de los niveles de mensajero de AZIN2 y AZ3 en testículos de animales adultos controles y tratados con dieta deficiente en potasio. De nuevo se apreciaron diferencias importantes tanto en el peso testicular y de las vesículas seminales como en la expresión de AZ3 y AZIN2 debido a la hipokalemia prolongada. Estos cambios en la expresión génica en el testículo de los ratones adultos deficientes en potasio, fueron reversibles ya que los niveles de los ARNm de AZIN2 y AZ3 se recuperaron parcialmente, al administrar KCl 1% en el agua de bebida durante los 10 días previos a la finalización del tratamiento con el pienso deficiente en potasio.

Comoquiera que la hipokalemia produce la disminución tanto de LH como de testosterona (Sánchez-Capelo et al., 1996), para intentar determinar el papel de cada una de estas hormonas en la expresión de AZIN2 testicular se realizó también un tratamiento con flutamida (2-metil-N-(4-nitro-3-[trifluorometil]fenil)propanamida), fármaco anti-androgénico que se utiliza como tratamiento del cáncer de próstata (Neri et al., 1979; Trump et al., 2001). La flutamida actúa bloqueando los receptores androgénicos y, por tanto, la acción de la testosterona en distintos tejidos. En el testículo del ratón se ha descrito que la flutamida altera la espermatogénesis, y como consecuencia de ello se producen espermatozoides anormales (Anahara et al., 2008). Para comprobar si estos efectos descritos sobre la espermatogénesis pudieran afectar los niveles de ARNm de AZIN2 y otros genes que se expresan en las células germinales se aisló el ARNm de testículos de ratones adultos tratados durante un mes con flutamida (dosis diaria de 80 mg/kg vía subcutánea), tiempo suficiente para afectar al ciclo espermatogénico murino de aproximadamente 40 días de duración.

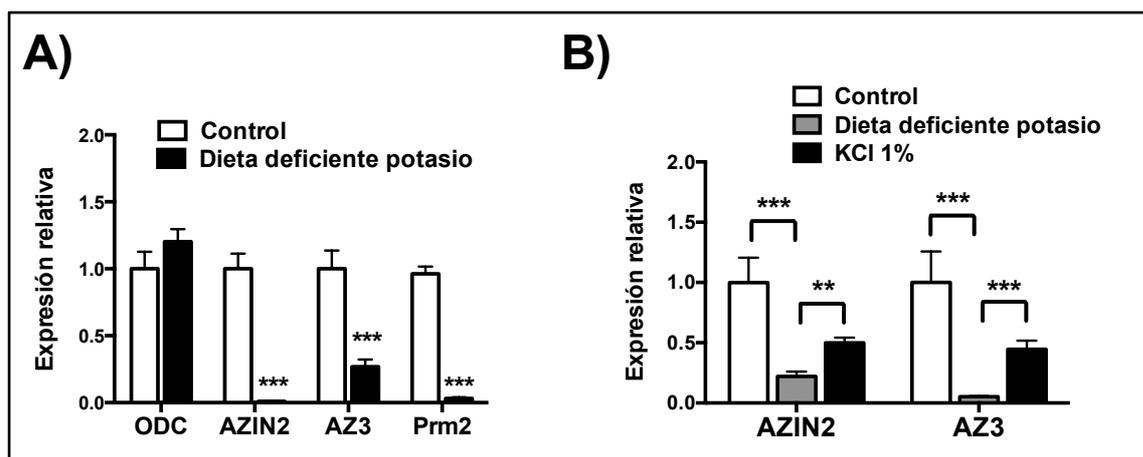


FIGURA 8. Efecto de la dieta deficiente en potasio sobre la expresión de AZIN2 y otros genes relacionados en testículo de ratones prepúberes.(A) Expresión de ODC, AZIN1, AZ3 y Prm2 en testículos de animales de 23 días tratados con dieta deficiente en potasio o normal (controles) durante 11 días. (B) Expresión de AZIN2 y AZ3 en testículos de animales adultos (3-4 meses) tratados con dieta normal (control) o deficiente en potasio durante 30 días. En algunos casos, se adicionó KCl 1% en el agua de bebida 10 días antes del fin del tratamiento. En ambos casos tras el tratamiento se aisló el ARNm de los testículos, se sintetizó el ADNc y se analizó cada muestra mediante RT-PCR a tiempo real. Los valores mostrados en las figuras se obtuvieron tras la normalización con β -actina y representan la media \pm SEM de 3 animales por grupo. Las figuras muestran los valores representados como porcentaje respecto al valor control tomado como 1. Los valores absolutos normalizados frente a β -actina de las muestras controles del experimento A fueron 0.61 ± 0.08 , 0.39 ± 0.04 , 3.91 ± 0.53 y 47.57 ± 2.67 para ODC, AZIN2, AZ3 y Prm2, respectivamente, mientras que los del experimento B fueron 0.41 ± 0.05 y 6.49 ± 1.67 para AZIN2 y AZ3, respectivamente. Significación estadística: (***) $P < 0.001$; (**) $P < 0.01$.

Como se observa en la Fig. 9A, los niveles de ARN mensajeros de los genes ODC, AZIN2, AZ3 y Prm2 no variaron tras el tratamiento con flutamida, indicativo en principio de que la cantidad de células germinales permanece inalterada. Para determinar si el tratamiento con flutamida había producido algún efecto a nivel testicular, se midieron ciertos genes implicados en la ruta esteroidogénica testicular tales como Cyp11a1, Cyp17a1, y Star. La Fig. 9B muestra que el tratamiento produjo un aumento de los genes de la ruta esteroidogénica, lo que podría ser indicativo de un incremento en la liberación de LH y FSH debido al menor efecto de la retro inhibición de testosterona a nivel hipofisario por el bloqueo de los receptores de testosterona provocado por el tratamiento con flutamida. Para determinar si se produjo el bloqueo de los receptores de testosterona a nivel renal como consecuencia de la administración de la flutamida, se midió la actividad ODC en el riñón de los animales controles y tratados, ya que estudios previos habían mostrado que en ratones machos la elevada actividad ODC renal es altamente dependiente la acción de testosterona (Sánchez-Capelo et al., 1994). Como se observa en la Fig. 9C, la actividad ODC disminuyó drásticamente en los riñones de los animales tratados con flutamida. Sin embargo, el mismo tratamiento produjo un marcado aumento de la actividad ODC testicular. Dicho aumento podría deberse a un efecto producido por el aumento de gonadotropinas sobre ODC, a nivel post-

transcripcional, ya que como se mostraba en la Fig. 9A los niveles de ARNm de ODC no resultaron afectados por el tratamiento.

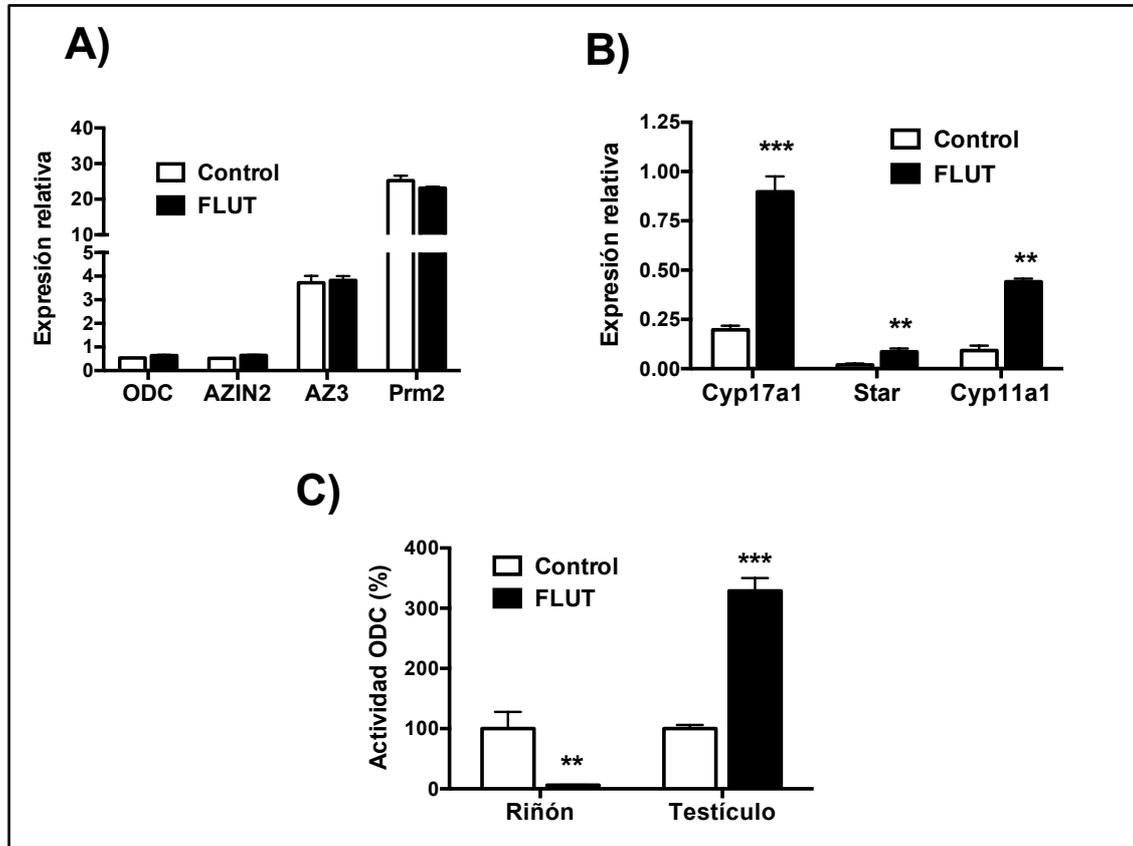


FIGURA 9. Efecto de la administración de flutamida (FLUT) sobre los niveles de ARNm de ODC, AZIN2, AZ3 y Prm2 (A) y de genes relacionados con la ruta esteroidogénica (B) en testículo de ratones adultos. Los ratones adultos fueron tratados durante 30 días con flutamida (dosis diaria de 80 mg/kg vía subcutánea). El análisis de la expresión génica se realizó mediante RT-PCR a tiempo real. Los valores se normalizaron frente a beta actina. Los valores de los grupos control y tratados con FLUT son la media±SEM de 3-4 animales. (C) Actividad ODC en riñón y testículo de animales adultos controles y tratados con flutamida. Los valores son la media±SEM(n=3-4).Significación estadística: (**) P < 0.01 vs control; (***) P < 0.001 vs control.

DISCUSIÓN

Los resultados presentados en el presente capítulo, junto a los mencionados en el capítulo 4 vienen a mostrar claramente que AZIN2 y AZ3 comparten una serie de características en el testículo de rata y ratón. Por una parte, en ambos modelos AZIN2 y AZ3 presentan una mayor tasa de expresión que el resto de sus genes homólogos. Por otra, el patrón de expresión temporal en testículo de rata y ratón de ambos genes durante la primera ronda de espermatogénesis es similar, estando fuertemente asociada dicha expresión a la del gen de la protamina 2 (Prm2), proteína específica de la espermiogénesis. Estos resultados vienen a confirmar el patrón de expresión ya

conocido para AZIN2 en ratón (López-Contreras et al., 2009a) e indican que tanto en el ratón como en la rata la expresión de AZIN2 parece tener lugar fundamentalmente en las células germinales haploides, sugiriendo un posible papel en la espermiogénesis. Estos resultados contrastan con los descritos para AZIN2 en testículo humano, que asignaban una alta expresión de AZIN2 a las células intersticiales de Leydig y ausencia de expresión en las células de los túbulos seminíferos (Mäkitie et al., 2009c). Aunque los autores de este estudio achacaban estas discrepancias a diferencias biológicas entre el hombre y el ratón, también existe la posibilidad de que los anticuerpos utilizados por dichos autores pudieran estar dando reacción cruzada con alguna proteína de las células secretoras diferente a AZIN2. La desaparición conjunta de AZIN2, AZ3 y Prm2 en los testículos de ratones tratados con ciclofosfamida, y su recuperación sincrónica posterior a las varias semanas tras el cese del tratamiento con dicho fármaco, de nuevo apoyan la idea de que AZIN2 se expresa fundamentalmente en las células haploides testiculares. Los resultados encontrados en los testículos de los ratones modificados genéticamente en ATM y ATR también sustentan esta posibilidad, además de demostrar que los cambios dispares entre la expresión de las enzimas esteroideogénicas y la de AZIN2, hacen poco probable que en el ratón AZIN2 tenga una localización exclusiva en las células de Leydig, como se ha descrito en muestras de testículos humanos (Mäkitie et al., 2009c). Los recientes hallazgos en ratones transgénicos sobre la expresión de lac-Z dirigida por el promotor de AZIN2, que muestran la expresión de beta-galactosidasa en las células haploides testiculares (López-García et al., 2013), apoyan también la distribución celular de AZIN2 inicialmente propuesta (López-Contreras et al., 2009a).

Los resultados obtenidos mediante la manipulación de los niveles de gonadotropinas a través de la deficiencia en potasio, vienen a indicar que estas hormonas juegan un papel importante en la expresión de AZIN2. Teniendo en cuenta que en este tratamiento también se produce un estrecho paralelismo entre la variación del patrón de expresión de AZIN2 con la de AZ3 y Prm2, y el efecto que estas hormonas ejercen sobre la espermatogénesis (Holdcraft & Braun, 2004), parece lógico pensar que las variaciones en la expresión de dichos genes obedecen más a los cambios transcripcionales asociados con los procesos celulares de diferenciación de las células germinales, que a una acción directa sobre los promotores de dichos genes. Más difícil de interpretar son los resultados obtenidos en el tratamiento con el antiandrógeno flutamida. Aunque este fármaco produjo, como era esperable, una marcada caída de la expresión de ODC renal, que está regulada por andrógenos (Sánchez-Capelo et al., 1994), y un aumento en la de ODC testicular, presumiblemente debido al incremento de los niveles de LH por el bloqueo de la retroinhibición de la liberación de gonadotropinas

por el antiandrógeno, no se observaron variaciones significativas en la expresión testicular de AZIN2, AZ3 y Prm2. Teniendo en cuenta que la ausencia de testosterona o la carencia de receptores funcionales de andrógenos hace que las células germinales no progresen más allá del estadio de meiosis (Walker, 2010), dicha interrupción debería de haber hecho disminuir los niveles de ARNm de las células postmeióticas. Una posible interpretación estaría relacionada con una baja entrada de flutamida a las células testiculares debido a la existencia de la barrera hemato-testicular. En este sentido es conocido que mientras flutamida ejerce marcadas acciones antiandrogénicas en la próstata y las vesículas seminales (Bustos-Obregón, 2010), determinados tratamientos crónicos con flutamida no han mostrado ejercer efectos negativos sobre la espermatogénesis (Chandolia et al., 1991).

Con relación a los mecanismos moleculares por los que AZIN2 pudiera ejercer acciones en el proceso de diferenciación de las células germinales o funcionamiento de los espermatozoides generados, poco se puede concluir. En principio, y debido a la interacción demostrada entre AZIN2 y AZ3 se podría pensar que AZIN2 pudiera participar en modular las acciones que AZ3 desempeñe en las espermátidas. La función propuesta para AZ3 tras su descubrimiento es que esta proteína participaría en la regulación de los niveles de poliaminas testiculares, acontecimiento necesario para la generación de células germinales diferenciadas (Ivanov et al., 2000b; Tosaka et al., 2000), ya que en ratones transgénicos con sobreexpresión de ODC hay profundas alteraciones de la estructura testicular (Halmekyto et al., 1991). Aunque la generación de ratones *knock-out* de AZ3 ha venido a demostrar la relevancia de este gen en la función testicular, ya que los ratones machos son estériles (Tokuhiro et al., 2009), la constatación de que en el testículo de estos ratones transgénicos no se produzcan variaciones en los niveles de poliaminas ha venido a desafiar el concepto de que AZ3 ejerce sus funciones a través de la modulación de la homeostasis de las poliaminas. En este sentido, diferentes publicaciones han mostrado que AZ3 pudiera afectar procesos de la fisiología testicular a través de mecanismos no directamente relacionados con la acción de las poliaminas. Así, se ha descrito que AZ3 interacciona con gametogenetina, una proteína testicular de función desconocida (Zhang et al., 2005). También se ha publicado recientemente que una forma truncada de AZ3, que se expresa en testículo y que no interacciona con ODC, modula la actividad de ciertas protein-fosfatasa localizadas en las colas de los espermatozoides (Ruan et al., 2011).

Aunque en las células co-transfectadas con AZIN2 y AZ3 se produce una clara interacción entre ambas proteínas que afecta a los niveles de poliaminas, es posible que en las células testiculares, estas proteínas presenten localizaciones subcelulares diferentes que condicionen sus posibilidades de interacción. Habida cuenta de que en

las células HEK293 transfectadas con AZIN2, la proteína no se encuentra en el citosol sino asociada a membranas del complejo retículo-endoplásmico-Golgi, se podría pensar que AZIN2 pudiera participar en la redistribución intracelular de las poliaminas, en las espermátidas afectando al hipotético transportador vesicular de poliaminas (Poulin et al., 2012). De hecho, es conocido que durante el proceso de diferenciación de las espermátidas a espermatozoides, la mayor parte del contenido celular de poliaminas es secuestrado en los denominados cuerpos residuales (Shin et al., 2007) y que por tanto AZIN2 podría participar en este proceso, independientemente de las acciones que pudiera desempeñar AZ3. En cualquier caso, tanto AZ3 como AZIN2 parecen ser relevantes para una correcta espermiogénesis, ya que se han encontrado expresiones alteradas de dichos genes en pacientes astenozoospermicos y teratozoospermicos (Platts et al., 2007; Jodar et al., 2012). Los estudios que se están llevando a cabo en los ratones transgénicos de AZIN2 anteriormente mencionados (López-García et al., 2013), pudieran aportar nueva información para comprender mejor el papel de AZIN2 en la función testicular.

- Capítulo 3 -

Transporte de agmatina en células de mamíferos. Influencia de AZIN2 y otras proteínas relacionadas con el metabolismo de poliaminas.

La agmatina (4-aminobutil guanidina) es el producto de descarboxilación de la arginina por la enzima arginina descarboxilasa (ADC) que funciona como intermediario de la ruta biosintética de las poliaminas en bacterias y plantas, puesto que puede transformarse en putrescina por la acción de la enzima agmatinasa (Fig. 1). Desde que en 1994 se publicó que agmatina estaba presente en cerebro bovino y que extractos de cerebro de rata eran capaces de transformar arginina en agmatina (Li et al., 1994), el número de estudios sobre las acciones fisiológicas de la agmatina ha aumentado de forma considerable (Uzbay, 2012). Sin embargo, la existencia de ADC en células de mamíferos ha sido un tema muy controvertido. La asignación inicial a la proteína ODCp de actividad ADC (Zhu et al., 2004) no pudo ser corroborada por otros laboratorios, incluido el nuestro, que demostraron que ODCp carece de actividad descarboxilante de arginina y que en realidad se comporta como un inhibidor de antizimas, por lo que dicha proteína fue denominada AZIN2 (López-Contreras et al., 2006; Kanerva et al., 2008). Aunque la agmatina se encuentra en cerebro (Li et al., 1994) y también en otros tejidos de mamíferos como intestino, estómago, bazo e hígado (Raasch et al., 1995), sus niveles son mucho más bajos que los encontrados para las poliaminas fisiológicas. Se ha postulado que la agmatina ejerce determinadas acciones fisiológicas o farmacológicas uniéndose a los receptores imidazolínicos (Li et al., 1994). También han sido descritos una gran variedad de efectos distintos como su capacidad para bloquear los receptores glutamatérgicos NMDA (Yang & Reis, 1999), la inhibición de la NO sintasa (Galea et al., 1996) y la disminución de la proliferación celular por inducir el *frameshifting* de la AZ y disminuir los niveles de poliaminas tanto en células normales (Satriano et al., 1998) como en líneas celulares tumorales (Wolf et al., 2007; Haenisch et al., 2011). Sin embargo, hay que destacar que para producir muchos de estos efectos se necesitan concentraciones de agmatina muy superiores a las aparentemente existentes en los tejidos de mamíferos.

Muchos autores sostienen que al menos una parte importante de la agmatina encontrada en los tejidos de mamíferos tiene un origen exógeno, procedente de la agmatina presente en la dieta y la suministrada por la flora intestinal. Sin embargo, los sistemas transportadores de agmatina en células de mamíferos y sus mecanismos

moleculares, como ocurre en el caso de las poliaminas, no han sido caracterizados de manera detallada, existiendo además resultados contradictorios, no pudiéndose descartar que agmatina pueda entrar en las células por medio de diferentes sistemas. Así, mientras que en sinaptosomas procedentes de cerebro de rata su captación se produce a través de un canal catiónico compartido por calcio pero no por poliaminas (Sastre et al., 1997), en sinaptosomas derivados de médula espinal de rata la captación se produce a través del transportador de poliaminas (Goracke-Postle et al., 2007). En otros tipos celulares el transporte de agmatina también ha sido asignado al sistema transportador de poliaminas, como es el caso de hepatocitos de rata (Cabella et al., 2001) o líneas celulares derivadas de riñón (Satriano et al., 2001; del Valle et al., 2001) o de endotelio vascular pulmonar (Babál et al., 2001).

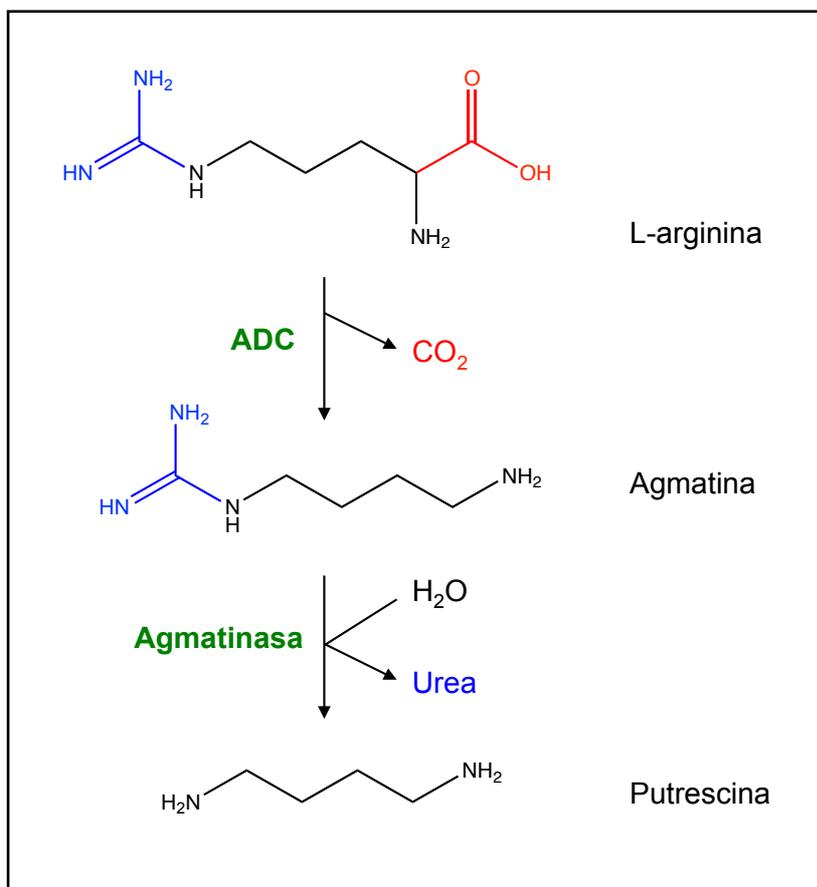


FIGURA 1. Ruta de generación de putrescina a partir de arginina. La descarboxilación de arginina en agmatina por arginina descarboxilasa (ADC) ha sido únicamente demostrada en bacterias y plantas, siendo controvertida su existencia en mamíferos. Agmatinasa, en cambio, sí ha sido caracterizada en ciertos tejidos de mamíferos, por lo que la agmatina existente puede ser molécula precursora para la biosíntesis de poliaminas en aquellos tejidos donde sus niveles sean importantes.

Teniendo en cuenta que el cerebro es el órgano en el que mayor relevancia parece tener agmatina, y en el que AZIN2 es expresada de forma significativa en comparación con otros tejidos, unido al hecho de que AZIN2 estimula la captación de las poliaminas putrescina, espermidina y espermina (López-Contreras et al., 2008), nos planteamos el objetivo de determinar el efecto de AZIN2 sobre la captación de agmatina por células de mamíferos. Comoquiera que también ha sido descrito que agmatina estimula la síntesis de antizimas (Satriano et al., 1998), incluimos dentro de este objetivo el estudio de la influencia de antizimas y otras proteínas relacionadas con el metabolismo de poliaminas en la captación de agmatina.

6.1. Transporte de agmatina en células de origen renal.

Para los estudios sobre el transporte de agmatina en células de mamíferos, se eligió la línea celular COS7 derivada de riñón de mono, de rápido crecimiento y gran eficacia de transfección mediante lipofectamina (ver sección “Materiales y Métodos”). Experimentos previos indicaron que la captación de agmatina marcada con ^{14}C por células COS7 a 37°C fue prácticamente lineal al menos durante los 30 primeros minutos de incubación (resultados no mostrados). La captación específica se calculó deduciendo la captación inespecífica (captación a 0°C) de la captación total. En la mayoría de los experimentos la captación inespecífica no fue superior al 10% de la total. La Fig. 2A muestra la variación de la captación de agmatina por las células COS7 en el rango de concentraciones de arginina de 0 a $100\ \mu\text{M}$, mientras que en la Fig. 2B se muestra la captación en el rango 0- $1000\ \mu\text{M}$. La K_m aparente y V_{max} calculadas en el primer caso fueron $44\pm 4\ \mu\text{M}$ y $19.6\pm 2.4\ \text{nmol h}^{-1}\ \text{mg}^{-1}\ \text{proteína}$, respectivamente. En el segundo, aumentaron a $649\pm 92\ \mu\text{M}$ y $92.8\pm\ \text{nmol h}^{-1}\ \text{mg}^{-1}\ \text{proteína}$. La representación de Eadie-Hofstee mostrada en la Fig. 2C es compatible con la existencia de dos sistemas transportadores con diferente afinidad por agmatina.

Estos resultados indicaban que la captación de agmatina por células COS7 depende de la existencia de un transportador específico de mayor afinidad, pero que a concentraciones más elevadas agmatina puede entrar a través de un mecanismo menos afín. Teniendo en cuenta que los valores de K_m para putrescina, espermidina y espermina obtenidos en el mismo tipo de células en trabajos previos fueron $4.5\ \mu\text{M}$, $1\ \mu\text{M}$ y $0.8\ \mu\text{M}$, respectivamente (López-Contreras et al., 2008), y los obtenidos aquí, se deduce que la captación de agmatina por las células COS7 parece ser menos afín que la de las poliaminas fisiológicas. Debido a que estos resultados no permitían dilucidar si existe un transportador exclusivo para agmatina, o si bien agmatina entra al interior de la célula por el sistema transportador de poliaminas u otro transportador menos

específico, se decidió llevar a cabo una serie de experimentos con el fin de obtener información adicional.

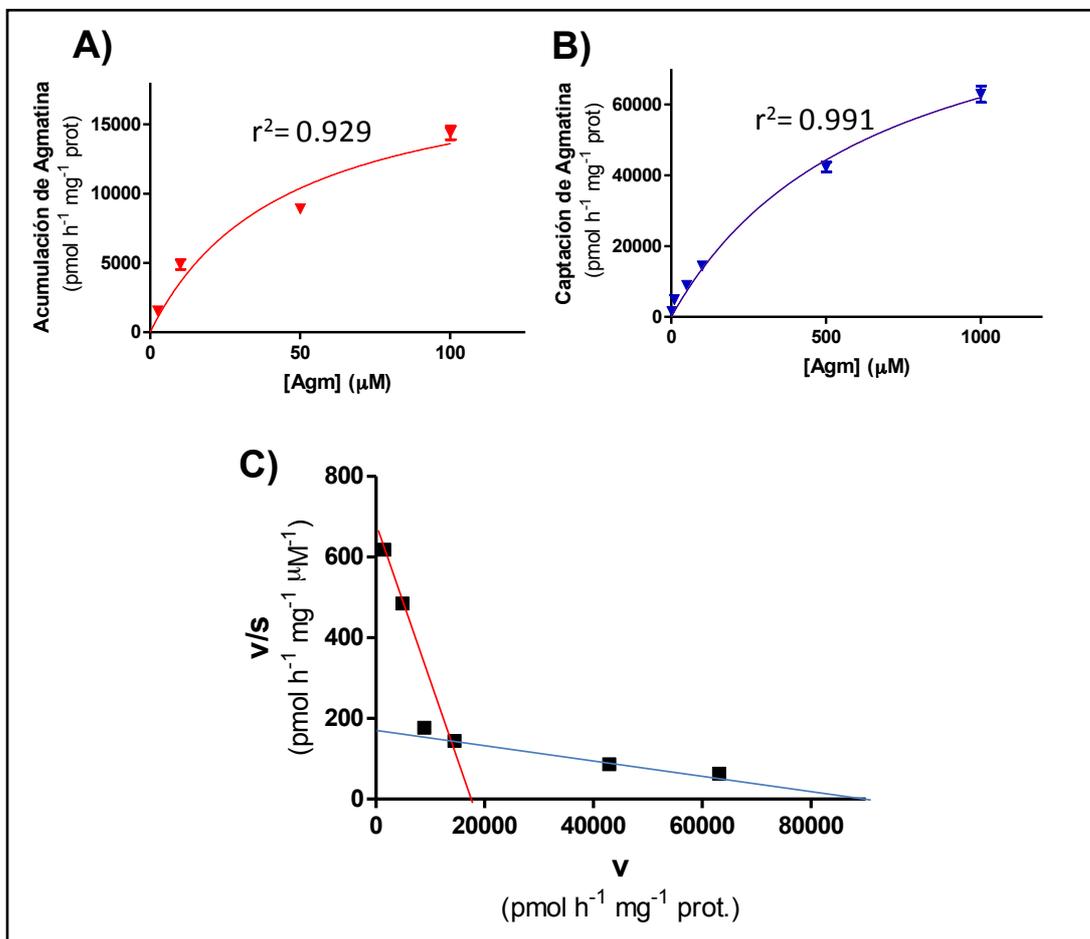


FIGURA 2. Cinética de la captación de agmatina por células COS7. Los ensayos de captación de agmatina se describen en la sección "Materiales y métodos", usando ^{14}C -agmatina en un rango de concentraciones desde 0.1 a 1000 μM (0.1, 10, 50, 100, 500 y 1000 μM). (A) Representación de la velocidad de captación de agmatina frente a la concentración de sustrato radiactivo en el rango de concentraciones 0.1-100 μM . (B) Representación de la velocidad de captación de agmatina frente a la concentración de sustrato radiactivo en el rango de concentraciones 0.1-1000 μM . (C) Representación de Eadie-Hofstee. Los datos son la media \pm SEM.

Como se muestra en la Fig. 3A la preincubación con DFMO, inhibidor irreversible de ODC aumentó la captación de agmatina en la línea celular COS7, encontrándose niveles de agmatina radiactiva 10 veces mayores en relación a las células sin tratar. Estos resultados, están de acuerdo con estudios previos que demostraron que la depleción de poliaminas debida a la acción del DFMO aumentaba la captación de agmatina a través del sistema transportador de poliaminas en la línea celular murina NIH-3T3 transformada con Ha-ras, Ras/3T3 (Satriano et al., 2001) y en la línea celular

de origen renal BHK-21 (del Valle et al., 2001). Además, la captación de agmatina disminuyó por la adición de poliaminas (a concentración 20 μ M) al medio extracelular durante el ensayo de medida (Fig. 3B), lo que indica que putrescina, espermidina y espermina compiten con la entrada de agmatina, sugiriendo que en estas células la captación de agmatina se pudiera producir a través del sistema transportador de poliaminas.

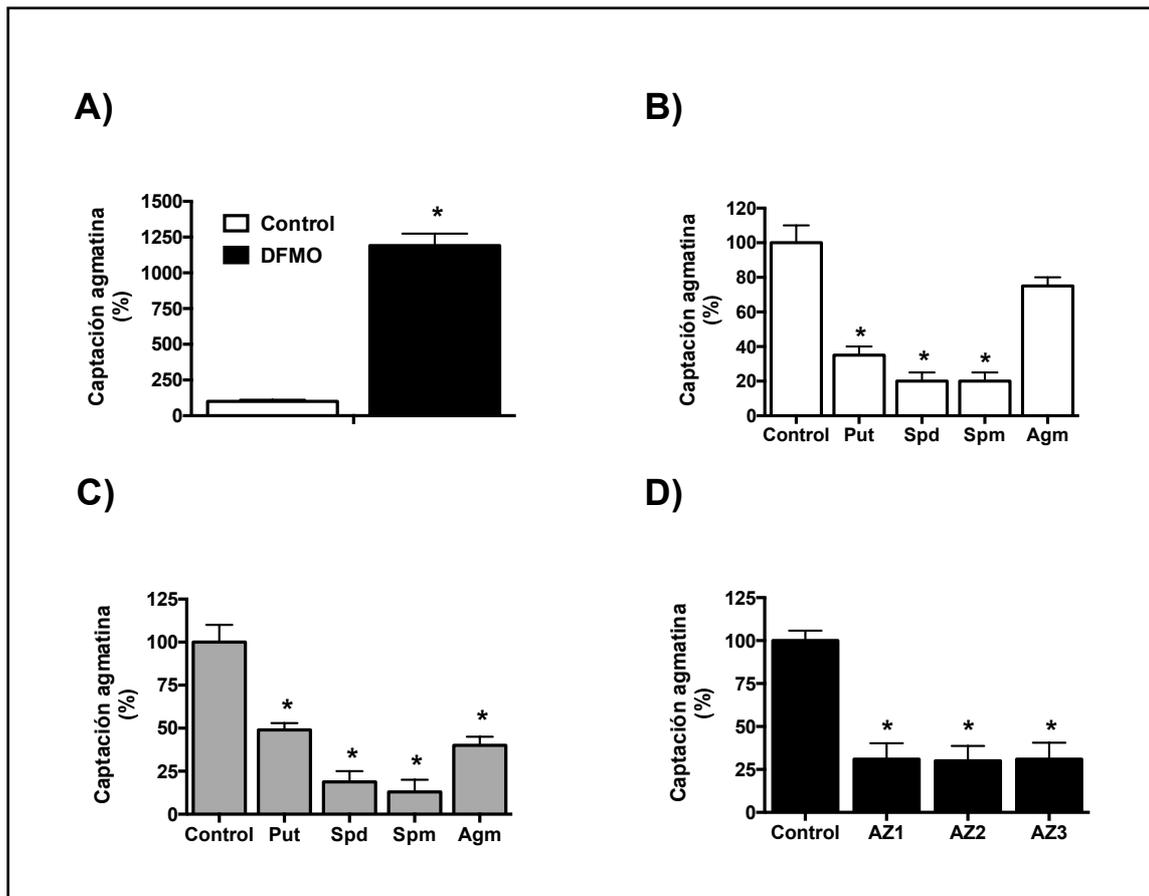


FIGURA 3. Influencia de las poliaminas sobre la captación de agmatina en la línea celular COS7. (A) Efecto del tratamiento de las células con DFMO 1mM durante 24h sobre la captación de agmatina (B) Influencia de la presencia de poliaminas a concentración 20 μ M en el medio durante el proceso de medida sobre la captación de agmatina. (C) Influencia sobre la captación de agmatina de la preincubación de las células con poliaminas(100 μ M) durante 3h antes de realizar el ensayo de transporte. (D) Efecto de la sobre-expresión de las AZs en la captación de agmatina por células COS7 transfectadas transitoriamente (24h) con las construcciones de las AZ mutadas o plásmido vacío (control). La concentración de 14 C-agmatina en el medio de medida fue 2 μ M, y el tiempo de medida de 30 min. La captación de agmatina se expresa como porcentaje de los valores de sus respectivos controles. Los datos son la media \pm SEM de ensayos realizados por triplicado. Significación estadística: (*) P < 0.01 vs control.

Por su parte, la preincubación de las células COS7 con poliaminas a concentración 100 μ M durante 3h disminuyó grandemente la captación de agmatina,

sobre todo en los casos de espermidina y espermina (Fig. 3C), probablemente debido a la inducción de las AZs. La preincubación con agmatina también produjo una caída de la acumulación de agmatina radiactiva, lo que estaría de acuerdo con el hecho de que agmatina también fuera capaz de inducir las AZs (Satriano et al., 1998). Para comprobar si efectivamente las AZs son capaces de disminuir el transporte de agmatina, se sobre-expresaron las tres AZs conocidas (AZ1-3) mediante transfección transitoria en esta línea celular. Como se muestra en la Fig. 3D, todas las AZs inhibieron la entrada de agmatina a la célula, como se ha descrito para el resto de poliaminas (López-Contreras et al., 2008). Estos resultados demuestran por primera vez que la captación de agmatina puede estar regulada por las antizimas.

Todos estos resultados son compatibles con la hipótesis de que agmatina pudiera ser captada por las células COS7 a través del sistema transportador de poliaminas. Para intentar corroborar dicha hipótesis se decidió estudiar la influencia del calcio en la captación de agmatina. En este sentido, trabajos previos habían demostrado la importancia del calcio en la regulación del transporte de poliaminas (Khan et al., 1993; Seiler et al., 1996). De hecho, en células humanas de cáncer de mama la captación de putrescina se inhibe como consecuencia de una depleción del calcio extracelular, mientras que la adición de calcio al medio aumenta significativamente la entrada de putrescina (Poulin et al., 1995). En el caso del transporte de la agmatina los efectos no están tan claros, ya que mientras en determinados sistemas, el transporte de agmatina disminuyó significativamente en presencia de quelantes de calcio en células de origen renal (del Valle et al., 2001) y en sinaptosomas de médula espinal (Goracke-Postle et al., 2007), en sinaptosomas de cerebro de rata la quelación del calcio incrementó la captación de agmatina (Sastre et al., 1997). La tabla I muestra que en las células COS7 la adición del quelante de calcio EGTA al medio DMEM aumentó la captación de agmatina, mientras que la adición de calcio al medio PBS carente de calcio inhibió la captación de agmatina. Este efecto del calcio sobre la captación de agmatina no fue tan evidente sobre la captación de putrescina o espermidina (resultados no mostrados). Por otra parte, la administración de bloqueadores de canales de calcio tipo L mostraron resultados dispares. Mientras que la administración de verapamilo hizo caer significativamente la entrada de agmatina, el nifedipino no influyó sobre la captación de agmatina. Estos resultados sugieren que la captación de agmatina podría estar influenciada por algún tipo de transportador catiónico dependiente de calcio y que el efecto del verapamilo no se produce como consecuencia del bloqueo de canales de calcio tipo L.

Medio	Tratamiento	Variación de la captación de Agmatina sobre el control correspondiente (%)
DMEM	EGTA 2 mM ^a	193±2*
PBS sin calcio	CaCl ₂ 2 mM ^b	52±4*
DMEM	Verapamilo 1 mM ^c	42±8*
DMEM	Nifedipino 1 mM ^c	103±5

TABLA 1. Influencia de los cationes Ca y Na sobre la captación de agmatina en células. (a) Los ensayos con EGTA 2 mM se realizaron en DMEM (concentración de CaCl₂ 1,8mM). El quelante se adicionó junto a la agmatina radiactiva en el ensayo de transporte. (b) El ensayo se realizó en PBS libre de calcio (NaCl 137 mM, KCl 2,7mM, Na₂HPO₄ 12,5 mM, KH₂PO₄ 1 mM) o con CaCl₂ 2 mM. (c) Las células se incubaron con los bloqueadores de canales de calcio verapamilo y nifedipino a concentración 1mM durante 30 min antes del ensayo de captación, adicionando posteriormente medio fresco con agmatina radiactiva. Los datos son la media±SEM de ensayos realizados por triplicado. Se toma valor 100 la captación de agmatina en condiciones controles. Significación estadística: (*) P < 0.01 vs control.

6.2. Efecto de la sobreexpresión de AZIN2 y otras proteínas implicadas en el metabolismo de poliaminas sobre la captación de agmatina.

Estudios previos realizados en nuestro laboratorio habían demostrado que la captación de putrescina, espermidina y espermina se encuentra regulada positivamente por los inhibidores de antizimas (López-Contreras et al., 2008), y que la presencia de ODC disminuía la entrada de poliaminas, probablemente debido a la inducción de las AZs endógenas, como consecuencia del aumento de los niveles intracelulares de poliaminas. La Fig. 4A muestra que la captación de agmatina se estimuló alrededor de 5 veces tanto por la presencia de AZIN1 como de AZIN2, al igual que ocurre para la captación de putrescina (Fig. 4B). Sorprendentemente, la sobre-expresión de ODC mostró un efecto totalmente opuesto sobre la captación de agmatina y putrescina. Mientras que en el caso de la agmatina, la captación por las células transfectadas se incrementó en una proporción similar a la producida por AZIN1 y AZIN2 (Fig. 4A), en el caso de la captación de putrescina la transfección con ODC produjo un marcado descenso del transporte de putrescina (Fig. 4B). Esta caída podría explicarse asumiendo que la elevación de los niveles intracelulares de putrescina causados por el aumento de la actividad ODC pudiera inducir alguna de las antizimas, que frenasen la entrada de putrescina. Sin embargo, si esto fuera así, se tendría que haber producido un efecto inhibitor sobre la captación de agmatina, ya que como se mostró en la Fig. 3D, la elevación de los niveles de antizimas, disminuyen también la captación de agmatina. La Fig. 4C muestra que el efecto ejercido por ODC sobre el incremento de la entrada de agmatina en las células COS7 es dependiente del aumento de la síntesis de putrescina,

ya que tanto en las células tratadas con DFMO como en las transfectadas con un mutante inactivo de ODC por la sustitución de la cisteína 360 por alanina, no se apreció ningún aumento significativo en la captación de agmatina. Una posible explicación de la activación de la captación de agmatina por la inducción de ODC estaría relacionada con el hecho de que putrescina pudiera ejercer una acción trans-estimuladora sobre un posible intercambiador de diaminas. Los resultados mostrados en la Fig. 4D, en los que la salida de putrescina radiactiva previamente acumulada por las células COS aumenta cuando se adiciona agmatina al medio extracelular, estarían de acuerdo con la posible existencia de dicho intercambiador.

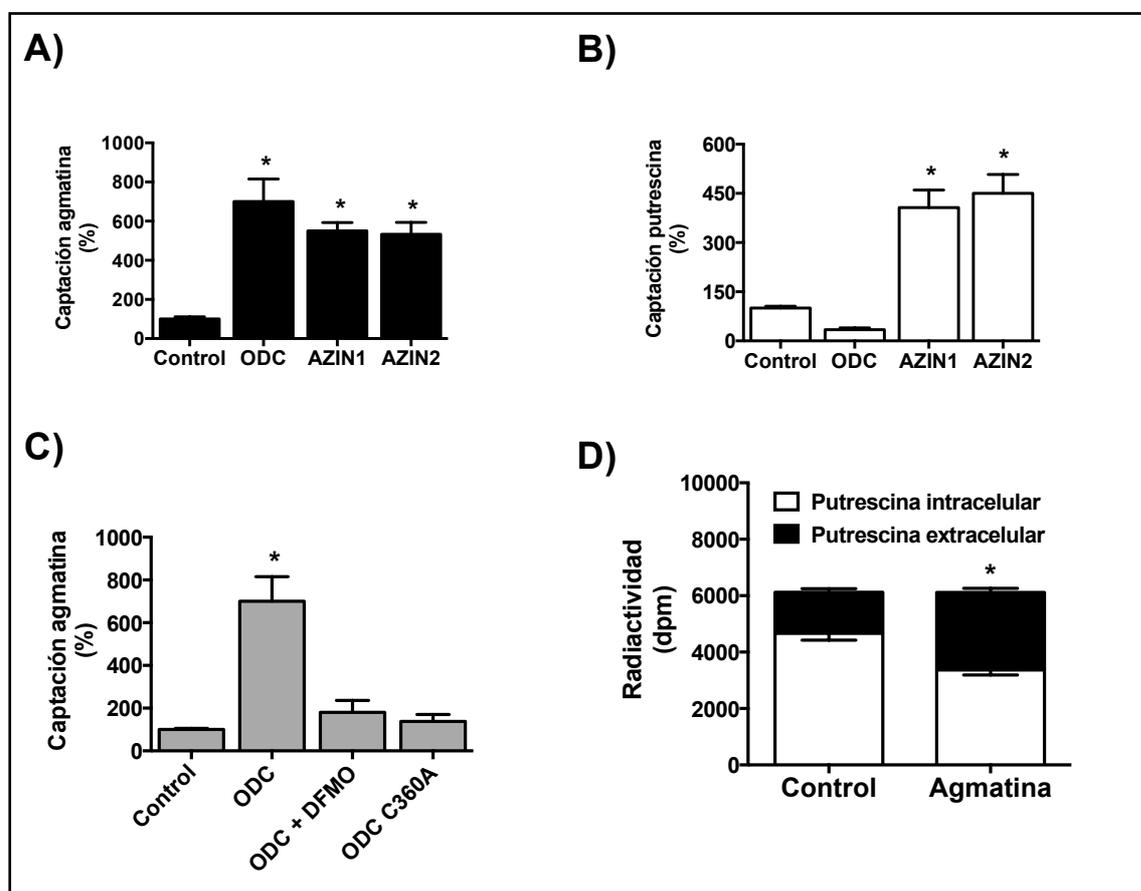


FIGURA 4. Transporte de diaminas en células COS7 transfectadas con ODC o sus parálogos AZIN1 y AZIN2. Efecto de la sobre-expresión de ODC, AZIN1 y AZIN2 sobre la captación de (A) agmatina y (B) putrescina. (C) Captación de agmatina en presencia de ODC (control y preincubación 5h, con DFMO 1mM) y del mutante de ODC C360A inactivo. Los datos son la media±SEM de ensayos realizados por triplicado. Se toma valor 100 la captación de agmatina en células transfectadas con el plásmido vacío. (D) Influencia de la presencia de agmatina en el medio sobre la salida de putrescina en células COS7. Las células se preincubaron con putrescina radiactiva 2μM durante 1h. Tras la preincubación las células se dejaron 1h en medio fresco con o sin agmatina 50μM, midiéndose la radioactividad presente en el medio extracelular y en el interior celular. Significación estadística: (*) P < 0.01 vs control.

Los resultados de transfección con genes relacionados con el metabolismo de poliaminas mostrados hasta aquí estarían de acuerdo con la hipótesis de que agmatina pudiera entrar en las células COS7 por más de un sistema transportador. Otro gen que juega un papel importante en el control de la homeostasis de poliaminas es la espermidina/espermina acetil transferasa (SSAT o SAT1), que participa en la acetilación de las poliaminas espermidina y espermina (Pegg, 2008). En este sentido, se ha descrito recientemente que SSAT, podría participar en la excreción de putrescina a través de la interacción e inducción de un intercambiador arginina/putrescina en células de carcinoma de colon (Uemura et al., 2008). Por este motivo, junto con el hecho anteriormente comentado de que a consecuencia de un aumento de su actividad enzimática se alteran los niveles de poliaminas intracelulares, nos propusimos estudiar el posible efecto de la sobre-expresión de SSAT sobre el transporte de agmatina. Como se observa en la Fig. 5A, la sobre-expresión de SSAT aumentó considerablemente la captación de agmatina en células COS7, siendo incluso mas marcado que el producido por ODC. Además, y a diferencia con ODC, la transfección con SSAT también aumentó el transporte de putrescina (Fig. 5B). Además, SSAT también estimuló el transporte de espermidina y espermina, aunque no tan marcadamente como en el caso de agmatina o putrescina (Fig. 5C). Este efecto diferencial pudiera estar asociado a la acetilación de espermidina y espermina por la acción de SSAT y la consecuente excreción de las poliaminas acetiladas hacia el medio extracelular. Por otra parte, la sobre-expresión de SSAT no afectó la captación de arginina u ornitina (Fig. 5D), aminoácidos catiónicos relacionados con el metabolismo de poliaminas/agmatina, descartando la estimulación del intercambiador arginina/putrescina observada en células tumorales (Uemura et al., 2008). Los resultados sugieren que SSAT podría estar induciendo específicamente el transporte de agmatina y poliaminas.

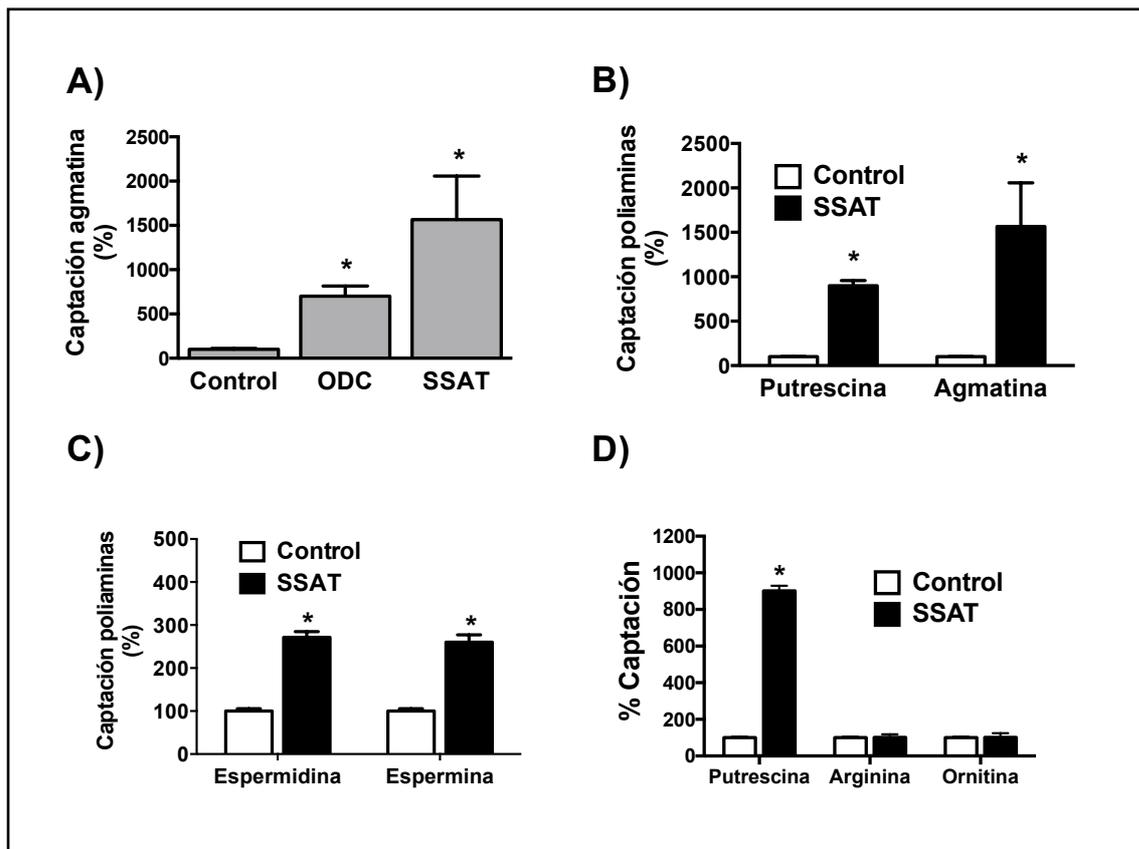


FIGURA 5. Transporte de poliaminas en células COS7 transfectadas con SSAT. (A) Efecto de la sobre-expresión de SSAT y ODC sobre la captación de agmatina. (B-C) Influencia de SSAT sobre el transporte de agmatina y poliaminas en células COS7. (D) Transporte de putrescina, ornitina y arginina en células transfectadas con SSAT y plásmido control. Los datos son la media±SEM de ensayos realizados por triplicado. Se toma valor 100 la captación de sustrato radiactivo en células transfectadas con el vector vacío. Significación estadística: (*) $P < 0.01$ vs control.

6.3. Efecto de diguanidinas a aminoguanidinas en el transporte de agmatina

Mientras que son muchos los estudios que indican que diversos análogos sintéticos de las poliaminas afectan el transporte de las mismas, así como que modulan muchas de las proteínas y enzimas implicadas en su metabolismo (Wallace & Niiranen, 2007), no existen estudios sobre la influencia de análogos de agmatina en el transporte de la misma o en el metabolismo de poliaminas. Por otra parte, en la última década, una gran variedad de compuestos guanidínicos e imidazolínicos han sido ensayados como posibles agentes antitripanosomales (Dardonville & Brun, 2004; Dardonville et al., 2006). Teniendo en cuenta los numerosos efectos farmacológicos atribuidos a la agmatina y la naturaleza amino-guanidínica y catiónica de la misma, se decidió estudiar el posible efecto de diversos compuestos, diguanidínicos y aminoguanidínicos fundamentalmente, sobre la captación de agmatina por las células COS7. En la Fig. 6 se muestran la estructura química y la denominación asignada a estos compuestos.

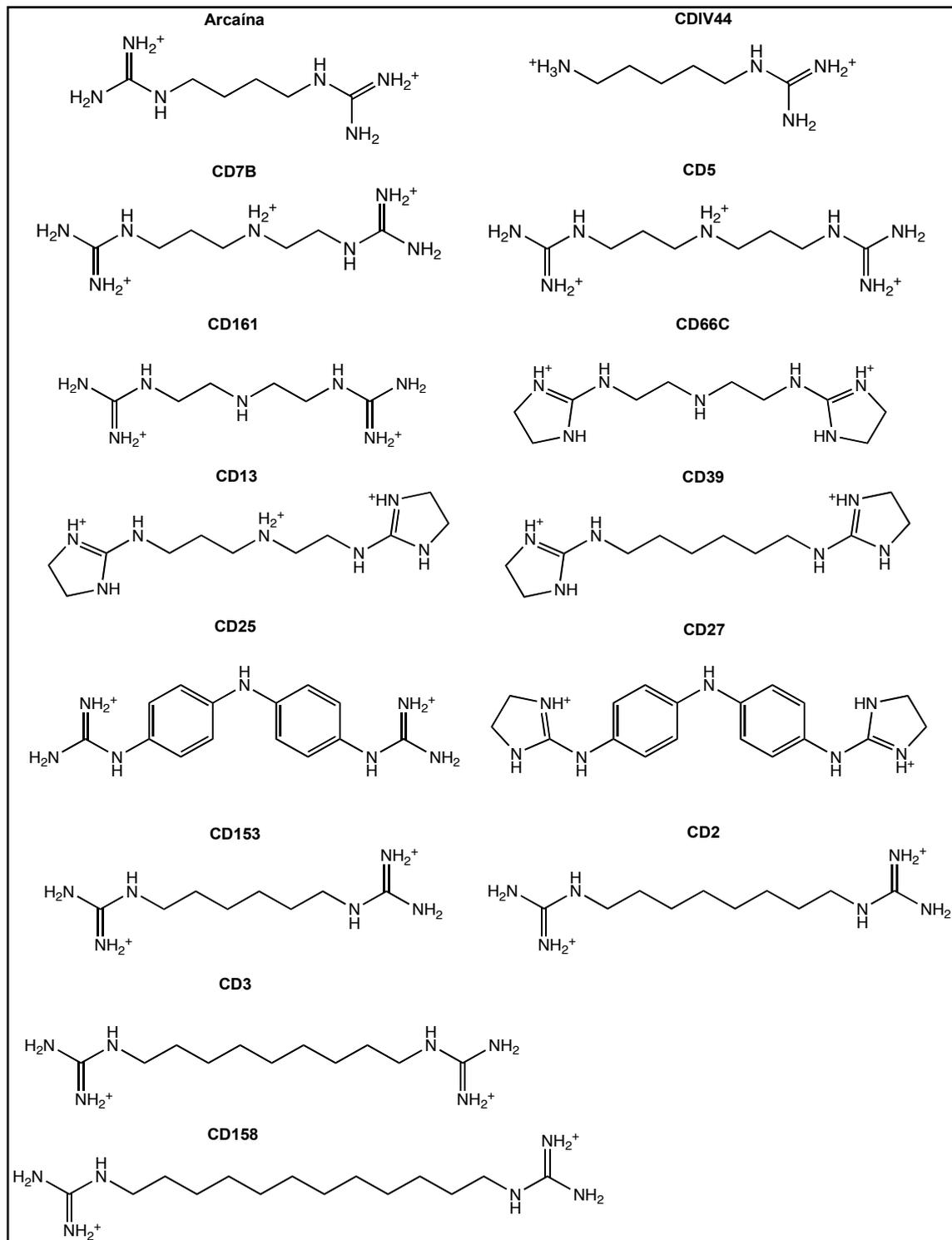


FIGURA 5. Estructura química los derivados aminoguanidinos (CDIV44), diguanidinos (arcaína, CD7B, CD5, CD161, CD153, CD2 y CD158) y diimidazolinicos (CD66C, CD13, CD39, CD25 y CD27) utilizados en los ensayos de transporte de agmatina.

La Fig. 7 muestra el efecto de estos compuestos sobre la captación de agmatina. De todos ellos, el único con estructura de aminoguanidinio, el CDIV44 produjo una inhibición de alrededor al 45%. De todos los diguanidinos, el CD5 fue el que mostró una inhibición superior, alrededor al 75%, seguido por el CD7B con una inhibición del 56%. Arcaína y CD153 mostraron porcentajes de inhibición próximos al 40%, mientras que en el caso de CD161 la inhibición fue un 30%. Las diaguanidinas CD2, CD3 y CD158 no afectaron la captación de agmatina. Estos resultados indican que un factor importante para la inhibición es la distancia entre los grupos guanidinos cargados positivamente al pH fisiológico. La presencia de un tercer grupo cargado en el interior de la molécula, como el caso del CD5 y CD7B es importante para aumentar la efectividad inhibidora. En el caso de la azo-diguanidina CD5 la eficacia competitiva fue similar a la de espermidina mostrada en la Fig. 3B, lo que sugiere que es el número de cargas positivas y la distribución espacial de las mismas un factor más importante que la naturaleza del grupo químico que las portan. De los diimidazoles, el CD13 y CD66C fueron los más potentes, con inhibiciones próximas al 50%, lo que de nuevo apoya lo sugerido anteriormente.

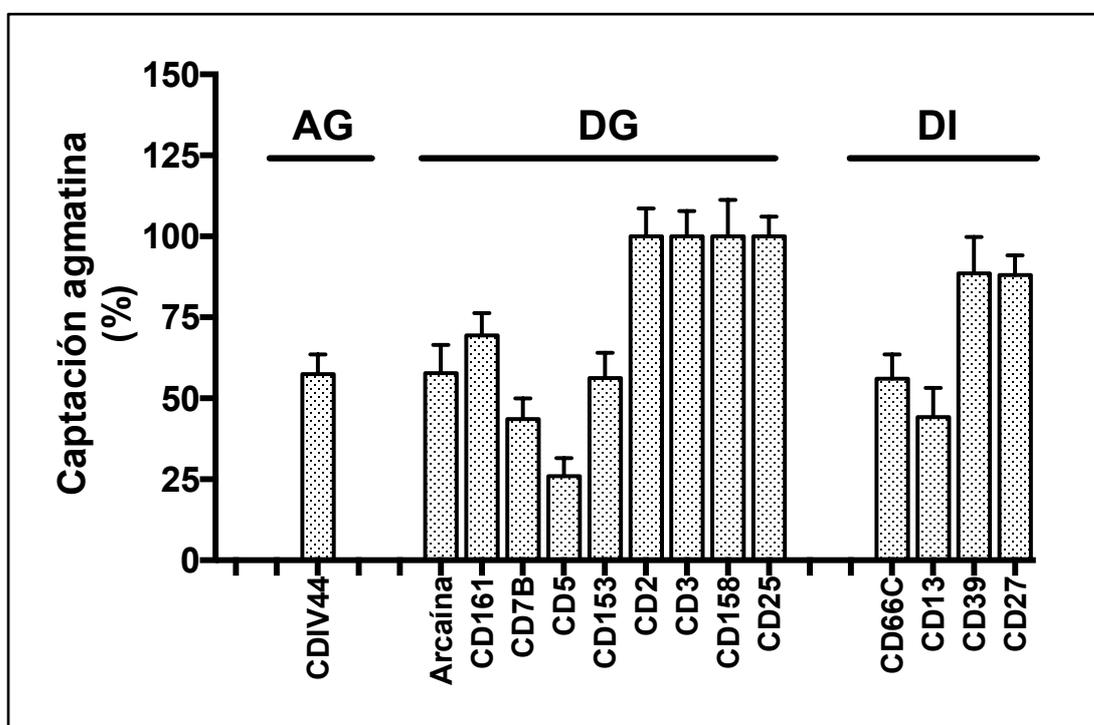


FIGURA 7. Efecto de distintos análogos de agmatina sobre el transporte de agmatina por células COS7. Los ensayos de captación de agmatina se realizaron en células COS7 al 80% de confluencia en presencia de los distintos compuestos a concentración 20µM. Los compuestos ensayados se han clasificado según su naturaleza aminoguanidínica (AG), diguanidínica (DG) o diimidazolinica (DI). Se toma valor 100 la captación de agmatina en las mismas condiciones experimentales. Los datos son la media±SEM de tres ensayos distintos.

6.3. Estudio de la influencia de las poliaminas sobre los sistemas transportadores inducidos por AZIN2, ODC y SSAT.

Los resultados anteriores mostraban que la captación de agmatina en células no transfectadas se encuentra fuertemente inhibida por un exceso de poliaminas, lo que sugiere que agmatina entra a la célula a través del sistema transportador de poliaminas en estas condiciones. Para determinar si el incremento de la captación de agmatina debida a la sobre-expresión de AZIN2, ODC y SSAT se pudiera producir también a través del transportador de poliaminas, se realizaron experimentos de competición en presencia de poliaminas. La Fig. 8 muestra que mientras que en las células transfectadas con AZIN2 y SSAT la presencia de poliaminas inhibió claramente la captación de agmatina (Fig. 8A, 8C), en células transfectadas con ODC la presencia de poliaminas no afectó la entrada de agmatina (Fig. 8B).

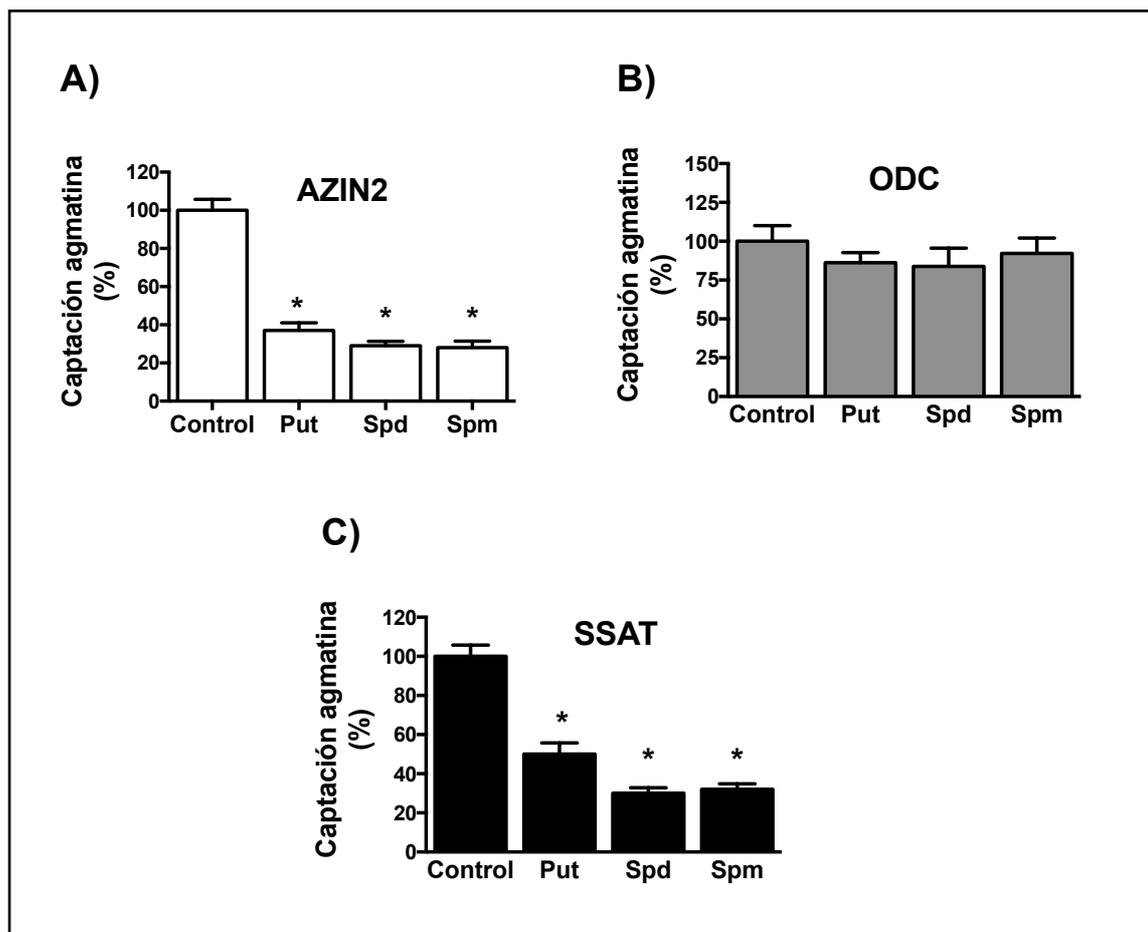


FIGURA 8. Efecto de la presencia de poliaminas sobre el transporte de agmatina en células COS7 transfectadas ODC, AZIN2 y SSAT. La captación de agmatina se determinó en células transfectadas transitoriamente con ODC (A), AZIN2 (B) o SSAT (C) en presencia de poliaminas a concentración 20 μ M. Los datos son la media \pm SEM de ensayos realizados por triplicado. Se toma valor 100 la captación de agmatina en condiciones controles. Significación estadística: (*) $P < 0.01$ vs control.

DISCUSIÓN

Diversos argumentos explican el interés por conocer el transporte de agmatina en células de mamíferos. Por una parte, serviría para explicar la distribución de este compuesto entre los distintos tejidos y sus posibles acciones fisiológicas. Por otra, está el hecho de que la agmatina al ser capaz de inhibir la proliferación celular mediante la disminución de los niveles intracelulares de poliaminas (Satriano et al., 1998; Babál et al., 2001; Vargiu et al., 1999; Dudkowska et al., 2003), posiblemente por inducir la antizima (Satriano et al., 1998; Isome et al., 2007), pudiera tener un uso como fármaco. En este sentido el hecho de que los efectos antiproliferativos de agmatina sean mayores en líneas celulares transformadas, donde el transporte de poliaminas se encuentra activado (Isome et al., 2007), ha aumentado el interés sobre el conocimiento del sistema transportador de agmatina en células de mamíferos.

Nuestros resultados sugieren que en las células COS7, el transportador de poliaminas es el sistema de mayor relevancia para la captación de agmatina, si bien la afinidad de agmatina por el sistema transportador parece inferior a la de putrescina, espermidina y espermina. Esta interpretación se basa en diversos hechos: el valor de la K_m y la marcada inhibición del transporte de agmatina por las tres poliaminas; el aumento de su transporte por la disminución de las poliaminas intracelulares promovida por el tratamiento con DFMO; la inhibición de la captación de agmatina por las tres antizimas, y que las diguanidinas que muestran la mayor inhibición son las que más se asemejan a la estructura de triamina. Estos resultados estarían de acuerdo con los publicados que apoyan que la captación de agmatina se encuentra mediada por el transportador de poliaminas en varias líneas celulares tales como sinaptosomas de médula espinal, hepatocitos, células de riñón y células endoteliales de arteria pulmonar (Goracke-Postle et al., 2007; Cabella et al., 2001; Satriano et al., 2001; del Valle et al., 2001; Babál et al., 2001).

Sin embargo, no se puede descartar que agmatina pudiera penetrar en la célula por otros sistemas transportadores diferentes al transportador de poliaminas. En efecto, los resultados sobre la cinética de captación muestran que a concentraciones elevadas de agmatina, un sistema menos afín pudiera participar en el transporte de agmatina. En este sentido, el hecho de que una actividad ODC elevada estimule la entrada de agmatina significativamente, junto a que la salida de putrescina aumente en presencia de agmatina, sugieren que en estas células pudiera expresarse un intercambiador de diaminas. Teniendo en cuenta que este hipotético intercambiador no parece ser sensible a la presencia de poliaminas exógenas (Fig. 8B), podría pensarse que este sistema se estimula como consecuencia de niveles elevados de putrescina.

La Fig. 9 muestra un modelo hipotético para el transporte de agmatina en células COS7. En resumen, agmatina podría entrar a las células a través de dos sistemas de transporte diferentes. En condiciones basales, la captación de agmatina se produciría principalmente a través del transportador de poliaminas, el cual es inhibido por AZs y estimulado por AZINs y SSAT. Además, agmatina podría ser también introducida al interior celular a través de otro sistema transportador que se induciría o potenciaría cuando los niveles de ODC elevados. En este caso, la gran acumulación de putrescina como consecuencia de una elevada actividad ODC podría inducir un intercambiador agmatina/putrescina, siendo la agmatina exógena transportada hacia el citosol y el exceso de putrescina excretado al medio extracelular.

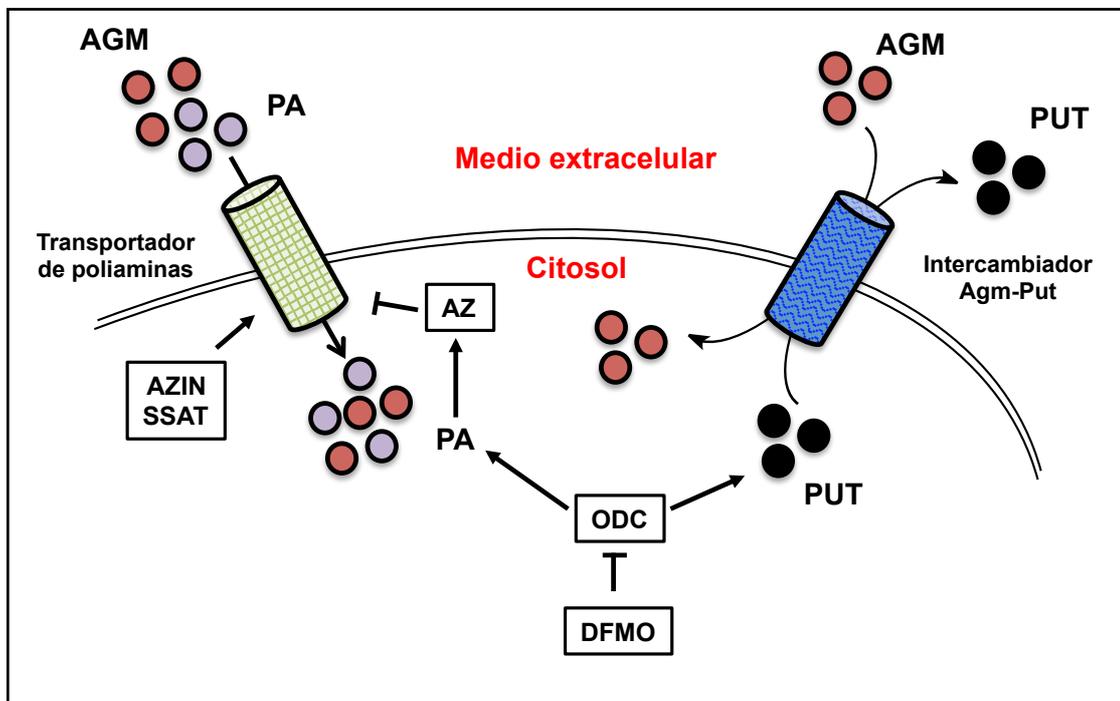


FIGURA 9. Esquema de los hipotéticos sistemas de transporte a través de los cuales agmatina pudiera entrar al interior de las células COS7. En condiciones basales agmatina entraría mayoritariamente a través del sistema transportador de poliaminas, el cual se inhibe por AZ y se estimula por los AZINs y SSAT. Cuando los niveles de ODC son elevados, agmatina se transportaría a través de otro sistema transportador distinto al de poliaminas.

- Capítulo 4 -

Análisis de la estructura terciaria y cuaternaria del inhibidor de antizimas 2 y de su interacción con las antizimas

Numerosos estudios han demostrado que ODC es enzimáticamente activa como homodímero (Solano et al., 1985; Tobias et al., 1993; Pegg, 2006), y que existe un equilibrio entre la forma monomérica inactiva y la dimérica activa en condiciones fisiológicas (Solano et al., 1985; Mitchell & Chen, 1990). Por otra parte, las AZs ejercen sus efectos negativos sobre la actividad ODC mediante su unión al monómero de ODC, previniendo de esta forma la formación del dímero activo, y por dirigir a ODC al proteasoma 26S donde es degradada sin ubiquitinación previa (Murakami et al., 1992). Los estudios iniciales basados en la diferente afinidad mostrada por la ODC de ratón y la de *T. brucei* hacia las AZs identificaron el elemento de unión a antizimas (AZBE), delimitando esta región entre los residuos 117-140 de ODC murina (Li & Coffino, 1992). Posteriormente, el análisis de la estructura terciaria de ODC reveló que esta región se encuentra en dos hélices α incluidas en un dominio tipo barril α/β , y que ciertos residuos básicos están expuestos hacia la superficie (Kern et al., 1999; Almrud et al., 2000). Por otro lado, pese a que AZIN1 ha sido cristalizado como dímero, ha sido detectado en un estado monomérico en condiciones fisiológicas (Albeck et al., 2008). Al igual que ODC, AZIN1 se une a las AZs a través de la región AZBE, pero en este caso la unión a las AZs hace que AZIN1 sea más resistente frente a la degradación proteasomal, probablemente debido a que estas inhiben su ubiquitinación (Bercovich & Kahana, 2004). La interacción entre ODC y AZIN1, con AZ1 ha sido predicha computacionalmente mediante *docking*, siendo los modelos propuestos muy similares en ambos casos (Cohavi et al., 2009). Aunque las secuencias de aminoácidos de la región AZBE de ODC y AZIN1 son muy similares, se ha descrito que las diferencias en los residuos 125 y 140 son críticas para la distinta afinidad hacia las AZs (Liu et al., 2011a).

En comparación con ODC y AZIN1, los datos sobre los aspectos moleculares de la interacción entre AZIN2 y AZ1 son muy escasos, probablemente debido a la carencia de información sobre la estructura de AZIN2. El objetivo de este capítulo es analizar las propiedades estructurales y funcionales de AZIN2, así como su papel en la interacción con las AZs, utilizando para ello técnicas bioquímicas y estrategias computacionales.

1.1. Estudios bioquímicos sobre la estructura cuaternaria de AZIN2.

Para este propósito se usaron extractos de células HEK 293T transfectadas con AZIN2-FLAG, y se compararon los resultados con aquellos obtenidos para ODC-FLAG bajo las mismas condiciones experimentales. Se realizaron experimentos de *cross-linking* con diferentes agentes y posterior análisis de los productos mediante PAGE y Western blot, análisis electroforético en condiciones no desnaturizantes, y cromatografía de permeación en gel.

Los análisis mediante *cross-linking* mostraron claramente la presencia de dímeros de ODC, si bien en el caso de AZIN2 la banda del dímero no fue detectada (Fig. 1A). Además, tras la reacción de *cross-linking* la banda del monómero desapareció prácticamente, detectándose en cambio especies de peso molecular mayor que el del hipotético homodímero (Fig. 1A). Puesto que en este sistema AZIN2 se localiza en el compartimento intermedio Golgi-retículo endoplásmico (ERGIC) y en la red trans-Golgi (TGN) (López-Contreras et al., 2009b; Kanerva et al., 2010), estas bandas de mayor peso molecular podrían corresponderse a complejos formados por el monómero de AZIN2 con proteínas de la membrana del ERGIC o del Golgi. Es interesante destacar, como muestra la Fig. 1A, que cuando AZIN2 se co-transfectó con AZ1, AZIN2 se detectó principalmente como monómero, probablemente debido a que la sobreexpresión de AZ1 previene la unión de AZIN2 a dichas proteínas de membrana. Para corroborar la existencia de AZIN2 como monómero en condiciones fisiológicas, se realizaron otros experimentos en los que se analizaron y compararon mediante electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE) en condiciones no desnaturizantes extractos celulares de células transfectadas con AZIN2 y ODC. La Fig. 1B muestra que mientras que en el caso de ODC se encontraron dos bandas, que corresponderían muy probablemente con las formas monoméricas y diméricas de ODC, únicamente la banda de menor peso molecular se detectó en el caso de AZIN2. Además, se analizaron los extractos de células transfectadas con AZIN2 y ODC mediante cromatografía de exclusión molecular. La Fig. 1C muestra que el patrón de elución de ODC y AZIN2 a través de la columna fue distinto, ya que mientras que ODC migró principalmente como dímero, AZIN2 migró solamente como monómero.

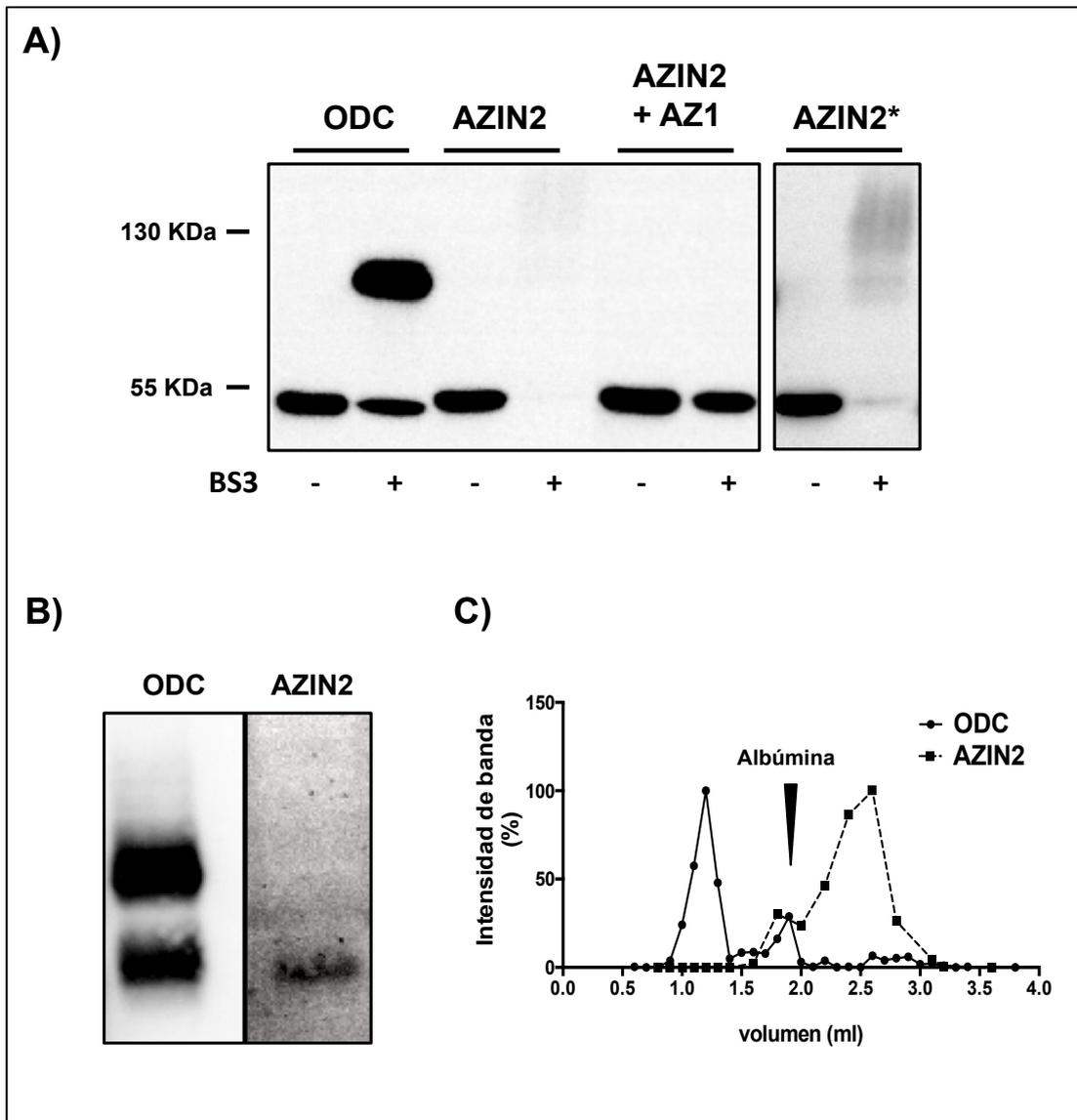


FIGURA 1. Estudios bioquímicos de la estructura cuaternaria de AZIN2 en células transfectadas. (A) Análisis mediante *cross-linking* de lisados de células transfectadas con ODC y AZIN2. Las células HEK 293T se transfectaron transitoriamente con ODC-FLAG o AZIN2-FLAG, o se co-transfectaron con AZIN2-FLAG y AZ1, y los lisados se incubaron con BS3 1 mM durante 1 hora. Las proteínas fueron entonces separadas por SDS-PAGE e incubadas con anticuerpo anti-FLAG. El asterisco (*) indica mayor exposición. (B) Patrón de migración de ODC-FLAG y AZIN2-FLAG en condiciones nativas mediante PAGE en condiciones no desnaturalizantes e incubación con anticuerpo anti-FLAG. (C) Cromatograma de exclusión por tamaño molecular de AZIN2-FLAG comparado con ODC-FLAG y albúmina de suero bovino. Las células HEK 293T transfectadas con ODC-FLAG o AZIN2-FLAG se lisaron en tampón de solubilización y centrifugaron a 14000xg durante 20 minutos, y el sobrenadante se inyectó directamente en una columna Zorbax Bio Series GF-250 (Agilent Technologies, CA, USA) previamente calibrada en un tampón que contenía Tris-HCl 50 mM, EDTA 1 mM, fosfato de piridoxal 4 mM e Igepal 0.1%. Tras la inyección se recogieron sesenta fracciones de 100 μ l que se analizaron por Western blotting e incubación con anticuerpo anti-FLAG. Como estándar se utilizó albúmina de suero bovino (66 KDa), pero en este caso las fracciones se separaron por SDS-PAGE y el gel se tificó con azul de Coomassie.

Puesto que todos estos resultados apuntan a que AZIN2 es incapaz de formar homodímeros, al contrario que ODC, se estudió si AZIN2 podía formar heterodímeros con ODC. Para ello se llevaron a cabo experimentos de inmunoprecipitación usando

células co-transfectadas con AZIN2 marcada con el epítipo FLAG (AZIN2-FLAG) y con ODC marcada con el epítipo hemaglutinina (ODC-HA) o el epítipo FLAG (ODC-FLAG). La Fig. 2A muestra que en células co-transfectadas con ambas construcciones de ODC se pudieron detectar dímeros formados por los monómeros ODC-HA y ODC-FLAG. Sin embargo, mediante esta técnica no se encontraron evidencias de la formación de heterodímeros entre AZIN2 y ODC en células co-transfectadas con AZIN2-FLAG y ODC-HA. Esta incapacidad para heterodimerizar AZIN2 con ODC se vio apoyada por las medidas de actividad ODC en los extractos de las células transfectadas. Así, no se detectó ninguna disminución de la actividad ODC tras la co-transfección con AZIN2 (Fig. 2B), como podría esperarse si AZIN2, carente de actividad enzimática (López-Contreras et al., 2006; Kanerva et al., 2008), hubiera formado dímeros con ODC. Por el contrario, se observó un aumento de la actividad ODC, atribuible a la unión de AZIN2 a las antizimas endógenas.

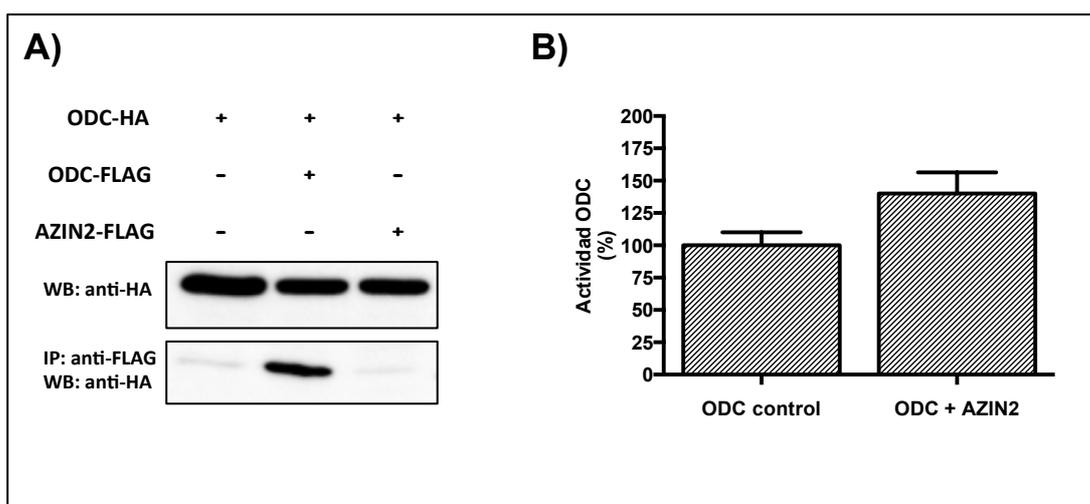


FIGURA 2. El monómero de AZIN2 no interacciona con ODC *in vivo*. (A) Las células fueron transfectadas con ODC-HA en presencia de ODC-FLAG o AZIN2-FLAG. Los lisados celulares se inmunoprecipitaron con esferas de agarosa anti-FLAG M2 (monoclonal) durante 3 horas. Tras los lavados, las proteínas eluidas fueron analizadas mediante SDS-PAGE e incubación con anticuerpo anti-HA. (B) Actividad ODC en células transfectadas con ODC en presencia y ausencia de AZIN2. Las células HEK 293T se transfectaron con ODC o se co-transfectaron con ODC y AZIN2. Tras la transfección se determinó la actividad ODC en los extractos celulares como se describió previamente en la sección “Materiales y métodos”.

1.2. Predicción de la estructura tridimensional de AZIN2 de ratón mediante modelado por homología.

La estructura 3D de ODC murina, humana o de *T. brucei* (Kern et al., 1999; Almrud et al., 2000; Grishin et al., 1999) ha sido previamente caracterizada. En todos los casos la estructura está formada por dos dominios bien definidos: un barril α/β tipo TIM,

formado por ocho hélices α y ocho láminas β , y un dominio hoja plegada β . Debido a que ODC cristaliza como dímero, los residuos presentes en la interfaz entre los monómeros han sido bien caracterizados (Kern et al., 1999). Asimismo, la estructura 3D de AZIN1 de ratón ha sido recientemente determinada (Albeck et al., 2008). Aunque AZIN1 cristalizaba como dímero, experimentos posteriores demostraron que AZIN1 existe como monómero en condiciones fisiológicas (Albeck et al., 2008). Por otra parte, poco se conoce sobre la estructura 3D de AZIN2, ya que no se ha conseguido cristalizar. Sin embargo, debido a la alta similitud de secuencia de AZIN2 con ODC y AZIN1 (48% y 38% de identidad de secuencia, respectivamente), AZIN2 es un excelente candidato para ser modelado mediante modelado comparativo.

Para ello, la secuencia completa de AZIN2 de ratón se introdujo en el servidor *Genesilico* (Kurowski & Bujnicki, 2003). Los métodos de reconocimiento de plegado de proteínas (*protein fold-recognition*) detectaron que las proteínas más cercanas evolutivamente con estructura conocida fueron la ODC de ratón (código PDB: 7odc) y la AZIN1 de ratón (código PDB: 3btn), como era de esperar. Teniendo en cuenta que las estructuras tridimensionales de ambas proteínas mostraban regiones sin determinar (bucles 30-35, 158-168 y 298-311, y los últimos 37 residuos de la región terminal en ODC, y la región N-terminal 1-7, bucles 160-167, 294-310 y 330-334, y los últimos 13 residuos de la región C-terminal en AZIN1), se realizó el modelado comparativo usando tanto ODC como AZIN1 como moldes. El modelo preliminar de AZIN2 se generó mediante el programa automatizado para modelado de proteínas *Modeller* (Sali & Blundell, 1993), y se evaluó con *MetaMQAPII* (Pawlowski et al., 2008). Dado que la evaluación mostró que existían regiones con bajas puntuaciones (dos bucles comprendidos entre los residuos 160-167 y 298-310, y 13 residuos del N-terminal, es decir, las regiones sin determinar tanto en ODC como en AZIN1), el modelo fue objeto de optimización local mediante *Refiner* (Boniecki et al., 2003). El modelo final resultante (Fig. 3A, 3B) obtuvo muy buenas puntuaciones tras la evaluación con *ProQ* (Wallner et al., 2003) y *MetaMQAPII*, indicativo de que la calidad del modelo es alta. La Fig. 3C muestra la estructura 3D predicha de AZIN2 en la que los residuos 70-110, que forman parte de un dominio importante para la localización subcelular de AZIN2 (López-Contreras et al., 2009b), y 111-145, que incluye la región AZBE, se destacan en rojo y amarillo, respectivamente. Al igual que ODC y AZIN1, en AZIN2 la región AZBE está formada principalmente por dos hélices α y una hoja β , todos incluidos en un barril α/β tipo TIM. Además, la región formada por los residuos 70-110 se encuentra también incluida entre dos hélices α y una hoja β del barril α/β .

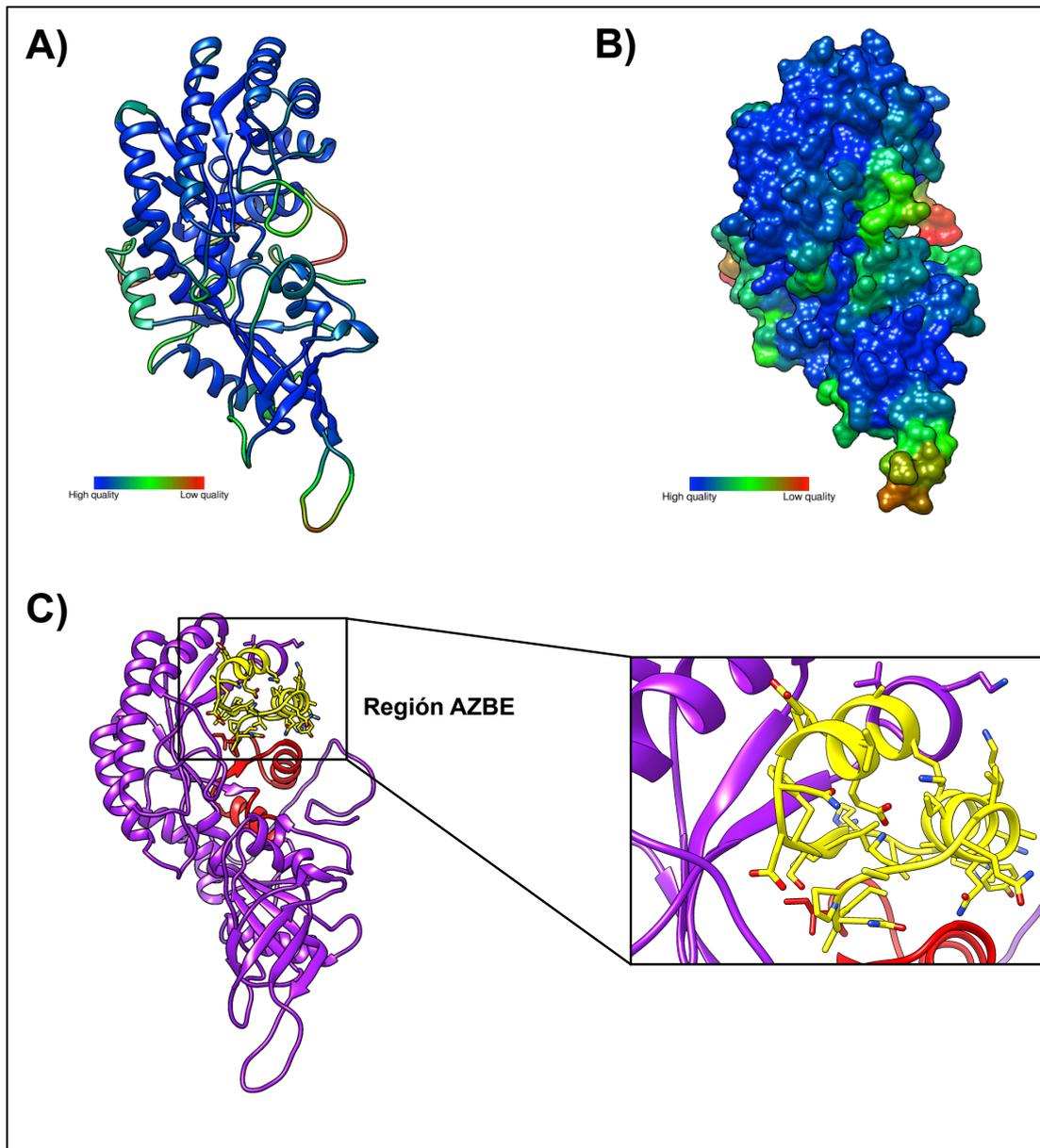


FIGURA 3. Modelo estructural de AZIN2 de ratón. En la fila superior se presenta el modelo final generado mediante modelado comparativo en representación de cintas (A) y superficie (B) y coloreado de acuerdo con la desviación local predicha a partir de la estructura real (es decir, el error del modelo), calculada por *MetaMQAPII*: en azul se indica una baja desviación de los átomos $C\alpha$ por debajo de 0 Å, en rojo se indica las regiones poco fiables con desviación >5 Å, en verde se indican valores intermedios. (C) Estructura terciaria predicha de AZIN2 en representación de cintas con la región AZBE en amarillo y la región N-terminal formada por los residuos 70-110 en rojo. Las cadenas laterales de los aminoácidos incluidos en la región AZBE (111-145) también se mostraron y se colorearon de acuerdo con el tipo de átomo (rojo, oxígeno; azul, nitrógeno).

1.3. Análisis comparativo de la secuencia del elemento de unión a antizimas (AZBE) de AZIN2 en distintos organismos eucariotas.

A pesar de que se ha descrito que AZIN2 interacciona con los tres tipos de AZs (López-Contreras et al., 2006), existen pocos datos sobre los aspectos moleculares de esta interacción. Como se comentó anteriormente, en ODC la región AZBE es un elemento estructural importante implicado en la unión a las AZs. Esta región fue inicialmente identificada mediante la comparación de la ODC de *T. brucei*, una isoforma que no está regulada por AZs, con la ODC de ratón (Li & Coffino, 1992). Esta región está comprendida entre los residuos 117-140 de la ODC de ratón. En un trabajo previo de nuestro grupo se demostró que la delección de esta secuencia en AZIN2 elimina la capacidad de esta proteína de estimular la captación de poliaminas, presumiblemente porque esta variante no interacciona con las AZs (López-Contreras et al., 2008). Para determinar los posibles residuos de la región AZBE de AZIN2 implicados en la interacción con AZs, se determinaron los aminoácidos conservados de esta región usando un análisis de alineamiento múltiple de secuencias AZBE de distintos organismos eucariotas. Para ello se analizó la conservación de la secuencia de diferentes ortólogos de AZIN2 disponibles en la base de datos de genomas ENSEMBL. Mediante este análisis se encontró que en la secuencia AZBE consenso sólo siete residuos están completamente conservados entre especies (Fig. 4A). Análisis similares de los ortólogos de ODC y AZIN1 también revelaron residuos invariantes entre especies (Fig. 4B, 4C). La comparación de residuos invariantes entre las tres proteínas mostró que únicamente cinco de ellos se encuentran conservados entre ortólogos y parálogos: los correspondientes a K116, A124, E139, L140 y K142 de AZIN2 de ratón (Fig. 5A).

A) Inhibidor de antizimas 2 (AZIN2)

Homo sapiens	CANPCKQIAQIKYAAKHGVRLLSFDNEVELAKV
Nomascus leucogenys	CANPCKQIAQIKYAAKHGIRLLSFDNEMELAKV
Gorilla gorilla	CANPCKQIAQIKYAAKHGIQLLSFDNEMELAKV
Macaca mulatta	YANPCKQIAQIKYAAKHGIQLLSFDNEMELAKV
Callithrix jacchus	YANPCKQIAQIKYAAKRGIQLLSFDNEMELAKV
Pongo abelii	CANPCKQIAQIKYAAKHGIRLLSFDNEMELAKV
Mus musculus	CANPCKQVAQIKYAAKHGVRLLSFDNEVELAKV
Rattus norvegicus	CANPCKQVAQIKYAAKHGVRLLSFDNEVELAKV
Spermophilus tridecemlineatus	YANPCKQIAQIKYAAKHGVRLLSFDNEMELAKV
Monodelphis domestica	YTSACKQAAQVQKQAAARLGIRMLSDNEVELAKV
Microcebus murinus	YTNPCKQIAQIKYAAKHGIRLLSFDNEMELAKV
Ochotona princeps	YANPCKQIAQIKYAAEHGVQLLSFDNEMELAKV
Dipodomys ordii	YTSACKQIAQIRYAAEHGVQLLSFDNEMELAKV
Sorex araneus	YANPCKQVAQIKYAAKHGVQLLSFDNTLELAKV
Bos taurus	YANPCKQIAHIKYAAKHGVRLLSFDNEMELAKV
Canis familiaris	YANPCKQIAQIKYAAKHGIQLLSFDNEMELAKV
Otolemur garnettii	YTNPCKQIVQIKYAAKHGIRLLSFDNEMELAKV
Ornithorhynchus anatinus	YANPCKQISHIKYAAHGVQVMTFDNEVELAKV
Sus scrofa	YANPCKQIAQIKYAAKHGVQLLSFDNEMELAKV
Cavia porcellus	YANPCKQIAQIKYAAKHGVQLLSFDNEVELAKV
Loxodonta africana	YANPCKQIAQIKYAAKHGVRLLSFDNEMELAKV
Myotis lucifugus	FANPCKQIAQIKYAAKYGIQLLSFDNEMELAKV
Vicugna pacos	YASACKQIAQIKYAAKHGVQLLSFDNEMELAKV
Tursiops truncatus	YANPCKQIAHIKYAAKHGVRLLSFDNEMELAKV
Equus caballus	YANPCKQIAHIKYAAKHGVRLLSFDNEIELAKV
Pteropus vampyrus	YANPCKQIAQIKYAAKHGVQLLSFDNEMELVKV
Ailuropoda metanoleuca	CANPCKQIAQIKYAAKHGVRLLSFDNEVELAKV
Tarsius syrichta	YANPCKQIAQIKYAAKQGIQLLSFDNEMELAKV
Tupaia belangeri	YTNPCKQIAQVRYAAQIRGIQLLSFDNEVELAKV
Meleagris gallopavo	YHHTKPKQSHIKYACTHGINLMTFDSEDELRKI
Taeniopygia guttata	YSSPCKQVAHIRYAAAAGVRLMAFDNEVELSKV
Takifugu rubripes	YHHTKPKQSHIKYACAQGVNLMTFDDEELQKV
Tetraodon nigroviridis	YSSPCKQVAHIKYAASHGVQLMTFDNEVELGKV
Xenopus tropicalis	YANPCKQISQIKFAAKTGVQMMTFDNEVELSKV
Anolis carolinensis	CASPCKQLSLIKYAAASQGVQLMTFDNEVELGKV
Cyona savigny	FANPCKQTSHVRYAKENNIKPVVFDNKEELVKM
Cyona intestinalis	FANPCKQASHVRYARDNNVKRIVFDNVEELIKM
Caenorhabditis elegans	YANPCKTRSFIAHAMDRDVKMMTFDNPEELLKI
Saccharomyces cerevisiae	YANPCKVASFIRYAAASKNVMKSTFDNVEELHKI
Residuos conservados (*)	* * ** ** *
Secuencia consenso	YANPCKQIAQIKYAAKHGVQLLSFDNEVELAKV

B) Ornitina descarboxilasa (ODC)

Homo sapiens	YANPCKQVSQIKYAANNGVQMMTFDSEVELMKV
Pan troglodytes	YANPCKQVSQIKYAANNGVQMMTFDSEVELMKV
Nomascus leucogenys	YANPCKQVSQIKYAANNGVQMMTFDSEVELMKV
Gorilla gorilla	YANPCKQVSQIKYAANNGVQMMTFDSEVELMKV
Macaca mulatta	YANPCKQVSQIKYAANNGVQMMTFDSEVELMKV
Callithrix jacchus	YANPCKQVSQIKYAANNGVQMMTFDSEVELMKV
Pongo abelii	YANPCKQVSQIKYAANNGVQMMTFDSEVELMKV
Mus musculus	YANPCKQVSQIKYAASNGVQMMTFDSEIELMKV
Rattus norvegicus	YANPCKQVSQIKYAASNGVQMMTFDSEIELMKV
Spermophilus tridecemlineatus	YANPCKQVSQIKYASAHGVRMMTFDSEVELMKV
Monodelphis domestica	YANPCKQVSQIKYAANNGVQMMTFDSEVELMKV
Dipodomys ordii	YANPCKQVSQIKYAAGSGVQMMTFDSEVELMKV
Bos taurus	YANPCKQVSQIKYAANNGVQMMTFDSEVELMKV
Canis familiares	YANPCKQVSQIKYASNNGVQMMTFDSEVELMKV
Felis catus	YANPCKQVSQIKYAANNGVQMMTFDSEVELMKV
Oryctolagus cuniculus	YANPCKQVSQIKYAASSGVQMMTFDSEVELMKV
Echinops telfairi	YANPCKQVSQIKYAANNGVQMMTFDSEVELMKV
Otolemur garnettii	YANPCKQVSQIKYAANNGVQMMTFDSEVELMKV
Ornithorhynchus anatinus	YANPCKQVSQIKYAANSNGVQMMTFDSEVELMKV
Erinaceus europaeus	YANPCKQVSQIKYAASNGVQMMTFDSEVELMKV
Cavia porcellus	YANPCKQVSQIKYAASSGVQMMTFDSEVELLKV
Loxodonta africana	YANPCKQVSQIKYAASNGVQMMTFDSEVELMKV
Myotis lucifugus	YANPCKQVSQIKYAANNGVQMMTFDSEVELMKV
Vicugna pacos	YANPCKQVSQIKYAANNGVQMMTFDSEVELMKV
Dasyus novemcinctus	YANPCKQVSQIKYAANNGVEMMTFDSEVELMKV
Tursiops truncatus	YANPCKQVSQIKYAANNGVQMMTFDSEVELMKV
Equus caballus	YANPCKQVSQIKYAANNGVQMMTFDSEVELMKV
Pteropus vampyrus	YANPCKQVSQIKYAANNGVQMMTFDSEVELMKV
Ailuropoda metanoleuca	YANPCKQVSQIKYAANNGVQMMTFDSEVELMKV
Choloepus hoffmanni	YANPCKQVSQIKYAANNGVEMMTFDSEVELMKV
Gallus gallus	YANPCKQLSQIKHAANSNGVRMMTFDSEVELMKI
Meleagris gallopavo	YANPCKQLSQIKHAASSGVQMMTFDSEVELMKI
Taeniopygia guttata	YANPCKQVSQIKHAASSGVQMMTFDSEVELMKV
Dario rerio	YANPCKQVSQIKYASAHGVQMMTFDSEVELMKV
Oryzias latipes	YANPCKQVSQMKYASAHGVEMMTFDSEVELMKV
Gasterosteus aculeatus	YANPCKQVSQIKYASAHGVRMMTFDSEVELMKV
Takifugu rubripes	YANPCKQVSQIKYASAHGVKMMTFDSEVELMKV
Tetraodon nigroviridis	YANPCKQASQIKYAAAHGVQMMTFDSEVELMKV
Xenopus tropicalis	YANPCKQVSQIKYAASCGVEKMTFDSEVELMKV
Anolis carolinensis	YANPCKQVSQIKHAANNGVQMMTFDSEVELMKV
Cyona savigny	YANPCKQVSQIKYAASCGVEKMTFDSEVELMKV
Cyona intestinalis	FANPCKQASHVRYARDNNVKRIVFDNVEELIKM
Caenorhabditis elegans	YANPCKTRSFIAHAMDRDVKMMTFDNPEELLKI
Saccharomyces cerevisiae	YANPCKTRSFIAHAMDRDVKMMTFDNPEELLKI
Residuos conservados (*)	***** * * * ** ** *
Secuencia consenso	YANPCKQVSQIKYAANNGVQMMTFDSEVELMKV

C) Inhibidor de antizimas 1 (AZIN1)

Homo sapiens	YISPCKQVSQIKYAAKVGVNILTCDNEIELKKI
Pan troglodytes	YISPCKQVSQIKYAAKVGVNILTCDNEIELKKI
Nomascus leucogenys	YISPCKQVSQIKYAAKVGVNIMTCDNEIELKKI
Gorilla gorilla	YISPCKQVSQIKYAAKVGVNILTCDNEIELKKI
Macaca mulatta	YISPCKQVSQIKYAAKVGVNIMTCDNEIELKKI
Callithrix jacchus	YISPCKQVSQIKYAAKVGVNIMTCDNEIELKKI
Mus musculus	FTSPCKQVSQIKYAAKVGVNIMTCDNEIELKKI
Rattus norvegicus	YTSPCKQASQIKYAAKVGVNIMTCDNEVELKKI
Spermophilus tridecemlineatus	YISPCKQVSQIKYAAKIGVNIMTCDSEIELKKI
Monodelphis domestica	DISPCKQSSQIKYAAKTGVNIMSCDNEIELKKI
Dipodomys ordii	YISPCKQISQIKYAAKVGVNIMTCDNEIELKKI
Bos taurus	YISPCKQVSQIKYAAKVGVNIMTCDNEVELKKI
Canis familiares	YISPCKQVSQIKYAAKIGVNTMTCDNEVELKKI
Felis catus	YISPCKQVSQIKYAAKIGVNIMTCDNEVELKKI
Oryctolagus cuniculus	YISPCKQASQIKYAAKVGVNIMTCDNEIELKKI
Sorex araneus	YISPCKQVAQIKYAAKVGVNIMTCDNEVELKKI
Otolemur garnettii	YISPCKQVSQIKYAAKIGVNIMTCDNEIELKKI
Ornithorhynchus anatinus	YVSPSKQTSQIKFAAKAGVNIMTCDNEMELKKI
Erinaceus europaeus	YISPCKQVSQIKYAAKAGVNIMTCDNEIELKKI
Cavia porcellus	YISPCKQVSHIKYAAKIGVNIMTCDNEIELKKI
Loxodonta africana	YISPCKQVSQIKYAAKVGVNIMTCDNDVELKKI
Myotis lucifugus	YISPCKQVSQIKYAAKVGVNIMTCDSEVELKKI
Vicugna pacos	YISPCKQVSQIKYAAKVGVTIMTCDNEVELKKI
Tursiops truncatus	YISPCKQVSQIKYAAKVGVNIMTCDNEVELKKI
Equus caballus	YISPCKQVSQIKYAAKVGVNIMTCDNEVELKKI
Pteropus vampyrus	YISPCKQVSQIKYAAKVGVNIMTCDSEVELKKI
Ailuropoda metanoleuca	YISPCKQVSQIKYAAKIGVNIMTCDNEVELKKI
Choloepus hoffmanni	YISPCKQVSQIKYAAKIGVNIMTCDNEIELKKI
Tarsius syrichta	YISPCKQVSQIKYAAKVGVNIMTCDNEIELKKI
Gallus gallus	YTNPCKQASQIKYAAKAGINIMTCDSIELKKI
Meleagris gallopavo	YTNPCKQASQIKYAAKAGINIMTCDSIELKKI
Taeniopygia guttata	YTNPCKQASQIKYAAKAGINIMTCDNDIELKKI
Dario rerio	LSGVCKQLSLIKHAAKTGINFLLCENEAEELRKI
Oryzias latipes	YSGVCKQVSHIKYAAATNGIDLLVCDNEAEELRKI
Gasterosteus aculeatus	YSGICKQVSQIKYAAKNGIDLLVCDNEAEELRKI
Takifugu rubripes	FSGVSKQLSOLKYAAKNGIDLLVCDNEVELCKI
Tetraodon nigroviridis	FSGVSKQLSQMKYAAKNGVDLLVCDNEVELCKI
Xenopus tropicalis	YTNPCKQASQIKHAAKIGVNLMTCDSETELKKI
Anolis carolinensis	FSNPCKQASQIKYAAKTGVNVLTCDNELELKKI
Cyona savigny	FSGVSKQLSQMKYAAKNGVDLLVCDNEVELCKI
Cyona intestinalis	FANPCKQASHVRYARDNNVKRIVFDNVEELIKM
Caenorhabditis elegans	FANPCKQASHVRYARDNNVKRIVFDNVEELIKM
Saccharomyces cerevisiae	YANPCKVASFIRYAASKNVMKSTFDNVEELHKI
Residuos conservados (*)	* * * * *
Secuencia consenso	YISPCKQVSQIKYAAKVGVNIMTCDNEVELKKI

FIGURA 4. Alineamiento múltiple de las secuencias del sitio de unión a AZs (AZBE) de distintos ortólogos de AZIN2 (A), ODC (B) y AZIN1 (C). Las secuencias aminoacídicas de la región AZBE de distintos organismos eucariotas se obtuvieron a partir de la base de datos de genomas ENSEMBL y se alinearon con el programa ClustalW. Los asteriscos representan los residuos conservados en todos los organismos analizados. Los sitios AZBE en mamíferos, en otros vertebrados, y en invertebrados y levaduras se mostraron en azul, verde y rojo respectivamente. En la parte inferior se muestra la secuencia consenso en cada caso, en donde los residuos conservados son destacados con fondo rosa.

Debido al hecho de que se han encontrado varios residuos de ácido glutámico en la región de AZ1 necesaria para la interacción con ODC (Hoffman et al., 2005) y a que el sitio AZBE de ODC contiene varios residuos básicos, podría esperarse algún tipo de interacción electrostática entre AZ1 y ODC. De acuerdo con esta hipótesis, un estudio reciente ha asociado la carga eléctrica de la región AZBE con la interacción ODC-AZ1 (Liu et al., 2011b). En el caso de AZIN2 de ratón la carga total del sitio AZBE es +2, debido a la presencia de cinco residuos básicos y tres ácidos (Fig. 5B). Destaca el hecho de que dos de los residuos conservados sean lisinas cargadas positivamente (K116 y K142) que podrían interaccionar electrostáticamente con los residuos conservados de glutámico de AZ1. Para determinar la influencia de la carga eléctrica sobre la interacción entre AZIN2 y AZ se generaron distintas mutaciones de AZIN2 en las que se sustituyeron los residuos conservados de lisina o glutámico por alanina. Las diferentes substituciones realizadas en AZIN2 se muestran en la Fig. 5C. Como se puede observar se generaron mutaciones simples, dobles y triples de AZIN2 que los que se mantenía (A124S; L140A; E139A/L140A/K142A), reducía (K116A; K142A; K116A/K142A) o aumentaba (E139A; E139A/L140A) la carga eléctrica. Aparte de estos mutantes, se generó un mutante en el que se eliminó la secuencia AZBE completa (DelAZBE).

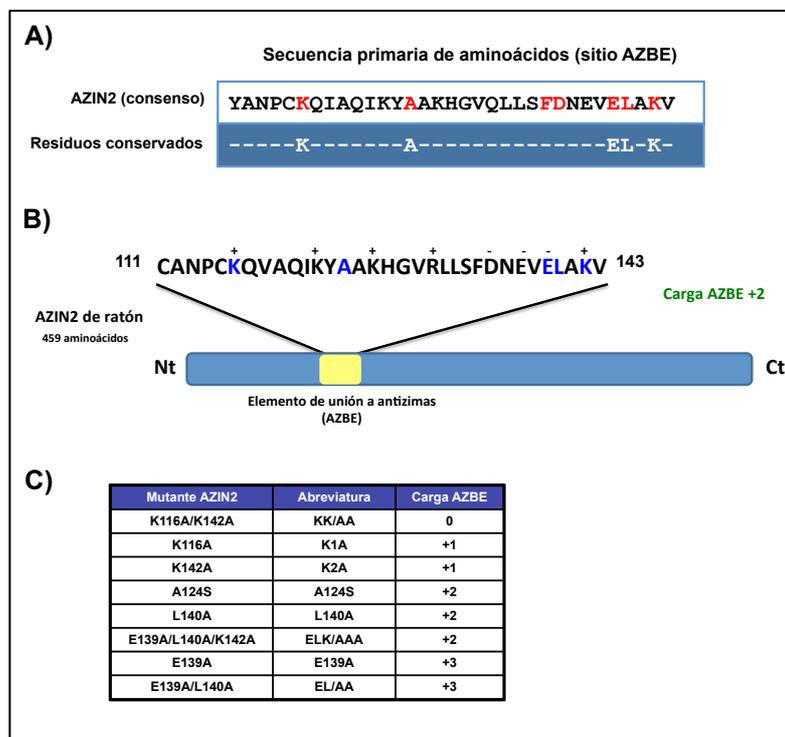


FIGURA 5. Análisis de la región AZBE de AZIN2 de ratón. (A) El alineamiento múltiple de las secuencias de la región AZBE de diferentes ortólogos de AZIN2 reveló ciertos residuos completamente conservados en AZIN2 (en rojo). Cinco de estos residuos también se encontraban conservados en ODC y AZIN1: K116, A124, E139, L140 y K142. (B) Esquema del sitio de unión a AZs en AZIN2 de ratón. Esta región incluye cinco residuos básicos y tres ácidos (en azul), por lo que la carga eléctrica total es positiva (+2). (C) Sustitución de los residuos conservados por alaninas. Influencia sobre la carga eléctrica total de la región AZBE.

1.4. Efecto de la sustitución de los residuos conservados de AZIN2 sobre la interacción con AZ1.

Para cuantificar la interacción directa de AZ1 con AZIN2 se llevaron a cabo experimentos de inmunoprecipitación usando células HEK 293T co-transfectadas con AZ1 y las diferentes variantes de AZIN2. La Fig. 6A muestra que mientras que los mutantes simples K1A y K2A interaccionaron claramente con AZ1, de manera similar a la proteína *wild type* (wt), en el caso del doble mutante KK/AA se detectó una interacción más débil, lo que sugiere que la eliminación de cargas positivas en la región AZBE disminuye la interacción de AZIN2 con AZ1. Además, no se observó señal para la construcción con la región AZBE delecionada (DelAZBE), ya que esta proteína carecía del dominio estructural responsable de la unión a AZs. Para testar si la carga eléctrica de la región AZBE es el único factor responsable para la interacción con AZ1 o si la sustitución de los residuos conservados puede afectar también tal interacción, se estudió la unión de AZ1 al triple mutante ELK/AAA. En este mutante, aunque los residuos conservados E139, L140 y K142 han sido sustituidos por alaninas, la carga neta total en la región AZBE continúa siendo +2. La interacción de este mutante a AZ1 fue marcadamente menor que en el caso de la proteína wt o los mutante simples (Fig. 6A). Este resultado sugiere que no solo la carga puede ser importante para la interacción de AZIN2 con AZ1, si no que la presencia de los residuos conservados también parece ser crítica para tal interacción.

Para confirmar esta hipótesis, se generaron mutaciones adicionales en las que se sustituyeron individualmente los residuos E139 y L140 por alaninas, y A124 por serina. Además, se obtuvo el mutante doble EL/AA para determinar la importancia de ambos residuos respecto a la triple sustitución ELK/AAA en la que K142 también fue mutada. El efecto de estas sustituciones sobre la interacción AZIN2-AZ1 se testó mediante experimentos de inmunoprecipitación (Fig. 6B). El mutante A124S interaccionó claramente con AZ1, de manera similar a la proteína wt, descartando un papel relevante de este residuo en la unión a AZ1. La sustitución de los residuos E139 y L140 por alaninas solo redujo moderadamente la interacción con AZ1. Sin embargo, el doble mutante EL/AA mostró una interacción más débil con AZ1 respecto a los mutantes simples, aunque mayor que el triple mutante ELK/AAA. Destaca el hecho de que los mutantes E139A y EL/AA, pese a tener una carga eléctrica +3, no mostraron una mayor afinidad hacia AZ1. Esto sugiere de nuevo que la sustitución de dos o más residuos conservados en la región AZBE de AZIN2 parece ser un factor más importante que la mera variación de la carga positiva de dicha región para interaccionar con AZ1.

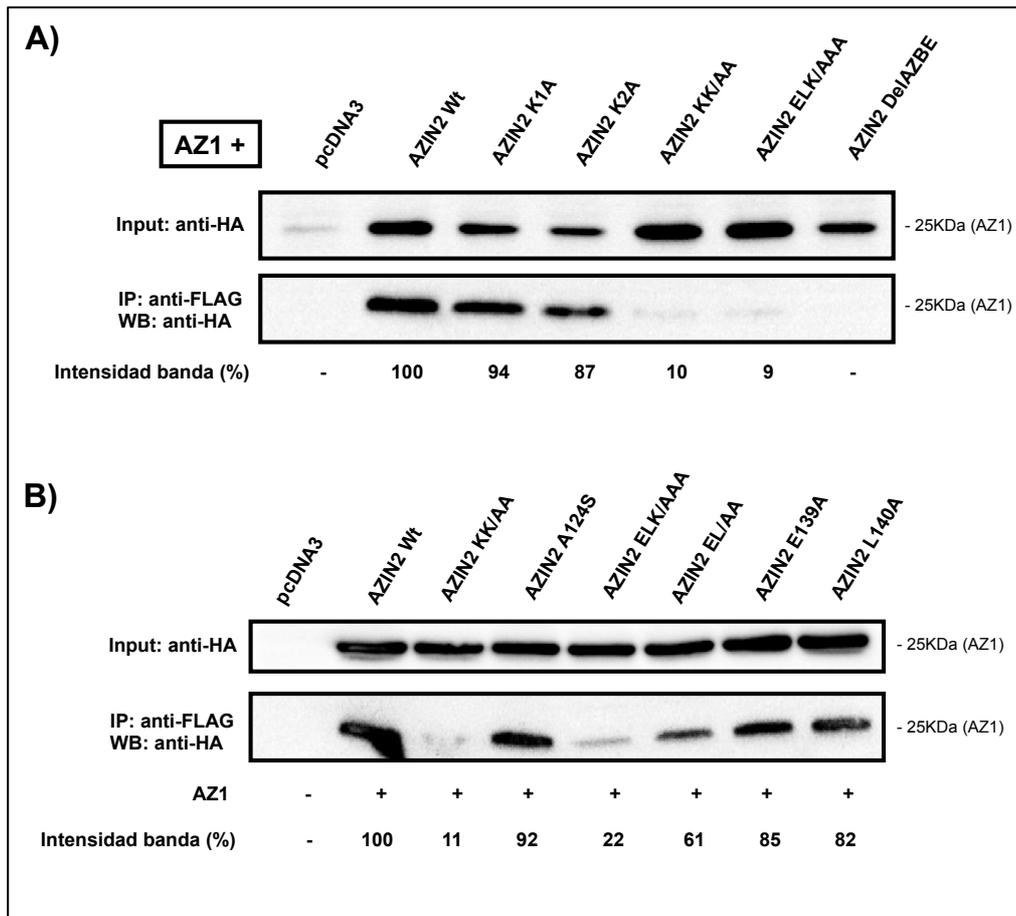


FIGURA 6. Interacción entre los mutantes de AZIN2 y AZ1. (A) Las células HEK 293T se transfectaron con AZIN2-FLAG wt, los mutantes simples K116A y K142A, el doble mutante KK/AA, el triple mutante ELK/AAA y la proteína con la región AZBE deletada (DelAZBE), conjuntamente con AZ1-HA. (b) Células transfectadas con AZIN2-FLAG wt, los mutantes simples A124S, E139A y L140A, los dobles mutantes KK/AA y EL/AA, y el triple mutante ELK/AAA, en presencia de AZ1-HA. Los lisados celulares se inmunoprecipitaron con esferas de agarosa anti-FLAG M2 (monoclonal) durante 3 horas. Tras los lavados, las proteínas eluidas fueron analizadas mediante SDS-PAGE e incubación con anticuerpo anti-HA.

1.4. Efecto de la substitución de los residuos conservados de AZIN2 sobre la actividad ODC y la captación de poliaminas.

En estudios previos sobre la función de AZIN2 se había demostrado claramente que AZIN2 aumenta la actividad ODC y el transporte de poliaminas a través de la inhibición de la AZ endógena (López-Contreras et al., 2006; López-Contreras et al., 2008; Kanerva et al., 2008; Snapir et al., 2008). Para confirmar que la menor capacidad de interacción con AZ1 mostrada por algunos mutantes de AZIN2 afecta a la funcionalidad de la proteína, se transfectaron células HEK 293T o COS7 con diferentes construcciones de AZIN2 y se estudiaron los efectos sobre la actividad ODC y el transporte de poliaminas. La Fig. 7A muestra que mientras que AZIN2 wt aumenta marcadamente la actividad ODC endógena de células HEK 293T, ni el doble mutante KK/AA ni el triple mutante ELK/AAA, con una reducida capacidad de unión a AZs, fueron

capaces de aumentar la actividad ODC endógena. En otro grupo de experimentos, en los que se utilizaron transfecciones dobles y triples, se obtuvieron resultados similares (Fig. 7B). Mientras AZIN2wt evitó el efecto de AZ1 sobre la actividad y niveles de proteína ODC, los mutantes KK/AA y ELK/AAA fueron incapaces de impedir el efecto de AZ1. Finalmente, se ensayó el efecto de AZIN2 y sus mutantes sobre la captación de putrescina en células COS7 transfectadas con AZ3, ya que esta isoforma se expresa mayoritariamente con AZIN2 en el testículo (López-Contreras et al., 2009a). La Fig. 7C muestra que en las células transfectadas con AZIN2 aumentó notablemente la captación de putrescina, contrarrestando el efecto negativo de AZ3 sobre el transporte de poliaminas. El efecto del doble y el triple mutante sobre la captación de putrescina fue mucho menos importante que el producido por AZIN2 wt, lo que está de acuerdo con los estudios anteriormente descritos que sugerían una menor interacción de estos mutantes con AZ1.

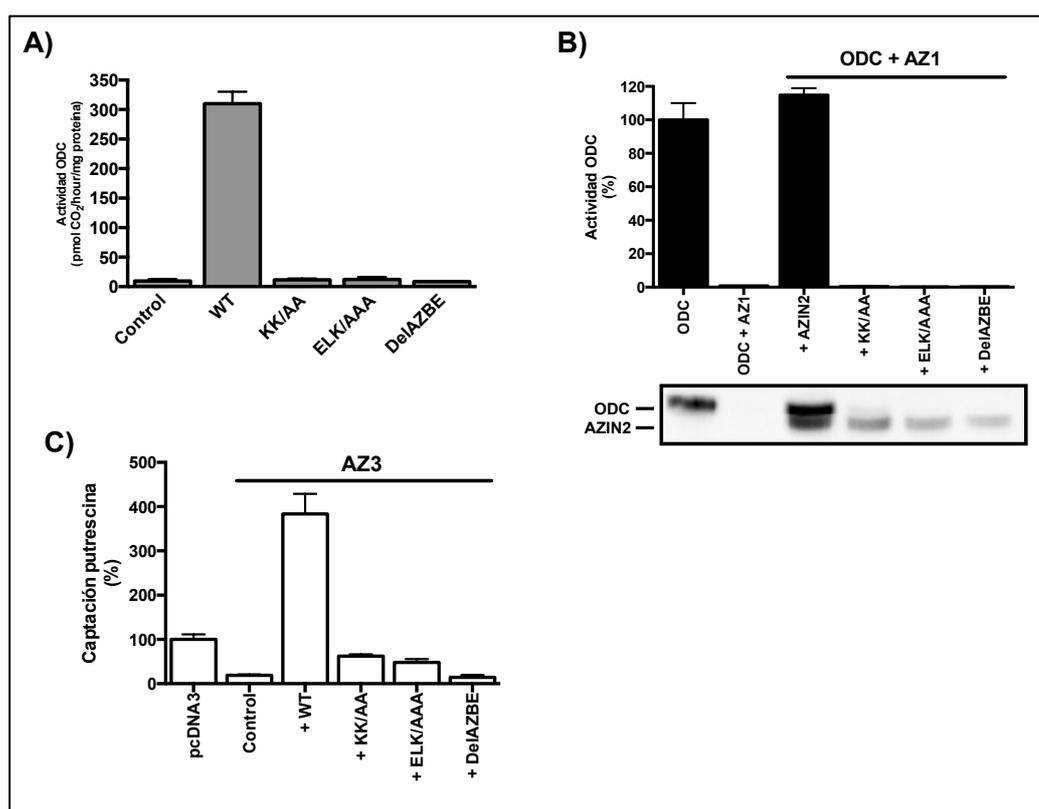


FIGURA 7. Efecto de las mutaciones en los residuos conservados de la región AZBE de AZIN2 sobre la actividad ODC y captación de putrescina. (A) Actividad ODC endógena en células HEK 293T transfectadas con AZIN2 wt y los mutantes KK/AA, ELK/AAA y DelAZBE. (B) Actividad y niveles de proteína ODC en células transfectadas con diferentes combinaciones de ODC, AZ1 y AZIN2 (wt y mutantes KK/AA, ELK/AAA y DelAZBE). La relación molar ODC/AZIN2/AZ de las diferentes construcciones fue 10:10:1. (C) Captación de putrescina en células COS7 transfectadas con AZ3 o co-transfectadas con AZ3 y AZIN2 (wt y mutantes KK/AA, ELK/AAA y DelAZBE). Las células del grupo control fueron transfectadas con plásmido vacío (pcDNA3). Los datos se expresan como la media \pm S.E. de determinaciones por triplicado. En cada caso se usó un pocillo para medir los niveles de proteína de AZIN2 mediante Western Blotting e incubación con anticuerpo anti-FLAG.

DISCUSIÓN

A pesar de que tanto los inhibidores de antizimas (AZIN1 y AZIN2) como ODC comparten una alta similitud de secuencia y la capacidad de unir a antizimas, existen muchas diferencias entre estas tres proteínas homólogas. De hecho, mientras ODC posee actividad descarboxilante de ornitina, los inhibidores de antizimas no muestran actividad catalítica (Murakami et al., 1996; López-Contreras et al., 2006). Además, ODC es una de las pocas proteínas de mamífero que se degrada a nivel proteasomal sin ubiquitinación (Hoyt & Coffino, 2004), mientras que la degradación de los inhibidores de antizimas en el proteasoma sí requieren ubiquitinación previa (Bercovich & Kahana, 2004; Snapir et al., 2008). El conocimiento de la estructura terciaria y cuaternaria de una proteína es fundamental para la comprensión de su mecanismo de acción. En células de mamíferos, las forma monomérica y dimerica de ODC están en equilibrio, aunque solo el homodímero es catalíticamente activo (Solano et al., 1985). Además, únicamente el monómero de ODC es capaz de unirse a las antizimas, siendo esta etapa requerida para su degradación en el proteasoma (Murakami et al., 2000). Aunque la estructuras cristalinas de ODC y AZIN1 han sido dilucidadas (Kern et al., 1999; Almrud et al., 2000; Albeck et al., 2008), y ambas proteínas cristalizan como dímeros, en disolución AZIN1 existe como monómero (Albeck et al., 2008).

Nuestros resultados de filtración en gel, electroforesis en condiciones no disociantes y *cross-linking* claramente indican que AZIN2 se encuentra presente mayoritariamente como monómero, al menos en extractos de células transfectadas. Los experimentos de *cross-linking* también apoyaron que el monómero de AZIN2 podría estar en contacto con otras proteínas celulares, lo que estaría de acuerdo con resultados previos que habían mostrado que AZIN2 está asociado a membranas del Golgi (López-Contreras et al., 2009b; Kanerva et al., 2010). Además, el hecho de que la co-transfección con AZ1 anulara el *cross-linking* de AZIN2 con estas proteínas, podría deberse a que la unión de AZ1 con AZIN2 esté impidiendo la interacción de AZIN2 con estas proteínas diana. Estos resultados estarían también de acuerdo con los descritos en anteriores experimentos de co-transfección en los que se demostró que la localización subcelular de AZIN2 está influenciada por la presencia de antizimas, induciendo éstas la translocación desde estructuras membranosas relacionadas con ERGIC al citosol (López-Contreras et al., 2009b).

Nuestros resultados revelan no sólo la incapacidad de AZIN2 para formar homodímeros, en claro contraste con ODC y AZIN1, sino también la nula tendencia a heterodimerizar con ODC, a pesar de la analogía de secuencia entre ambas proteínas. Si bien, la distinta capacidad de ODC y AZIN1 para formar dímeros ha sido explicada por las diferencias en cuatro residuos esenciales en la interfaz de contacto entre los

monómeros AZIN1 (Su et al., 2009), en el caso de AZIN2 estos residuos son similares a los de ODC, lo que sugiere que en AZIN2 existen otros elementos estructurales responsables de su incapacidad de formar dímeros.

En relación con la estructura 3D de AZIN2 predicha mediante modelado comparativo, usando las estructuras conocidas de ODC y AZIN1 como moldes, el modelo final fue muy similar al de ODC y AZIN1 de ratón, principalmente en los dos principales dominios (barril α/β tipo TIM y dominio hoja plegada β), aunque mostró ciertas diferencias en las regiones menos conservadas, entre las que se incluyen las regiones N-terminal y C-terminal, así como algunos bucles. Es de destacar que las diferencias estructurales en las regiones N-terminal y C-terminal entre AZIN2 y ODC, pudieran explicar las diferencias en la localización subcelular de estas proteínas homólogas, AZIN2 asociada a Golgi y ODC en citosol (López-Contreras et al., 2009b), y en la degradación, ya que la secuencia C-terminal de ODC es crítica para la interacción con el proteasoma y su posterior degradación (Li & Coffino, 1993).

Con relación a la posible implicación de los residuos de la región AZBE de AZIN2 en su interacción con las antizimas, es de destacar que no todos los residuos conservados en los diferentes ortólogos de AZIN2 parecen desempeñar un papel fundamental. De acuerdo con nuestros datos, la sustitución de un solo residuo conservado de la región AZBE de AZIN2 no parece afectar de manera importante la interacción con AZ1, independientemente de la influencia de la sustitución sobre la carga eléctrica del AZBE (disminuida en el caso de K116A o K142A, mantenida en A124S, o aumentada en E139A; ver Fig. 5C). Sin embargo, las sustituciones dobles o triples de residuos conservados redujeron marcadamente la interacción de AZIN2 con AZ1, independientemente de los efectos de las sustituciones sobre la carga eléctrica neta de la región AZBE. Estos resultados sugieren que los residuos conservados cargados en la región AZBE de AZIN2 son importantes para la interacción con AZs, independientemente de la carga eléctrica neta de la región.

En conclusión, nuestros resultados indican que AZIN2 es una proteína, con una estructura terciaria similar a la de ODC y AZIN1, en la que ciertos residuos conservados son importantes para su interacción con AZs, pero que a diferencia con aquellas no forma homodímeros ni heterodímeros. También es de destacar que AZIN2 parece interaccionar con otras proteínas, estando dicha interacción afectada por la presencia de antizimas. Ya que estudios recientes han postulado que AZIN2 podría tener un papel en células secretoras (Kanerva et al., 2009; Kanerva et al., 2010), el conocimiento sobre los diversos aspectos estructurales de la proteína podría ayudar a una mejor comprensión de los mecanismos moleculares por los que AZIN2 podría participar en la secreción o en otros procesos celulares todavía sin identificar.

- Capítulo 5 -

Análisis mutacional de aminoácidos conservados en el elemento de unión a antizimas de ornitina descarboxilasa

Es bien conocido que mientras que la ODC de mamíferos tiene una vida media corta, la enzima del parásito *T. brucei* es más estable, estando esta discrepancia principalmente relacionada con dos hechos: diferencias en la región C-terminal y que la ODC de *T. brucei* no interacciona con las antizimas (Ghoda et al., 1990; Li & Coffino, 1992). Estudios previos en los que se usaron proteínas ODC quiméricas ratón-tripanosoma demostraron que el locus responsable de la unión entre ODC y las AZs era una región localizada entre los residuos 117-140 de la ODC murina (Li & Coffino, 1992). Esta región, denominada elemento de unión a antizimas (AZBE), es altamente homóloga entre ODC, AZIN1 y AZIN2 (López-Contreras et al., 2010). Aunque la sustitución de este locus en ODC de ratón por la secuencia correspondiente de ODC de *T. brucei* o su delección total provoca que ODC no interaccione con AZ1, los residuos implicados en esta interacción no han sido totalmente caracterizados. La comparación entre las secuencias de la región AZBE de la ODC ratón y la de *T. brucei* reveló doce residuos no conservados (Val117, Gln119, Ala124, Ser125, Asn126, Gln129, Met130, Ser135, Glu136, Ile137, Met140, Arg144 and Ala145), potencialmente asociados con la diferente capacidad de interacción de dichas enzimas con AZ. De hecho, en la ODC de ratón la sustitución de todos estos residuos por los correspondientes de *T. brucei* provocó la pérdida de interacción (Mamroud-Kidron et al., 1994; Bercovich & Kahana, 2004). Más recientemente se ha demostrado que la sustitución de sólo tres de estos residuos (Gln119, Val137 y Met140) en la ODC humana por los correspondientes aminoácidos de *T. brucei* es crítica para la unión a AZ (Liu et al., 2011a). Estudios adicionales sobre el sitio AZBE de la ODC humana mostraron también que el cambio de los residuos Asn125 y Met140 por los aminoácidos correspondientes de su parálogo AZIN1 aumentaba la afinidad de ODC hacia AZ1 (Liu et al., 2011b). En todos estos estudios, se analizó la influencia de los residuos no conservados en las regiones AZBE entre las ODCs de *T. brucei* y mamíferos sobre la unión diferencial a AZ1. Sin embargo, existe poca información sobre los residuos conservados en esta región y su posible influencia sobre las propiedades de ODC.

El objetivo del presente capítulo se centra en estudiar la influencia de los residuos invariantes en la región AZBE de ODC y sus parálogos AZIN1 y AZIN2 en distintas especies eucariotas (descritos en el capítulo 1), sobre la interacción entre ODC y AZ, así como sobre otros aspectos relacionados con la funcionalidad de ODC.

2.1. Alineamiento múltiple de secuencias de las regiones AZBE de ODC, AZIN1 y AZIN2 de distintos organismos eucariotas.

La comparación de las secuencias AZBE consenso de ODC, AZIN1 y AZIN2 (ver capítulo 1) reveló la existencia de cinco aminoácidos conservados comunes entre las tres proteína parálogas (Fig. 1A). En la secuencia de la región AZBE de la ODC de ratón estos residuos corresponden a lisina 115, alanina 123, glutámico 138, leucina 139 y lisina 141 (Fig. 1B). De acuerdo con la estructura terciaria de la región AZBE de la ODC humana (Almud et al., 2000), cuatro de los residuos conservados (A123, E138, L139 y K141) están localizados en dos hélices alfa (H5 y H6), mientras que K115 está en la conexión de una lámina beta (B6) y una hélice alfa (H5) (Fig. 1C). Para investigar la importancia de estos residuos conservados en la funcionalidad de ODC, se llevaron a cabo análisis mutacionales, sustituyendo K115, E139, L139 y K141 por alanina, y A123 y L139 por serina. Aparte de las mutaciones simples, también se generaron los dobles mutantes K115A/K141A y E138A/L139S.

2.2. Influencia de las mutaciones de residuos conservados de la región AZBE sobre la interacción entre ODC y AZ1.

Para analizar la implicación de los residuos conservados en la unión entre ODC y AZ, se estudió la degradación de las enzimas mutantes en presencia de AZ1, ya que es conocido que AZ1 acelera el proceso de degradación de ODC por el proteasoma tras la unión al monómero de ODC (Murakami et al., 1992; Li & Coffino, 1993). La Fig. 2A muestra que mientras que el doble mutante K115A/K141A fue degradado por AZ1 tan eficientemente como en el caso de la proteína *wild type* (wt), la doble sustitución de E138 y L139 por alanina y serina, respectivamente, anuló la degradación de ODC, de forma similar a lo observado en el caso del mutante con la región AZBE delecionada (Δ AZBE). En el caso del doble mutante de E138 y L139, para discriminar si solo uno de los residuos o ambos eran responsables de los efectos observados, se realizaron experimentos de co-transfección de AZ1 con cada uno de los mutantes simples (E138A, L139A o L139S) o el doble mutante (E138A/L139S). La Fig. 2B muestra la existencia de diferencias claras entre los mutantes de E138 y L139. Mientras que en presencia de AZ1 el mutante E138A se degradó de manera similar a la enzima wt, los mutantes L139A y L139S fueron resistentes. Esto sugiere que el residuo L139 pudiera ser crítico para interacción ODC-AZ. Finalmente, la degradación del mutante A123S también se estimuló por AZ1, aunque mostró ser más resistente a la acción de AZ1 que la enzima wt (Fig. 2C).

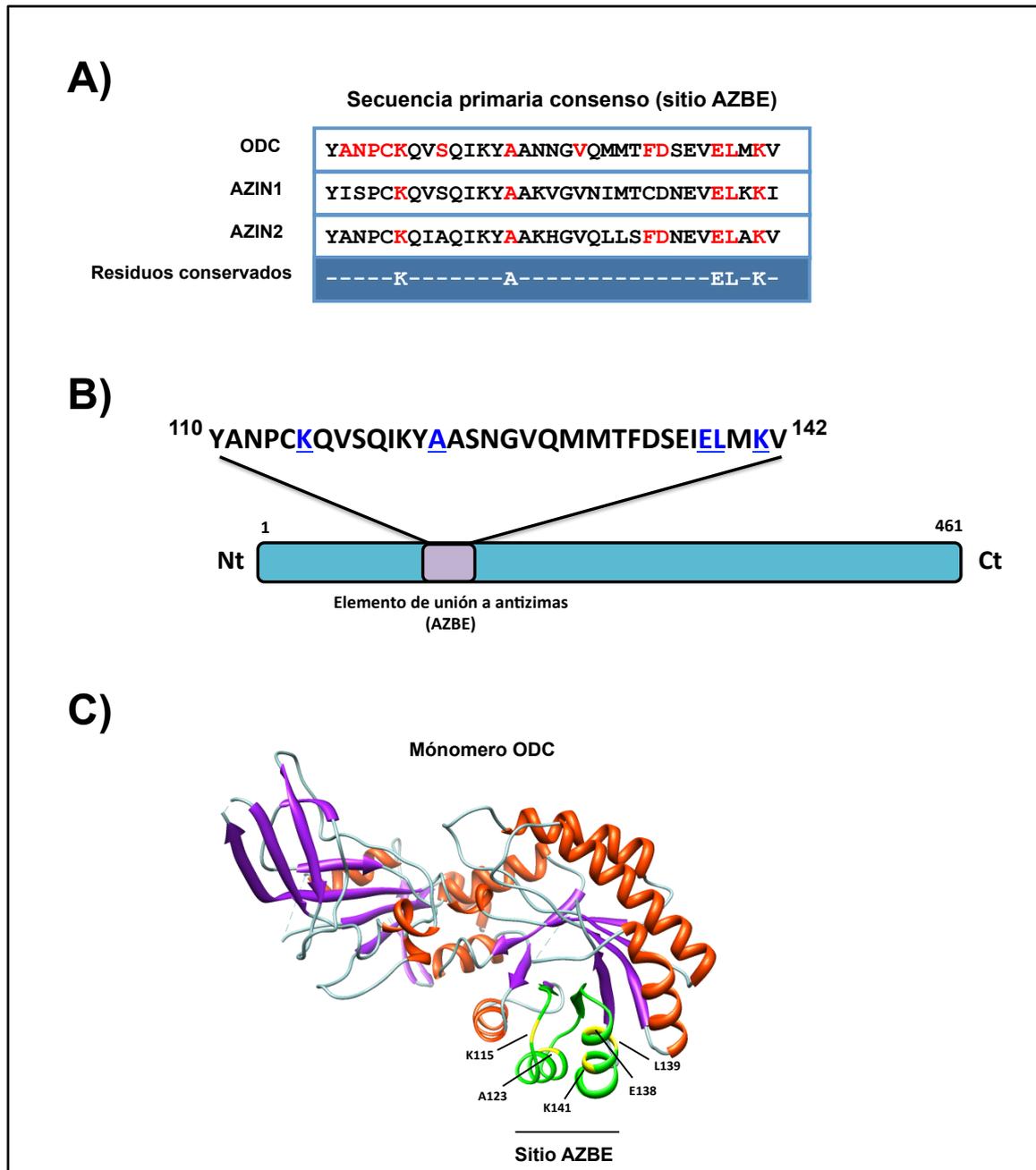


FIGURA 1. Análisis del elemento de unión a AZs (AZBE) de ODC. (A) El alineamiento múltiple de las secuencias aminoacídicas del AZBE de diferentes ortólogos reveló varios residuos completamente conservados en ODC, AZIN1 y AZIN2 (en rojo). Los residuos más frecuentes en otras posiciones se muestran en negro. Cinco de estos residuos se encuentran también conservados entre parálogos: K115, A123, E138, L139 y K141. (B) Esquema de la secuencia de la región AZBE en la ODC de ratón. (C) Estructura del monómero de ODC. La imagen fue generada usando el programa UCSF Chimera a partir de los datos disponibles en el "Protein Data Bank" (código PDB para ODC humana: 1d7k). El sitio AZBE, localizado entre los residuos 110-145, se muestra en verde. Los residuos invariantes se muestran en amarillo.

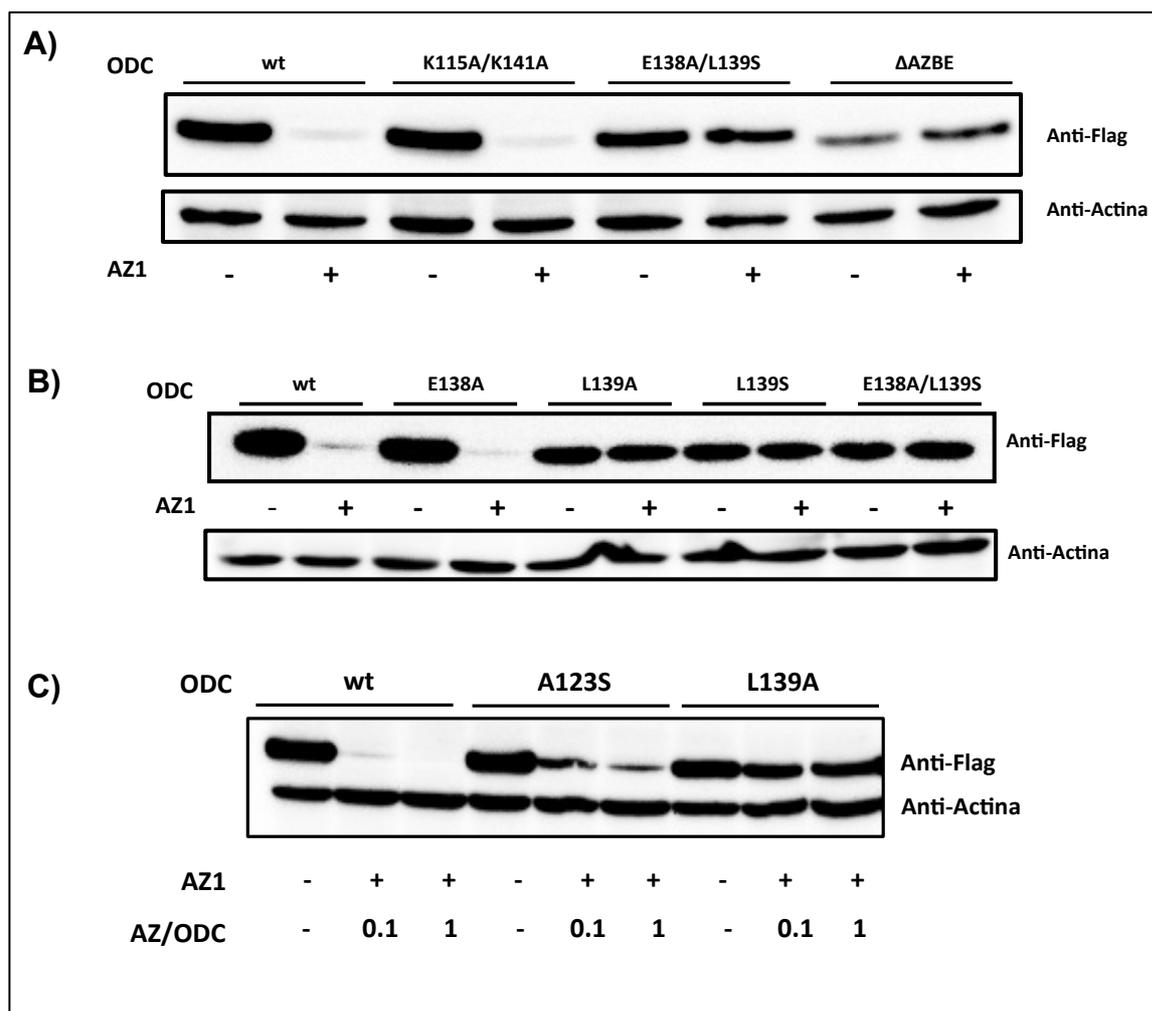


FIGURA 2. Influencia de la sustitución de los residuos conservados de la región AZBE sobre la degradación de ODC mediada por AZ1. (A) Células HEK 293T transfectadas con ODC-Flag wt, los dobles mutantes KK/AA y EL/AS, y la construcción con el AZBE deletado (Δ AZBE) o co-transfectadas con AZ1 (relación molar AZ1/ODC de 0.1). (B) Células HEK 293T transfectadas con ODC-Flag wt, los mutantes simples E138A, L139A y L139S, y el doble mutante EL/AS o co-transfectadas con AZ1 (relación molar AZ1/ODC de 0.1). (C) Células HEK 293T transfectadas con ODC-Flag wt y los mutantes simples A123S y L139A o co-transfectadas con AZ1 (relaciones molares AZ1/ODC de 0.1 y 1). Los niveles de proteína ODC se detectaron por Western blot de extractos celulares e incubación con anticuerpo anti-Flag. Los controles de carga se realizaron usando el anticuerpo anti-actina. Los resultados son representativos de tres experimentos independientes.

Para corroborar la pérdida de interacción entre ODC y AZ1 en el caso de la mutación del residuo L139 de la ODC de ratón, se llevaron a cabo experimentos de co-inmunoprecipitación usando homogenados de células co-transfectadas con AZ1 y diferentes construcciones de ODC. Para comparar la unión de AZ1 al mutante L139S y a ODC wt, y debido a que la ODC de ratón es inestable en presencia de AZ1, se generó una forma estable de ODC mediante la delección de la región C-terminal (Ghoda et al., 1990; Li & Coffino, 1993). De esta forma se consiguió analizar la unión de AZ1 a ODC en cantidades similares de proteína ODC mediante experimentos de co-inmunoprecipitación. Esta forma truncada fue creada mediante la introducción de un

codón STOP prematuro en sustitución del triplete que codifica la Cys441 (Fig. 3A). Esta forma truncada de ODC (Δ CtODC) fue estable incluso cuando la relación AZ1:ODC en los experimentos de co-transfección fue 1, es decir 10 veces más alta que la requerida para la degradación de ODC wt (Fig. 3B). La Fig. 3C muestra que ni el mutante simple L139S ni el doble mutante E138A/L139S fueron capaces de unir a AZ1, al contrario que la forma truncada de ODC, que interactuó claramente con AZ. Todos estos resultados indican que entre los cinco residuos conservados de la región AZBE de ODC, L139 tiene un papel crítico para la interacción del monómero de ODC con AZ1.

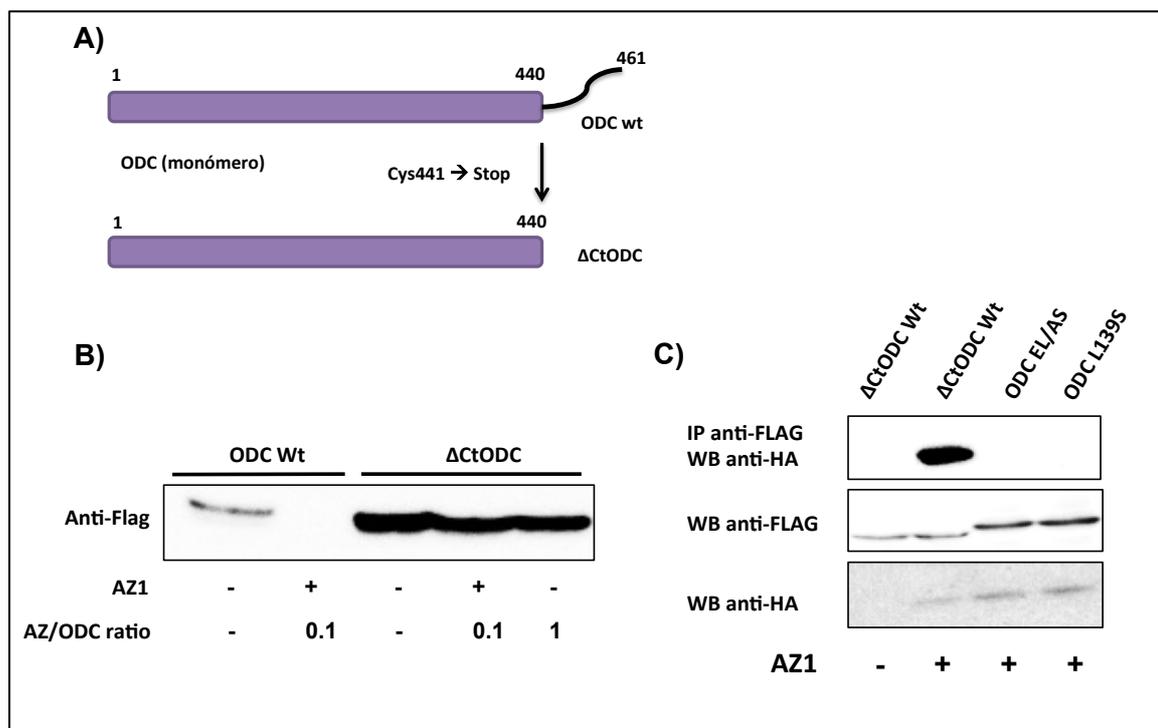


FIGURA 3. Efecto de la sustitución de Leu139 por alanina o serina sobre la interacción ODC-AZ1. (A) Generación de la forma truncada estable de ODC. El residuo Cys441 fue sustituido por un codón STOP mediante mutagénesis dirigida, generándose una forma truncada que carecía de los últimos 21 aminoácidos de la región C-terminal. (B) Células HEK 293T transfectadas con ODC-Flag wt o truncada (Δ CtODC) en presencia o ausencia de AZ1 (relaciones molares AZ1/ODC de 0.1 y 1). (C) Experimentos de inmunoprecipitación de los mutantes de ODC y AZ1. Las células HEK 293T fueron co-transfectadas transitoriamente con distintos mutantes de ODC-Flag y AZ1-HA, y los lisados celulares se inmunoprecipitaron con esferas de agarosa anti-FLAG M2 (monoclonal). Las muestras eluidas se fraccionaron por SDS-PAGE y se detectaron mediante un anticuerpo anti-HA.

2.3. Influencia de los residuos conservados de la región AZBE en la actividad enzimática de ODC.

Para determinar la influencia de los residuos conservados de la región AZBE en la actividad ODC, se analizó la actividad enzimática de extractos de células transfectadas con la construcción ODC-Flag wt y los distintos mutantes generados. La

Fig. 4 muestra que la sustitución de los residuos K115, E138, L139 y K141A por alanina afectó claramente la actividad enzimática, encontrándose el descenso más marcado en el caso del mutante E138A. Por el contrario, la sustitución de A123 por serina no afectó de manera significativa la actividad ODC. Además, la mutación de L139 por serina abolió totalmente la actividad ODC, como en el caso del mutante E138A. La doble sustitución de los residuos K115 y K141 por alanina causó una pérdida de actividad mayor que en los mutantes simples. La doble sustitución E138A/L139S anuló completamente la actividad ODC. La reducción en la actividad ODC no pudo ser atribuida a cambios en la cantidad de proteína ODC, puesto que se detectaron niveles similares de proteína ODC-FLAG en todos los casos (Fig. 4). El efecto observado para la mutación K115A sobre la actividad ODC fue menor que la descrita en la bibliografía para K115R (Tsirka & Coffino, 1992), si bien en el caso de K141A el efecto fue mayor que cuando la lisina se sustituyó por arginina. El análisis de los parámetros cinéticos de las distintas mutaciones de ODC respecto a la proteína wt mostró que la constante de Michaelis-Menten (K_m) de los mutantes A123S y L139A no varió significativamente respecto a la enzima wt ($223 \pm 32 \mu\text{M}$), en contraste con el aumento encontrado en los mutantes K115A y K141A ($1573 \pm 105 \mu\text{M}$ y $606 \pm 171 \mu\text{M}$, respectivamente). La K_m de los mutantes E138A y L139S no pudo ser determinada debido a su actividad extremadamente baja.

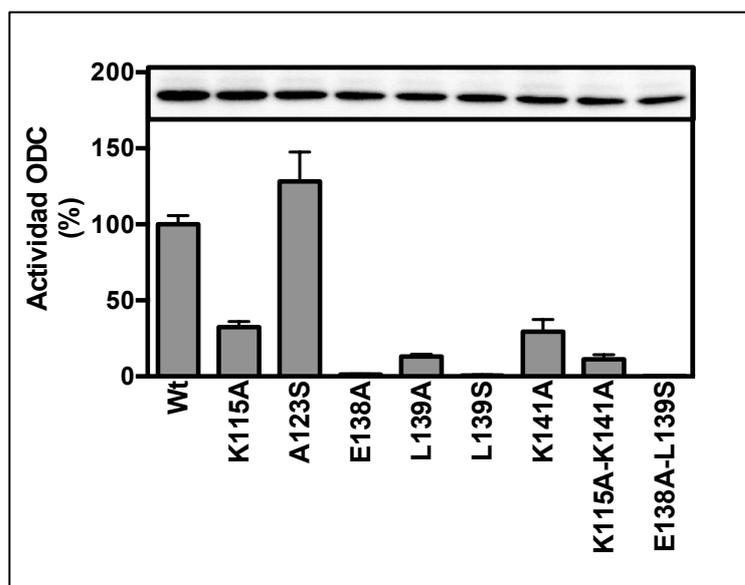


FIGURA 4. Efecto de la sustitución de los residuos invariantes del sitio AZBE sobre la actividad enzimática de ODC. La actividad ODC de extractos de células HEK 293T transfectadas con ODC wt y los diferentes mutantes se ensayó midiendo la liberación de $^{14}\text{CO}_2$ a partir de L-[1- ^{14}C] ornitina como se describe en el apartado "Materiales y métodos". Los niveles de proteína ODC, medidos en las mismas muestras por Western Blotting e incubación con anticuerpo anti-Flag, se muestran en la parte de arriba de la figura.

2.4. Los residuos conservados K115, E138 y L139 son importantes para la formación de homodímeros de ODC.

Teniendo en cuenta que la mutación de algunos residuos invariantes de la región AZBE redujo marcadamente la actividad ODC, y que ODC es enzimáticamente activa como homodímero (Solano et al., 1985), se estudió si el cambio de estos residuos podía afectar el proceso de formación de homodímeros estables. Para ello, se analizó la capacidad de dimerización de los mutantes a través de dos aproximaciones distintas: análisis mediante cross-linking y electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones no desnaturizantes. Las Fig. 5A y 5B muestran que la sustitución de K115, pero no la de K141, por alanina afectó de manera crítica la formación de dímeros ODC. Mientras que en la ODC wt y el mutante K141A las bandas correspondientes al monómero y el dímero se observaron claramente, en el caso del mutante K115A únicamente fue evidente la banda del monómero. Además, mientras que el cambio de E138 y L139 por alanina, y de L139 por serina también afectaba la dimerización de ODC, el mutante A123S fue capaz de formar el dímero, de manera similar a la proteína wt (Fig. 5C, 5D). Todos estos resultados sugieren un papel relevante para los residuos K115, E138 y L139 en el proceso de dimerización de ODC.

Para obtener información adicional sobre el efecto de estas mutaciones en el equilibrio monómero-dímero, se estudió la formación de dímeros en presencia de NaCl y ornitina, ya que en un estudio previo se había establecido que NaCl y el sustrato ornitina producían efectos opuestos en la dimerización de ODC (Solano et al., 1985). La Fig. 5E muestra que mientras que NaCl disminuyó claramente la formación de dímeros, ornitina (5 mM) aumentó la formación de dímeros tanto en el caso de la ODC wt como en el mutante E138A. El efecto de ornitina fue mayor en el caso de la forma mutante, donde la proporción de dímero en ausencia de ornitina era muy baja. Para el mutante E138A, también se demostró que otros aminoácidos catiónicos, tales como DFMO o arginina, fueron incapaces de inducir la formación de dímeros (Fig. 5F). Es interesante destacar que lisina (5 mM) también aumentó significativamente la dimerización del mutante, presumiblemente debido a que este aminoácido es también sustrato de ODC (Osterman et al., 1997). Sin embargo, a pesar de que en presencia de ornitina se indujo claramente la dimerización de ODC, no se rescató la actividad enzimática del mutante E138A, lo que sugiere que el residuo E138 podría ser también crítico para la actividad catalítica del dímero mutante.

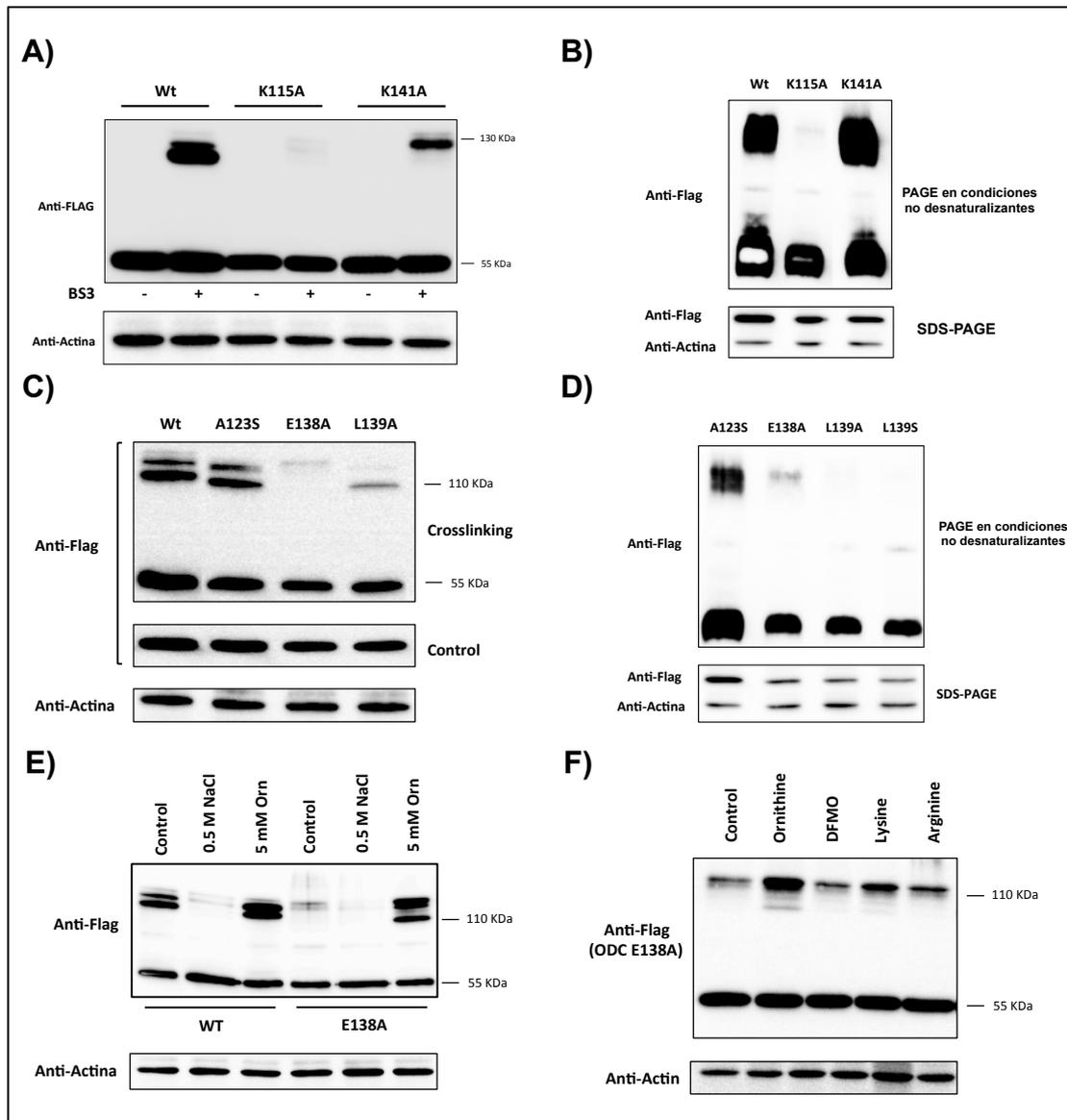


FIGURA 5. La mutación simple de K115, E138 y L139 disminuye la formación de homodímeros de ODC. (A) Análisis mediante cross-linking de extractos de células HEK 293T transfectadas con ODC-Flag wt, K115A y K141A. Los lisados celulares se incubaron en ausencia (-) o presencia (+) del reactivo de cross-linking BS3, y las proteínas se analizaron por Western Blotting e incubación con anticuerpo anti-Flag. (B) Patrón de migración de ODC-Flag wt y los mutantes K115A y K141A en condiciones nativas tras el análisis por electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones no desnaturizantes e incubación con anticuerpo anti-Flag. (C) Análisis mediante Western Blotting de lisados celulares de células transfectadas con las construcciones ODC-Flag wt, A123S, E138A, L139A o L139S, tras cross-linking con BS3. (D) Patrón de migración de las proteínas mutantes A123S, E138A, L139A o L139S en condiciones nativas mediante electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones no desnaturizantes e incubación con anticuerpo anti-Flag. (E) Análisis por Western Blotting de células transfectadas con ODC-Flag wt y E138A tras cross-linking con BS3 en presencia de NaCl 0.5 M o L-ornitina 5 mM. (F) Influencia de aminoácidos básicos en los análisis de cross-linking de extractos celulares transfectados con E138A. La concentración de cada aminoácido fue 5 mM. Los resultados son representativos de varios experimentos independientes.

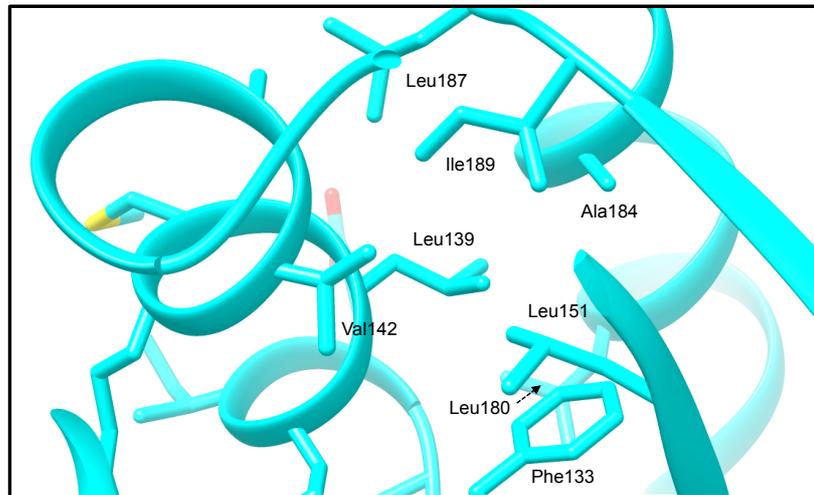
DISCUSIÓN

En las células, la actividad ODC depende tanto de la cantidad de proteína como de la actividad catalítica de la enzima, factores que están relacionados con distintos aspectos estructurales de ODC. De hecho, ODC es activa como homodímero, el cual se encuentra en rápido equilibrio con los monómeros inactivos (Solano et al., 1985; Mitchell & Chen, 1990). Diferentes análisis bioquímicos, cristalográficos y mutacionales han contribuido a la identificación de residuos localizados en la interfaz del dímero que juegan un papel importante tanto para la función catalítica como para la estabilidad del dímero. En cada homodímero de ODC hay dos sitios activos, cada uno de los cuales se compone por residuos del dominio N-terminal de una subunidad y del dominio C-terminal de la otra (Coleman et al., 1994; Almrud et al., 2000; Jackson et al., 2004). Entre estos residuos, Lys69 y Cys360 son críticos para la actividad ODC, siendo el primero de ellos responsable de la unión del cofactor fosfato de piridoxal (Poulin et al., 1992; Coleman et al., 1993), mientras que el segundo ha sido implicado en el mecanismo catalítico (Poulin et al., 1992). Además, se ha descrito que en la ODC murina Gly387 tiene un papel relevante en la formación de homodímeros (Tobias et al., 1993). Por otro lado, ODC es una proteína de vida media corta, principalmente debido a que su degradación se acelera por la unión a AZ1 (Li & Coffino, 1993). AZ se une fuertemente al monómero de ODC, reduciendo la formación de dímeros activos y, posteriormente, induce la degradación de ODC por el proteasoma 26S independientemente de ubiquitinación previa (Coffino, 2001; Zhang et al., 2003). Se ha puesto de manifiesto que la formación de homodímeros de ODC o de heterodímeros ODC-AZ depende tanto de la concentración de ODC y AZ, como de la constante de unión de cada proceso. Es conocido que en cada subunidad de ODC existen al menos dos regiones que son importantes para su degradación mediada por AZ: la secuencia incluida entre los residuos 117-140, requerida para la unión a AZs (Li & Coffino, 1992), y la región C-terminal desordenada (Zhang et al., 2003). Se ha propuesto que la interacción de AZ con ODC expone esta región C-terminal para su reconocimiento por el proteasoma (Li & Coffino, 1993). Recientemente, estudios mutacionales de residuos no conservados de la región AZBE entre la ODC de *T. brucei* (la cual no es regulada por AZ) y de humano han revelado que algunos de estos residuos, tales como Q119, M140 y V137, son críticos para la unión a AZ (Liu et al., 2011a). Además, se han relacionado las diferencias existentes en los residuos 119 y 140 entre las proteínas ODC y AZIN1 de humano con las diferente afinidad de unión a las AZs (Liu et al., 2011b).

Mientras que la mayoría de estos estudios se han centrado en el análisis de las diferencias existentes en la región AZBE entre la ODC de *T. brucei* y la ODC humana o murina, en nuestro estudio hemos identificado los residuos conservados de la región

AZBE de ODC, y de sus parálogos AZIN1 y AZIN2, en diferentes especies eucariotas mediante el alineamiento múltiple de secuencias. Esta conservación sugiere que estos residuos pueden ser importantes para la interacción de ODC y AZINs con las antizimas. Los resultados del análisis mutacional que se presentan en este capítulo indican que de entre los cinco residuos conservados de la región AZBE de la ODC murina, Leu139 tiene un papel crítico en la unión a AZ1, ya que la sustitución de este residuo por Ala o Ser disminuye drásticamente la interacción de ODC con AZ1 y, como consecuencia, la enzima mutante es mucho más resistente a la degradación proteasomal mediada por AZs. Además, estos mutantes mostraron una menor capacidad de formar homodímeros, y fueron prácticamente inactivos. Aunque se han descrito distintas mutaciones que afectan la actividad ODC (Lu et al., 1991; Tsirka & Coffino, 1992; Coleman et al., 1993; Tobias et al., 1993; Osterman et al., 1995; Osterman et al., 1997; Kilpelainen & Hietala, 1998), esta es la primera mutación simple que altera simultáneamente la actividad enzimática de ODC, así como su capacidad de formación de homodímeros y la interacción con antizima. De acuerdo con la estructura 3D de la ODC humana (Almud et al., 2000), Leu139 se localiza en la parte no expuesta de la hélice 6, en el centro de un agrupamiento hidrofóbico formado por Phe133, Val142, Leu151, Leu180, Ala184, Leu187 e Ile189 (ver Fig. 6A). Para explicar los marcados cambios fenotípicos asociados a esta mutación, se puede especular con que la sustitución de este residuo presente en la parte interior del dominio hidrofóbico podría alterar la conformación del monómero de ODC de tal manera que reduce notablemente su capacidad de formar homodímeros o de unir a la antizima. Otro residuo conservado, cuya alteración produce efectos marcados sobre la actividad ODC, es Glu138. El mutante E138A fue catalíticamente inactivo, y mostró una menor capacidad de formar dímeros. Sin embargo, el monómero fue todavía capaz de interactuar con AZ1, ya que su degradación se aceleró en presencia de AZ1. En cuanto a los otros dos residuos conservados de la región AZBE, Lys115 y Lys141, pese a ser importantes para el mantenimiento de la actividad enzimática, su sustitución no produce efectos tan drásticos como los que se producían por cambios en los residuos E138 o L139. Aunque en ambos mutantes la actividad ODC se redujo, en el caso de Lys115 el notable aumento en la K_m podría estar relacionado con una reducción en la proporción dímero/monómero presente en condiciones fisiológicas. Teniendo en cuenta la estructura 3D de la ODC humana, estos residuos cargados, K115, E138 y K141, están suficientemente cercanos para interactuar electrostáticamente (ver Fig. 6B). Nuestros resultados sugieren que cualquier cambio en la carga positiva o negativa en esta zona podría afectar la conformación de ODC, disminuyendo la actividad enzimática pero no la capacidad del monómero para interactuar con AZ1.

A)



B)

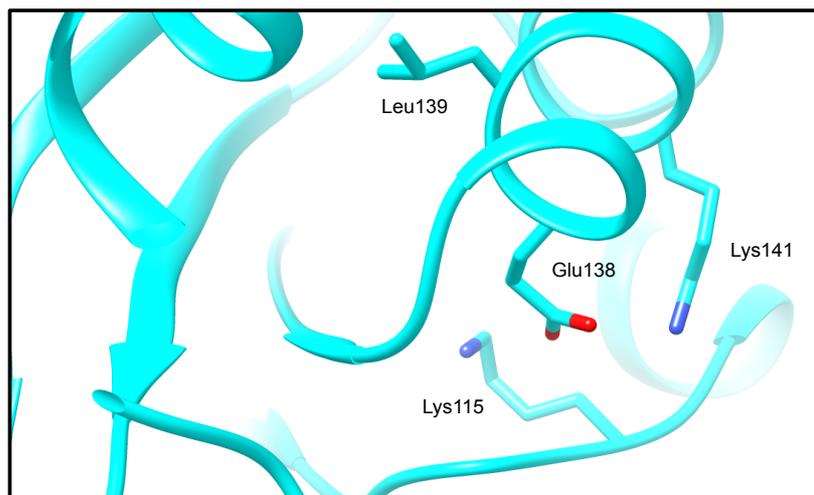


FIGURA 6. Visualización de los residuos conservados del sitio AZBE en la estructura 3D de la ODC humana. (A) Residuos encontrados dentro de una distancia de 4 Å del residuo L139. (B) Residuos K115, E138, L139 y K141 mostrados selectivamente en la estructura 3D de ODC. Esta figura se generó usando el programa UCSF Chimera a partir de los datos disponibles en "Protein Data Bank" (código PDB: 1d7k). Los residuos están coloreados en función del tipo de átomo (oxígeno en rojo y nitrógeno en azul).

En conclusión, los resultados de este capítulo indican que de entre los cinco residuos conservados de la región AZBE de la ODC de ratón, cuatro de ellos están implicados en la eficacia catalítica de la enzima, parcialmente por afectar el equilibrio monómero/dímero, pero sólo Leu139 parece ser crítica para interactuar con antizima. Teniendo en consideración que estos cinco residuos están también conservados en la ODC de *T. brucei*, enzima que no interactúa con AZ (Li & Coffino, 1992), podría

concluirse que tanto los residuos conservados como los no conservados son críticos para hacer ODC sensible a la acción de las antizimas. Además, ya que el residuo no conservado V137, al cual se le ha atribuido un papel directo en la unión a AZ (Liu et al., 2011a), está localizado en la hélice 6 del monómero de ODC de humano o ratón, el cual está también formado por los residuos E138, L139 y K141 descritos aquí, parece bastante probable que esta hélice pudiera ser un elemento estructural importante para la función de ODC.

- Capítulo 6 -

Degradación y estabilidad de AZIN2. Influencia de la interacción con AZs.

En mamíferos ODC es una proteína altamente lábil tanto en células como en tejidos, con una vida media corta inferior a 30 minutos, aunque se ha descrito que en ciertos tejidos como en riñones de ratones macho o placentas de hembras gestantes la vida media de ODC es mucho mayor (Seely et al., 1982; Murakami et al., 1988; López-Ballester et al., 1990; Lopez-Garcia et al., 2009). En este sentido, se ha postulado que la labilidad de ODC es altamente dependiente de su relación con las AZs. Por otra parte, tanto AZIN1 como AZIN2 son proteínas de rápida degradación, si bien AZIN2 podría ser algo menos lábil que AZIN1 (Kahana, 2007; Kanerva et al., 2008; Snapir et al., 2008). Además, ciertos trabajos han demostrado que la unión de AZ1 o AZ3 podría aumentar la estabilidad de AZIN2 (Snapir et al., 2008; López-Contreras et al., 2009a). En este capítulo se muestra un estudio detallado de la vida media de AZIN2 en condiciones basales y en presencia de antizimas, así como un estudio comparativo de la estabilidad de AZIN2 y sus proteínas homólogas ODC y AZIN1 en las mismas condiciones experimentales. Por otro lado, aunque varios trabajos sugieren que la degradación de AZIN2 se produce en el proteasoma 26S mediante un proceso dependiente por ubiquitinación (Kanerva et al., 2008; Snapir et al., 2008), ninguno de ellos aporta pruebas concluyentes al respecto. Por ello, otro objetivo de este capítulo ha sido el estudio de la degradación de AZIN2 y sus proteínas homólogas en presencia de ciertos inhibidores del proteasoma.

3.1. Análisis de la vida media de AZIN2 en células transfectadas. Efecto de la co-expresión de las AZs en la degradación de los AZINs.

Para las determinaciones de vida media se transfectaron transitoriamente células HEK 293T con las construcciones ODC-FLAG y AZIN2-FLAG, y tras la transfección las células se incubaron con el inhibidor de la síntesis proteica cicloheximida a distintos tiempos. Como se muestra en la Fig. 1, en condiciones de sobreexpresión la vida media de AZIN2 fue mucho más corta que la de ODC. En realidad, ODC fue bastante estable, con una vida media superior a 8 horas, lo que contrasta con la vida media de ODC endógena, ya que en células sin transfectar la proteína ODC endógena mostró una vida media corta, pues se determinó que a los 30 minutos de tratamiento con cicloheximida la actividad enzimática fue inferior al 20% de los valores controles (datos no mostrados). Por otro lado, la vida media de

AZIN2 en células transfectadas fue de aproximadamente 89 minutos.

Para determinar el efecto de las AZs sobre la degradación de AZIN2 se transfectaron transitoriamente células HEK 293T con AZIN2-FLAG en presencia de los tres tipos de antizimas y se compararon los niveles de proteína respecto al control. Como se puede observar en la Fig. 2A, la degradación de AZIN2 disminuyó en presencia de los tres tipos de AZ, aunque el efecto protector fue claramente mayor en el caso de AZ1 y AZ2. Nótese que la cantidad de proteína AZIN2 siempre fue mayor en presencia de AZ que en condiciones controles, lo que está de acuerdo con lo descrito en la bibliografía (Snapir et al., 2008; López-Contreras et al., 2009). La cuantificación de los valores mostró que la vida media de AZIN2 pasó de 89 ± 9 min a 543 ± 93 min en el caso de transfección con AZ1, a 492 ± 99 min para AZ2 y 155 ± 10 min para AZ3.

Por otra parte, en la Fig. 3 se puede comprobar que AZIN1 también es una proteína bastante lábil, incluso más que AZIN2, pues la degradación fue casi del 100% a los 120 minutos de tratamiento con cicloheximida. Además, mientras que en presencia de AZ1 la degradación de AZIN1 fue inhibida parcialmente, no se observó efecto protector en el caso de AZ2 y AZ3.

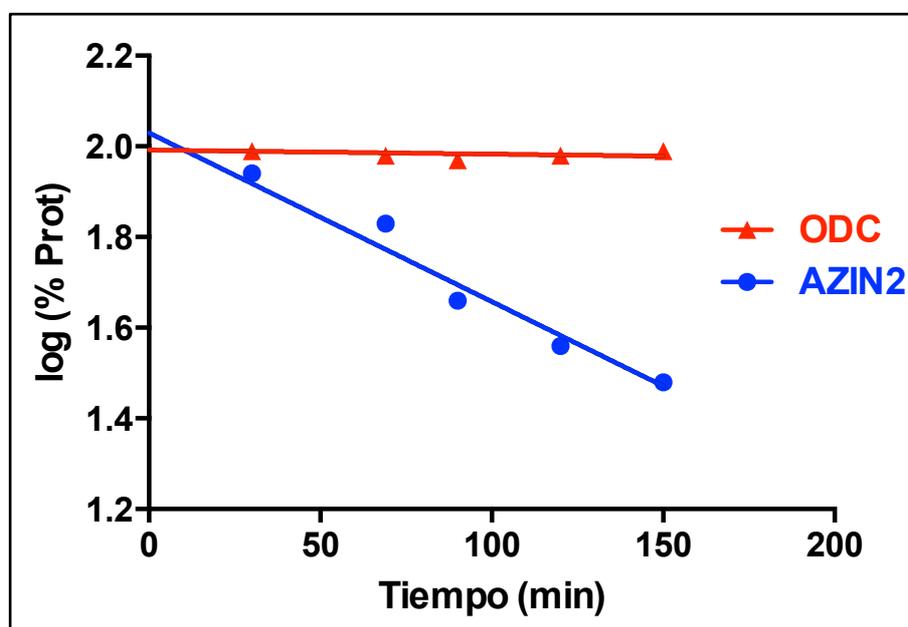


FIGURA 1. Vida media de AZIN2 y ODC en células HEK 293T. Las células se transfectaron con AZIN2-FLAG o ODC-FLAG durante 20 h y se incubaron con cicloheximida $100 \mu\text{M}$ durante los tiempos indicados. Los niveles de ODC se detectaron mediante ensayos de actividad enzimática, mientras que la proteína AZIN2 se determinó mediante Western Blotting e incubación con anticuerpo anti-Flag. Se tomó valor 100 la actividad enzimática o la intensidad de banda a tiempo 0. Los ensayos se realizaron por triplicado.

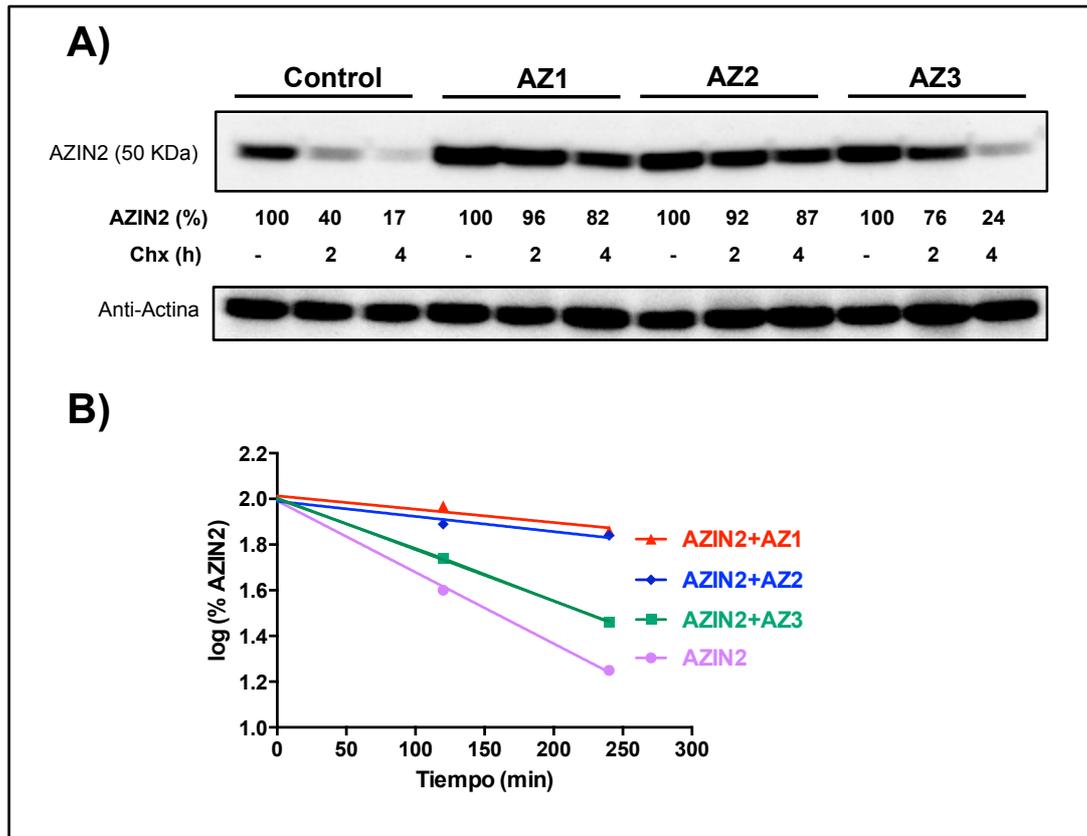


FIGURA 2. Degradación de AZIN2 en presencia de las AZs. (A) Las células HEK 293T se transfectaron con AZIN2-FLAG en presencia de las tres AZs durante 20h y se incubaron con cicloheximida 100 μ M durante los tiempos indicados. Los niveles de proteína se determinaron mediante Western Blotting e incubación con anticuerpo anti-Flag. Para los estudios de vida media se tomó valor 100 la intensidad de banda a tiempo 0. Los controles de carga se llevaron a cabo usando un anticuerpo anti-Actina. (B) Estimación de la vida media de AZIN2 en presencia de las AZs.

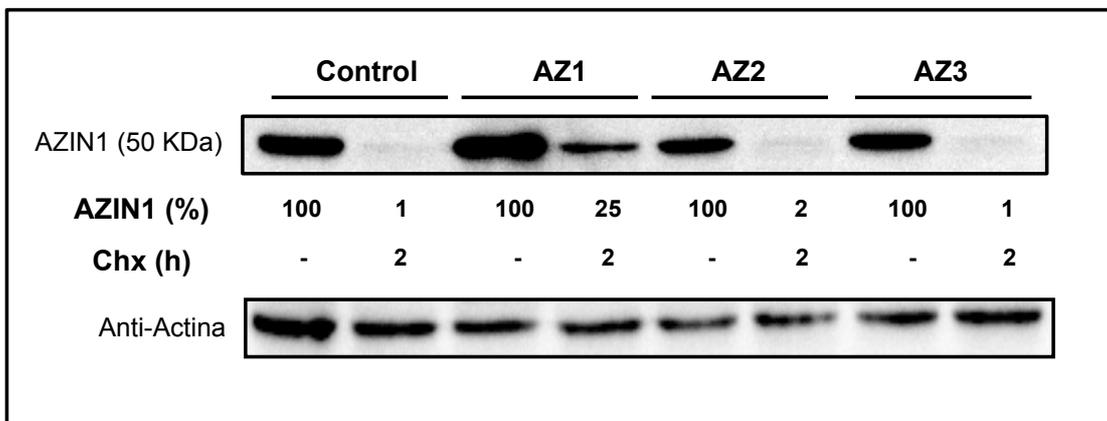


FIGURA 3. Influencia de las AZs en la degradación de AZIN1. Las células HEK 293T se transfectaron con AZIN1-FLAG en presencia de cada una de las tres AZs durante 20h y se incubaron con cicloheximida 100 μ M durante los tiempos indicados. Los niveles de proteína se determinaron mediante Western Blotting e incubación con anticuerpo anti-Flag. Los controles de carga se llevaron a cabo usando un anticuerpo anti-Actina.

3.2. Análisis de la estabilidad de las AZs de ratón en células transfectadas. Efecto de la co-expresión de ODC y los AZINs.

El hecho de que la presencia de las AZs afecte la estabilidad de los AZINs sugiere que estas proteínas pudieran modular la estabilidad de las AZs. Estudios previos habían demostrado que la degradación de AZ1 se produce rápidamente a nivel proteasomal y que es dependiente de ubiquitinación (Gandre et al., 2002). En nuestro estudio se transfectaron células HEK 293T con cada una de las construcciones de las AZs mutadas y se trataron posteriormente con cicloheximida para determinar la estabilidad de las mismas. Como se muestra en la Fig.4 la degradación de las distintas isoformas de AZ fue bastante elevada a los 30 minutos de incubación con cicloheximida, lo que está de acuerdo con los resultados previamente publicados sobre la alta labilidad de estas proteínas.

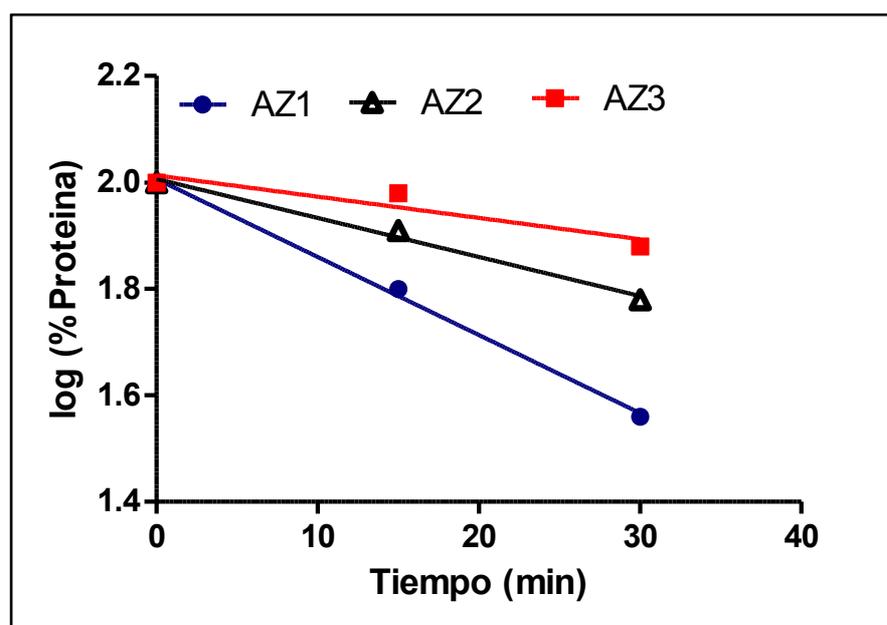


FIGURA 4. Degradación de las AZs en células HEK 293T transfectadas con las diferentes construcciones de las mismas. Las células se transfectaron con las construcciones MAZ1-HA, MAZ2-HA y MAZ3-HA durante 20h y se incubaron con cicloheximida 100µM durante los tiempos indicados. Los niveles de proteína de las AZs se determinaron mediante Western Blotting e incubación con anticuerpo anti-HA.

Aunque se conoce que las AZs son capaces de unirse y regular a ODC y a los AZINs, existen pocos datos sobre la estabilidad de las AZs durante la interacción con estas proteínas. En la Fig.5A se pueden observar los niveles de proteína de las tres AZs en presencia de ODC y AZIN2. Por un lado se detectaron mayores niveles de proteína tras la co-transfección con AZIN2 en los tres casos. Estos resultados

estarían indicando que AZs y AZIN2 se estabilizarían mutuamente por la formación del complejo AZ-AZIN2. Además, se observó que la estabilización de las AZs por AZIN2 se debió a la interacción directa entre ambas proteínas, pues no se apreció aumento de proteína cuando las AZs se co-transfectaron con la proteína AZIN2 con la región AZBE delecionada (Fig. 5B). Sin embargo, mientras que AZ2 y AZ3 se estabilizaron en presencia de ODC, los niveles de AZ1 fueron incluso menores respecto al control lo que sugiere que AZ1 se pudiera degradar junto con ODC en el proteasoma, y no se reciclaría como hasta ahora se había descrito (Gandre et al., 2002).

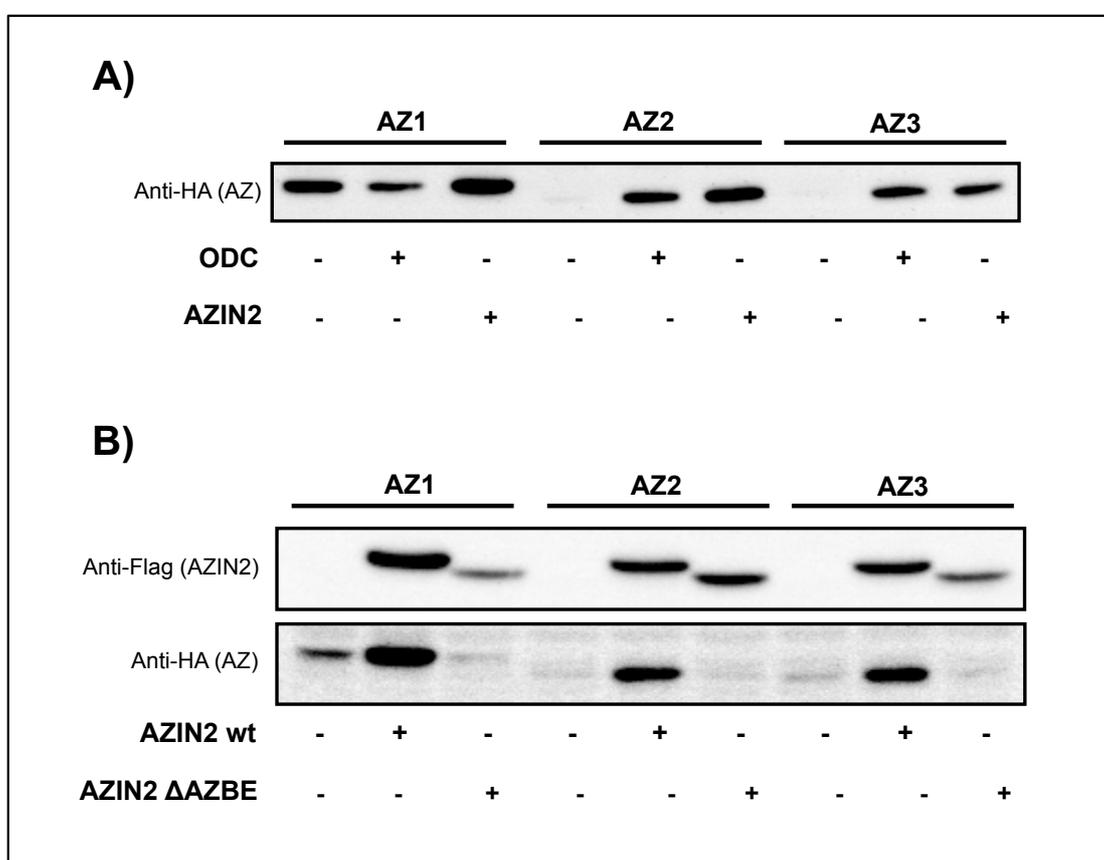


FIGURA 5. Efecto de ODC y AZIN2 sobre la estabilidad de las AZs. (A) Las células HEK 293T se transfectaron con cada una de las AZs mutadas con el epítipo HA en presencia de ODC o AZIN2. (B) Las células se co-transfectaron con cada una de las AZs en presencia AZIN2-FLAGwt o delecionada en la región AZBE. Los niveles de proteína de las AZs se determinaron mediante Western Blotting e incubación con anticuerpo anti-HA. Los controles de carga se llevaron a cabo usando un anticuerpo anti-Actina (no mostrados en la figura).

Teniendo en cuenta los resultados anteriores sobre la cantidad de proteína AZ1 en presencia de ODC y AZIN2, nos propusimos estudiar con detalle la co-expresión de AZ1 con ODC y los AZINs. Para ello se analizó la proteína AZ1 en

presencia de ODC wt y una forma estable de esta enzima generada por el truncamiento de la región C-terminal (ver capítulo 5), así como en presencia de los dos tipos de AZINs. Como se muestra en la Fig. 6, mientras que AZIN2 y la forma truncada de ODC (Δ CtODC) estabilizaron claramente a AZ1, ni la presencia de ODC wt ni la de AZIN1 aumentó la estabilidad de la proteína.

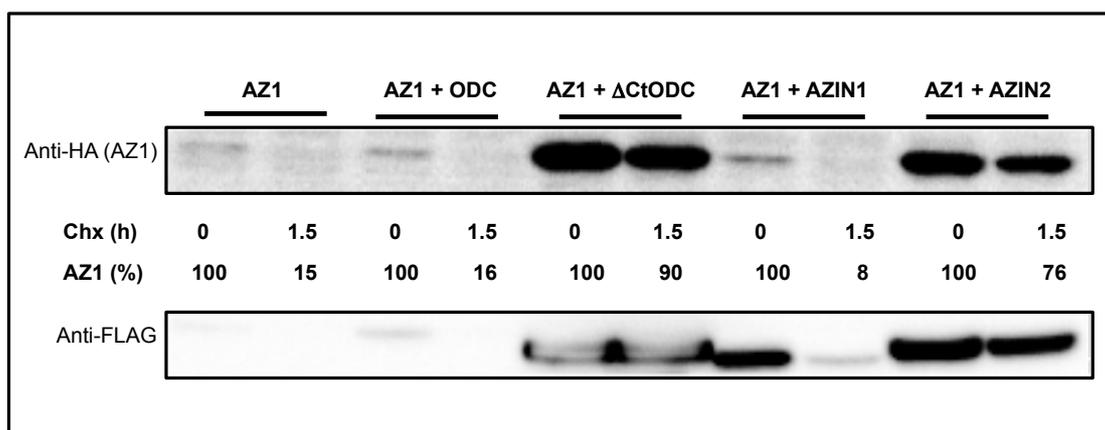


FIGURA 6. Degradación de las AZs en presencia de ODC y los AZINs. Las células se transfectaron con AZ1 (MAZ1-HA) en presencia de ODC-FLAG wt, Δ CtODC-FLAG, AZIN1-FLAG y AZIN2-FLAG, y se incubaron con cicloheximida 100 μ M durante 90 minutos. Los niveles de proteína de las AZs se determinaron mediante Western Blotting e incubación con anticuerpo anti-HA, mientras que ODC y los AZINs se detectaron con anticuerpo anti-Flag. Los controles de carga se llevaron a cabo usando un anticuerpo anti-Actina (no mostrados en la figura).

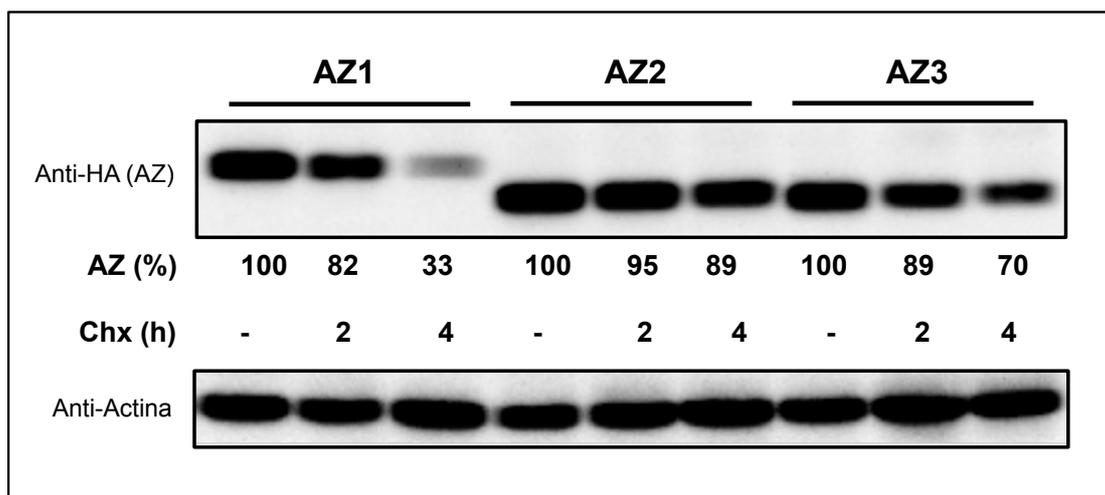


FIGURA 7. Degradación las AZs en presencia AZIN2. Las células se transfectaron con las AZs (MAZ-HA) en presencia de AZIN2 y se incubaron con cicloheximida durante 2 y 4 horas. Los niveles de proteína de las AZs se determinaron mediante Western Blotting e incubación con anticuerpo anti-HA. Los controles de carga se llevaron a cabo usando un anticuerpo anti-Actina

Debido a la labilidad de las AZs pese a las condiciones de sobre-expresión y la estabilización aparente de estas proteínas en presencia de AZIN2, nos propusimos determinar la degradación de las AZs al co-transfectarlas con AZIN2. La Fig. 7 muestra que la degradación de las AZs fue fuertemente inhibida en presencia de AZIN2 lo que podría poner de manifiesto la formación de complejos estables AZIN2-AZ. Además, se puede observar que AZIN2 protegió a AZ2 y AZ3 incluso más eficientemente que a AZ1.

3.3. Estudio del mecanismo de degradación de AZIN2 y proteínas homólogas mediante la inhibición del proteasoma 26S

Teniendo en cuenta trabajos previos, la degradación de ODC, AZs y AZINs tiene lugar en el proteasoma 26S (Gandre et al., 2002; Bercovich & Kahana, 2004; Palanimurugan et al., 2004; Pegg, 2006; Kahana, 2007; Kanerva et al., 2008; Snapir et al., 2008; Kahana, 2009). Para corroborar y reforzar todos estos estudios nos propusimos analizar los efectos de la administración de varios inhibidores del proteasoma 26S sobre la cantidad de cada una de estas proteínas en células transfectadas. Como se puede observar en la Fig. 8A, la administración del inhibidor del proteasoma lactacistina (Fenteany & Schreiber, 1998) en células transfectadas con ODC, AZIN1 o AZIN2, aumentó la acumulación de AZIN1, mientras que no se observaron cambios apreciables en ODC y sorprendentemente una disminución de AZIN2. Por otra parte, mientras que sobre todo AZ1 y también AZ2 se acumularon tras el tratamiento con lactacistina (Fig. 8B), no se observó aumento significativo de AZ3.

Para descartar que los resultados anteriores fueran debidos a un efecto inespecífico de la lactacistina sobre AZIN2, se realizaron experimentos similares utilizando el inhibidor del proteasoma MG132 (Lee & Goldberg, 1998). Como se muestra en la Fig. 9, mientras que los niveles de ODC permanecieron inalterados, AZIN1 se acumuló de forma clara tras el tratamiento. Por su parte, en el caso de AZIN2 no solo no se observó acumulación o los mismos niveles de proteína respecto al control, sino que se detectó una caída marcada de la proteína en presencia del inhibidor.

Para corroborar los resultados anteriores sobre la degradación proteasomal de AZIN2 y sus proteínas homólogas, se realizó un experimento consistente en la inhibición de la síntesis proteica mediante cicloheximida en presencia o ausencia del inhibidor del proteasoma MG132. Como se observa en la Fig. 10, el tratamiento con cicloheximida durante 3 horas provocó una caída drástica en los niveles de AZIN1 y AZIN2, pero leve en el caso de ODC. Además, mientras que MG132 inhibió la caída

de proteína en el caso de ODC y AZIN1, no se observó efecto alguno sobre los niveles de AZIN2.

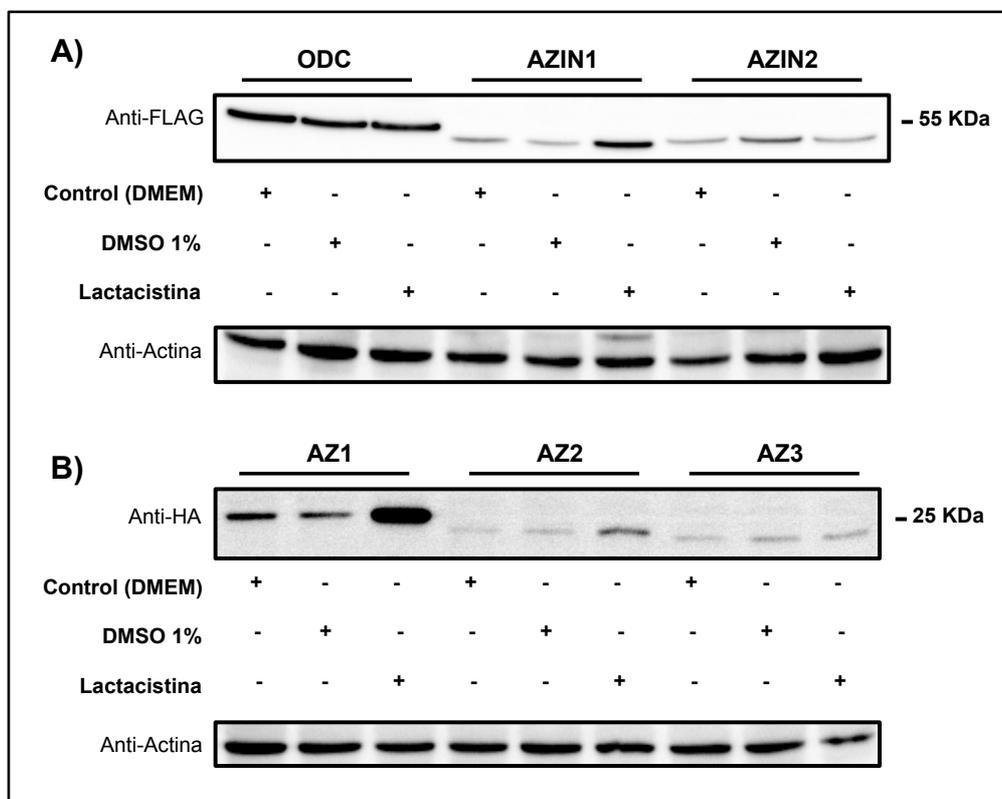


FIGURA 8. Efecto del tratamiento con el inhibidor del proteasoma lactacistina sobre AZIN2 y proteínas homólogas. Las células se transfectaron con ODC-FLAG, AZIN1-FLAG o AZIN2-FLAG (A) y las AZs (MAZ-HA) (B) durante 24 horas y se incubaron con DMEM solo, DMSO 1% o lactacistina 5 μ M durante 6 horas. Los niveles de proteína se determinaron mediante Western Blotting e incubación con anticuerpo anti-Flag en el caso de ODC y AZINs, y anti-HA en el caso de las AZs. Los controles de carga se llevaron a cabo usando un anticuerpo anti-Actina

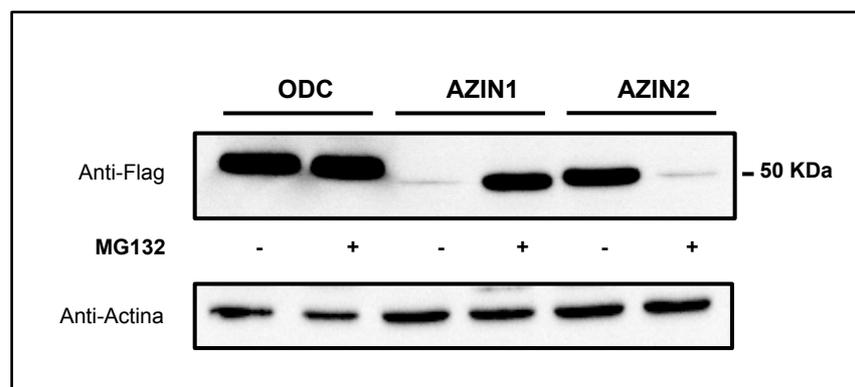


FIGURA 9. Efecto de la incubación con el inhibidor del proteasoma MG132 sobre AZIN2 y proteínas homólogas. Las células se transfectaron con ODC-FLAG, AZIN1-FLAG o AZIN2-FLAG durante 24 horas y se incubaron con MG132 50 μ M o DMSO 1% durante 4 horas. Los niveles de proteína se determinaron mediante Western Blotting e incubación con anticuerpo anti-Flag. Los controles de carga se llevaron a cabo usando un anticuerpo anti-Actina

Por otro lado, se determinaron los efectos de la inhibición del proteasoma con lactacistina sobre la degradación de ODC mediada por AZ1. Como se puede observar en la Fig. 11A la degradación de ODC en presencia de AZ1 es parcialmente inhibida por lactacistina. Además, se observó una banda marcada de AZ1 en las muestras tratadas con el inhibidor. Para determinar si AZ1 también se acumula en presencia de lactacistina se realizó un experimento similar en el que se co-transfectó AZ1 en presencia y ausencia de ODC (Fig. 11B). Puede observarse que los niveles de proteína son muy bajos en presencia de ODC pero aumentan considerablemente en presencia de ODC tras el tratamiento con el inhibidor del proteasoma.

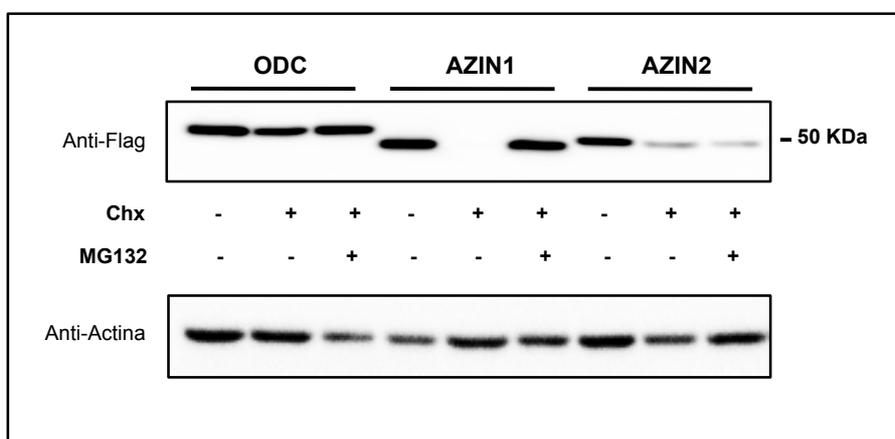


FIGURA 10. Efecto de la incubación con el inhibidor del proteasoma MG132 sobre los niveles de AZIN2 y proteínas homólogas tras el tratamiento con cicloheximida. Las células se transfectaron con ODC-FLAG, AZIN1-FLAG o AZIN2-FLAG durante 24 horas y se incubaron con DMSO 1%, Chx 100µM ó Chx 100 µM + MG132 50 µM durante 4 horas. Los niveles de proteína se determinaron mediante Western Blotting e incubación con anticuerpo anti-Flag. Los controles de carga se llevaron a cabo usando un anticuerpo anti-Actina

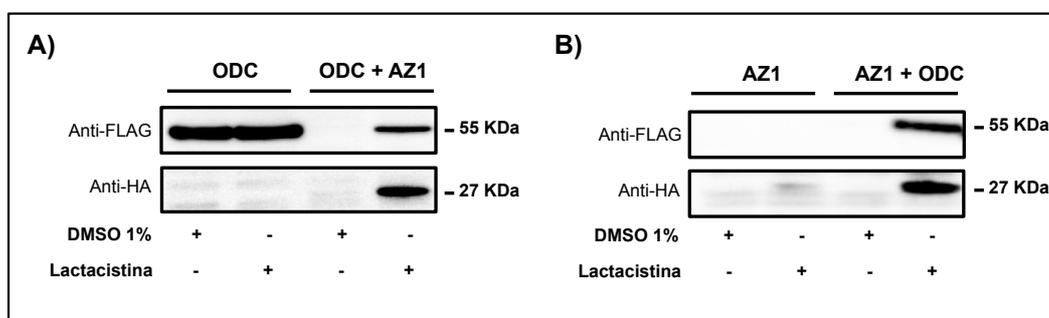


FIGURA 11. Efecto de la incubación con el inhibidor del proteasoma lactacistina sobre la degradación de ODC y AZ1 en células co-transfectadas. Las células se co-transfectaron con ODC-FLAG en presencia y ausencia de MAZ1-HA (A) y con MAZ1-HA en presencia y ausencia de ODC-FLAG (B), incubándose en ambos casos con lactacistina 5µM o DMSO 1% durante 6 horas. Los niveles de proteína se determinaron mediante Western Blotting e incubación con anticuerpo anti-Flag en el caso de ODC, y anti-HA en el caso de AZ1. Los controles de carga se llevaron a cabo usando un anticuerpo anti-Actina (datos no mostrados).

DISCUSIÓN

Pese a la alta homología existente entre ODC y AZIN1, existen diferencias claras en el proceso de degradación de ambas proteínas. Aunque tanto ODC como AZIN1 se degradan a nivel proteasomal, mientras que ODC se degrada mediante la intervención de las AZs y sin ubiquitinación previa, AZIN1 tiene que ser ubiquitinado para su posterior degradación (Bercovich & Kahana, 2004; Kanerva et al., 2008; Snapir et al., 2008). Pese a estas diferencias se ha descrito que tanto ODC como AZIN1 son proteínas altamente lábiles, si bien en el caso de ODC el rápido recambio es altamente dependiente de su relación con las AZs. De hecho, en nuestros estudios de vida media mostraron que mientras que en condiciones de sobre-expresión ODC es altamente estable, la proteína endógena es muy lábil con una vida media inferior a 30 minutos. Por tanto, cuando la relación ODC/AZ es muy elevada la proteína ODC es bastante estable, probablemente debido a que no existe un mecanismo alternativo de degradación no dependiente de AZs. Estas observaciones fueron previamente descritas en riñón murino, postulándose que la vida media de ODC es altamente dependiente del porcentaje de formación del complejo ODC-AZ (Murakami et al., 1988). En comparación con la ODC la vida media de AZIN2 fue bastante más baja y parece degradarse con gran eficiencia incluso cuando sus niveles intracelulares son elevados, lo que indicaría que es una proteína de rápido recambio. Además, AZIN2 se estabilizó significativamente en presencia de las AZs, mostrando unos niveles de proteína más elevados de proteína en todos los casos respecto al control. Sin embargo, la degradación de AZIN2 era claramente inferior en presencia de AZ1 y AZ2, pero era similar al control en presencia de AZ3. Estos resultados podrían sugerir, al menos en los casos de AZ1 y AZ2, que la co-expresión de las AZs impide el rápido recambio de AZIN2. Teniendo en consideración que tras su sobre-expresión en células HEK 293T AZIN2 se acumula en el compartimento intermedio retículo endoplasmático/Golgi (ERGIC) y que se ha observado expresión de AZIN2 en la red trans-Golgi en ciertos tipos celulares de origen neuronal (López-Contreras et al., 2009b; Kanerva et al., 2010), la degradación de AZIN2 podría estar asociada al tráfico vesicular y el recambio de vesículas. Además, dado que en presencia de las AZs, AZIN2 se acumula en el citosol en lugar del ERGIC (López-Contreras et al., 2009b), se podría especular con que cuando los niveles de AZs son elevados se formaría un heterodímero AZIN2-AZ citosólico mucho más estable que AZIN2. Por otro lado, la co-expresión de AZ3 no redujo la degradación de AZIN2, aunque sí se inducía un cambio de localización subcelular y un aumento en la cantidad de proteína AZIN2 (López-Contreras et al., 2009a, 2009b). Estos resultados podrían poner de manifiesto que aunque se

produzca la interacción AZIN2-AZ3, el complejo formado por ambas proteínas no sería tan estable como el formado por AZIN2 y AZ1 o AZ2.

Por otro lado, aunque se han estudiado ampliamente los efectos de las antizimas sobre la degradación proteasomal de ODC y otras proteínas (Coffino, 2001b; Newman et al., 2004; Lim & Gopalan, 2007), existen pocos datos sobre la degradación de las propias antizimas en células de mamíferos. Aunque está bien establecido que los ARNm de AZ1 y AZ2 son abundantes en todas las células donde han sido analizados, siendo además la cantidad de mensajero de AZ1 bastante mayor que la de AZ2 (Ivanov et al., 1998), y la expresión de AZ3 es muy alta en el testículo (Tosaka et al., 2000), la síntesis de la proteína en todos los casos requiere la presencia de niveles elevados de poliaminas intracelulares (Coffino et al., 2001b). Además, teniendo en cuenta su efecto tan potente sobre la biosíntesis y captación de poliaminas, es lógico deducir que los niveles de estas proteínas se encuentran altamente regulados en las células. En este sentido, se ha descrito que AZ1 es una proteína altamente lábil que se degrada rápidamente en el proteasoma en un proceso dependiente de ubiquitinación cuando no está ejerciendo su acción sobre ODC (Gandre et al., 2002). En nuestros estudios, además de corroborar la labilidad de AZ1, determinamos que el resto de isoformas también son altamente lábiles, incluso más que AZ1. Por otra parte, aunque existen numerosos trabajos que han descrito el efecto de las AZs sobre la degradación de distintas proteínas relacionadas con el metabolismo de poliaminas como ODC y AZINs, los efectos de estas proteínas sobre la degradación de las AZs no ha sido tan estudiada. Nuestros resultados muestran que AZIN2 estimula grandemente la acumulación de las AZs y las protege de degradación, lo que estaría de acuerdo con estudios previos y los resultados de este capítulo que sugieren que cuando los niveles de ambas proteínas son elevados se formaría un complejo AZIN2-AZ estable en el citosol. Sin embargo, la co-expresión de ODC mostraba resultados dispares dependiendo del tipo de AZ. Mientras que en presencia de ODC, tanto AZ2 como AZ3 se estabilizaron significativamente, los niveles de AZ1 fueron incluso menores que en ausencia de la enzima. Dado que se ha descrito que AZ1 induce claramente la degradación de ODC por dirigir a esta al proteasoma donde se degrada, los resultados anteriores podrían sugerir que cuando el heterodímero ODC-AZ1 llega al proteasoma, no solo se degrada ODC sino que AZ1 podría degradarse conjuntamente. Además, los experimentos de co-transfección de AZ1 y la ODC truncada en la región C-terminal no solo demostraron que esta forma de ODC no se degrada en presencia de AZ1, sino que la AZ1 también parece estabilizarse como consecuencia de la formación de un heterodímero ODC-AZ1 estable. Estos resultados están de acuerdo con estudios

previos que demostraron que la co-expresión de AZ1 y una ODC deleccionada en los 6 últimos residuos del C-terminal estabilizaba ambas proteínas (Gandre et al., 2002). Los resultados con el inhibidor del proteasoma lactacistina también apoyan que AZ1 podría degradarse conjuntamente con ODC, ya que la inhibición del proteasoma causó una acumulación de ambas proteínas.

Aunque estudios previos han aportado evidencias de que tanto ODC como AZIN1 se degradan en el proteasoma 26S, el mecanismo a través del cual estas proteínas se degradan es diferente. Asimismo, mientras que la degradación de ODC está mediada por AZs y es independiente de ubiquitinación, la de AZIN1 sí que requiere ubiquitinación previa (Pegg, 2006; Bercovich & Kahana, 2004; Kahana, 2009). En el caso de AZIN2, existen varios trabajos en los que se ha sugerido que esta proteína podría ubiquitinarse, aunque no existen pruebas claras de que su degradación esté mediada por el proteasoma 26S. En este capítulo hemos realizado una serie de experimentos que demuestran que mientras la degradación de ODC y AZIN1, es inhibida por el tratamiento con varios inhibidores del proteasoma, la de AZIN2 no. Es más, en el caso del inhibidor MG132 los niveles de proteína no solo no aumentaron sino que fueron incluso menores respecto al control. Aunque se ha descrito que MG132 puede ejercer otro tipo de efectos además de inhibir el proteasoma, como estimular la formación de neuritas en ciertos tipos celulares (Saito et al., 1992), su efecto diferencial sobre AZIN1 y AZIN2 resulta bastante llamativo. Además, efectos similares a los ejercidos por MG132 sobre AZIN2 han sido descritos para otras proteínas como PTEN (Tang & Eng, 2006). Por su parte, mientras que los niveles de proteína AZ1 y AZ2 se acumulan tras la administración de inhibidores del proteasoma, los niveles de AZ3 permanecieron inalterados tras los distintos tratamientos. Estos resultados sugieren que AZIN2 y AZ3 podrían tener vías alternativas a la degradación por el proteasoma, al menos en condiciones de sobre-expresión en células HEK 293T, y que una hipotética proteína degradada por el proteasoma pudiera estimular la degradación de estas proteínas por la vía alternativa. Dado que ambas proteínas son específicas de tejido debería realizarse un estudio más exhaustivo sobre la degradación de estas proteínas en células donde realmente se expresan, como por ejemplo en células testiculares.

DISCUSIÓN GENERAL

Como refleja el título de esta memoria, nuestro trabajo ha estado centrado en el estudio de la expresión del gen Azin2 en tejidos de ratón, así como en profundizar en el conocimiento de diferentes aspectos funcionales y estructurales de AZIN2, proteína caracterizada por primera vez en nuestro laboratorio (López-Contreras et al., 2006), comparando los mismos con los de sus proteínas homólogas ODC y AZIN1.

Cuando se inició el presente proyecto de tesis doctoral, los estudios realizados en nuestro laboratorio, utilizando un análisis semicuantitativo del ARNm de AZIN2 en diferentes tejidos de ratón, habían mostrado que dicho gen se expresaba fundamentalmente en testículo y cerebro (López-Contreras et al., 2006), lo que estaba de acuerdo con los resultados pioneros del grupo de Andersson y col. (Pitkanen et al., 2001) sobre los niveles de expresión de transcritos de dicho gen en tejidos humanos, inicialmente denominado ODCp. Sin embargo, los resultados de RT-PCR semicuantitativa obtenidos por nuestro grupo sugerían que dicho gen podría también expresarse en otros tejidos aparte de cerebro y testículo.

Los resultados de análisis de ARNm mediante RT-PCR cuantitativa mostrados en el Capítulo 1 corroboraron que el tejido con más alta expresión de AZIN2 es el testículo, pero también mostraron que existen cantidades significativas del ARNm de AZIN2 en otros tejidos como epidídimo, glándula adrenal, corazón, pulmón o páncreas. De hecho, la expresión en testículo, cerebro, epidídimo, glándula adrenal y pulmón es bastante superior a la de AZIN1, gen previamente considerado de expresión ubicua (Murakami et al., 1996), por lo que se puede concluir que la expresión de AZIN2 en ratón no está tan restringida como se propuso inicialmente. Si bien es claro que los niveles de ARNm no tienen por qué guardar una relación directa con los niveles de la proteína codificada, se puede deducir de nuestros resultados que en todos los tejidos de ratón analizados, con la excepción del testículo, la expresión de ODC supera ampliamente a la de sus dos parálogos. Igualmente el análisis de los niveles de ARNm de las distintas AZs reveló que AZ3 se expresa casi exclusivamente en testículo, mientras que AZ1 y AZ2 tienen una expresión ubicua. Cabe destacar que en todos los tejidos a excepción del testículo, los niveles de ARNm de AZ1 fueron mucho mayores que los de AZ2, variando de unos tejidos a otros, lo que sugiere que existe un control transcripcional en la expresión de las antizimas, en adición al estricto control traduccional de *frameshifting* que las poliaminas ejercen sobre la expresión de dichos genes (Matsufuji et al., 1995; Coffino, 2001a;).

Nuestros estudios también revelaron que la expresión de AZIN2 en líneas celulares derivadas de tumores humanos es mucho más baja que la de AZIN1, lo

que sugiere que la posible participación de AZIN2 en la regulación del crecimiento tumoral parece ser menos importante que la de AZIN1, para el que diferentes estudios han revelado que existe una correlación positiva entre la expresión de AZIN1 y la proliferación celular (Nilsson et al., 2000; Keren-Paz et al., 2006). En cualquier caso, en todas las líneas celulares examinadas la expresión de ODC fue bastante más elevada que la de las AZINs, lo que estaría de acuerdo con el papel relevante asignado a ODC en la proliferación celular. Cabe también subrayar, que en las células de origen tumoral, los niveles de los ARNm de las AZs fueron menores que los detectados en tejidos normales de ratón, lo que estaría de acuerdo con su postulado papel como supresor tumoral, destacando el predominio de la expresión de AZ2 en las células derivadas de neuroblastomas. Este hecho unido a estudios clínicos que han establecido una clara correlación entre una alta expresión de AZ2 con un aumento de la supervivencia en pacientes con neuroblastomas (Geerts et al., 2010), sugiere que AZ2 pudiera tener un papel destacable en la biología de este tipo de células.

Mientras que el papel fisiológico de AZIN2 en los diferentes tejidos en los que se expresa está por dilucidar, existen claras evidencias que tanto este gen como AZ3 están relacionados con el proceso de espermatogénesis (López-Contreras et al., 2009a; Tokuhiro et al., 2009). De hecho, los estudios publicados sobre la expresión de AZIN2 en testículo murino habían mostrado que este gen tiene un patrón de expresión temporal muy específico, ya que mientras que durante las primeras etapas de la espermatogénesis los niveles de ARNm de AZIN2 eran indetectables, su expresión aumentó de manera considerable durante la aparición y diferenciación de las espermátidas haploides, es decir, durante la espermiogénesis (López-Contreras et al., 2009a). Los resultados presentados en el Capítulo 2 relacionados con la expresión de AZIN2 y AZ3 en testículo de rata vuelven a mostrar que, en analogía con lo observado en ratón, ambos genes se expresan en las espermátidas, lo que refuerza que su posible implicación en el proceso de espermiogénesis no es específica de una sola especie animal. La drástica disminución conjunta de los ARNm de AZIN2, AZ3 y Prm2 tras el tratamiento de los ratones adultos con ciclofosfamida, fármaco que induce la destrucción de las células de los túbulos seminíferos, incluidas las espermátidas (Elangovan et al., 2006) y la recuperación coordinada de la expresión de los tres genes tras el tratamiento, de nuevo apoyan que la expresión de AZIN2 es mayoritaria en las células haploides testiculares. Estos resultados acerca de la expresión de AZIN2 en testículo de ratón y rata, no coinciden con los publicados sobre la expresión de dicho gen en testículo humano, que asignaban la expresión de AZIN2 mayoritariamente a las células de

Leydig (Mäkitie et al., 2009c). El mantenimiento de los niveles de expresión de las enzimas esteroideogénicas observada en los ratones tratados con ciclofosfamida sugiere que este tratamiento no afecta de manera significativa a las células de Leydig, lo que contrasta con la drástica caída de AZIN2. Además, el hecho de que en los ratones transgénicos *ATM^{-/-}*, con marcado déficit de células haploides, también se observara el mismo fenómeno en relación con la expresión de AZIN2 y de las enzimas esteroideogénicas, de nuevo refuerza la proposición inicial que AZIN2 se expresa mayoritariamente en las células haploides testiculares.

Una de las posibles explicaciones es que esta discrepancia pudiera estar relacionada con un diferente patrón de expresión del gen entre roedores y el hombre. Sin embargo, existe también la posibilidad de que el desacuerdo esté relacionado con las diferencias en las técnicas utilizadas, ya que en el caso de humanos se analizó la expresión mediante anticuerpos generados frente a un fragmento peptídico de AZIN2 (Mäkitie et al., 2009c), mientras que en el ratón se midió la expresión del ARNm de AZIN2. Resultados recientes obtenidos en nuestro laboratorio utilizando ratones transgénicos que expresan una proteína quimérica AZIN2-beta galactosidasa bajo el control del promotor de *Azin2*, han corroborado la expresión mayoritaria de la misma en las espermátidas (López-García et al., 2013). Aunque no se puede descartar la primera posibilidad apuntada, es también posible que se puedan producir falsos positivos en los análisis inmunohistoquímicos, cuando no se hace un análisis riguroso de los anticuerpos utilizados.

En otro orden de cosas, aunque nuestros estudios sobre AZIN2 de ratón (López-Contreras et al., 2006), y otros posteriores llevados a cabo con AZIN2 humana (Kanerva et al., 2008; Snapir et al., 2008) vinieron a demostrar que AZIN2 carece de actividad arginina descarboxilasa, la enzima que transforma arginina en agmatina, diversos trabajos han sostenido que existe una cierta relación entre esta proteína y la concentración de agmatina (Zhu et al., 2004; Moon et al., 2010; Bokara et al., 2011). Teniendo en cuenta que AZIN2 estimula el transporte de poliaminas (López-Contreras et al., 2008), existía la posibilidad de que esta proteína pudiera también participar en la captación de agmatina por las células de mamíferos.

Nuestros resultados mostraron que las células COS7 de origen renal son capaces de captar agmatina del medio de cultivo por dos sistemas transportadores de diferente afinidad, sugiriendo que el de mayor afinidad es el transportador común para las poliaminas putrescina, espermidina y espermina, ya que a concentraciones de agmatina próximas a las fisiológicas la captación de agmatina se estimuló por tratamiento con DFMO, se inhibió por las poliaminas, y por el incremento de los

niveles de antizimas, lo que estaría de acuerdo con lo descrito para otras líneas celulares de origen renal (Satriano et al., 2001; del Valle et al., 2001). Por su parte, AZIN2 y otras proteínas relacionadas con el metabolismo de poliaminas como ODC y SSAT fueron capaces de estimular en gran medida la captación de agmatina por las células transfectadas, si bien los mecanismos moleculares por los que estas proteínas ejercen sus acciones están por confirmar. Mientras que es muy probable que AZIN2 estimule la entrada de agmatina por inhibir la acción de las antizimas endógenas que bloquean, mediante mecanismos desconocidos, el hipotético transportador de poliaminas, la acción de SSAT podría deberse tanto a los efectos que pudiera tener la inducción de la enzima sobre los niveles endógenos de poliaminas, como a la interacción directa con el sistema transportador, ya que existen evidencias que localizan a SSAT en la membrana plasmática (Uemura et al., 2008). El hecho de que el estímulo de la captación de agmatina producido por AZIN2 y SSAT se reduzca por la presencia de poliaminas sugiere que el transportador modulado en esas condiciones es el transportador de poliaminas. Es de destacar que en el caso de las células transfectadas con ODC, los efectos opuestos observados sobre la captación de agmatina y putrescina no pueden ser explicados como en los casos anteriores por la mera estimulación del transportador de poliaminas. Es posible que cuando se produce un aumento de las concentraciones intracelulares de putrescina, pudiera ser funcional un intercambiador de diaminas, que facilitaría la captación de agmatina a expensas de la salida de putrescina, y que no sería afectado por las poliaminas. La posibilidad de que dicho transportador pudiera corresponder con los exportadores de diaminas descritos en células de mamíferos (Xie et al., 1997; Uemura et al., 2008) está por determinar. Por último comentar que los efectos observados por los compuestos guanidínicos sobre la captación de agmatina, de nuevo apoyan la hipótesis de que la entrada de agmatina a las células de mamíferos parece estar mediada fundamentalmente por el transportador general de poliaminas.

Nuestros resultados sobre aspectos estructurales muestran que AZIN2 comparte una serie de características con ODC y AZIN1, aunque también presenta claras diferencias con estas proteínas. Así, AZIN2 no tiene tendencia a formar homodímeros sino que existe fundamentalmente como monómero en disolución. Estos resultados contrastan con los descritos para ODC, ya que ésta, en condiciones fisiológicas, se encuentra en un equilibrio monómero-dímero (Solano et al., 1985), si bien son similares a los de AZIN1 (Albeck et al., 2008). Dado que la principal función atribuida a AZIN2 consiste en prevenir la acción de las AZs sobre

ODC y el transportador de poliaminas (López-Contreras et al., 2006; López-Contreras et al., 2008), nuestros resultados apoyarían estudios de otros grupos que sugirieron que el estado monomérico del AZIN es importante para su mayor capacidad de unión a AZs respecto a la de ODC (Murakami et al., 1996; Bercovich & Kahana, 2004). Además, los experimentos de *cross-linking* sugieren que AZIN2 pudiera estar interaccionando con alguna proteína o proteínas, y que tal interacción se interrumpe cuando los niveles intracelulares de AZs se elevan en la célula. Teniendo en cuenta los resultados previos de nuestro laboratorio relativos a la localización subcelular de AZIN2, presente tanto en el citosol como mayoritariamente en el ERGIC (López-Contreras et al., 2009b), estas proteínas podrían formar parte de la membrana de las cisternas del Golgi y participar en el anclaje de AZIN2 a la cara externa de dichas membranas. Por su parte, AZIN2, que se encontraría asociada a las membranas de Golgi en condiciones basales cuando su concentración es mayor que la de las AZs, podría servir para regular la acción de las AZs cuando los niveles de estas proteínas fueran elevados, y así modular la inhibición y degradación de la ODC citosólica o la inhibición del transporte de poliaminas. El cambio de localización subcelular de AZIN2 desde la fracción particulada de la célula al citosol inducida por niveles elevados de AZs (López-Contreras et al., 2009b), podría a su vez servir para modular hipotéticas acciones que AZIN2 pudiera desempeñar en el ERGIC.

Por otro lado, la estructura tridimensional de AZIN2 se determinó mediante modelado comparativo debido a la existencia de una alta homología de secuencia proteica con ODC y AZIN1, proteínas cuyas estructuras habían sido previamente determinadas mediante cristalización y posterior análisis de la estructura cristalina por rayos X y RMN, respectivamente (Kern et al., 1999; Almrud et al., 2000; Albeck et al., 2008). La predicción de la estructura de AZIN2 se realizó mediante aproximaciones computacionales por ser mucho menos tediosas y costosas que las técnicas clásicas de cristalización y difracción, y por haber sido demostrada su eficacia cuando existen proteínas molde con alta homología (Kosinski et al., 2007). Nuestros resultados revelaron, como era de esperar, que la estructura global de AZIN2 es muy similar a la de sus proteínas homólogas ODC y AZIN1, en lo referente a los dominios barril α/β tipo TIM y hoja plegada β , aunque difiere considerablemente en algunas regiones, como en ciertos bucles o en los extremos N- y C-terminal, donde posiblemente puedan residir algunas de las diferencias funcionales entre parálogos. De hecho, en estudios previos realizados en nuestro laboratorio se había demostrado que un segmento del extremo N-terminal de la proteína es clave para la localización específica de AZIN2 en compartimentos membranosos del aparato de

Golgi (López-Contreras et al., 2009b) y que alteraciones tanto de la región N-terminal como de la C-terminal afectaban de forma negativa su función como inhibidor de antizimas (López-Contreras et al., 2008).

Una de las características de las tres proteínas homólogas es su capacidad para unir a las AZs. El estudio estructural de AZIN2 puso de manifiesto que tanto en ODC como en los AZINs la región de unión a antizimas AZBE está incluida entre las dos hélices α más expuestas del dominio barril α/β y es altamente homóloga entre las tres proteínas parálogas. De hecho, la comparación de secuencias AZBE de los diferentes ortólogos de AZIN2 vino a demostrar que existen varios residuos altamente conservados, cinco de los cuales (K116, A124, E139, L140 y K142) también se encuentran conservados en los diferentes ortólogos de ODC y AZIN1. Nuestros resultados de mutagénesis dirigida de los mencionados residuos han aportado evidencias sobre la importancia de algunos de estos residuos tanto en la interacción con las AZs como en la funcionalidad de AZIN2. De igual manera, la comparación de los efectos de estas mutaciones sobre AZIN2 y ODC, ha venido a demostrar la diferente relevancia que tienen algunos de estos residuos en una y otra proteína. Así, mientras que la mutación simple de cualquiera de los residuos K116, A124, E139, L140 y K142 por alaninas afectó muy débilmente la unión de AZIN2 a las AZs, la doble sustitución de las lisinas o la triple sustitución de los residuos ELK redujo marcadamente la interacción con las AZs, y como consecuencia de ello alteró la función de AZIN2 como inhibidor de estas moléculas. Estos resultados ponen de manifiesto que si bien estos residuos de AZIN2 en su conjunto son importantes para la unión a las AZs, y aunque parcialmente de acuerdo con la hipótesis de que la interacción electrostática puede ser importante para la unión a las AZs como se postuló para ODC y AZIN1 (Kern et al., 1999; Almrud et al., 2000; Hoffman et al., 2005; Liu et al., 2011b), también indican que aunque se mantenga la carga eléctrica neta del AZBE la interacción con las AZs puede verse afectada por los cambios en estos residuos.

En ODC, sin embargo, las sustituciones sencillas de algunos de los residuos conservados ya mostraron efectos drásticos sobre las propiedades de la enzima, tanto en su actividad, como en su capacidad de dimerizar e interactuar con las AZs. Especialmente interesante es la constatación de que el residuo L139 del AZBE juega un papel importante no solo para interactuar con las AZs sino también en la dimerización de ODC y en la actividad catalítica. Aunque se han descrito distintas mutaciones que afectan la actividad ODC (Lu et al., 1991; Tsrirka & Coffino, 1992; Coleman et al., 1993; Tobias et al., 1993; Osterman et al., 1995; Osterman et al., 1997; Kilpelainen & Hietala, 1998), ésta es la primera mutación

simple conocida que altera simultáneamente la actividad enzimática de ODC, así como su capacidad para formar homodímeros e interactuar con las antizimas. Es de destacar, la diferente transcendencia funcional que la sustitución de esta leucina tiene para ODC y AZIN2. Las diferencias en el entorno aminoacídico de la leucina conservada en el AZBE que existen entre ODC y AZIN2 (Figura 1) podrían explicar el diferente comportamiento de los mutantes de una y otra proteína. Además, la mayor transcendencia de dichas mutaciones en ODC en comparación con AZIN2, parecen estar justificadas teniendo en cuenta la importancia que la dimerización tiene para la creación de los centros activos de ODC, mientras que la función de AZIN2 parece ser independiente de la capacidad para dimerizar. Todos estos resultados confirman que de los 5 residuos analizados, 4 de ellos (las dos lisinas, el ácido glutámico y la leucina) son importantes para la funcionalidad de AZIN2 y ODC, lo que estaría de acuerdo con su alto grado de conservación a lo largo de la evolución.

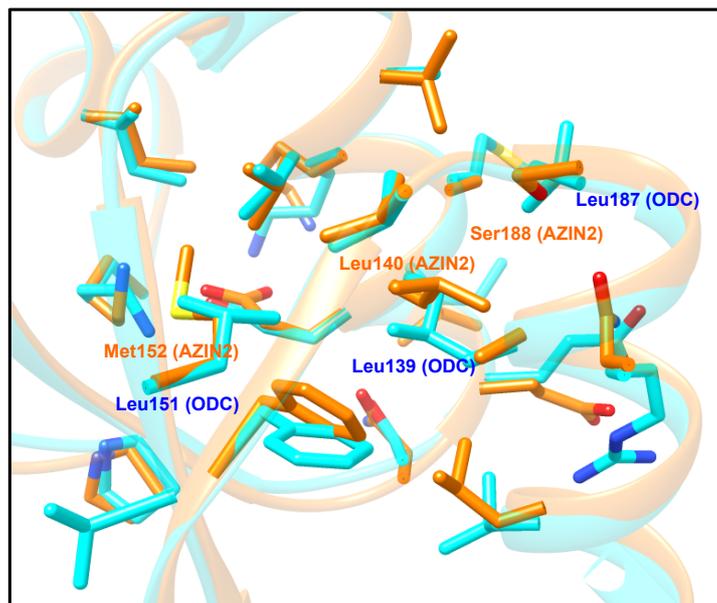


Figura 1. Visualización de los residuos críticos de la región AZBE en las estructuras 3D de ODC y AZIN2 murinas. La figura muestra los residuos encontrados en una distancia de 4 Å de los residuos L139 y L140 en ODC (azul) y AZIN2 (naranja), respectivamente. Esta figura se generó usando el programa UCSF Chimera a partir de los datos disponibles en "Protein Data Bank" (código PDB: 7odc) y el modelo final de AZIN2 generado mediante modelado comparativo. Los residuos están coloreados en función del tipo de átomo (oxígeno en rojo, nitrógeno en azul y azufre en amarillo)

Respecto a los estudios sobre la estabilidad de ODC y los AZINs en células de mamíferos, nuestros resultados demuestran por una parte que ODC es muy estable en condiciones de sobreexpresión, en contraste con estudios previos que demostraron la alta labilidad de la proteína endógena tanto en tejidos como en

células de mamíferos (Pegg, 2006), y por otra que tanto AZIN1 como AZIN2 son proteínas de rápido recambio aun cuando sus niveles intracelulares sean elevados. La alta vida media de ODC en nuestras condiciones experimentales sugiere que la degradación de esta proteína es muy dependiente de su relación con los niveles de AZ. De hecho, estudios previos demostraron que la vida media de ODC era mucho mayor en tejidos murinos con elevados niveles de actividad ODC, como en riñones de macho adulto o placenta, en relación con otros tejidos con expresión mucho más baja (Seely et al., 1982; Murakami et al., 1988; López-Ballester et al., 1990; Lopez-Garcia et al., 2009). Todo ello está de acuerdo con el hecho de que la degradación de ODC es grandemente estimulada por AZ1, y por tanto la vida media será tanto mayor cuanto mayor sea la relación ODC/AZ, tal como ocurre en las células transfectadas con sobreexpresión de ODC.

Por su parte, el hecho de que AZIN2 sea mucho más lábil que ODC en las mismas condiciones experimentales, está de acuerdo con el efecto opuesto que mostraron las AZs sobre la estabilidad de dichas proteínas. Dicho efecto está en concordancia con los estudios que sostienen que los AZINs, a diferencia de ODC, son degradados por el proteasoma tras su ubiquitinación (Bercovich & Kahana, 2004; Kanerva et al., 2008; Snapir et al., 2008), y que por tanto su interacción con las AZs podría disminuir dicha modificación post-traducciona. Mientras que es evidente que las manipulaciones experimentales de los sistemas de ubiquitinación, afectan la estabilidad de AZIN2 (Kanerva et al., 2008; Snapir et al., 2008), no está demostrado que en el caso de AZIN2 sea el proteasoma quien participe de forma exclusiva y directa en la degradación de esta proteína, ya que existe la posibilidad de que los efectos observados pudieran ser indirectos y estar relacionados con cambios en la degradación de las antizimas (Gandre et al., 2002). Nuestros resultados utilizando inhibidores del proteasoma, demuestran que mientras que la degradación de AZIN1 y AZ1, proteínas de alto recambio en nuestro sistema, fue considerablemente inhibida, la de AZIN2 fue por el contrario aumentada, lo que sugiere que en la degradación de dicha proteína pudiera participar algún sistema proteolítico diferente al proteasomal, y que la degradación de AZIN2 por esta vía podría estar también modulada por las AZs.

Todos estos resultados vienen a demostrar la existencia de marcadas diferencias entre AZIN2 y los demás parálogos, que afectan no solamente a su nivel de expresión en los diferentes tejidos y a su localización subcelular sino también a aspectos estructurales y funcionales y a sus mecanismos de degradación, que sugieren un papel fisiológico específico para AZIN2.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. El análisis mediante RT-PCR a tiempo real mostró que, además de cerebro y testículo, AZIN2 se expresa de manera significativa en otros tejidos de ratón adulto como epidídimo, glándula adrenal, páncreas, corazón y pulmón, mientras que su expresión en diversas líneas celulares humanas de origen tumoral fue prácticamente indetectable.
2. Diversos modelos experimentales corroboran que en el testículo murino la gran mayoría del ARNm de AZIN2 se encuentra localizado en las células germinales haploides, descartando una expresión significativa en otros tipos celulares testiculares como las células intersticiales.
3. El patrón de expresión postnatal de AZIN2 y AZ3 en el testículo de rata es similar al encontrado en ratón, sugiriendo que AZIN2 y AZ3 también podrían estar participando en el proceso de espermiogénesis en esta especie.
4. La sobreexpresión de AZIN2, ODC o SSAT estimula la entrada de agmatina a las células COS7, mientras que las AZs la inhiben. En condiciones basales, dicho transporte, a concentraciones próximas a las fisiológicas, parece tener lugar a través del transportador general de poliaminas, mostrando una $K_m=44 \mu M$.
5. La estructura tridimensional de AZIN2, deducida mediante modelado comparativo, es similar a la descrita para sus parálogos ODC y AZIN1 en lo referente a los dominios barril α/β y hoja plegada β , aunque difiere en regiones menos conservadas como ciertos bucles y las regiones N- y C-terminal.
6. A diferencia de ODC, AZIN2 es incapaz de formar homodímeros o a heterodimerizar con monómeros de ODC, aunque comparte con esta proteína la capacidad para interactuar con las tres antizimas conocidas.
7. El análisis comparativo de la secuencia del elemento de unión a antizimas (AZBE) en los diferentes ortólogos de AZIN2 y los de sus parálogos AZIN1 y ODC reveló la existencia de cinco residuos conservados (K116, A124, E139, L140 y K142 en la secuencia de AZIN2 de ratón).

8. Mientras que las mutaciones simples de cada uno de estos residuos en AZIN2 apenas afectaron la interacción de esta proteína con las AZs, las mutaciones dobles o triples de algunos de ellos, anularon la capacidad de AZIN2 para interactuar con las AZs, de manera independiente de la repercusión de dichas mutaciones sobre la carga eléctrica neta del elemento AZBE.

9. Los residuos conservados en la secuencia AZBE de ODC parecen ser muy importantes para la función de la enzima, ya que todas las mutaciones simples de los mismos, con la excepción de A123, disminuyeron notablemente la actividad catalítica de la enzima.

10. Los residuos E138 y L139 son críticos para la funcionalidad de ODC, ya que su sustitución por alaninas disminuye grandemente la homodimerización de la proteína, produciendo además la del segundo un gran aumento en su estabilidad por anular su interacción con AZ1.

11. En células transfectadas, AZIN2 es una proteína más lábil que ODC, mostrando una vida media de aproximadamente 90 minutos, y que a diferencia con ODC se estabiliza grandemente al interactuar con las antizimas.

12. A diferencia con lo observado para ODC y AZIN1, la inhibición de la maquinaria proteasomal con lactacistina o MG132 produce una marcada disminución de la proteína AZIN2, sugiriendo que su degradación pudiera estar mediada por una vía alternativa a la del proteasoma 26S.

PHD THESIS SUMMARY

STRUCTURE, EXPRESSION AND FUNCTIONAL ASPECTS OF ANTIZYME
INHIBITOR 2 (AZIN2).



Author: Bruno Ramos Molina

Address: Department of Biochemistry and Molecular Biology
Faculty of Medicine, University of Murcia
Campus Universitario de Espinardo
30100, Murcia, SPAIN

Advisors: Prof. Rafael Peñafiel García
Dr. Andrés Joaquín López Contreras

Advisor during external stays:

Dr. Janusz Bujnicki (Laboratory of Structural Bioinformatics, Institute of Molecular Biology and Biotechnology, Adam Mickiewicz University, Poznan, POLAND)

INTRODUCTION

Polyamines are small cationic molecules essential for cell growth, proliferation, differentiation and apoptosis (Tabor & Tabor, 1984; Thomas & Thomas, 2001; Wallace et al., 2003; Seiler & Raul, 2005). In mammals, the intracellular polyamine levels are tightly controlled by the regulation of different processes including their biosynthesis, degradation and transport across the plasma membrane (Pegg, 2009). Ornithine decarboxylase (ODC) is the key biosynthetic enzyme that converts ornithine into putrescine, which is the precursor for the physiological polyamines, spermidine and spermine. Different studies have revealed that ODC and polyamines play an important role in the development of cancer (Pegg, 1988; Auvinen et al., 1992; Gerner & Meyskens, 2004). ODC activity is highly dependent on the intracellular polyamine concentrations, being rapidly down regulated by high polyamines, acting at transcriptional, translational and post-translational levels (Pegg, 2006). Post-translational regulation of ODC is mainly mediated by the action of a family of small proteins named antizymes (AZs), whose synthesis is stimulated by high polyamine levels (Coffino, 2001a). AZs bind and inhibit ODC and target it to proteasomal degradation without ubiquitination (Murakami et al., 1992; Murakami et al., 2000). Besides, AZs inhibit extracellular polyamine uptake presumably by interacting with the polyamine transport system (Mitchell et al., 1994; Suzuki et al., 1994; Poulin et al., 2012). Initial studies based on the differential affinity for AZ between murine and trypanosomal ODC (an enzyme form that is not regulated by AZ), led to the identification of the antizyme-binding element (AZBE), as a sequence spanning the residues from 117 to 140 in mouse ODC (Li & Coffino, 1992). Subsequently, the analysis of the tertiary structure of ODC revealed that this region is present in two α -helices included in a TIM-like α/β -barrel domain, in which several basic residues are exposed toward the surface (Kern et al., 1999; Almrud et al., 2000). In this regard, several acidic residues conserved in AZs have been also related to the interaction with ODC (Hoffman et al., 2005), and several groups have postulated that both ODC and AZ interact electrostatically through these residues.

In mammals, the family of AZs is composed by three isoforms (AZ1-3), AZ1 being the predominant form in most cells and tissues (Ivanov et al., 1998; Mangold, 2005). Despite the fact that all AZ isoforms are able to inhibit ODC and the polyamine uptake, only AZ1 clearly induces ODC proteasomal degradation (Murakami et al., 1992; Li & Coffino, 1993). In fact, there are controversial data on the capacity of AZ2 for targeting ODC to degradation *in vivo* and *in vitro* (Zhu et al., 1999; Chen et al., 2002; Snapir et al., 2009), and recently it has been reported that AZ3, a testis-specific isoform (Ivanov et al., 2000b; Tosaka et al., 2000), is unable to target ODC to degradation (Snapir et al., 2009).

In addition to AZs, the ODC activity is also indirectly regulated by a family of proteins named antizyme inhibitors (AZINs). These proteins, closely related to ODC but without enzymatic activity, also interact with antizymes, even more efficiently than ODC, counteracting the effects of antizymes on ODC (Kahana, 2009; López-Contreras et al., 2010). In mammals, the AZIN family is formed by two members: AZIN1 and AZIN2. AZIN1 is a ubiquitous protein that regulates intracellular polyamine levels and cell growth (Murakami et al., 1996; Nilsson et al., 2000; Mitchell et al., 2004; Keren-Paz et al., 2006). Mice with disruption of the AZIN1 gene die soon after birth (Tang et al., 2009). On the other hand, AZIN2 was first found to be expressed in testis and brain (Pitkanen et al., 2001; López-Contreras et al., 2006), but more recent analyses have indicated that it is also expressed in specific type of secretory cells and tissues (Kanerva et al., 2009; Mäkitie et al., 2009c). Although the physiological role of AZIN2 is mostly unknown, there are data suggesting that it is involved in cell growth, vesicular trafficking, secretion and spermiogenesis (Snapir et al., 2008; Kanerva et al., 2009; López-Contreras et al., 2009a; Kanerva et al., 2010). Interestingly, overexpression of AZIN2 has been observed in certain pathologies (Mäkitie et al., 2009b).

AIMS

Taken into consideration the previous research in the field, the specific aims of this work were:

1. To determine the expression pattern of AZIN2 and homologous proteins, as well as those of AZs, in different adult mouse tissues by real-time RT-PCR.
2. To elucidate the AZIN2 expression in rat normal testes and in mouse testes with impaired spermatogenesis.
3. To analyse the effect of AZIN2 and proteins related to the polyamine metabolism and the influence of aminoguanidine compounds on agmatine transport.
4. To predict the tridimensional structure of AZIN2 by comparative modeling and to determine whether AZIN2 is able to form homodimers or heterodimers with ODC in mammalian cells.
5. To analyse the AZBE region of AZIN2 and its paralogs and the effect of conserved residues in the functionality of these proteins.
6. To study the half-life and the mechanism of degradation of AZIN2 and its paralogs in mammalian cells.

RESULTS AND DISCUSSION

1. Differential expression of antizyme inhibitors and antizymes in rodent tissues and human cell lines.

Previous studies on the expression of AZIN2 based on dot-blot and semiquantitative RT-PCR analyses revealed that, in humans and mice, AZIN2 transcripts were most abundant in testis and brain (Pitkanen et al., 2001; Lopez-Contreras et al., 2006). In order to quantify more accurately mRNA levels, we analysed using real-time RT-PCR the expression pattern of AZIN2 and other related genes in several mouse tissues and in cell lines derived from different human tumors.

In agreement with previous data, testes presented the highest values (normalized against beta-actin) among several mouse tissues analysed. In addition, the expression of AZIN2 in the testis was about 30-fold higher than in the brain. Similar values to those found in brain were observed in epididymis and pancreas, whereas lower values were found in other tissues, including lung, heart, kidney and liver. The comparison between AZIN2 and AZIN1 mRNA levels in the tissues studied showed that whereas AZIN2 was more highly expressed than AZIN1 in testis, adrenal gland, lung, brain and epididymis, this ratio being the highest for testis (about tenfold), the expression of AZIN1 was considerably higher than that of AZIN2 in kidney and liver, with values about 8- and 25-fold, respectively. In order to compare the expression of antizyme inhibitors with their paralog ODC, the levels of ODC mRNA were also determined and the percentages of each paralog were calculated. In all tissues studied, the levels of ODC mRNA were considerably higher than those of their paralogs AZIN1 and AZIN2, especially in lung, kidney, intestine and heart (higher than 80%). The highest percentage of AZIN2 was observed in testes (45%), followed by brain (25%) and adrenal glands (16%). The tissue exhibiting the highest proportion of AZIN1 mRNA was the liver (36%) followed by pancreas (20%) and brain (15%). Interestingly, a mouse model deficient for AZIN1 showed early lethality linked to hepatic alterations (Tang et al., 2009), which supports the relevance of the highest AZIN1 expression level in the liver found in our study.

Since the three ODC paralogs are functionally related to AZs, we next examined the transcript levels of the three ODC antizymes expressed in mammalian tissues. AZ1 and AZ2 were expressed in all the tissues studied, and their absolute values (normalized to beta actin) were much higher than those found for AZINs in the same type of tissue. In agreement with previous studies (Ivanov et al., 2000b; Tosaka et al., 2000), AZ3 was almost exclusively expressed in the testes. The measured value of AZ3 in the mouse testis was 4.63 ± 0.51 and it was the AZ most highly expressed in that tissue (85% of all AZs). In the other tissues examined, AZ1 mRNA was predominant with most values

higher than 90% in most of them. The ratio between values of AZ1 and AZ2 varied from 2 (in testis) to 41 (in lung). These data are in agreement with results from dot-blot analysis of human tissues, where AZ1 was found to be overall 16 times more abundant than that of AZ2 (Ivanov et al., 1998).

Since the expression of AZIN2 and AZ3 has been almost exclusively studied in murine and human testes (Ivanov et al., 2000b; Tosaka et al., 2000; Lopez-Contreras et al., 2006), we analysed the expression of both genes and their corresponding paralogs also in rat testes, finding that the relative expression of ODC paralogs in mouse and rat testes was similar. AZIN2 mRNA was more abundant than that of AZIN1, but in the rat testis the two AZINs were overall more highly expressed than ODC, in contrast with mice. In addition, AZ3 mRNA was again the most abundant of the three AZs in the rat testis. In contrast to mouse testis, AZ2 mRNA values in the rat testis were higher than those of AZ1.

On the other hand, whereas in tumor cells, ODC expression has been widely studied (Shantz & Levin, 2007), data on the expression of AZs and AZINs are scarce. So, we decided to measure mRNA levels of AZs and AZINs in different tumor cell lines. ODC was the most abundant paralog expressed in all types of cells studied. In addition, the absolute values of AZIN2 were extremely low, and consequently the AZIN1:AZIN2 ratio was much higher than found in any of the mouse tissues examined. Regarding AZs, no significant expression of AZ3 was found in any of the tumor cells. The relative expression of AZ1 and AZ2 was dependent on the type of cells analysed. Of note is that AZ2 was predominantly expressed in cells derived from neuroblastomas, such as Kelly, NB69, U373 or SHSY5Y cells and also in U973 cells derived from a histiocytic lymphoma. In this context, high AZ2 mRNA expression has been correlated with increased survival in patients suffering from neuroblastoma (Geerts et al., 2010). In contrast, AZ1 was more expressed in carcinoma-derived cells such as HepG2 (hepatic carcinoma), Caco-2 cells (colon carcinoma), HeLa cells (cervical carcinoma), Kato III cells (gastric carcinoma), HBL (melanoma) or DMS3 cells (small cell lung carcinoma).

2. Expression of AZIN2 in testis: regulatory factors.

Different studies have demonstrated that in testes a strict control of the polyamine levels is necessary for a correct spermatogenesis. In this regard, transgenic mice with high testicular ODC activity are infertile, the generation of haploid germ cells being affected by the excess of putrescine (Hakovirta et al., 1993). In addition, it has been demonstrated that ODC activity is drastically diminished after meiosis in male germ cells (Shubhada et al., 1989). Additionally, several groups have displayed that the testis-specific AZ isoform AZ3 is specifically expressed in haploid spermatids (Ivanov et al.,

2000b; Tosaka et al., 2000), and that the deficiency of this protein in mutant mice causes abnormal spermatozoa formation, these mice being infertile (Tokuhiro et al., 2009). Like AZ3, AZIN2 is expressed specifically in haploid spermatids in mouse testes, where it might be participating in the spermiogenesis (López-Contreras et al., 2009a). However, a recent histological analysis showed that AZIN2 protein could be accumulated in Leydig cells in samples from human testes (Mäkitie et al., 2009c). To clarify these discrepancies between human and mouse, we decided to analyse the AZIN2 expression in the rat testes, finding that in these samples the mRNA levels of AZIN2 were much higher than those for ODC and AZIN1 and that, similarly to mice, the temporal expression pattern was similar to those for AZ3 and Prm2, specific markers of haploid spermatids.

Apart from these data in male gonads of rat, we also demonstrated by different pharmacological and hormonal treatments that in mouse testes the expression of AZIN2 is exclusively detected in haploid germ cells. Thus, the mRNA levels of AZIN2 were extremely low after destroying specifically the germ cells with cyclophosphamide, in contrast with the unaffected expression levels of some steroidogenic genes. Additionally, we also found low expression of AZIN2 and of the spermatid markers AZ3 and Prm2 in testes from mice with impaired spermatogenesis (chronic hypokalemia and ATM-null transgenic mice).

3. Transport of agmatine in mammalian cells. Influence of AZIN2 and other proteins related to the polyamine metabolism.

Although the existence of L-arginine decarboxylase activity has not been demonstrated in mammals, agmatine (decarboxylated L-arginine) has been detected in different mammalian tissues, probably due to its intake from the diet or its synthesis by gastrointestinal bacteria. Agmatine is related to the polyamine biosynthetic pathway, since it can be converted into putrescine by the enzyme agmatinase and is able to induce the synthesis of AZ (Satriano et al., 1998). In mammals, agmatine was firstly detected in rat brain (Li et al. 1994), and most studies about its function have been focused mainly in this organ (Uzbay, 2012). Nevertheless, there are detectable agmatine levels in other mammalian tissues such as intestine, stomach, spleen, kidney or liver (Raasch et al. 1995; Lortie et al., 1996).

Despite the low agmatine levels in mammalian tissues, it has been demonstrated that this cationic molecule has neuromodulatory and antiproliferative functions in cells (Satriano et al., 1998; Uzbay, 2012). The mechanism of agmatine uptake depends on the type of cell line, and various studies displayed that agmatine uptake in renal cells is mediated by the polyamine transporter (Satriano et al. 2001; del Valle et al. 2001). Recently, it has been demonstrated that AZIN2 is able to stimulate the transport of the

different polyamines through the polyamine transporter (López-Contreras et al., 2008). In this work, we have analysed the transport of agmatine into the kidney-derived COS7 cell line, finding that the uptake of agmatine is mediated by the polyamine transporter at physiological concentrations but with less affinity than for the rest of polyamines, and that this process is calcium-dependent. In addition, agmatine uptake is markedly induced by ODC and AZIN2, and significantly inhibited by antizymes. Furthermore, spermidine/spermine N1-acetyltransferase (SSAT), an enzyme involved in the polyamine catabolism, also stimulated the uptake of both agmatine and polyamines. Whereas both AZIN2- and SSAT-mediated transport of agmatine were polyamine-dependent, the ODC-mediated agmatine uptake was not sensitive to polyamines. Taken into account that the effect of ODC overexpression on the agmatine uptake was dependent on the enzymatic activity and the fact that agmatine induced the excretion of putrescine, it seems likely that the transport system induced by ODC might be an agmatine-putrescine exchanger.

4. Structural and mutational analyses of AZIN2 reveal a monomeric state in solution and conserved residues critical for the interaction with antizymes.

The knowledge of the tertiary and quaternary structure of proteins is crucial to understand their mechanism of action. Thus, in mammalian cells, monomeric and dimeric forms of ODC are in equilibrium, but only the homodimer is catalytically active (Solano et al., 1985). In addition, only the ODC monomer is able to bind to antizymes, this step being required for its degradation by the proteasome (Murakami et al., 2000). Although the crystal structures of ODC and AZIN1 have been elucidated (Kern et al., 1999; Almrud et al., 2000; Albeck et al., 2008), and both ODC and AZIN1 crystallize as a dimer, AZIN1 exists only as a monomer in solution (Albeck et al., 2008). In comparison to ODC and AZIN1, little is known on the molecular aspects of the interaction between AZIN2 and AZ1, probably due to the lack of information on AZIN2 structure. The aim of this work was to analyse structural and functional properties of AZIN2, and their role on the interaction with AZs, using biochemical techniques and computational strategies.

The results obtained by different biochemical approaches (cross-linking experiments, polyacrylamide gel electrophoresis under non-denaturing conditions and size exclusion chromatography) clearly demonstrated that AZIN2 is unable to dimerize, at least in transfected cells. In addition, no evidence of heterodimer formation between AZIN2 and ODC was found in co-transfected cells.

The 3D structure of AZIN2 was predicted by comparative modeling, using known structures of ODC and AZIN1 as templates. As expected, the final model was very similar to those of mouse ODC and AZIN1, mainly in the two main domains (TIM-like α/β -barrel and β -sheet), but differed considerably in the less conserved regions including

the N-terminus, C-terminus and some of the loops. In this regard, it should be mentioned that a segment in the N-terminal region of AZIN2 is required for its interaction with the Golgi membranes (López-Contreras et al., 2009b), and that in ODC the C-terminal sequence is critical for the interaction with the proteasome in the antizyme-induced degradation of this enzyme (Li & Coffino, 1993).

The comparison of the AZBE regions of the different AZIN2 orthologues revealed the existence of seven conserved residues, five of which were equally conserved in the ODC and AZIN1 orthologues (three charged residues K116, K142 and E139; and two non-charged residues A124 and L140). In the case of mouse AZIN2 the net electric charge of the AZBE region is +2. Given that in previous reports it was postulated that ODC and AZ might interact electrostatically (Almud et al., 2000; Liu et al., 2011a), the possible influence of the electric charge of the AZBE region of mouse AZIN2 on its interaction with AZ1 can be evaluated from our results with the different variants, in which the conserved residues and hence the electric charge had been modified. According to our data, the substitution of only a single conserved residue of the AZBE region of AZIN2 does not appear to importantly affect the interaction with AZ1, independently of the influence of the substitution on the electric charge of AZBE (decreased in the case of K116A or K142A, maintained in A124S, or increased in E139A). However, double or triple substitutions of conserved residues cause that the interaction of AZIN2 with AZ1 was markedly decreased, independently of the effects of substitutions on the net electric charge of the AZBE region. These results suggest that charged conserved residues in the AZBE region of AZIN2 are important for the interaction with AZs, independently of the net charge of the region.

5. Mutational analysis of the antizyme-binding element reveals critical residues for the function of ODC.

Recently, mutational studies of the non-conserved residues of the AZBE region between trypanosomal ODC (enzyme that does not interact with AZ) and human ODC have revealed that some of these residues, such as Q119, M140 and specially V137, are critical for AZ binding (Liu et al., 2011a). In addition, differences in the residues 119 and 140 between human ODC and AZIN1 have been related to the differential AZ-binding affinities of these proteins (Liu et al., 2011b). Whereas most of these studies have been focused on the analysis of the differences existing in the AZBE region between the trypanosomal ODC and human or mouse ODC, our study has identified the conserved residues of the AZBE region of many ODCs and its paralogs of different eukaryotic species by using multi-sequence alignment analysis. This conservation suggests that these residues may be important for the interaction of ODC and AZINs with antizymes.

The mutational results presented here indicate that among the five conserved residues in the AZBE region of mouse ODC (Lys115, Ala123, Glu138, Leu139 and Lys141), Leu139 plays a critical role for binding AZ1, since the substitution of this residue by Ala or Ser dramatically decreased the interaction of ODC with AZ1 and, in consequence, the mutant enzyme was much more resistant to the antizyme-mediated degradation by the proteasome. In addition, these mutants displayed a marked decrease in their ability to form homodimers, and were almost enzymatically inactive. Although many different mutations have been described affecting ODC activity (Tsirka & Coffino, 1992; Coleman et al., 1993; Tobias et al., 1993; Osterman et al., 1995; Kilpelainen et al., 1998), to our knowledge, this is the first single mutation that alters simultaneously the decarboxylating activity of ODC, as well as the ability to form homodimers, and the interaction with antizyme. According to the 3D structure of human ODC (Almud et al., 2000), Leu139 is located in the non-exposed side of the helix 6, in the center of a hydrophobic cluster formed by Phe133, Val142, Leu151, Leu180, Ala184, Leu187 and Ile189. To explain the marked phenotypic changes associated to this mutation, it is tempting to speculate that the substitution of this residue in the inner part of the hydrophobic domain may alter the protein conformation of the ODC monomer in such a way that it markedly reduces its ability to form homodimers or to bind to the antizyme. Another conserved residue, the alteration of which produced marked effect on ODC activity, is Glu138. The ODC E138A variant was catalytically inactive, and showed a decreased capacity to form a dimer. However, the monomer was still able to interact with AZ1, since its degradation was accelerated in the cells co-transfected with AZ1 and the mutant construct. The other two conserved residues in the AZBE region are Lys115 and Lys141. Although these residues are important to keep the enzymatic activity, their substitution did not produce such drastic effects as those produced by the changes in the residues E138 or L139. Although in both mutants ODC activity was reduced, in the case of Lys115 the marked increase in the K_m enzymatic parameter could be related with a decrease in the proportion dimer/monomer present under physiological conditions. Taking into consideration the 3D structure of human ODC, these three charged residues, K115, E138 and K141, are close enough to interact electrostatically. Our results suggest that any change in the positive or negative charge in this patch may affect ODC conformation, decreasing the enzyme activity but not the capacity of the monomers to interact with AZ1.

6. Degradation and stability of AZIN2. Influence of the interaction with AZs.

Despite the high homology between ODC and AZIN1, there are clear differences in the degradation of both proteins by the proteasome 26S. Thus, whereas the proteasomal degradation of ODC is mediated by AZs in a ubiquitin-independent manner,

AZIN1 is degraded by the proteasome after ubiquitination (Bercovich & Kahana, 2004; Kanerva et al., 2008; Snapir et al., 2008). Despite these differences, it has been reported that both ODC and AZIN1 are labile proteins, the degradation of ODC being highly dependent of the AZ levels. In fact, in this work we demonstrated that whereas overexpressed ODC is stable, the endogenous protein is labile (half-life lower than 30 min). In comparison to overexpressed ODC, the half-life of AZIN2 was very low (less than 100 min), finding a high turnover rate for this protein even in overexpression conditions. In addition, AZIN2 was significantly stabilized in presence of the three types of AZ. These results suggest that AZs are able to prevent the high turnover rates of AZIN2, probably by inducing the formation of a stable heterodimer AZIN2-AZ in the cytosol (López-Contreras et al., 2009b).

With regard to the AZs, it has been reported that AZ1 is a very labile protein that is degraded by the proteasome when not bound to ODC or other targets (Gandre et al., 2002). In the present work, we also found a high turnover of the different isoforms of AZ under overexpression conditions. As expected, the presence of AZIN2 caused the stabilization of the AZs, detecting high AZ levels even after several hours of protein synthesis inhibition. However, the effect of the presence of ODC was different depending on the type of AZ isoform. Thus, whereas AZ2 and AZ3 protein levels were much higher than in the absence of ODC, AZ1 levels were lower than in control conditions. These results suggest that the heterodimer ODC-AZ1 is degraded in the proteasome, and that the effects on the other AZs are due to the fact that neither AZ2 nor AZ3 are capable of targeting ODC to degradation.

On the other hand, although previous studies have clearly demonstrated that the degradation of ODC and AZIN1 is mediated by the proteasome, in a ubiquitin-independent and -dependent manner respectively, there are little data on the process through AZIN2 is degraded. In this work, we analysed the effect of the treatment of proteasome inhibitors on AZIN2 protein levels, comparing the results with those for ODC and AZIN1 in the same experimental conditions. Our results demonstrated that whereas ODC was unaffected by the proteasome inhibitors, probably because its high stability in overexpression conditions, AZIN1 was accumulated. In the case of AZIN2, the protein levels were even lower than those of control. Similarly, we observed different responses to the proteasome inhibitors depending on the type of AZ. In this regard, whereas AZ1 and AZ2 were accumulated by the treatment, AZ3 was unaffected. These results suggest that both AZIN2 and AZ3, tissue-specific proteins, might be degraded through an alternative route to the degradation by the proteasome.

CONCLUSIONS

1. Real-time RT-PCR analysis showed that, in addition to brain and testis, AZIN2 is expressed significantly in other adult mouse tissues such as epididymis, adrenal glands, pancreas, heart and lung, whereas its expression in several human cancer cell lines is almost undetectable.
2. In mouse testis, most AZIN2 mRNA is located in haploid germ cells, without significant expression in other testicular cells such as the interstitial cells.
3. The postnatal expression patterns of AZIN2 and AZ3 genes in rat testis are similar to those found in mice, indicating a evolutionary conserved expression pattern and suggesting that in the rat both proteins might be also participating in the spermiogenesis.
4. Agmatine uptake in COS7 cells is stimulated by AZIN2, ODC or SSAT overexpression, and inhibited by the presence of AZs. In basal conditions, agmatine uptake occurs through the polyamine transporter when the concentration of agmatine is close to the physiological values.
5. The tertiary structure of AZIN2, predicted by comparative modeling, is similar to those of its paralogs ODC and AZIN1 in the domains TIM α/β barrel and β sheet, but it differs considerably in less conserved regions such as some loops and the N- and C-terminal regions.
6. Unlike ODC, AZIN2 is unable to form homodimers or heterodimers with ODC, but it is able to interact with the three AZ isoforms.
7. The comparative analysis of the AZBE sequences from multiple AZIN1, AZIN2 and ODC orthologs revealed the existence of five conserved residues (K116, A124, E139, L140 and K142 in mouse AZIN2).
8. In AZIN2, the double and triple substitutions of some of the conserved residues, but not single substitutions, drastically affected its interaction with AZs, independently from the effect of the substitutions on the net electric charge of the AZBE region.
9. In the case of ODC, the conserved residues play an important role in the function of the enzyme, since all single substitutions, with the exception of A123, significantly

diminished ODC catalytic activity.

10. The residues E138 and L139 are critical for ODC functionality, since their substitution by alanines clearly reduced the formation of homodimers, causing the change L139A a potential increase of the protein stability by decreasing its interaction with AZ1.

11. In transfected cells, AZIN2 is more labile than ODC, having a half-life of approximately 90 minutes and being considerably stabilized by the interaction with AZs.

12. Unlike ODC and AZIN1, AZIN2 protein levels decreased after treatment with proteasome inhibitors, suggesting that its degradation might be mediated by an alternative route to proteasome 26S.

BIBLIOGRAFÍA

Albeck S., Dym O., Unger T., Snapir Z., Bercovich Z., Kahana C. (2008) Crystallographic and biochemical studies revealing the structural basis for antizyme inhibitor function. *Protein Sci.*, 17, 793-802.

Almud J.J., Oliveira M.A., Kern A.D., Grishin N.V., Phillips M.A., Hackert M.L. (2000) Crystal structure of human ornithine decarboxylase at 2.1 Å resolution: structural insights to antizyme binding. *J. Mol. Biol.*, 295, 7-16.

Anahara R., Toyama Y., Mori C. (2008) Review of the histological effects of the anti-androgen, flutamide, on mouse testis. *Reprod. Toxicol.*, 25, 139-43.

Araneda R.C., Lan J.Y., Zheng X., Zukin R.S., Bennet M.V. (1999) Spermine and arcaine block and permeate N-methyl-D-aspartate receptor channels. *Biophys. J.*, 76, 2899-2911.

Auvinen M., Paasinen A., Andersson L.C., Holtta E. (1992) Ornithine Decarboxylase Activity Is Critical for Cell-Transformation. *Nature*, 360, 355-358.

Babál P., Ruchko M., Campbell C.C., Gilmour S.P., Mitchell J.L., Olson J.W., Gillespie M.N. (2001) Regulation of ornithine decarboxylase activity and polyamine transport by agmatine in rat pulmonary artery endothelial cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 296, 372-7.

Bachelot A., Meduri G., Massin N., Misrahi M., Kuttann F., Touraine P. (2005) Ovarian steroidogenesis and serum androgen levels in patients with premature ovarian failure. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 90, 2391-6.

Bardocz S., Duguid T.J., Brown D.S., Grant G., Pusztai A., White A., Ralph A. (1995) The importance of dietary polyamines in cell regeneration and growth. *Br. J. Nutr.*, 73, 819-828.

Bello-Fernandez C., Packham G., Cleveland J.L. (1993) The ornithine decarboxylase gene is a transcriptional target of c-Myc. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 90, 7804-8.

Belting M., Mani K., Jönsson M., Cheng F., Sandgren S., Jonsson S., Ding K., Delcros J.G., Fransson L.A. (2003) Glypican-1 is a vehicle for polyamine uptake in mammalian cells. A pivotal role for nitrosothiol-derived nitric oxide. *J. Biol. Chem.*, 278, 47181-47189.

Bence A.K., Worthen D.R., Stables J.P., Crooks P.A. (2003) An in vivo evaluation of the antiseizure activity and acute neurotoxicity of agmatine. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 74, 771-775.

Benveniste M., Mayer M.L. (1993) Multiple effects of spermine on N-methyl-D-aspartic acid receptor responses of rat cultured hippocampal neurones. *J. Physiol.*, 464, 131-163.

Bercovich Z., Kahana C. (2004) Degradation of antizyme inhibitor, an ornithine decarboxylase homologous protein, is ubiquitin-dependent and is inhibited by antizyme. *J. Biol. Chem.*, 279, 54097-54102.

Bercovich Z., Snapir Z., Keren-Paz A., Kahana C. (2011) Antizyme affects cell proliferation and viability solely through regulating cellular polyamines. *J. Biol. Chem.*, 286, 33778-83.

Bernstein H.G., Müller M. (1999) The cellular localization of the L-ornithine decarboxylase/polyamine system in normal and diseased central nervous systems. *Prog. Neurobiol.*, 57, 485-505.

Bhattacharya S., Guo H., Ray R.M., Johnson L.R. (2007) Basic helix-loop-helix protein E47-mediated p21Waf1/Cip1 gene expression regulates apoptosis of intestinal epithelial cells. *Biochem. J.*, 407, 243–254.

Bhattacharya S., Ray R.M., Johnson L.R. (2009) Role of polyamines in p53-dependent apoptosis of intestinal epithelial cells. *Cell Signal.*, 21, 509–522.

Bokara K.K., Kwon K.H., Nho Y., Lee W.T., Park K.A., Lee J.E. (2011) Retroviral expression of arginine decarboxylase attenuates oxidative burden in mouse cortical neural stem cells. *Stem Cells Dev.*, 20, 527-37.

Bolkenius F.N., Seiler N. (1981) Acetyl derivatives as intermediates in polyamine catabolism. *Int. J. Biochem.*, 13, 287-292.

Boniecki, M., Rotkiewicz, P., Skolnick, J., Kolinski, A. (2003) Protein fragment reconstruction using various modeling techniques. *J. Comput. Aided. Mol. Des.*, 17, 725-38.

Bustos-Obregón E., Esponda P., Sarabia L. (2006) Effect of Flutamide in Mouse Spermatogenesis and on the Function of Seminal Vesicle and Prostate. *Int. J. Morphol.*, 24, 171-174.

Cabella C., Gardini G., Corpillo D., Testore G., Bedino S., Solinas S.P., Cravanzola C., Vargiu C., Grillo M.A., Colombatto S. (2001) Transport and metabolism of agmatine in rat hepatocyte cultures. *Eur. J. Biochem.*, 268, 940-7.

Casero R.A. Jr., Pegg A.E. (1993) Spermidine/spermine N1-acetyltransferase-the turning point in polyamine metabolism. *FASEB J.*, 7, 653-661.

Casero R.A. Jr, Marton L.J. (2007) Targeting polyamine metabolism and function in cancer and other hyperproliferative diseases. *Nat. Rev. Drug Discov.*, 6, 373-390.

Chatterjee I., Gross S.R., Kinzy T.G., Chen K.Y. (2006) Rapid depletion of mutant eukaryotic initiation factor 5A at restrictive temperature reveals connections to actin cytoskeleton and cell cycle progression. *Mol. Genet. Genomics.*, 275, 264–276.

Chattopadhyay M.K., Tabor C.W., Tabor H. (2005) Studies on the regulation of ornithine decarboxylase in yeast: effect of deletion in the MEU1 gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*,

102, 16158-63.

Chattopadhyay M.K., Park M.H., Tabor H. (2008) Hypusine modification for growth is the major function of spermidine in *Saccharomyces cerevisiae* polyamine auxotrophs grown in limiting spermidine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 105, 6554–6559.

Chandolia RK, WeinbauerGF, Simoni M, Behre HM, Nieschlag E (1991) Comparative effects of chronic administration of the non-steroidal antiandrogens flutamide and Casodex on the reproductive system of the adult male rat. *Acta Endocrinol.*, 125, 547-555.

Chen H., MacDonald A., Coffino P. (2002) Structural elements of antizymes 1 and 2 are required for proteasomal degradation of ornithine decarboxylase. *J. Biol. Chem.*, 277, 45957-45961.

Chen J., Rao J.N., Zou T., Liu L., Marasa B.S., Xiao L., Zeng X., Turner D. J., Wang, J.Y. (2007) Polyamines are required for expression of Toll-like receptor 2 modulating intestinal epithelial barrier integrity. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 293, G568–G576.

Chen L., Li Y., Lin C.H., Chan T.H., Chow R.K., Song Y., Liu M., Yuan Y.F., Fu L., Kong K.L., Qi L., Li Y., Zhang N., Tong A.H., Kwong D.L., Man K., Lo C.M., Lok S., Tenen D.G., Guan X.Y. (2013) Recoding RNA editing of AZIN1 predisposes to hepatocellular carcinoma. *Nat. Med.*, 19, 209-16.

Childs A.C., Mehta D.J., Gerner E.W. (2003) Polyamine-dependent gene expression. *Cell Mol. Life Sci.*, 60, 1394-1406.

Choi KS, Suh Y.H., Kim W.H., Lee T.H., Jung M.H. (2005) Stable siRNA-mediated silencing of antizyme inhibitor: regulation of ornithine decarboxylase activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 328, 206-212.

Coleman, C.S., Stanley, B.A., Pegg, A. (1993) Effect of mutations at active site residues on the activity of ornithine decarboxylase and its inhibition by active site-directed irreversible inhibitors. *J. Biol. Chem.*, 268, 24572-24579.

Coleman, C.S., Stanley, B.A., Viswanath, R., Pegg, A.E. (1994) Rapid exchange of subunits of mammalian ornithine decarboxylase. *J. Biol. Chem.*, 269, 3155-3158.

Cohavi, O., Tobi, D., Schreiber, G. (2009) Docking of antizyme to ornithine decarboxylase and antizyme inhibitor using experimental mutant and double-mutant cycle data. *J. Mol. Biol.*, 390, 503-15.

Coffino P. (2000) Polyamines in spermiogenesis: not now, darling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97, 4421-3.

Coffino P. (2001a) Regulation of cellular polyamines by antizyme. *Nat. Rev. Mol. Cell*

Biol., 2, 188-194.

Coffino P. (2001b) Antizyme, a mediator of ubiquitin-independent proteasomal degradation. *Biochimie*, 83, 319-323.

Cohen S.S (1998). A guide to the polyamines. New York, Oxford University Press.

Coleman C.S., Stanley B.A., Pegg A.E. (1993) Effect of mutations at active site residues on the activity of ornithine decarboxylase and its inhibition by active site-directed irreversible inhibitors. *J. Biol. Chem.*, 268, 24572-24579.

Coleman C.S., Stanley B.A., Viswanath R., Pegg A.E. (1994) Rapid exchange of subunits of mammalian ornithine decarboxylase. *J. Biol. Chem.*, 269, 3155-3158.

Coleman C.S., Hu G.R., Pegg A.E. (2004) Putrescine biosynthesis in mammalian tissues. *Biochem. J.*, 379, 849-855.

Dang W., Steffen K.K., Perry R., Dorsey J.A., Johnson F.B., Shilatifard A., Kaerberlein M., Kennedy B.K., Berger S.L. (2009) Histone H4 lysine 16 acetylation regulates cellular lifespan. *Nature*, 459(7248), 802-7

Dardonville C., Brun R. (2004) Bisguanidine, bis(2-aminoimidazoline), and polyamine derivatives as potent and selective chemotherapeutic agents against *Trypanosoma brucei rhodesiense*. *J. Med. Chem.*, 47, 2296-307.

Dardonville C., Barrett M.P., Brun R., Kaiser M., Tanious F., Wilson W.D. (2006) DNA binding affinity of bisguanidine and bis(2-aminoimidazoline) derivatives with in vivo antitrypanosomal activity. *J. Med. Chem.*, 49, 3748-52.

Das R., Kanungo M.S. (1982) Activity and modulation of ornithine decarboxylase and concentrations of polyamines in various tissues of rats as a function of age. *Exp. Gerontol.*, 17, 95-103.

del Valle A.E., Paz J.C., Sánchez-Jiménez F., Medina M.A. (2001) Agmatine uptake by cultured hamster kidney cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 280, 307-11.

Dias C.A., Cano V.S., Rangel S.M., Apponi L.H., Frigieri M.C., Muniz J.R., Garcia W., Park M.H., Garratt R.C., Zanelli C.F., Valentini S.R. (2008) Structural modeling and mutational analysis of yeast eukaryotic translation initiation factor 5A reveal new critical residues and reinforce its involvement in protein synthesis. *FEBS J.*, 275, 1874-1888.

Dingledine R., Borges K., Bowie D., Traynelis S.F. (1999) The glutamate receptor ion channels. *Pharmacol Rev.*, 51, 7-61.

Dollery C. (1999) *Therapeutic Drugs*. Churchill Livingstone, Edinburg, pp. C349-C354.

Driessen A.J., Smid E.J., Konings W.N. (1988) Transport of diamines by *Enterodoccus*

faecalis is mediated by an agmatine-putrescine antiporter. *J. Bacteriol.*, 170, 4522-7.

Dudkowska M., Lai J., Gardini G., Stachurska A., Grzelakowska-Sztabert B., Colombatto S., Manteuffel-Cymborowska M. (2003) Agmatine modulates the in vivo biosynthesis and interconversion of polyamines and cell proliferation. *Biochim. Biophys. Acta*, 1619, 159-166.

Dulloo I., Gopalan G., Melino G., Sabapathy K. (2010) The antiapoptotic DeltaNp73 is degraded in a c-Jun-dependent manner upon genotoxic stress through the antizyme-mediated pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 107, 4902-7.

Durand G.M, Bennett M.V., Zukin R.S. (1993) Splice variant of the N-methyl-D-aspartate receptor NR1 identify domains involved in regulation by polyamines and protein kinase C. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90, 6731-35.

Eisenberg T., Knauer H., Schauer A., Büttner S., Ruckenstuhl C., Carmona-Gutierrez D., Ring J., Schroeder S., Magnes C., Antonacci L., Fussi H., Deszcz L., Hartl R., Schraml E., Criollo A., Megalou E., Weiskopf D., Laun P., Heeren G., Breitenbach M., Grubeck-Loebenstein B., Herker E., Fahrenkrog B., Fröhlich K.U., Sinner F., Tavernarakis N., Minois N., Kroemer G., Madeo F. (2009) Induction of autophagy by spermidine promotes longevity. *Nat. Cell. Biol.*, 11(11), 1305-14

Elangovan N., Chiou T.J., Tzeng W.F., Chu S.T. (2006) Cyclophosphamide treatment causes impairment of sperm and its fertilizing ability in mice. *Toxicology*, 222, 60-70.

Feinstein S.C., Dana S.L., McConlogue L., Shooter E.M., Coffino P. (1985) Nerve growth factor rapidly induces ornithine decarboxylase mRNA in PC12 rat pheochromocytoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 82, 5761-5765.

Feith D.J., Shantz L.M., Pegg A.E. (2001) Targeted antizyme expression in the skin of transgenic mice reduces tumor promoter induction of ornithine decarboxylase and decreases sensitivity to chemical carcinogenesis. *Cancer. Res.*, 61, 6073-81.

Feith D.J., Origanti S., Shoop P.L., Sass-Kuhn S., Shantz L.M. (2006) Tumor suppressor activity of ODC antizyme in MEK-driven skin tumorigenesis. *Carcinogenesis*, 27, 1090-8.

Feith D.J., Shantz L.M., Shoop P.L., Keefer K.A., Prakashagowda C., Pegg A.E. (2007) Mouse skin chemical carcinogenesis is inhibited by antizyme in promotion-sensitive and promotion-resistant genetic backgrounds. *Mol. Carcinog.*, 46, 453-65.

Feith D.J., Pegg A.E., Fong L.Y. (2013) Targeted expression of ornithine decarboxylase antizyme prevents upper aerodigestive tract carcinogenesis in p53-deficient mice. *Carcinogenesis*, 34, 570-6.

Fenteany G., Schreiber S.L. (1998) Lactacystin, proteasome function, and cell fate. *J. Biol. Chem.*, 273, 8545-8.

Fiori L.M., Turecki G. (2008) Implication of the polyamine system in mental disorders. *J. Psychiatry Neurosci.*, 33, 102–110.

Fleiderovich I.A., Libman L., Katz E., Gutnick M. J. (2008) Endogenous polyamines regulate cortical neuronal excitability by blocking voltage-gated Na¹ channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 105, 18994–18999.

Fong LY, Feith DJ, Pegg AE (2003) Antizyme overexpression in transgenic mice reduces cell proliferation, increases apoptosis, and reduces N-nitrosomethylbenzylamine-induced forestomach carcinogenesis. *Cancer Res* 63:3945-54.

Freireich E.J., Gehan E.A., Rall D.P., Schmidt L.H., Skipper H.E. (1966) Quantitative comparison of toxicity of anticancer agents in mouse, rat, hamster, dog, monkey and man. *Cancer Chemother. Rep.*, 50, 219-44.

Fujita K., Murakami Y., Hayashi S. (1982) A macromolecular inhibitor of the antizyme to ornithine decarboxylase. *Biochem. J.*, 204, 647-652.

Galea E., Regunathan S., Eliopoulos V., Feinstein D.L., Reis D.J. (1996) Inhibition of mammalian nitric oxide synthases by agmatine, an endogenous polyamine formed by decarboxylation of arginine. *Biochem. J.*, 316, 247-9.

Gandre S., Bercovich Z., Kahana C. (2002) Ornithine decarboxylase-antizyme is rapidly degraded through a mechanism that requires functional ubiquitin-dependent proteolytic activity. *Eur. J. Biochem.*, 269, 1316-1322.

Gandre S., Bercovich Z., Kahana C. (2003) Mitochondrial localization of antizyme is determined by context-dependent alternative utilization of two AUG initiation codons. *Mitochondrion*, 2, 245-256.

García-Faroldi G., Rodríguez C.E., Urdiales J.L., Pérez-Pomares J.M., Dávila J.C., Pejler G., Sánchez-Jiménez F., Fajardo I. (2010) Polyamines are present in mast cell secretory granules and are important for granule homeostasis. *PLoS One*, 5, e15071.

Geerts D., Koster J., Albert D., Koomoa D.L., Feith D.J., Pegg A.E., Volckmann R., Caron H., Versteeg R., Bachmann A.S. (2010) The polyamine metabolism genes ornithine decarboxylase and antizyme 2 predict aggressive behavior in neuroblastomas with and without MYCN amplification. *Int. J. Cancer*, 126, 2012-2024.

Gerner E.W. and Meyskens F.L. (2004) Polyamines and cancer: old molecules, new understanding. *Nat. Rev. Cancer.*, 4, 781–792.

Ghoda L., van Daalen W.T., MacRae M., Ascherman D., Coffino P. (1989) Prevention of rapid intracellular degradation of ODC by a carboxyl-terminal truncation. *Science*, 243, 1493-1495.

Ghoda L., Phillips M.A., Bass K.E., Wang C.C., Coffino P. (1990) Trypanosome ornithine

decarboxylase is stable because it lacks sequences found in the carboxyl terminus of the mouse enzyme which target the latter for intracellular degradation. *J. Biol. Chem.*, 265, 11823-11826.

Gingras A.C., Gygi S.P., Raught B., Polakiewicz R.D., Abraham R.T., Hoekstra M.F., Aebersold R., Sonenberg N. (1999) Regulation of 4E-BP1 phosphorylation: a novel two-step mechanism. *Genes Dev.*, 13, 1422-1437.

Goracke-Postle C.J., Overland A.C., Stone L.S., Fairbanks C.A. (2007) Agmatine transport into spinal nerve terminals is modulated by polyamine analogs. *J. Neurochem.*, 100, 132-41.

Greenberg M.E., Greene L.A., Ziff E.B. (1985) Nerve growth factor and epidermal growth factor induce rapid transient changes in proto-oncogene transcription in PC12 cells. *J. Biol. Chem.*, 260, 14101-14110.

Grillo M.A., Colombatto S. (2004) Metabolism and function in animal tissues of agmatine, a biogenic amine formed from arginine. *Amino Acids*, 26, 3-8.

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, 15174-84.

Gritli-Linde A., Nilsson J., Bohlooly Y., Heby O., Linde A. (2001) Nuclear translocation of antizyme and expression of ornithine decarboxylase and antizyme are developmentally regulated. *Dev. Dyn.*, 220, 259-275.

Gruendler C., Lin Y., Farley J., Wang T.W. (2001) Proteasomal degradation of Smad1 induced by bone morphogenetic proteins. *J. Biol. Chem.*, 276, 46533-46543.

Gupta V.K., Scheunemann L., Eisenberg T., Mertel S., Bhukel A., Koemans T.S., Kramer J.M., Liu K.S., Schroeder S., Stunnenberg H.G., Sinner F., Magnes C., Pieber T.R., Dipt S., Fiala A., Schenck A., Schwaerzel M., Madeo F., Sigrist S.J. (2013) Restoring polyamines protects from age-induced memory impairment in an autophagy-dependent manner. *Nat. Neurosci.*, 16, 1453-60.

Haenisch B., Bönisch H., Cichon S., Allam J.P., Novak N., Molderings G.J. (2011) Effects of exogenous agmatine in human leukemia HMC-1 and HL-60 cells on proliferation, polyamine metabolism and cell cycle. *Leuk. Res.*, 35, 1248-53.

Hakovirta H., Keiski A., Toppari J., Halmekyto M., Alhonen L., Jänne J., Parvinen M. (1993) Polyamines and Regulation of Spermatogenesis - Selective Stimulation of Late Spermatogonia in Transgenic Mice Overexpressing the Human Ornithine Decarboxylase Gene. *Mol. Endocrinol.*, 7, 1430-1436.

Halaris A., Plietz J. (2007) Agmatine: metabolic pathway and spectrum of activity in brain. *CNS Drugs*, 21, 885-900.

Halmekytö M., Alhonen L., Wahlfors J., Sinervirta R., Eloranta T., Jänne J. (1991) Characterization of a transgenic mouse line over-expressing the human ornithine decarboxylase gene. *Biochem. J.*, 278, 895-8.

Hayashi S., Murakami Y. (1995) Rapid and regulated degradation of ornithine decarboxylase. *Biochem. J.*, 306, 1-10.

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.

Hoffman D.W., Carroll D., Martinez N., Hackert M.L. (2005) Solution structure of a conserved domain of antizyme: a protein regulator of polyamines. *Biochemistry*, 44, 11777-11785.

Holdcraft R.W., Braun R.E. (2004) Hormonal regulation of spermatogenesis. *Int. J. Androl.*, 27, 335-42.

Holtta E. (1977) Oxidation of spermidine and spermine in rat liver: purification and properties of polyamine oxidase. *Biochemistry*, 16, 91-100.

Hoshino K., Momiyama E., Yoshida K., Nishimura K., Sakai S., Toida T., Kashiwagi K., Igarashi K. (2005) Polyamine transport by mammalian cells and mitochondria: role of antizyme and glycosaminoglycans. *J. Biol. Chem.*, 280, 42801-8.

Hoyt, M.A., Coffino, P. (2004) Ubiquitin-free routes into the proteasome. *Cell. Mol. Life Sci.*, 61, 1596–1600.

Hsieh J.Y., Yang J.Y., Lin C.L., Liu G.Y., Hung H.C. (2011) Minimal antizyme peptide fully functioning in the binding and inhibition of ornithine decarboxylase and antizyme inhibitor. *PLoS One*, 6(9):e24366.

Huang H., Shiffman M.L., Friedman S., Venkatesh R., Bzowej N., Abar O.T., Rowland C.M., Catanese J.J., Leong D.U., Sninsky J.J., Layden T.J., Wright T.L., White T., Cheung R.C. (2007) A 7 gene signature identifies the risk of developing cirrhosis in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology*, 46, 297-306.

Hyvönen M.T., Keinänen T.A., Cerrada-Gimenez M., Sinervirta R., Grigorenko N., Khomutov A.R., Vepsäläinen J., Alhonen L., Jänne J. (2007) Role of hypusinated eukaryotic translation initiation factor 5A in polyamine depletion-induced cytostasis. *J. Biol. Chem.*, 282, 34700–34706.

Hyvönen M.T., Keinänen T.A., Khomutov M., Simonian A., Vepsäläinen J., Park J.H., Khomutov A.R., Alhonen L., Park M.H. (2012) Effects of novel C-methylated spermidine analogs on cell growth via hypusination of eukaryotic translation initiation factor 5A. *Amino Acids*, 42, 685-95.

Ichiba T., Matsufuji S., Miyazaki Y., Murakami Y., Tanaka K., Ichihara A., Hayashi S. (1994) Functional regions of ornithine decarboxylase antizyme. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 200, 1721-7.

Igarashi K., Kashiwagi K. (1999) Polyamine transport in bacteria and yeast. *Biochem. J.*, 344, 633-42.

Igarashi K., Kashiwagi K. (2000) Polyamines: mysterious modulators of cellular functions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 271, 559-64.

Ike A., Yamada S., Tanaka H., Nishimune Y., Nozaki M. (2002) Structure and promoter activity of the gene encoding ornithine decarboxylase antizyme expressed exclusively in haploid germ cells in testis (OAZt/Oaz3). *Gene*, 298, 183-93.

Isome M., Lortie M.J., Murakami Y., Parisi E., Matsufuji S., Satriano J. (2007) The antiproliferative effects of agmatine correlate with the rate of cellular proliferation. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.*, 293, C705-11.

Ivanov I.P., Gesteland R.F., Atkins J.F. (1998) A second mammalian antizyme: Conservation of programmed ribosomal frameshifting. *Genomics*, 52, 119-129.

Ivanov I.P., Gesteland R.F., Atkins J.F. (2000a) Antizyme expression: a subversion of triplet decoding, which is remarkably conserved by evolution, is a sensor for an autoregulatory circuit. *Nucleic Acids Res.*, 28, 3185-96

Ivanov I.P., Rohrwasser A., Terreros D.A., Gesteland R.F., Atkins J.F. (2000b) Discovery of a spermatogenesis stage-specific ornithine decarboxylase antizyme: antizyme 3. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97, 4808-13.

Ivanov I.P., Anderson C.B., Gesteland R.F., Atkins J.F. (2004) Identification of a new antizyme mRNA +1 frameshifting stimulatory pseudoknot in a subset of diverse invertebrates and its apparent absence in intermediate species. *J. Mol. Biol.*, 339, 495-504.

Jackson, L.K., Baldwin, J., Akella, R., Goldsmith, E.J., Phillips, M.A. (2004) Multiple active site conformations revealed by distant site mutation in ornithine decarboxylase. *Biochemistry*, 43, 12990-9.

Jänne J., Poso H., Raina A. (1978) Polyamines in rapid growth and cancer. *Biochim. Biophys. Acta*, 473, 241-293.

Jänne J., Alhonen L., Pietilä M., Keinänen T. (2004) Genetic approaches to the cellular functions of polyamines in mammals. *Eur. J. Biochem.*, 271, 877-894.

Jao D.L., Chen K.Y. (2006) Tandem affinity purification revealed the hypusine-dependent binding of eukaryotic initiation factor 5A to the translating 80S ribosomal complex. *J. Cell.*

Biochem., 97, 583–598.

Jodar M., Kalko S., Castillo J., Balleca J.L., Oliva R. (2012) Differential RNAs in the sperm cells of asthenozoospermic patients. *Hum. Reprod.*, 27, 1431-8.

Johnson T.D. (1996) Modulation of channel function by polyamines. *Trends Pharmacol. Sci.*, 17, 22-27.

Jung M.H., Kim S.C., Jeon G.A., Kim S.H., Kim Y., Choi K.S., Park S.I., Joe M.K., Kimm K. (2000) Identification of differentially expressed genes in normal and tumor human gastric tissue. *Genomics*, 69, 281-286.

Kahana C., Asher G., Shaul Y. (2005) Mechanisms of protein degradation: an odyssey with ODC. *Cell Cycle*, 4, 1461-1464.

Kahana C. (2007) Ubiquitin dependent and independent protein degradation in the regulation of cellular polyamines. *Amino Acids*, 33, 225-230.

Kahana C. (2009) Antizyme and antizyme inhibitor, a regulatory tango. *Cell. Mol. Life Sci.*, 66, 2479-88.

Kanerva K., Mäkitie L.T., Pelander A., Heiskala M., Andersson L.C. (2008) Human ornithine decarboxylase paralogue (ODCp) is an antizyme inhibitor but not an arginine decarboxylase. *Biochem. J.*, 409, 187-92.

Kanerva K., Lappalainen J., Mäkitie L.T., Virolainen S., Kovanen P.T., Andersson L.C. (2009) Expression of antizyme inhibitor 2 in mast cells and role of polyamines as selective regulators of serotonin secretion. *PLoS One*, 4, e6858.

Kanerva K., Mäkitie L.T., Bäck N., Andersson L.C. (2010) Ornithine decarboxylase antizyme inhibitor 2 regulates intracellular vesicle trafficking. *Exp. Cell Res.*, 316, 1896-906.

Kasbek C., Yang C., Fisk H.A. (2010) Antizyme Restrains Centrosome Amplification by Regulating the Accumulation of Mps1 at Centrosomes. *Mol. Biol. Cell.*, 21, 3878–3889.

Kawabata T., Ohshima H., Ino M. (1978) Occurrence of methylguanidine and agmatine in foods. *IARC Sci. Publ.*, 19, 415–423.

Kawahara T.L., Michishita E., Adler A.S., Damian M., Berber E., Lin M., McCord R.A., Ongaiui K.C., Boxer L.D., Chang H.Y., Chua K.F. (2009) SIRT6 links histone H3 lysine 9 deacetylation to NF-kappaB-dependent gene expression and organismal life span. *Cell*, 136 (1), 62-74

Keren-Paz A., Bercovich Z., Porat Z., Erez O., Brener O., Kahana C. (2006) Overexpression of antizyme-inhibitor in NIH3T3 fibroblasts provides growth advantage through neutralization of antizyme functions. *Oncogene*, 25, 5163-5172.

- 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, 567-81.
- Khan N.A., Sezan A., Quemener V., Moulinoux J.P. (1993) Polyamine transport regulation by calcium and calmodulin: role of Ca⁽²⁺⁾-ATPase. *J. Cell. Physiol.*, 157, 493-501.
- Kilpeläinen, P.T., Hietala, O.A. (1998) Mutation of aspartate-233 to valine in mouse ornithine decarboxylase reduces enzyme activity. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.*, 30, 803-809.
- Kilpeläinen P., Rybnikova E., Hietala O., Pelto-Huikko M. (2000) Expression of ODC and its regulatory protein antizyme in the adult rat brain. *J. Neurosci. Res.*, 62, 675–685.
- Kim S.W., Mangold U., Waghorne C., Mobascher A., Shantz L., Banyard J., Zetter B.R. (2006) Regulation of cell proliferation by the antizyme inhibitor: evidence for an antizyme-independent mechanism. *J. Cell Sci.*, 119, 2853-2861.
- Koguchi K., Kobayashi S., Hayashi T., Matsufuji S., Murakami Y., Hayashi S. (1997) Cloning and sequencing of a human cDNA encoding ornithine decarboxylase antizyme inhibitor. *Biochim. Biophys. Acta*, 1353, 209-16.
- Koomoa D.L., Yco L.P., Borsics T., Wallick C.J., Bachmann, A. S. (2008) Ornithine decarboxylase inhibition by alpha-difluoromethylornithine activates opposing signaling pathways via phosphorylation of both Akt/protein kinase B and p27Kip1 in neuroblastoma. *Cancer Res.*, 68, 9825–9831.
- Kosinski J., Kubareva E., Bujnicki J.M. (2007) A model of restriction endonuclease MvaI in complex with DNA: a template for interpretation of experimental data and a guide for specificity engineering. *Proteins*, 68, 324-36.
- Kucharzewska P., Welch J.E., Svensson K.J., Belting M. (2009) The polyamines regulate endothelial cell survival during hypoxic stress through PI3K/AKT and MCL-1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 380, 413–418.
- Kurian L., Palanimurugan R., Gödderz D., Dohmen R.J. (2011) Polyamine sensing by nascent ornithine decarboxylase antizyme stimulates decoding of its mRNA. *Nature*, 477, 490-4.
- Kurowski, M.A., Bujnicki, J.M. (2003) GeneSilico protein structure prediction meta-server. *Nucleic Acids Res.*, 31, 3305-7.
- Laitinen P., Hietala O., Pulkka A., Pajunen A. (1986) Purification of mouse brain ornithine decarboxylase reveals its presence as an inactive complex with antizyme. *Biochemistry*, 236, 613–616.

Landau G., Bercovich Z., Park M.H., Kahana C. (2010) The role of polyamines in supporting growth of mammalian cells is mediated through their requirement for translation initiation and elongation. *J. Biol. Chem.*, 285, 12474-81.

Le Roy F., Salehzada T., Bisbal C., Dougherty J.P., Peltz S.W. (2005) A newly discovered function for RNase L in regulating translation termination. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 12, 505-12.

Lee D.H., Goldberg A.L. (1998) Proteasome inhibitors: valuable new tools for cell biologists. *Trends Cell. Biol.*, 8, 397-403.

Lee S.B., Park J.H., Folk J.E., Deck J.A., Pegg A.E., Sokabe M., Fraser C.S., Park M.H. (2011) Inactivation of eukaryotic initiation factor 5A (eIF5A) by specific acetylation of its hypusine residue by spermidine/spermine acetyltransferase 1 (SSAT1). *Biochem. J.*, 433, 205-13.

Li X.Q., Coffino P. (1992) Regulated Degradation of Ornithine Decarboxylase Requires Interaction with the Polyamine-Inducible Protein Antizyme. *Mol. Cell. Biol.*, 12, 3556-3562.

Li X., Coffino P. (1993) Degradation of ornithine decarboxylase: exposure of the C-terminal target by a polyamine-inducible inhibitory protein. *Mol. Cell Biol.*, 13, 2377-83.

Li X., Coffino P. (1994) Distinct domains of antizyme required for binding and proteolysis of ornithine decarboxylase. *Mol. Cell Biol.*, 14, 87-92.

Li G., Regunathan S., Barrow C.J., Eshraghi J., Cooper R., Reis D.J. (1994) Agmatine: an endogenous clonidine-displacing substance in the brain. *Science*, 263, 966-969.

Li J., Doyle K.M., Tatlisumak T. (2007) Polyamines in the brain: distribution, biological interactions, and their potential therapeutic role in brain ischaemia. *Curr. Med. Chem.*, 14, 1807–1813.

Liao C.P., Lasbury M.E., Wang S.H., Zhang C., Durant P.J., Murakami Y., Matsufuji S., Lee C.H. (2009) Pneumocystis mediates overexpression of antizyme inhibitor resulting in increased polyamine levels and apoptosis in alveolar macrophages. *J. Biol. Chem.*, 284, 8174-84

Lim S.K., Gopalan G. (2007) Antizyme1 mediates AURKAIP1-dependent degradation of Aurora-A. *Oncogene*, 26, 6593-6603.

Lin X., Veenstra R.D. (2007) Effect of transjunctional KCl gradients on the spermine inhibition of connexin40 gap junctions. *Biophys. J.*, 93, 483–495.

Lin Y., Martin J., Gruendler C., Farley J., Meng X., Li B.Y., Lechleider R., Huff C., Kim R.H., Grasser W.A., Paralkar V., Wang T. (2002) A novel link between the proteasome

pathway and the signal transduction pathway of the bone morphogenetic proteins (BMPs). *BMC. Cell Biol.*, 3, 15.

Liu L., Guo X., Rao J.N., Zou T., Marasa B.S., Chen J., Greenspon J., Casero R.A. Jr, Wang J.Y. (2006) Polyamine-modulated c-Myc expression in normal intestinal epithelial cells regulates p21Cip1 transcription through a proximal promoter region. *Biochem. J.*, 398, 257–267.

Liu L., Guo X., Rao J.N., Zou T., Xiao L., Yu T., Timmons J.A., Turner D.J., Wang J.Y. (2009) Polyamines regulate E-cadherin transcription through c-Myc modulating intestinal epithelial barrier function. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, 296, C801– C810.

Liu, Y.C., Liu, Y.L., Su, J.Y., Liu, G.Y., Hung, H.C. (2011a) Critical factors governing the difference in antizyme-binding affinities between human ornithine decarboxylase and antizyme inhibitor. *Plos One*, 6, e19253.

Liu, Y.C., Hsu, D.H., Huang, C.L., Liu, Y.L., Liu, G.Y., Hung, H.C. (2011b) Determinants of the differential antizyme-binding affinity of ornithine decarboxylase. *Plos One* 6, e26835.

López-Ballester J.A., Gómez-Skarmeta J.L., Cremades A., Peñafiel R. (1990) Different turnover of rat fetal and placental ornithine decarboxylases. *Life Sci.*, 47, 1195-202.

López-Contreras A.J., López-García C., Jiménez-Cervantes C., Cremades A., Peñafiel R. (2006) Mouse ornithine decarboxylase-like gene encodes an antizyme inhibitor devoid of ornithine and arginine decarboxylating activity. *J. Biol. Chem.*, 281, 30896-906.

López-Contreras A.J., Ramos-Molina B., Cremades A., Peñafiel R. (2008) Antizyme inhibitor 2 (AZIN2/ODCp) stimulates polyamine uptake in mammalian cells. *J. Biol. Chem.*, 283, 20761-9.

López-Contreras A.J., Ramos-Molina B., Martínez-de-la-Torre M., Peñafiel-Verdú C., Puelles L., Cremades A., Peñafiel R. (2009a) Expression of antizyme inhibitor 2 in male haploid germinal cells suggests a role in spermiogenesis. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 41, 1070-8.

López-Contreras A.J., Sánchez-Laorden B.L., Ramos-Molina B., de la Morena M.E., Cremades A., Peñafiel R. (2009b) Subcellular localization of antizyme inhibitor 2 in mammalian cells: Influence of intrinsic sequences and interaction with antizymes. *J. Cell Biochem.*, 107, 732-40.

López-Contreras, A.J., Ramos-Molina, B., Cremades, A., Peñafiel, R. (2010) Antizyme inhibitor 2: molecular, cellular and physiological aspects. *Amino Acids*, 38, 603-611.

Lopez-Garcia C., Lopez-Contreras A.J., Cremades A., Castells M.T., Peñafiel R. (2009) Transcriptomic analysis of polyamine-related genes and polyamine levels in placenta, yolk sac and fetus during the second half of mouse pregnancy. *Placenta*, 30, 241-9.

López-García C., Ramos-Molina B., Lambertos A., López-Contreras A.J., Cremades A., Peñafiel R. (2013) Antizyme Inhibitor 2 Hypomorphic Mice. New Patterns of Expression in Pancreas and Adrenal Glands Suggest a Role in Secretory Processes. *PLoS ONE* 8(7): e69188.

Lortie M.J., Novotny W.F., Peterson O.W., Vallon V., Malvey K., Mendonca M., Satriano J., Insel P., Thomson S.C., Blantz R.C. (1996) Agmatine, a bioactive metabolite of arginine. Production, degradation, and functional effects in the kidney of the rat. *J. Clin. Invest.*, 97, 413-420.

Lu L., Stanley B.A., Pegg A.E. (1991) Identification of residues in ornithine decarboxylase essential for enzymic activity and for rapid protein turnover. *Biochem. J.*, 277, 671-675.

Lundstrom J., Rychlewski L., Bujnicki J., Elofsson A. (2001) Pcons: a neural-network-based consensus predictor that improves fold recognition. *Protein Sci.*, 10, 2354-62.

Mäkitie L.T., Kanerva K., Andersson L.C. (2009a) Ornithine decarboxylase regulates the activity and localization of rhoA via polyamination. *Exp. Cell Res.*, 315, 1008–1014.

Mäkitie L.T., Kanerva K., Polvikoski T., Paetau A., Andersson L.C. (2009b) Brain neurons express ornithine decarboxylase-activating antizyme inhibitor 2 with accumulation in Alzheimer's disease. *Brain Pathol.*, 20, 571-80.

Mäkitie L.T., Kanerva K., Sankila A., Andersson L.C. (2009c) High expression of antizyme inhibitor 2, an activator of ornithine decarboxylase in steroidogenic cells of human gonads. *Histochem. Cell Biol.*, 132, 633-8.

Mamroud-Kidron, E., Omer-Itsicovich, M., Bercovich, Z., Tobias, K.E., Rom, E., Kahana, C. (1994) A unified pathway for the degradation of ornithine decarboxylase in reticulocyte lysate requires interaction with the polyamine-induced protein, ornithine decarboxylase antizyme. *Eur. J. Biochem.*, 226, 547-554.

Mangold U. (2005) The antizyme family: Polyamines and beyond. *IUBMB Life*, 57, 671-676.

Mangold U., Leberer E. (2005) Regulation of all members of the antizyme family by antizyme inhibitor. *Biochem. J.*, 385, 21-28.

Mangold U., Hayakawa H., Coughlin M., Munger K., Zetter B.R. (2008) Antizyme, a mediator of ubiquitin-independent proteasomal degradation and its inhibitor localize to centrosomes and modulate centriole amplification. *Oncogene*, 27, 604–613.

Matsufuji S., Matsufuji T., Miyazaki Y., Murakami Y., Atkins J.F., Gesteland R.F., Hayashi S. (1995) Autoregulatory frameshifting in decoding mammalian ornithine decarboxylase antizyme. *Cell*, 80, 51-60.

Mechulam A., Chernov K.G., Mucher E., Hamon L., Curmi P.A., Pastre D. (2009) Polyamine sharing between tubulin dimers favours microtubule nucleation and elongation via facilitated diffusion. *PLoS Comput. Biol.*, 5, e1000255.

Mitchell, J.L., Chen, H.J. (1990) Conformational changes in ornithine decarboxylase enable recognition by antizyme. *Biochim. Biophys. Acta*, 1037, 115-21.

Mitchell J.L., Judd G.G., Bareyal-Leyser A., Ling S.Y. (1994) Feedback repression of polyamine transport is mediated by antizyme in mammalian tissue-culture cells. *Biochem. J.*, 299, 19-22.

Mitchell J.L., Leyser A., Holtorff M.S., Bates J.S., Frydman B., Valasinas A.L., Reddy V.K., Marton L.J. (2002) Antizyme induction by polyamine analogues as a factor of cell growth inhibition. *Biochem. J.*, 366, 663-671.

Mitchell J.L., Simkus C.L., Thane T.K., Tokarz P., Bonar M.M., Frydman B., Valasinas A.L., Reddy V.K., Marton L.J. (2004) Antizyme induction mediates feedback limitation of the incorporation of specific polyamine analogues in tissue culture. *Biochem. J.*, 384, 271-279.

Molderings G.J., Burian M., Homann J., Nilius M., Göthert M. (1999) Potential relevance of agmatine as a virulence factor of *Helicobacter pylori*. *Dig. Dis. Sci.*, 44, 2397–2404.

Moon S.U., Kwon K.H., Kim J.H., Bokara K.K., Park K.A., Lee W.T., Lee J.E. (2010) Recombinant hexahistidine arginine decarboxylase (hisADC) induced endogenous agmatine synthesis during stress. *Mol. Cell. Biochem.*, 345, 53-60.

Morselli E., Galluzzi L., Kepp O., Criollo A., Maiuri M.C., Tavernarakis N., Madeo F., Kroemer G. (2010) Autophagy mediates pharmacological lifespan extension by spermidine and resveratrol. *Aging (Albany NY)*, 1, 961-70.

Murakami Y., Marumo M., Hayashi S. (1988) Ornithine decarboxylase antizyme in kidneys of male and female mice. *Biochem. J.*, 254, 367-72.

Murakami, Y., Matsufuji, S., Kameji, T., Hayashi, S., Igarashi, K., Tamura, T., Tanaka, K., Ichihara, A. (1992) Ornithine decarboxylase is degraded by the 26S proteasome without ubiquitination. *Nature*, 360, 597-9.

Murakami Y., Ichiba T., Matsufuji S., Hayashi S. (1996) Cloning of antizyme inhibitor, a highly homologous protein to ornithine decarboxylase. *J. Biol. Chem.*, 271, 3340-3342.

Murakami, Y., Matsufuji, S., Hayashi, S., Tanahashi, N., Tanaka, T. (2000) Degradation of Ornithine Decarboxylase by the 26S Proteasome. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 267, 1–6.

Murakami Y., Suzuki J., Samejima K., Kikuchi K., Hascilowicz T., Murai N., Matsufuji S.,

Oka T. (2009) The change of antizyme inhibitor expression and its possible role during mammalian cell cycle. *Exp. Cell Res.*, 315, 2301-11.

Murakami Y., Suzuki J., Samejima K., Oka T. (2010) Developmental alterations in expression and subcellular localization of antizyme and antizyme inhibitor and their functional importance in the murine mammary gland. *Amino Acids*, 38, 591-601.

Murakami Y., Ohkido M., Takizawa H., Murai N., Matsufuji S. (2013) Multiple forms of mouse antizyme inhibitor 1 mRNA differentially regulated by polyamines. *Amino Acids (in press)*

Murai N., Murakami Y., Matsufuji S. (2003) Identification of nuclear export signals in antizyme-1. *J. Biol. Chem.*, 278, 44791-8.

Murai N., Shimizu A., Murakami Y., Matsufuji S. (2009) Subcellular localization and phosphorylation of antizyme 2. *J. Cell. Biochem.*, 108, 1012-21.

Murga M., Bunting S., Montaña M.F., Soria R., Mulero F., Cañamero M., Lee Y., McKinnon P.J., Nussenzweig A., Fernandez-Capetillo O. (2009) A mouse model of ATR-Seckel shows embryonic replicative stress and accelerated aging. *Nat. Genet.*, 41, 891-8.

Namy O., Galopier A., Martini C., Matsufuji S., Fabret C., Rousset J.P. (2008) Epigenetic control of polyamines by the prion [PSI⁺]. *Nat. Cell. Biol.*, 10, 1069-75.

Neri R., Peets E., Watnik A. (1979). Anti-androgenicity of flutamide and its metabolite Sch 16423. *Biochem. Soc. Trans.*, 7, 565-9.

Newman R.M., Mobascher A., Mangold U., Koike C., Diah S., Schmidt M., Finley D., Zetter B.R. (2004) Antizyme targets cyclin D1 for degradation. A novel mechanism for cell growth repression. *J. Biol. Chem.*, 279, 41504-41511.

Nilsson J., Koskiniemi S., Persson K., Grahn B., Holm I. (1997) Polyamines regulate both transcription and translation of the gene encoding ornithine decarboxylase antizyme in mouse. *Eur. J. Biochem.*, 250, 223-231.

Nilsson J., Grahn B., Heby O. (2000) Antizyme inhibitor is rapidly induced in growth-stimulated mouse fibroblasts and releases ornithine decarboxylase from antizyme suppression. *Biochem. J.*, 346, 699-704.

Nilsson J.A., Maclean K.H., Keller U.B., Pendeville H., Baudino T.A., Cleveland J.L. (2004) Mnt loss triggers Myc transcription targets, proliferation, apoptosis, and transformation. *Mol. Cell Biol.*, 24, 1560-1569.

Nilsson J.A., Keller U.B., Baudino T.A., Yang C., Norton S., Old J.A., Nilsson L.M., Neale G., Kramer D.L., Porter C.W., Cleveland J.L. (2005) Targeting ornithine decarboxylase in Myc-induced lymphomagenesis prevents tumor formation. *Cancer Cell.*, 7, 433-444.

Oka T., Borellini F. (1989) The role of ornithine decarboxylase and polyamine biosynthesis in cellular development and differentiation. In *Ornithine Decarboxylase: Biology, Enzymology and Molecular Genetics*, 7-19. New York, Hayashi S Ed. Pergamon Press.

Olsen R.R., Zetter B.R. (2011) Evidence of a role for antizyme and antizyme inhibitor as regulators of human cancer. *Mol. Cancer Res.*, 9, 1285-93.

Olsen R.R., Chung I., Zetter B.R. (2012) Knockdown of antizyme inhibitor decreases prostate tumor growth in vivo. *Amino Acids*, 42, 549-58.

Onoue H., Matsufuji S., Nishiyama M., Murakami Y., Hayashi S. (1988) Changes in ornithine decarboxylase and antizyme activities in developing mouse brain. *Biochem. J.*, 250, 797-803.

Origanti S., Shantz L.M. (2007) Ras transformation of RIE-1 cells activates cap-independent translation of ornithine decarboxylase: regulation by the Raf/MEK/ERK and phosphatidylinositol 3-kinase pathways. *Cancer Res.*, 67, 4834-4842.

O'Shaughnessy P.J., Hu L., Baker P.J. (2008) Effect of germ cell depletion on levels of specific mRNA transcripts in mouse Sertoli cells and Leydig cells. *Reproduction*, 135, 839-50.

Osterman, A.L., Kinch, L.N., Grishin, N.V., Phillips, M.A. (1995) Acidic residues important for substrate binding and cofactor reactivity in eukaryotic ornithine decarboxylase identified by alanine scanning mutagenesis. *J. Biol. Chem.*, 270, 11797-11802.

Osterman, A.L., Brooks, H. B., Rizo, J., Phillips, M.A. (1997) Role of Arg-277 in the binding of pyridoxal 5'-phosphate to *Trypanosoma brucei* ornithine decarboxylase. *Biochemistry*, 36, 4558-4567.

Palanimurugan R., Scheel H., Hofmann K., Dohmen R.J. (2004) Polyamines regulate their synthesis by inducing expression and blocking degradation of ODC antizyme. *EMBO J.*, 23, 4857-67

Paris A.J., Snapir Z., Christopherson C.D., Kwok S.Y., Lee U.E., Ghiassi-Nejad Z., Kocabayoglu P., Sninsky J.J., Llovet J.M., Kahana C., Friedman S.L. (2011) A polymorphism that delays fibrosis in hepatitis C promotes alternative splicing of AZIN1, reducing fibrogenesis. *Hepatology*, 54, 2198-207.

Park M.H. (2006) The post-translational synthesis of a polyamine-derived amino acid, hypusine, in the eukaryotic translation initiation factor 5A (eIF5A). *J. Biochem. (Tokyo)*. 139, 161-169.

Park M.H., Nishimura K., Zanelli C.F., Valentini S.R. (2010) Functional significance of eIF5A and its hypusine modification in eukaryotes. *Amino Acids*, 38, 491-500.

Pawlowski, M., Gajda, M.J., Matlak, R., Bujnicki, J.M. (2008) MetaMQAP: a meta-server for the quality assessment of protein models. *BMC Bioinformatics*, 9, 403.

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. (2008) Spermidine/spermine-N(1)-acetyltransferase: a key metabolic regulator. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, 294, E995-1010.

Pegg A.E. (2009) Mammalian polyamine metabolism and function. *IUBMB Life*, 61, 880-94.

Pestova T.V., Kolupaeva V.G., Lomakin I.B., Pilipenko E.V., Shatsky I.N., Agol V.I., Hellen C.U. (2001) Molecular mechanisms of translation initiation in eukaryotes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 98, 7029-7036.

Petros L.M., Howard M.T., Gesteland R.F., Atkins J.F. (2005) Polyamine sensing during antizyme mRNA programmed frameshifting. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 338, 1478–1489.

Pitkanen L.T., Heiskala M., Andersson L.C. (2001) Expression of a novel human ornithine decarboxylase-like protein in the central nervous system and testes. *Biochem. Biophys. Res Commun.*, 287, 1051-1057.

Platts A.E., Dix D.J., Chemes H.E., Thompson K.E., Goodrich R., Rockett J.C., Rawe V.Y., Quintana S., Diamond M.P., Strader L.F., Krawetz S.A. (2007) Success and failure in human spermatogenesis as revealed by teratozoospermic RNAs. *Hum. Mol. Genet.*, 16, 763-773.

Poulin, R., Lu, L., Ackermann, B., Bey, P., Pegg, A.E. (1992) Mechanism of the irreversible inactivation of mouse ornithine decarboxylase by alfa-difluoromethylornithine. *J. Biol. Chem.*, 267, 150-158.

Poulin R., Lessard M., Zhao C. (1995) Inorganic cation dependence of putrescine and spermidine transport in human breast cancer cells. *J. Biol. Chem.*, 270, 1695-704.

Poulin R., Casero R.A., Soulet D. (2012) Recent advances in the molecular biology of metazoan polyamine transport. *Amino Acids*, 42, 711–723.

Puri N., Roche P.A. (2008) Mast cells possess distinct secretory granule subsets whose

exocytosis is regulated by different SNARE isoforms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 105, 2580-85.

Pyronnet S., Pradayrol L., Sonenberg N. (2005) Alternative splicing facilitates internal ribosome entry on the ornithine decarboxylase mRNA. *Cell. Mol. Life Sci.*, 62, 1267–1274.

Quemener V., Blanchard Y., Lescoat D., Havouis R., Moulinoux J.P. (1992) Depletion in nuclear spermine during human spermatogenesis, a natural process of cell differentiation. *Am. J. Physiol.*, 263, 343-7.

Raasch W., Regunathan S., Li G., Reis D.J. (1995) Agmatine, the bacterial amine, is widely distributed in mammalian tissues. *Life Sci.*, 56, 2319-30.

Raasch W., Schafer U., Chun J., Dominiak P. (2001) Biological significance of agmatine, an endogenous ligand at imidazoline binding sites. *Br. J. Pharmacol.*, 133, 755-780.

Ray R.M., Bhattacharya S., Johnson L.R. (2007a) EGFR plays a pivotal role in the regulation of polyamine-dependent apoptosis in intestinal epithelial cells. *Cell. Signal.*, 19, 2519–2527.

Ray R.M., Guo H., Patel M., Jin S., Bhattacharya S., Johnson L.R. (2007b) Role of myosin regulatory light chain and Rac1 in the migration of polyamine-depleted intestinal epithelial cells. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 292, G983–G995.

Reis D.J., Regunathan S. (1999) Agmatine: an endogenous ligand at imidazoline receptors is a novel neurotransmitter. *Ann.N.Y.Acad.Sci.*, 881, 65-80.

Reis D.J., Regunathan S. (2000) Is agmatine a novel neurotransmitter in brain? *Trends Pharmacol.Sci.*, 21, 187-193.

Reguera R.M., Tekwani B.L., Balaña-Fouce R. (2005) Polyamine transport in parasites: a potential target for new antiparasitic drug development. *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.*, 140, 151-64.

Rom E., Kahana C. (1994) Polyamines regulate the expression of ornithine decarboxylase antizyme in vitro by inducing ribosomal frame-shifting. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 91, 3959-63.

Rosenberg-Hasson Y., Strumpf D., Kahana C. (1991) Mouse ornithine decarboxylase is phosphorylated by casein kinase-II at a predominant single location (serine 303). *Eur. J. Biochem.*, 197, 419-424.

Rounbehler R.J., Li W., Hall M.A., Yang C., Fallahi M., Cleveland J.L. (2009) Targeting ornithine decarboxylase impairs development of MYCN-amplified neuroblastoma. *Cancer Res.*, 69, 547–553.

Ruan Y., Cheng M., Ou Y., Oko R., van der Hoorn F.A. (2011) Ornithine decarboxylase antizyme Oaz3 modulates protein phosphatase activity. *J. Biol. Chem.*, 286, 29417-27.

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. USA*, 60, 1420-7.

Saito Y., Tsubuki S., Ito H., Kawashima S. (1992) Isolation and characterization of possible target proteins for neurite outgrowth induced by a tripeptide aldehyde in PC12H cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 184, 419-26.

Sali, A., Blundell, T.L. (1993) Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. *J. Mol. Biol.*, 234, 779-815.

Samal K., Zhao P., Kendzicky A., Yco L.P., McClung H., Gerner E., Burns M., Bachmann A.S., Scholler G. (2013) AMXT-1501, a novel polyamine transport inhibitor, synergizes with DFMO in inhibiting neuroblastoma cell proliferation by targeting both ornithine decarboxylase and polyamine transport. *Int. J. Cancer.*, 15, 1323-33.

Sánchez-Capelo A., Peñafiel R., Tovar A., Galindo J.D., Cremades A. (1994) Postnatal development of ornithine decarboxylase and polyamines in the mouse kidney: influence of testosterone. *Biol. Neonate*, 66, 119-127.

Sánchez-Capelo A., Castells M.T., Cremades A., Peñafiel R. (1996) Hypokalemia decreases testosterone production in male mice by altering luteinizing hormone secretion. *Endocrinology*, 137, 3738-43.

Sánchez-Capelo A., Tejada F., Ruzafa C., Cremades A., Peñafiel R. (1999) Postnatal exposure to androgens alters renal ornithine decarboxylase ontogeny and abolishes renal sexual dimorphism in mice. *Biol. Neonate*, 76, 72-83.

Sarkar T., Petrov A.S., Vitko J.R., Santai C.T., Harvey S.C., Mukerji I., Hud N.V. (2009) Integration host factor (IHF) dictates the structure of polyamine-DNA condensates: implications for the role of IHF in the compaction of bacterial chromatin. *Biochemistry*, 48, 667-675.

Sastre M., Regunathan S., Reis D.J. (1997) Uptake of agmatine into rat brain synaptosomes: possible role of cation channels. *J. Neurochem.*, 69, 2421-6.

Satriano J., Matsufuji S., Murakami Y., Lortie M.J., Schwartz D., Kelly C.J., Hayashi S., Blantz R.C. (1998) Agmatine suppresses proliferation by frameshift induction of antizyme and attenuation of cellular polyamine levels. *J. Biol. Chem.*, 273, 15313-6.

Satriano J., Isome M., Casero R.A. Jr, Thomson S.C., Blantz R.C. (2001) Polyamine transport system mediates agmatine transport in mammalian cells. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.*, 281, C329-34.

Savarin P., Barbet A., Delga S., Joshi V., Hamon L., Lefevre J., Nakib S., De Bandt J.P., Moinard C., Curmi P.A., Pastré D. (2010) A central role for polyamines in microtubule assembly in cells. *Biochem. J.*, 430, 151-9.

Seely J.E., Pösö H., Pegg A.E. (1982) Effect of androgens on turnover of ornithine decarboxylase in mouse kidney. Studies using labelling of the enzyme by reaction with [¹⁴C] alpha-difluoromethylornithine. *J. Biol. Chem.*, 257, 7549-53.

Seiler N. (1983) Liquid chromatographic methods for assaying polyamines using prechromatographic derivatization. *Methods Enzymol.*, 94, 10-25.

Seiler N., Delcros J.G., Moulinoux J.P. (1996) Polyamine transport in mammalian cells. An update. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.*, 28, 843-61.

Seiler N. (2004) Catabolism of polyamines. *Amino. Acids*, 26, 217-233.

Seiler N., Raul F. (2005) Polyamines and apoptosis. *J. Cell Mol. Med.*, 9, 623-642.

Schafer B., Hauber I., Bunk A., Heukeshoven J., Dusedau A., Bevec D., Hauber, J. (2006) Inhibition of multidrug-resistant HIV-1 by interference with cellular S-adenosylmethionine decarboxylase activity. *J. Infect. Dis.*, 194, 740–750.

Schaner M.E., Davidson B., Skrede M., Reich R., Florenes V.A., Risberg B., Berner A., Goldberg I., Givant-Horwitz V., Trope C.G., Kristensen G.B., Nesland J.M., Borresen-Dale A.L. (2005) Variation in gene expression patterns in effusions and primary tumors from serous ovarian cancer patients. *Mol. Cancer.*, 4, 26

Schipper R.G., Cuijpers V.M., De Groot L.H., Thio M., Verhofstad A.A. (2004) Intracellular localization of ornithine decarboxylase and its regulatory protein, antizyme-1. *J. Histochem. Cytochem.*, 52, 1259-1266.

Schrader R., Young C., Kozian D., Hoffmann R., Lottspeich F. (2006) Temperature-sensitive eIF5A mutant accumulates transcripts targeted to the nonsense-mediated decay pathway. *J. Biol. Chem.*, 281, 35336–35346.

Shantz L.M., Feith D.J., Pegg A.E. (2001) Targeted overexpression of ornithine decarboxylase enhances beta-adrenergic agonist-induced cardiac hypertrophy. *Biochem. J.*, 358, 25-32.

Shantz L.M. (2004) Transcriptional and translational control of ornithine decarboxylase during Ras transformation. *Biochem. J.*, 377, 257-264.

Shantz L.M., Levin V.A. (2007) Regulation of ornithine decarboxylase during oncogenic transformation: mechanisms and therapeutic potential. *Amino Acids*, 33, 213-223.

Shin M., Larsson L.I., Fujiwara K. (2007) Polyamines in spermatocytes and residual

bodies of rat testis. *Histochem. Cell. Biol.*, 127, 649–655.

Shubhada S., Lin S.N., Qian Z.Y., Steinberger A., Tsai Y.H. (1989) Polyamine profiles in rat testis, germ cells and Sertoli cells during testicular maturation. *J. Androl.*, 10, 145-151.

Snapir Z., Keren-Paz A., Bercovich Z., Kahana C. (2008) ODCp, a brain- and testis-specific ornithine decarboxylase paralogue, functions as an antizyme inhibitor, although less efficiently than Azl1. *Biochem. J.*, 410, 613-9.

Snapir Z., Keren-Paz A., Bercovich Z., Kahana C. (2009) Antizyme 3 inhibits polyamine uptake and ornithine decarboxylase (ODC) activity, but does not stimulate ODC degradation. *Biochem J.*, 419, 99-103

Soda K., Dobashi Y., Kano Y., Tsujinaka S., Konishi F. (2009) Polyamine- rich food decreases age-associated pathology and mortality in aged mice. *Exp. Gerontol.*, 44, 727-32.

Solano, F., Peñafiel, R., Solano, M.E., Lozano, J.A. (1985) Equilibrium between active and inactive forms of rat liver ornithine decarboxylase mediated by L-ornithine and salts. *FEBS Lett.*, 190, 324-328.

Soulet D., Gagnon B., Rivest S., Audette M., Poulin R. (2004) A fluorescent probe of polyamine transport accumulates into intracellular acidic vesicles via a two-step mechanism. *J. Biol. Chem.*, 279, 49355-49366.

Stanfield P.R., Sutcliffe M.J. (2003) Spermine is fit to block inward rectifier (kir) channels. *J. Gen. Physiol.*, 122, 481–484.

Stickle D., Bohrer A., Berger R., Morrissey J., Klahr S., Turk J. (1996) Quantitation of the putative neurotransmitter agmatine as the hexafluoroacetylacetonate derivate by stable isotope dilution gas chromatography and negative-ion chemical ionization mass spectrometry. *Anal. Biochem.*, 238, 129-36.

Su, K.L., Liao, Y.F., Hung, H.C., and Liu, G.Y. (2009) Critical factors determining dimerization of human antizyme inhibitor. *J. Biol. Chem.*, 284, 26768-77.

Suzuki T., He Y., Kashiwagi K., Murakami Y., Hayashi S., Igarashi K. (1994) Antizyme protects against abnormal accumulation and toxicity of polyamines in ornithine decarboxylase-overproducing cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91, 8930-8934.

Suzuki J., Murakami Y., Samejima K., Ohtani K.K., Oka T. (2009) Antizyme is necessary for conversion of pancreatic tumor cells into glucagon-producing differentiated cells. *Endocr. Relat. Cancer.*, 16, 649-59.

Tabor C.W., Tabor H. (1984) Polyamines. *Annu. Rev. Biochem.*, 53, 749-790.

Tabor C.W., Tabor H. (1985) Polyamines in microorganisms. *Microbiol. Rev.*, 49, 81–99.

- Takubo K., Hirao A., Ohmura M., Azuma M., Arai F., Nagamatsu G., Suda T. (2006) Premeiotic germ cells defect in seminiferous tubules of Atm-null testis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 351, 993-8.
- Tang X., Kim A.L., Feith D.J., Pegg A.E., Russo J., Zhang H., Aszterbaum M., Kopelovich L., Epstein E.H. Jr., Bickers D.R., Athar M. (2004) Ornithine decarboxylase is a target for chemoprevention of basal and squamous cell carcinomas in Ptch1+/- mice. *J. Clin. Invest.*, 113, 867-75.
- Tang Y., Eng C. (2006) p53 down-regulates phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10 protein stability partially through caspase-mediated degradation in cells with proteasome dysfunction. *Cancer Res.*, 66, 6139-48.
- Tang H., Ariki K., Ohkido M., Murakami Y., Matsufuji S., Li Z., Yamamura K. (2009) Role of ornithine decarboxylase antizyme inhibitor in vivo. *Genes Cells*, 14, 79-87.
- Thomas T., Thomas T.J. (2001) Polyamines in cell growth and cell death: molecular mechanisms and therapeutic applications. *Cell. Mol. Life Sci.*, 58, 244-258.
- Tobias, K.E., Mamroud-Kidron, E., Kahana, C. (1993) Gly387 of murine ornithine decarboxylase is essential for the formation of stable homodimers. *Eur. J. Biochem.*, 218, 245-250.
- Tokuhiro K., Isotani A., Yokota S., Yano Y., Oshio S., Hirose M., Wada M., Fujita K., Ogawa Y., Okabe M., Nishimune Y., Tanaka H. (2009) OAZ-t/OAZ3 is essential for rigid connection of sperm tails to heads in mouse. *PLoS Genet.*, 5(11):e1000712.
- Tosaka Y., Tanaka H., Yano Y., Masai K., Nozaki M., Yomogida K., Otani S., Nojima H., Nishimune Y. (2000) Identification and characterization of testis specific ornithine decarboxylase antizyme (OAZ-t) gene: expression in haploid germ cells and polyamine-induced frameshifting. *Genes Cells*, 5, 265-76.
- Tovar A., Penuela A., Sánchez-Capelo A., Monserrat F., Cremades A., Peñafiel R. (1995) Neuronal regulation of ornithine decarboxylase induced by androgens in the mouse kidney. *Gen. Pharmacol.*, 26, 997-1001.
- Trump D.L., Waldstreicher J.A., Kolvenbag G., Wissel P.S., Neubauer B.L. (2001) Androgen antagonists: potential role in prostate cancer prevention. *Urology*, 57, 64-7.
- Tsirka, S., Coffino, P. (1992) Dominant negative mutants of ornithine decarboxylase. *J. Biol. Chem.*, 267, 23057-23062.
- Tsuji T., Usui S., Aida T., Tachikawa T., Hu G.F., Sasaki A., Matsumura T., Todd R., Wong D.T. (2001) Induction of epithelial differentiation and DNA demethylation in hamster malignant oral keratinocyte by ornithine decarboxylase antizyme. *Oncogene*, 20, 24-33.

Tsuji T, Katsurano M, Ibaragi S, Shima K, Sasaki A, Hu GF (2007) Ornithine decarboxylase antizyme upregulates DNA-dependent protein kinase and enhances the nonhomologous end-joining repair of DNA double-strand breaks in human cancer cells. *Biochemistry*, 46, 8920-32.

Uemura T., Yerushalmi H.F., Tsapralis G., Stringer D.E., Pastorian K.E., Hawel L. 3rd, Byus C.V., Gerner E.W. (2008) Identification and characterization of a diamine exporter in colon epithelial cells. *J. Biol. Chem.*, 283, 26428-26435.

Uemura T., Stringer D.E., Blohm-Mangone K.A., Gerner E.W. (2010) Polyamine transport is mediated by both endocytic and solute carrier transport mechanisms in the gastrointestinal tract. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 299, G517-G522.

Uzbay T.I. (2012) The pharmacological importance of agmatine in the brain. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, 36, 502–519.

Vaidya R.J., Ray R.M., Johnson, L.R. (2005) MEK1 restores migration of polyamine-depleted cells by retention and activation of Rac1 in the cytoplasm. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, 288, C350– C359.

Vaidya R.J., Ray R.M., Johnson L.R. (2006) Akt-mediated GSK-3b inhibition prevents migration of polyamine-depleted intestinal epithelial cells via Rac1. *Cell. Mol. Life Sci.*, 63, 2871–2879.

van Duin M., van Marion R., Vissers K., Watson J.E., van Weerden W.M., Schröder F.H., Hop W.C., van der Kwast T.H., Collins C., van Dekken H. (2005) High-resolution array comparative genomic hybridization of chromosome arm 8q: evaluation of genetic progression markers for prostate cancer. *Genes Chromosomes Cancer*, 44, 438-49.

Vargiu C., Cabella C., Belliardo S., Cravanzola C., Grillo M.A., Colombatto S. (1999) Agmatine modulates polyamine content in hepatocytes by inducing spermidine/spermineacetyltransferase. *Eur. J. Biochem.*, 259, 933-938.

Vivó M., de Vera N., Cortés R., Mengod G., Camón L., Martínez E. (2001) Polyamines in the basal ganglia of human brain. Influence of aging and degenerative movement disorders. *Neurosci. Lett.*, 304, 107-11.

Vujcic S., Diegelman P., Bacchi C.J., Kramer D.L., Porter C.W. (2002) Identification and characterization of a novel flavin-containing spermine oxidase of mammalian cell origin. *Biochem. J.*, 367, 665-675.

Walker W.H. (2010) Non-classical actions of testosterone and spermatogenesis. *Phil. Trans. R. Soc. B.*, 365, 1557–1569.

Wallace H.M., Fraser A.V., Hughes A. (2003) A perspective of polyamine metabolism. *Biochem. J.*, 376, 1–14.

- Wallace H.M., Niiranen K. (2007) Polyamine analogues – an update. *Amino Acids*, 33, 261-5.
- Wallner, B., Fang., H, Elofsson, A. (2003) Automatic consensus-based fold recognition using Pcons, ProQ, and Pmodeller. *Proteins*, 53, 534–541.
- Wallner B., Elofsson A. (2007) Prediction of global and local model quality in CASP7 using Pcons and ProQ. *Proteins*, 8, 184-93.
- Wang T. (2003) The 26S proteasome system in the signaling pathways of TGF-beta superfamily. *Front. Biosci.*, 8, 1109-27
- Weiger T.M., Hermann A. (2009) Modulation of potassium channels by polyamines. In: Dandriose G (ed) Biological aspects of biogenic amines, polyamines and conjugates. Transworld Research Network, Kerala, pp 185–200
- Williams K. (1997) Interactions of polyamines with ion channels. *Biochem. J.*, 325, 289–297.
- Wolf C., Brüss M., Hänisch B., Göthert M., von Kügelgen I., Molderings G.J. (2007) Molecular basis for the antiproliferative effect of agmatine in tumor cells of colonic, hepatic, and neuronal origin. *Mol. Pharmacol.*, 71, 276-83.
- Xiao L., Rao J.N., Zou T., Liu L., Marasa B.S., Chen J., Turner D.J., Passaniti A., Wang, J.Y. (2007a) Induced JunD in intestinal epithelial cells represses CDK4 transcription through its proximal promoter region following polyamine depletion. *Biochem. J.*, 403, 573–581.
- Xiao L., Rao J.N., Zou T., Liu L., Marasa B.S., Chen J., Turner D.J., Zhou H., Gorospe M., Wang J.Y. (2007b) Polyamines regulate the stability of activating transcription factor-2 mRNA through RNA-binding protein HuR in intestinal epithelial cells. *Mol. Biol. Cell.*, 18, 4579–4590.
- Xie X., Gillies R.J., Gerner E.W. (1997) Characterization of a diamine exporter in Chinese hamster ovary cells and identification of specific polyamine substrates. *J. Biol. Chem.*, 272, 20484-9.
- Yamamoto D., Shima K., Matsuo K., Nishioka T., Chen C.Y., Hu G.F., Sasaki A., Tsuji T. (2010) Ornithine decarboxylase antizyme induces hypomethylation of genome DNA and histone H3 lysine 9 dimethylation (H3K9me2) in human oral cancer cell line. *PLoS One*, 5, e12554
- Yang X.C., Reis D.J. (1999) Agmatine selectively blocks the N-methyl-D-aspartate subclass of glutamate receptor channels in rat hippocampal neurons. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 288, 544-9.

Zhang M., Pickart C.M., Coffino P. (2003) Determinants of proteasome recognition of ornithine decarboxylase, an ubiquitin-independent substrate. *EMBO J.*, 22, 1488-1496.

Zhang J., Wang Y., Zhou Y., Cao Z., Huang P., Lu B. (2005) Yeast two-hybrid screens imply that GGNBP1, GGNBP2 and OAZ3 are potential interaction partners of testicular germ cell-specific protein GGN1. *FEBS Lett.*, 579, 559-566.

Zhu M.Y., Iyo A., Piletz J.E., Regunathan S. (2004) Expression of human arginine decarboxylase, the biosynthetic enzyme for agmatine. *Biochim. Biophys. Acta*, 1670, 156-164.

Zou T., Liu L., Rao J. N., Marasa B.S., Chen J., Xiao L., Zhou H., Gorospe M., Wang J.Y. (2008) Polyamines modulate the subcellular localization of RNA-binding protein HuR through AMP-activated protein kinase-regulated phosphorylation and acetylation of importin alpha1. *Biochem. J.*, 409, 389–398.

APÉNDICE

1. TAMPONES**PBS (pH 7.2):**

NaCl	137 mM
KCl	2.7 mM
Na ₂ HPO ₄	10.0 mM
KH ₂ PO ₄	1.0 mM

Tampón de solubilización celular:

Tris (pH 8.0)	50 mM
Igepal-CA630	1%
EDTA	1 mM

Tampón de carga de muestras de ADN (5x):

Ficoll 400	20%
Azul de bromofenol	0.05%
Azul xileno	0.05%
EDTA	50 mM

Tampón de recorrido TAE:

Tris	40 mM
EDTA	1.0 mM
Ácido acético	30 mM (0.175% v/v)

Tampón de medida de actividad ODC

Tris	10 mM (pH 7.2)
Sacarosa	0.25M
Ditiotreitol	1 mM
Fosfato de piridoxal	0.1 mM
EDTA	0.2 mM

2. REACTIVOS SDS-PAGE Y TRANSFERENCIA WESTERN.**a) SDS-PAGE.**

GELES de poliacrilamida: la mezcla acrilamida/bisacrilamida (AA/bAA) se utilizó en la proporción 30:0.8. A continuación se detalla la composición de los geles utilizados habitualmente en SDS-PAGE.

Gel separador (10% acrilamida)

H ₂ O	1.6 ml
AA/bAA	1.33 ml
Tris-HCl 1.5M pH 8.8	1 ml
SDS 10%	40 µl (0.1%)
Persulfato amónico 10%	40 µl
TEMED	5 µl

Gel hacinador (4% poliacrilamida)

H ₂ O	1.20 ml
AA/bAA	270 µl
Tris-HCl 0.5 M pH 6.8	0.5 ml (125 mM)
SDS 10%	20 µl (0.1%)
Persulf. amónico 10%	20 µl
TEMED	2.5 µl

Tampón de muestra (4x):

Tris HCl	0.24 M (pH 6.8)
Glicerol	20%
SDS	8%
Azul de bromofenol	0.08%
β-mercaptoetanol	3.2 M

Tampón de recorrido:

Tris (base)	25 mM
Glicina	190 mM
SDS	0.1%
(pH aproximado 8.3)	

b) Transferencia Western.

Tampón de transferencia:

Tris (base)	48 mM (pH 9.2)
Glicina	39 mM
SDS	0.04%
Metanol	20%

3. SITIOS WEB Y SOFTWARE UTILIZADOS PARA LOS ANÁLISIS COMPUTACIONALES:

a) Predicción de la estructura terciaria de proteínas

Página principal: <https://genesilico.pl>

Metaservidor: <https://genesilico.pl/meta2/> (necesita clave de acceso)

Modeller: <https://genesilico.pl/toolkit/unimod?method=Modeller>
(necesita registro: <http://salilab.org/modeller/registration.html>)

RefinerLoop: <https://genesilico.pl/toolkit/unimod?method=RefinerLoop>

b) Evaluación de los modelos generados:

MetaMQAPII: <https://genesilico.pl/toolkit/unimod?method=MetaMQAPII>

ProQ: <http://www.sbc.su.se/~bjornw/ProQ/ProQ.cgi>

c) Acceso a los datos sobre estructuras tridimensionales:

Protein Data Bank (PDB): <http://www.pdb.org/pdb/home/home.do>

Proteína	Especie	Código PDB
ODC	Humano	1D7K
ODC	Ratón	7ODC
AZIN1	Ratón	3BTN

d) Software:

Swiss-PDB-Viewer (4.01 o superior): <http://spdbv.vital-it.ch/>
BioEdit

4. BÚSQUEDA DE SECUENCIAS.

Secuencias de genes y cDNAs: Ensembl (<http://www.ensembl.org/index.html>)

Secuencias de proteínas: Ensembl y UniProt (<http://www.uniprot.org>)

Alineamiento múltiple de secuencias: ClustalW2

(<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>)

3. MAPAS Y SITIOS DE RESTRICCIÓN DE VECTORES EMPLEADOS.

pcDNA 3.1 (Invitrogen)

