



**BENEMÉRITA UNIVERSIDAD
AUTÓNOMA DE PUEBLA.**

*CENTRO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS
MICROBIOLÓGICAS.*

POSGRADO EN MICROBIOLOGÍA



“LOCALIZACIÓN CELULAR DE LAS PROTEÍNAS DE NMD

Upf 1,2 y 3 EN Ustilago maydis”

TESIS.

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

**MAESTRO EN CIENCIAS (MICROBIOLOGÍA)
CON OPCIÓN EN: BIOQUÍMICA Y GENÉTICA MICROBIANA.**

PRESENTA:

QFB. ARTURO MARTÍNEZ COLÓN.

ASESORA DE TESIS:

DC. REBECA DÉBORA MARTÍNEZ CONTRERAS.

AGRADECIMIENTOS.

- ✚ **A mi familia (tía Aiza, Rosy, Dany, Lucy, Jesús, Lupita, Mauricio, Rubí, Vicente, Aarón):** porque aunque la distancia sea lejana siempre están cerca de mi corazón; por creer en mí y por su apoyo incondicional. Dios me brindó esta nueva familia que me ha guiado y a la cual le dedico todos los éxitos que tengo hasta este momento de mi vida.

- ✚ **A Ma. Luisa Nava Reyes:** a mi maestra de vida; gracias por su presencia, por existir y por cruzarse en mi camino. Gracias por su sabiduría que refleja en sus palabras, su apoyo, cariño, bondad, amistad y confianza; todo esto englobado en ese amor que transmite a cada momento y del que agradezco inmensamente.

- ✚ **A Margarita Martínez:** por no sólo brindarme su corazón y amor, sino por regalarme a una nueva familia (Doña Gregoria, Don Sergio, Betzabé, Ury, etc.). Gracias amiga por apoyarme siempre, por tus cuidados, palabras, consejos y por llevarme a ganar por sobre todas las cosas y por haberme enseñado la amistad que conlleva al amor.

- ✚ **A Creación 19:** Mago, Chely, Víctor Chávez, Celina, Juanito, Solkamiry, Pablo, Manolo, Luce, Susan, Toño Aguilar, Tom, Andy, Faby, Wilfredo, Lupis, Jaime, Pam, Rita, Jorge, Héctor, Mike y Toño Vite; gracias por ser parte de mi vida, por las aventuras, momentos, sueños, regalos y días maravillosos a su lado. Gracias por crear magia juntos, por su amor, cariño y confianza. Y por estar ahí para descubrir que Yo soy un hombre libre, alegre y auténtico. Te llevo en mi corazón. In lak ech.

- ✚ **A mis queridas compas:** Lili, Jessie, Tania, Elena, Ángeles, Marycruz y Esme. “Y posiblemente habrá que arrancar sólo, y sorprenderse al encontrar más

adelante en el camino, a todos los que seguramente van en la misma dirección”. Y gracias a ustedes este trayecto fue más fácil, gracias por su hermandad, sus locuras, cariño y por todos los momentos juntos. Un placer y un honor compartir esta etapa de mi vida con ustedes. Gracias por siempre estar conmigo cuando le he requerido y por su amor, es recíproco.

- ✦ **A mis amigos:** Doña Betty, Nallely, Yair, Jacky, Martha, Elizabeth, Crystal, Julio y Juan Carlos: por sus palabras, consejos y por creer en mí a cada momento. Gracias por no soltarte de mi mano y por tu incondicional amistad.
- ✦ **A la DC. Rebeca Martínez Contreras:** Gracias por la dedicación y apoyo brindados hacia mi trabajo de investigación.
- ✦ **Al DC Eduardo Monjaraz Guzmán:** Gracias por sus enseñanzas, paciencia, tiempo y entrega hacia mi proyecto de investigación. Gracias por su hospitalidad en su laboratorio y la ayuda de sus alumnos como Rafa. Gracias por su espacio en el departamento de microscopía con el Biólogo José Luis.
- ✦ **A mis sinodales y comisión revisora:** DC Rosa del Carmen Rocha Gracia, DC Miguel Castañeda Lucio, DC Eduardo Monjaraz Guzmán y DC Antonio Munive Hernández. Por el gran enfoque metodológico y científico que le dan a mi investigación, por su tiempo, disposición y esfuerzo empleados.

ÍNDICE GENERAL.

	Pág.
RESUMEN	1
1. INTRODUCCIÓN	2
1.1. MADURACIÓN DE TRANSCRITOS NACIENTES.	2
1.1.1. ADICIÓN DE CAP AL EXTREMO 5'	3
1.1.2. POLIADENILACIÓN EN EL EXTREMO 3'	4
1.1.3. SPLICING	5
1.1.3.1 RIBONUCLEOPROTEÍNAS PEQUEÑAS NUCLEARES (UsnRNPs)	7
1.1.3.2 RIBONUCLEOPROTEÍNAS HETEROGÉNEAS NUCLEARES (hnRNPs) ..	9
1.1.3.3 PROTEÍNAS SR	10
1.2. SPLICING ALTERNATIVO.	12
1.3. PROCESO DE NMD.	16
1.3.1. NMD EN MAMÍFEROS	17
1.3.2. UPF 1	20
1.3.3. UPF 2	21
1.3.4. UPF 3	22
1.4. BIOLOGÍA CELULAR DEL ARNm.	22
1.4.1. P-BODIES	23
1.5. USTILAGO MAYDIS.	24
1.5.1. CICLO DE VIDA USTILAGO MAYDIS	25
1.5.2. USTILAGO MAYDIS COMO MODELO GENÉTICO-MOLECULAR	27
2. JUSTIFICACIÓN	29
3. OBJETIVO GENERAL Y OBJETIVOS PARTICULARES	30
4. DIAGRAMA DE TRABAJO	31
5. MATERIAL Y MÉTODOS	32

5.1. CEPA EXPERIMENTAL Y CONDICIONES DE CULTIVO	32
5.2. <i>DROP-PLATE</i>	32
5.3. OBTENCIÓN DE EXTRACTOS PROTEICOS	32
5.4. DETERMINACIÓN DE CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS.....	33
5.5. ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS	33
5.6. WESTERN BLOT	34
5.7. OBTENCIÓN DE PROTOPLASTOS.....	35
5.8. INMUNOCITOQUÍMICA.....	35
5.9. INMUNOFLUORESCENCIA	36
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	37
6.1. ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO	37
6.2. CURVA DE CRECIMIENTO Y <i>DROP-PLATE</i>	44
6.3. EXTRACCIÓN Y CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS.....	46
6.4. ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS.....	48
6.5. WESTERN BLOT	49
6.6. INMUNOCITOQUÍMICA EN LÍNEA CELULAR PC-3	51
6.7. OBTENCIÓN DE PROTOPLASTOS.....	54
6.8. ENSAYOS DE PERMEABILIZACIÓN	54
6.9. INMUNOCITOQUÍMICA EN <i>USTILAGO MAYDIS</i>	55
6.10. INMUNOFLUORESCENCIA EN <i>USTILAGO MAYDIS</i>	55
7. CONCLUSIONES.	58
8. PERSPECTIVAS	58
9. BIBLIOGRAFÍA	59
10. ANEXOS.....	72
10.1. SOLUCIONES PARA ELECTROFORESIS.....	72
10.2. PREPARACIÓN DEL GEL DE ACRILAMIDA.....	73
10.3. SOLUCIONES ADICIONALES PARA WESTERN BLOT	74
10.4. REACTIVOS EMPLEADOS EN INMUNOCITOQUIMICA	74
10.5. MEDIOS DE CULTIVO	76
10.6. ANTICUERPOS UTILIZADOS.....	77

ÍNDICE DE FIGURAS.

	Pág.
Figura 1. Síntesis de 7-mG en <i>S. cerevisiae</i> y estructura química del CAP	3
Figura 2. Poliadenilación en 3'	4
Figura 3. Representación del <i>splicing</i> constitutivo.....	5
Figura 4. Secuencias conservadas necesarias para que se lleve a cabo el proceso de <i>splicing</i>	6
Figura 5. Reacciones de trans-esterificación que ocurren durante el <i>splicing</i>	7
Figura 6. Composición de las diferentes snRNPs	8
Figura 7. Estructura tridimensional de UP1 humana.....	10
Figura 8. Proteínas SR en humanos (SRF1-12)	11
Figura 9. Alteraciones en la localización celular por eventos de <i>splicing</i> alternativo..	14
Figura 10. Tipos de <i>splicing</i> alternativo.....	15
Figura 11. Mecanismo general de NMD en mamíferos.....	18
Figura 12. Componentes principales y efectores proteicos de la vía NMD que se encuentran conservados en distintos organismos	20
Figura 13. Dominios estructurales presentes en Upf1 humana	21
Figura 14. Representación esquemática de los dominios estructurales presentes en Upf2	21
Figura 15. Representación esquemática de las diferentes isoformas de Upf1, Upf2 y Upf3b	22
Figura 16. Tumor característico de <i>U. maydis</i> en la mazorca de maíz	24
Figura 17. Ciclo de vida de <i>Ustilago maydis</i>	27
Figura 18. Análisis comparativo del proteoma de <i>Ustilago maydis</i> , <i>S. cerevisiae</i> y <i>H. sapiens</i>	28
Figura 19. Alineamiento de proteínas que incluyen: Anticuerpo Rent1, proteína Upf1 putativa de <i>U. maydis</i> y proteína Rent 1 de origen humano	39
Figura 20. Alineamiento de anticuerpo Rent 2, proteína Upf2 putativa de <i>Ustilago maydis</i> y proteína Rent2 de origen humano.....	40
Figura 21. Alineamiento de anticuerpo Rent 3, proteína Upf3 putativa de <i>Ustilago maydis</i> y proteína Rent3 de origen humano.....	41

Figura 22. Curva de crecimiento de <i>Ustilago maydis</i>	44
Figura 23. Curva de calibración con Albúmina de Suero Bovino (BSA 1mg/ml)	46
Figura 24. Comportamiento de concentración de proteínas en base a la densidad óptica del cultivo extraído	48
Figura 25. Gel SDS-PAGE de extractos proteicos de <i>Ustilago maydis</i>	49
Figura 26. Western Blot para proteínas Upf1, Upf2, Upf3 en <i>Ustilago maydis</i>	50
Figura 27. Inmunocitoquímica de proteínas de NMD en línea celular PC-3	51
Figura 28. Inmunocitoquímica en línea celular PC-3 para proteínas que participan en el <i>splicing</i>	52
Figura 29. Inducción para la formación de protoplastos en <i>Ustilago maydis</i>	54
Figura 30. Inmunocitoquímica en <i>Ustilago maydis</i> , validación del Anticuerpo Rent1	55
Figura 31. Epifluorescencia de proteínas de NMD en <i>Ustilago maydis</i>	56
Figura 32. Inmunofluorescencia de proteínas de <i>splicing</i> en <i>Ustilago maydis</i>	57

ÍNDICE DE TABLAS.

	Pág.
Tabla 1. Construcción de curva de calibración con BSA 1mg/ml	33
Tabla 2. Características de los anticuerpos comerciales utilizados en esta investigación.....	34
Tabla 3. Resumen comparativo de las proteínas de NMD en humano y <i>Ustilago maydis</i>	37
Tabla 4. Comparación de proteínas de <i>splicing</i> en humano y <i>Ustilago maydis</i>	38
Tabla 5. Resumen de alineamientos de las proteínas involucradas en <i>splicing</i> (de origen humano y de <i>Ustilago maydis</i>)	42
Tabla 6. Representación tridimensional de epítopos a detectar	43
Tabla 7. Datos obtenidos del análisis <i>drop-plate</i> a <i>Ustilago maydis</i>	45
Tabla 8. Concentración de proteínas en fase <i>lag</i>	47
Tabla 9. Concentración de proteínas ($\mu\text{g/ml}$) en fase <i>log</i> o experimental	47
Tabla 10. Resumen de localización celular propuesta y ensayo en línea celular PC-3..	53

ABREVIATURAS.

ARN:	Ácido Ribonucleico
ARNm:	Ácido Ribonucleico mensajero
ATP:	Adenosin Trifosfato
BP:	Punto de ramificación
BSA:	Albúmina Sérica Bovina
D.O.:	Densidad Óptica
EJC:	Complejo de Unión-Exón
ESE:	Promotores exónicos de <i>splicing</i>
ESS:	Silenciadores exónicos de <i>splicing</i>
HRP:	Peroxidasa de Rábano
ISE:	Promotores intrónicos de <i>splicing</i>
ISS:	Silenciadores intrónicos de <i>splicing</i>
KDa:	Kilodalton
MTS:	Señal Mitocondrial Blanco
mV:	mili- Volts
NLS:	Señal de Localización Nuclear
NMD:	Decaimiento del ARNm mediada por sinsentido
nt:	Nucleótido
ORF:	Marco de Lectura Abierto

PBS:	Buffer Fosfato Salino
PTC:	Codón Prematuro de Terminación
PVDF:	Polifluoruro de Vinilideno
RIPA:	Buffer de Ensayo de Radio Inmuno-Precipitación
SCS:	Sorbitol, Citrato de Sodio
SDS:	Dodecil Sulfato Sódico
snRNP:	Ribonucleoproteínas Pequeñas Nucleares
TBS:	Buffer Tris Salino
TEMED:	Tetra Metil Etilen Diamina
TM:	Región Transmembranal
UTR:	Región no-Traducible
YEPS:	Extracto de Levadura, Peptona, Sacarosa

RESUMEN.

La vía NMD (Nonsense-mediated decay, por sus siglas en inglés) tiene como función principal asegurar la precisión de la expresión genética, regulando algunos de los errores que pudieran existir al reconocer y degradar a los ARNm que contienen codones prematuros de terminación (PTC). Si esto no sucediera, podría ocasionarse una acumulación de proteínas truncas con funciones anómalas o potencialmente tóxicas para la célula.

Las principales proteínas que regulan la vía NMD son Upf1, Upf2 y Upf3, las cuales se encuentran conservadas en todos los eucariotes, desde levaduras hasta mamíferos, incluido el humano. En este trabajo se pretendió validar la presencia de las proteínas de NMD Upf1, Upf2 y Upf3 en *Ustilago maydis* mediante técnicas inmunológicas, haciendo uso de anticuerpos comerciales policlonales para reconocer a dichas proteínas.

Inicialmente se realizó un análisis bioinformático para determinar las regiones conservadas tanto en humano como en *Ustilago maydis*, además de que nos permitió definir si los epítomos antigénicos reportados para los anticuerpos comerciales se encontraban en las regiones conservadas de las proteínas de interés. De esta manera, el análisis bioinformático facilitó la correcta elección de los anticuerpos empleados en la identificación. Posteriormente, se validó mediante Western Blot e inmunocitoquímica la reactividad cruzada de los anticuerpos comerciales para Upf1, Upf2, Upf3 y para algunos factores de *splicing* en *Ustilago maydis*. En dichos experimentos, se utilizó como control positivo a la línea celular de cáncer de próstata PC-3 y como control negativo extracto proteico de *Escherichia coli* para validar los ensayos realizados. Con este trabajo, se implementaron las técnicas para determinar la localización celular de las proteínas de NMD en *Ustilago maydis*, ayudando a sustentar que *Ustilago maydis* es un modelo de estudio atractivo para estudiar dichos procesos celulares.

1. INTRODUCCIÓN.

En la expresión de la información genética en eucariotes, gran parte de los genes que codifican para proteínas sufren algún tipo de maduración mediante procesos que incluyen por ejemplo al *splicing* (corte de intrones y empalme de exones). En muchos casos, ocurren eventos de *splicing* alternativo, proceso responsable de aumentar la capacidad de codificación del genoma humano, pero que al efectuarse de forma incorrecta puede producir mutaciones que pueden inducir enfermedades tales como el cáncer, atrofia muscular espinal, tauopatías, etc. Posterior al *splicing*, ocurre el proceso NMD que actúa como un sistema de control de calidad celular para una correcta expresión genética. El conocimiento acerca de los procesos de *splicing* y NMD, incluyendo las proteínas involucradas en su regulación, aún no se encuentra completamente dilucidado para diferentes condiciones fisiológicas o patológicas celulares, de donde surge la necesidad de profundizar en el estudio de estos mecanismos. A continuación se describen de manera general los eventos co- y post-transcripcionales que se llevan a cabo en eucariotes implicados en la regulación de la expresión genética.

1.1 MADURACIÓN DE TRANSCRITOS NACIENTES.

Después del proceso de transcripción, los productos generados de manera inmediata por la ARN polimerasa II son los denominados pre-ARNm, los cuales requieren distintas modificaciones para ser madurados y así poder ser liberados del núcleo al citoplasma celular; dichas etapas asegurarán la vida media del ARNm al brindarle estabilidad y protección ante diferentes enzimas de degradación.

Las reacciones para dicha maduración incluyen las reacciones que se describen a continuación.

1.1.1 ADICIÓN DE CAP AL EXTREMO 5'.

El CAP favorece la estabilidad del ARNm (Cowling, 2011) al proteger su extremo 5' de la acción de enzimas como las fosfatasas y nucleasas, por tanto su presencia favorece la traducción de dichos ARNm. El extremo 5' trifosfato de la cadena de ARN naciente experimenta las siguientes modificaciones químicas (Berg *et al.*, 2010).

- a) *Desfosforilación*: existe liberación por hidrólisis de un grupo fosfato del extremo 5' terminal del ARN naciente.
- b) *Transferencia de un GTP mediante un enlace 5'-5'*: El extremo 5' difosfato ataca al átomo de fósforo α del GTP para formar un enlace atípico 5'-5' trifosfato. Esta porción característica es denominada CAP.
- c) *Metilación de la Guanina*: la S-adenosilmetionina metila al nitrógeno en la posición 7 de la guanina terminal, formándose así el CAP 0. Las ribosas próximas pueden ser metiladas para formar el CAP 1 ó 2.

En levaduras como *Saccharomyces cerevisiae* se han identificado diferentes enzimas responsables de la formación del CAP (Schroeder *et al.*, 2004), tales como la Ceg1p (ARN guaniltransferasa), Cet1p (ARN trifosfatasa) y la Abd1p (Guanina 7-metil-transferasa), que requieren unirse al dominio C-terminal (CTD) de la ARN polimerasa II.

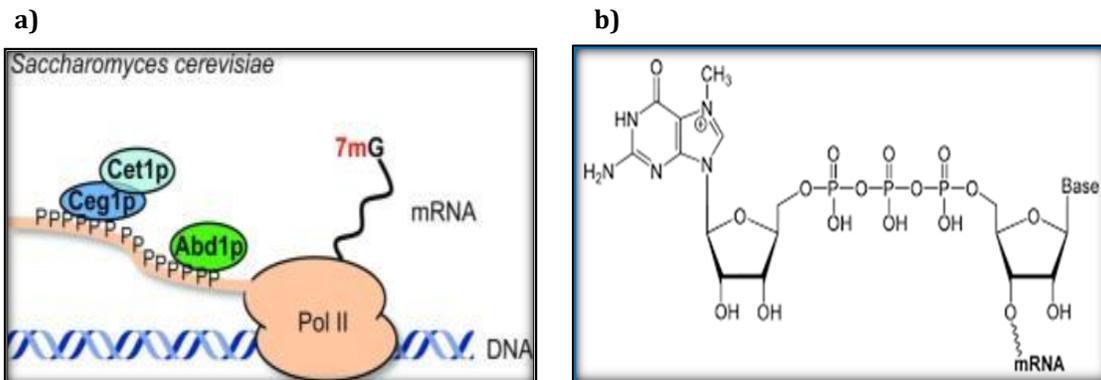


Figura 1. Modificación del extremo 5' del pre-ARNm. **a)** Síntesis de la 7-mG en *S. cerevisiae* y **b)** estructura química del CAP.

El complejo de unión al CAP (CAP-binding complex, CBC), tiene un papel clave en mecanismos de expresión génica (Gonatopoulos *et al.*, 2014) ya que se encuentra involucrado en procesos tales como la transcripción, el *splicing*, el transporte de transcritos y la traducción. En organismos como *Saccharomyces cerevisiae* y *A. thaliana* se ha demostrado que el complejo CBC es prescindible para la vía NMD (*Nonsense-mediated mRNA decay*) (Kuperwasser *et al.*, 2004).

1.1.2. POLIADENILACIÓN EN EL EXTREMO 3':

La modificación en el extremo 3' del pre-ARNm consiste en la incorporación de adeninas en la mayoría de los ARNm (a excepción de las histonas), denominada cola de poli-A, la cual está constituida por una secuencia de 50 a 250 nucleótidos en mamíferos y de 70 a 90 para levaduras (Eckmann *et al.*, 2011).

Al término de la transcripción, el transcrito es hidrolizado por medio de una endonucleasa específica, al reconocer los motivos AAUAAA o AUUAAA localizados de 20 a 30nt río-arriba del sitio de corte (Eliseeva *et al.*, 2013) y de manera consecutiva se agregan en su extremo 3' los residuos de Adeninas por la enzima Poli(A) polimerasa; en esta reacción participa el ATP como donador. Este proceso protege al ARNm de una posible degradación, aumenta su vida media en el citoplasma y por consiguiente le proporciona estabilidad al mensajero (Schmidt *et al.*, 2010).

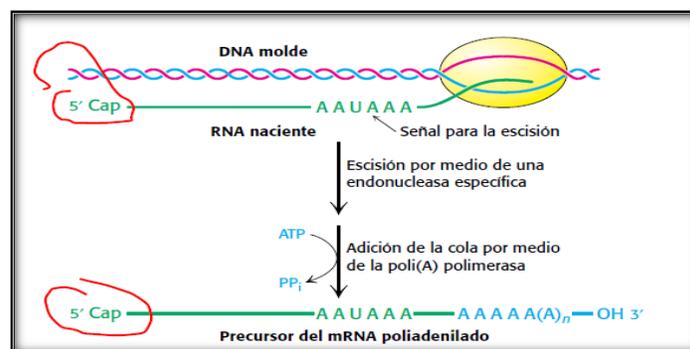


Figura 2. Poliadenilación del pre-ARNm.

1.1.3. *SPLICING*.

En diversos organismos eucariotes, gran parte de los genes se encuentran interrumpidos por secuencias no codificantes denominadas intrones o IVS (Chen *et al.*, 2012) y precisamente el proceso de *splicing* que ocurre en el núcleo celular, cataliza el corte de intrones y empalme de exones formando un transcrito maduro (Matlin *et al.*, 2005).

Este proceso requiere ser muy preciso; en algunos casos el desfase de un nucleótido afectaría el marco de lectura, por lo tanto se produciría una secuencia de aminoácidos distinta (Ahmed *et al.*, 2011), y con probabilidad de contener un codón prematuro de terminación (PTC).

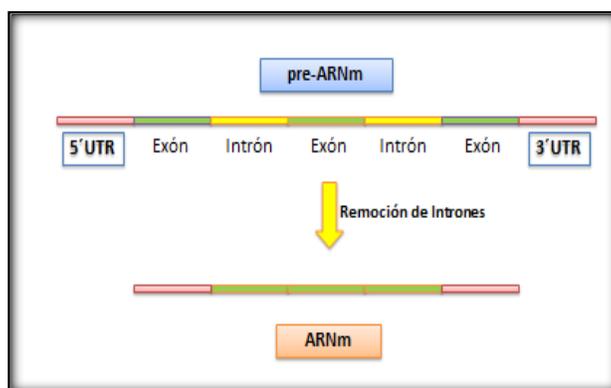


Figura 3. Representación del *Splicing* constitutivo.

En algunos genes que codifican para proteínas humanas, se ha calculado que la longitud de exones consta de 145 nucleótidos a diferencia de 3,365 nt en intrones; también se propone que más del 90% de los genes contienen éstas secuencias no codificantes (Wang *et al.*, 2008), las cuales serán removidas mediante el proceso de *splicing* (Tazi *et al.*, 2009).

De manera general se conocen las características necesarias que establecen cómo se delimita un exón y un intrón contiguo, a este respecto se ha descrito que más del 99% de los pre-ARNm presentan las siguientes secuencias conservadas (Van der Feltz *et al.*, 2012):

- Un GU en el extremo 5' de la unión entre el exón y el intrón (5' sitio de *splicing*).
- Un AG en el vínculo entre el intrón y el exón hacia el extremo 3' (3' sitio de *splicing*).
- Una adenosina invariable presente dentro de una región intrónica denominada secuencia de ramificación (BPS, por sus siglas en inglés, "branch point sequence"). En levaduras como *Saccharomyces cerevisiae*, la secuencia del sitio de ramificación es generalmente UACUAAAC (Seraphin & Rosbash, 1991).

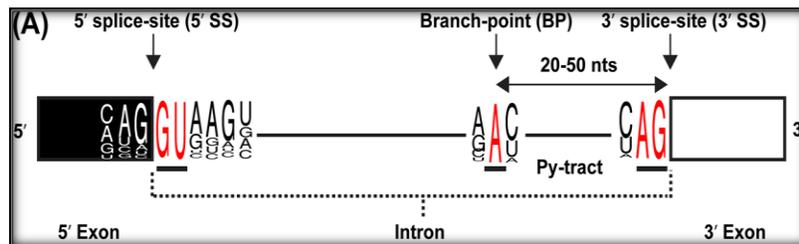


Figura 4. Secuencias conservadas necesarias para que se lleve a cabo el proceso de *splicing*. Se observan las secuencias consenso en los lugares donde ocurre el *splicing* en los extremos 5' y 3' del intrón.

El *splicing* se realiza con la participación de un complejo macromolecular proteico de aproximadamente 12 MDa denominado *spliceosoma* (Sperling *et al.*, 2008), el cual es de conformación y composición dinámica lo que a su vez permite que la maquinaria del *splicing* tenga características de precisión y flexibilidad (Frankenstein *et al.*, 2012). Químicamente, el *splicing* ocurre en dos reacciones sucesivas de transesterificación (Fabrizio *et al.*, 2009), que consisten en lo siguiente:

- 1.- El grupo 2'-OH de un extremo de Adenina del intrón efectúa un ataque nucleofílico sobre el sitio de *splicing* 5', lo que deriva en la unión del extremo 5' del intrón al residuo de Adenina de la secuencia BPS, formando una estructura de lazo.
- 2.- En una segunda etapa, el sitio de *splicing* 3' es atacado por el grupo 3'-OH del exón, esto conlleva a la ligación de los extremos de los exones y la liberación del intrón en forma de lazo (Valadkhan *et al.*, 2009).

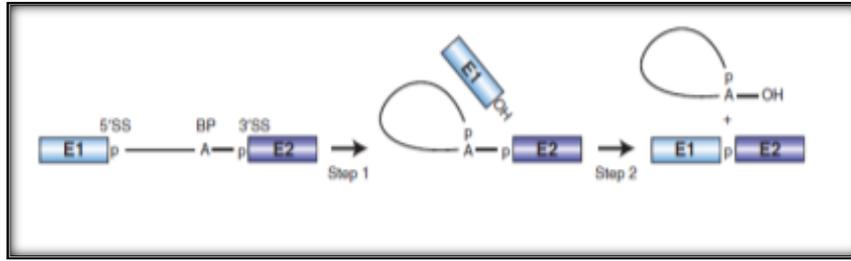


Figura 5. Reacciones de trans-esterificación que ocurren durante el *Splicing*.

En la mayoría de las células eucariotas, existen dos tipos de *spliceosomas* (Black 2003), los dependientes de U2 que catalizan la remoción o eliminación de intrones descrita anteriormente (Patel & Bellini, 2008) y los dependientes de U12, que se ha reportado que sólo están presentes en algunas especies de metazoos y plantas (Patel & Steitz, 2003).

Existen algunos elementos auxiliares presentes en el pre-ARNm que actúan en *cis* y que se incluyen en regiones de exones o intrones, que actúan como promotores (ESEs y ISEs) o silenciadores (ESSs y ISSs) (Chen & Manley, 2009), estos son de secuencias características cortas y diversas, que modulan principalmente el *splicing* alternativo, ya que reclutan a factores auxiliares de *splicing* que funcionan estimulando o reprimiendo el ensamble del *spliceosoma* (Goren *et al.*, 2006).

Para el ensamble del *spliceosoma* se requiere energía en forma de ATP (Matlin & Moore, 2007); este complejo se encuentra constituido principalmente por factores que actúan en *trans*, incluyendo diversas ribonucleoproteínas y 170 proteínas (Wahl *et al.*, 2009). A continuación se describen los principales componentes del *spliceosoma*.

1.1.3.1 RIBONUCLEOPROTEÍNAS PEQUEÑAS NUCLEARES (*UsnRNPS*).

Las snRNPS constituyen el núcleo catalítico del *spliceosoma* (Stanek & Neugebauer, 2006), son indispensables para la maduración de ARNm (Dey *et al.*,

2010) y están incluidas las siguientes: U1snRNP, U2snRNP, U4snRNP, U5snRNP y U6snRNP (Tardiff & Rosbash, 2006).

Las snRNPs presentan un ARN pequeño nuclear de tamaño variable comprendido entre 60 y 300 nt para levaduras y humanos, respectivamente (Brow, 2002).

En cuanto a sus componentes, cada snRNP presenta la siguiente conformación:

- Una molécula de ARN rica en Uracilo.
- Un anillo de siete proteínas Sm (Sm B/B', D1, D2, D3, E, F y G; de 8 a 25 KDa cada una) o tipo-Sm (LSm 2-8).
- Tres o más proteínas específicas para cada UsnRNP (Liu & Gall, 2007).

Las 7 proteínas Sm son de gran importancia en procesos como el ensamble, transporte y el mantenimiento de la integridad de las snRNPs; cada una de estas proteínas tienen un motivo conservado, el cual presenta dos secuencias primarias cortas que se denominan Sm1 y Sm2, separadas por un espaciador (Meister *et al.*, 2002).

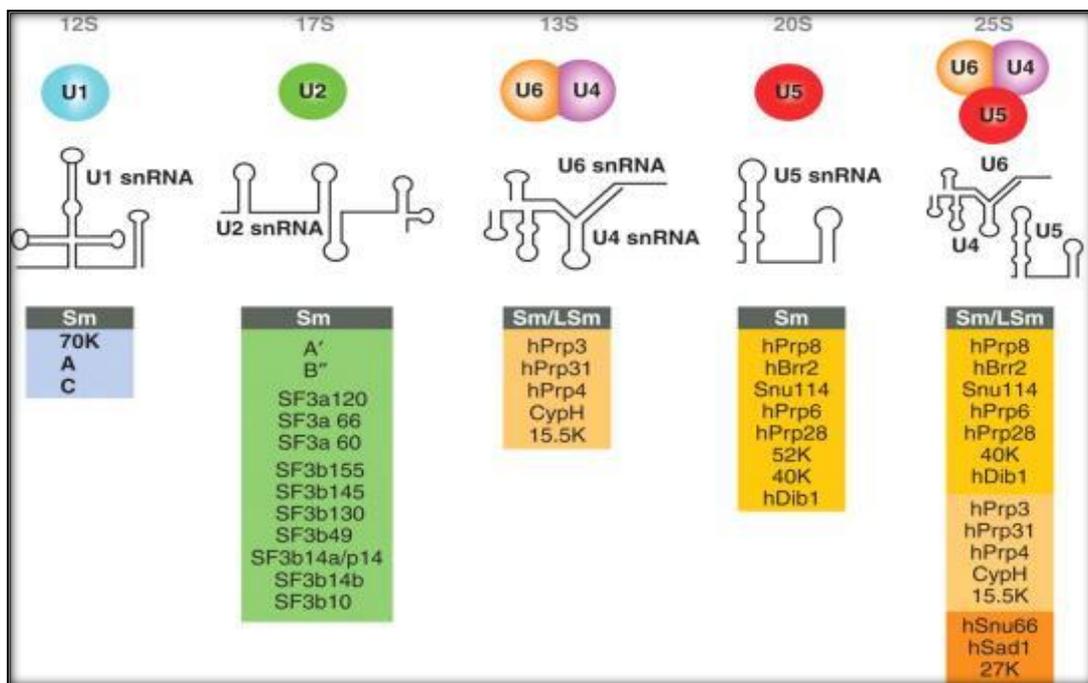


Figura 6. Composición de las diferentes snRNPs. Se incluyen las proteínas Sm y Lsm que conforman a las snRNPs humanas. (Will & Lüthmann, 2011).

Tanto en *Homo sapiens* como en *Saccharomyces cerevisiae*, se ha estudiado el ensamblaje del *spliceosoma* (Schwer *et al.*, 2013) el cual ocurre de la siguiente manera: en primera instancia se observa la formación de un complejo que comprende la snRNP U1 con el sitio 5' de *splicing* y la asociación de los factores U2AF35/65 en humano y el heterodímero Msl5*Mud2 en *S. cerevisiae* con la secuencia BPS. Este complejo se denomina de entrega en *S. cerevisiae* y complejo E (*early*) en mamíferos (Hoskins *et al.*, 2011).

La snRNP U2 se une al complejo E en una reacción dependiente de ATP para conformar al pre-*spliceosoma*. El trímero conformado por las snRNPs U4/U6*U5 a continuación reconoce al pre-*spliceosoma* para formar el *spliceosoma* completo (Warlocki *et al.*, 2009).

1.1.3.2 RIBONUCLEOPROTEÍNAS HETEROGÉNEAS NUCLEARES (*hnRNPs*).

Las hnRNPs tienen una función estabilizadora al interrumpir la formación de estructuras secundarias para el apareamiento de bases, esto al asociarse al pre-ARNm, impidiendo la interacción con otras moléculas (Han *et al.*, 2010).

Estas proteínas comprenden un grupo de 20 polipéptidos de 32 a 110 KDa aproximadamente y su nomenclatura es designada de manera progresiva en relación a su peso molecular, desde hnRNP-A hasta hnRNP-U (Martínez-Contreras *et al.*, 2006).

Las hnRNPs son proteínas abundantes en el núcleo celular que contienen al menos un motivo de unión al ARN (dominios RBD/RRM, KH o RGG), la mayoría de estas proteínas contienen múltiples isoformas que son producto del *splicing* alternativo (Papadodima *et al.*, 2013). Los miembros más abundantes de hnRNPs son los tipo A/B (hnRNP-A1 y A2/B1), la proteína hnRNP-A1 es considerada como el modelo de esta familia de proteínas; ésta se une a los transcritos nacientes y permanece asociada con los ARN blanco a través de todos los pasos del procesamiento de ARNm en el núcleo (Bailey-Serres *et al.*, 2009).

La modulación de estas proteínas sobre el *splicing* promueve la diversidad funcional al igual que lo hacen las proteínas SR; su dominio más importante es el denominado RRM que media la interacción específica con el pre-ARNm; con excepción de hnRNPs E/K que interactúan con el ARN a través del dominio KH de la proteína. Estos factores pueden albergar también cajas con repetidos de los tripéptidos RGG (Arginina-Glicina-Glicina), los cuales pueden unirse también al ARN (Cammass *et al.*, 2007).

Inicialmente, se reportaron algunos mecanismos mediante los cuales las hnRNPs interfieren en el *splicing*, en los que se ha observado lo siguiente:

- Represión del montaje del *spliceosoma* a través de multimerización de varias hnRNPs a lo largo de los exones.
- Bloqueo del reclutamiento de las snRNPs (Zhu *et al.*, 2007).

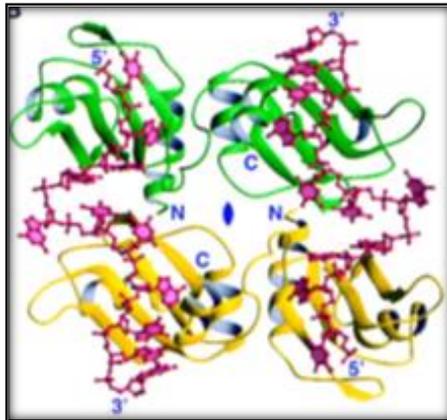


Figura 7. Estructura tridimensional de UP1 humana, el cual corresponde a una versión trunca de hnRNP A1 (Jianzhong *et al.*, 1999).

1.1.3.3 **PROTEÍNAS SR.**

Las proteínas SR están implicadas en procesos de regulación del *splicing* alternativo, al ser capaces de reconocer diversas secuencias de *splicing* (Coelho Ribeiro *et al.*, 2013). Estas proteínas contienen regiones abundantes en residuos en

arginina y dipéptidos de serina y por lo menos un dominio de unión a ARN denominado RRM (Busch & Hertel, 2011).

Estructuralmente, las proteínas SR contienen uno o dos dominios RRM localizados en el extremo N-terminal, seguidos de un dominio SR “río abajo” de 50 aminoácidos cuya composición presenta alrededor del 40% de residuos de serina o arginina; estas proteínas entonces se caracterizan por tener SR consecutivas o repetidas (Sheen & Green, 2006). Estos factores facilitan el reconocimiento del exón; se propone que el dominio SR de una proteína interactúa con una secuencia exónica facilitadora denominada *enhancer* (ESE), lo que promoverá el reclutamiento de la snRNP U1 y de U2AF, facilitando el ensamble del *spliceosoma* (Long & Cáceres, 2009).

Muy cercanas a las uniones exón-intrón, se encuentran presentes los sitios de unión para las proteínas SR y para las hnRNPs, lo que sugiere que la interacción entre la activación y la represión en el *spliceosoma* modula la probabilidad de la inclusión de un exón (Reed, 2000).

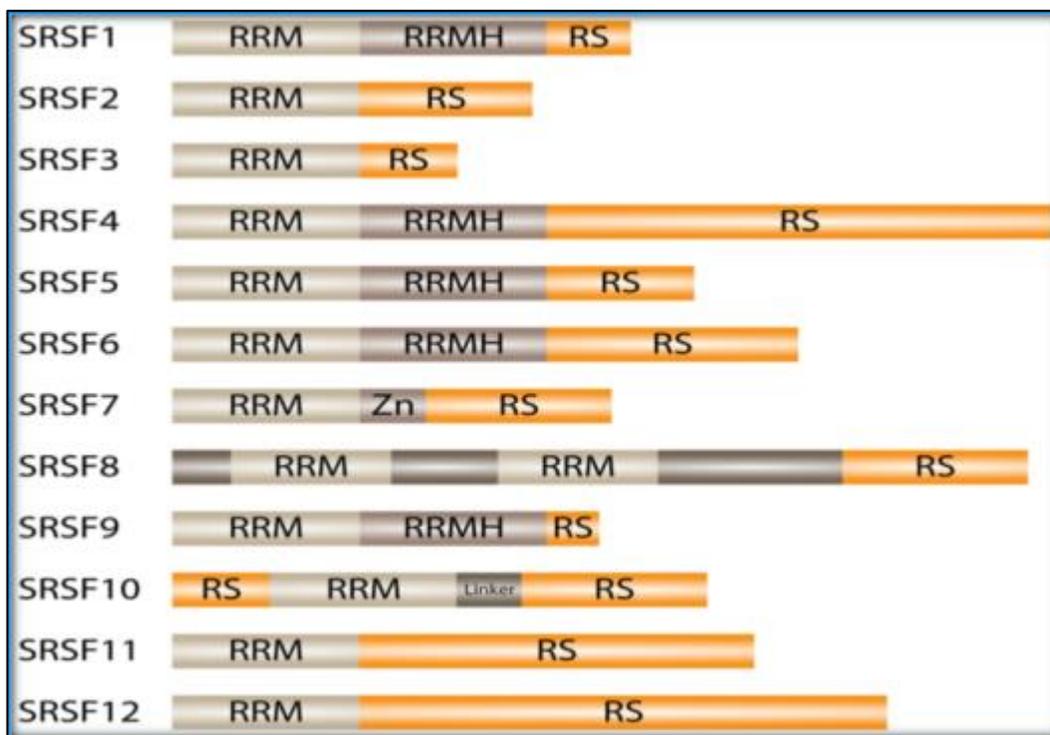


Figura 8. Proteínas SR en humanos (SRSF1-12). Integrada por un RRM al extremo N-terminal, seguido por un dominio SR hacia el C-terminal (Busch & Hertel, 2012).

Otras proteínas implicadas en el *splicing* incluyen:

- ⊗ Factores auxiliares del *splicing*; principalmente la proteína **U2AF**.
- ⊗ Superfamilia **ARN-helicosas**: como las DEAD y DEADH.

Al ocurrir las reacciones antes mencionadas, se formará el ARNm maduro, que será transferido al citoplasma celular en donde será traducido a proteínas.

1.2 SPLICING ALTERNATIVO.

El *splicing* alternativo es un mecanismo en el cual se pueden formar un gran número de isoformas de ARNm a partir de un mismo gen; por consiguiente se incrementa la capacidad de codificación del genoma, al poderse generar una diversidad de proteínas; esto aumenta en gran medida el uso de la información genética (Luco & Misteli, 2011).

Se ha observado que las isoformas producto de este proceso tienen diferentes funciones biológicas que difieren en la capacidad de interacción proteína-proteína, la localización subcelular y su capacidad catalítica, por mencionar algunos ejemplos (Kashyap & Tripathi, 2008). Algunos de los cambios que ocurren durante este proceso que parecieran ser muy pequeños y sutiles pueden tener consecuencias fatales (Lenzken *et al.*, 2013), como diversas alteraciones en la respuesta celular, un descontrol de la proliferación celular o incluso que se desencadene la muerte celular.

A diferencia del *splicing* constitutivo, en el cual el corte y empalme ocurre de manera secuencial y ordenada generando únicamente un transcrito (Kashyap & Tripathi, 2008), en el *splicing* alternativo múltiples acciones pueden ocurrir, tales como la exclusión de exones del ARNm o la incorporación de un intrón al ARNm maduro que fue reconocido como exón alternativo, esto por consiguiente aumenta la diversidad del código genético (Matlin *et al.*, 2005).

Este proceso es más común de lo que se pensaba; actualmente se estima que afecta a más del 90% de los genes que codifican para proteínas en el humano. También se calcula que un 75% de exones alternativos participan en este proceso aumentando el potencial de codificación del genoma (Shukla & Oberdoerffer, 2012).

La especificidad del *splicing* alternativo se debe a la disponibilidad de ciertos factores auxiliares de *splicing* que regulan este proceso de expresión del ARNm (Goldstrohm *et al.*, 2001); dicha disponibilidad depende principalmente de sus niveles de expresión, su localización celular, el contexto celular particular y las modificaciones post-traduccionales que sufren (Xie *et al.*, 2007).

Se ha demostrado también que la regulación del *splicing* está estrechamente relacionada a la transcripción, al asociarse los factores de *splicing* con la ARN polimerasa II (RNA Pol II) y el proceso de elongación; por lo tanto, se sospecha que el *splicing* alternativo puede ser sensible a la procesividad por parte de la RNA Pol II, a las modificaciones de las histonas y a la estructura de la cromatina (Allemand *et al.*, 2008).

El cambio de localización celular debido a errores en el *splicing* alternativo puede ocurrir (Heyd & Lynch, 2011), mediante la afectación de señales de localización, alteración de secuencias para la modificación post-traduccionales o la interacción con otras proteínas. Estas variaciones pueden tener un efecto o no en la célula, algunos ejemplos de esto son los siguientes:

- Un exón puede introducir o alterar una secuencia de localización nuclear (Kelemen *et al.*, 2013).
- Cuando algún exón alternativo altera la proporción de los transcritos generados, cambiando la distribución de las isoformas proteicas producidas entre los compartimentos celulares, como ocurre con las variantes de ING4 (Unoki *et al.*, 2006).
- Las proteínas pueden adquirir nuevas funciones en diferentes compartimentos, como ocurre con el gen *lipin* (Peterfy *et al.*, 2005), que en su forma nuclear

actúa como un factor de transcripción, mientras que en su forma citoplásmica tiene actividad de fosfatasa.

En casos extremos, un cambio en la localización celular debida a la selección de los sitios de *splicing* puede acarrear consecuencias fisiológicas graves (Orengo & Cooper, 2007); como ocurre en el caso de la retención de intrones durante el procesamiento de la Eritropoyetina, lo que puede contribuir a una resistencia a ésta y provocar enfermedades renales graves como consecuencia.

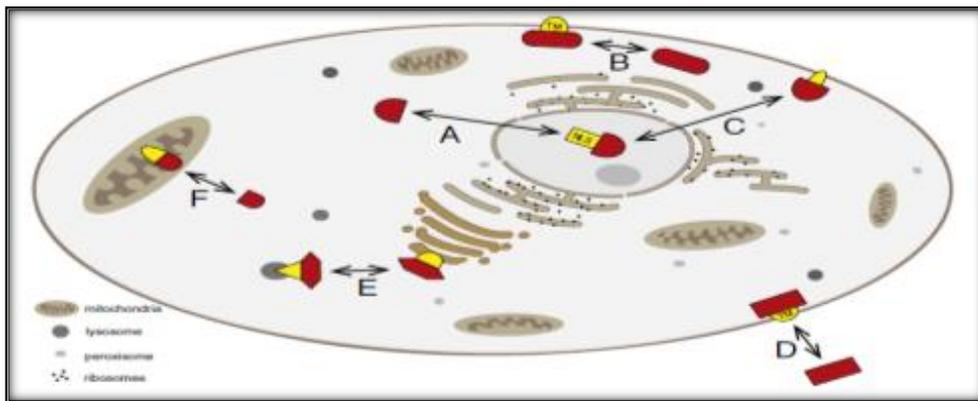


Figura 9. Alteraciones en la localización celular por eventos de *splicing* alternativo. Rojo: proteínas que sufren *splicing* alternativo, Amarillo: secuencias alternativas. A) Localización entre el citosol y el núcleo, alterándose la señal de localización nuclear (NLS). B) Cambio de localización entre el citoplasma y la membrana plasmática, frecuentemente mediante cambios en la región transmembranal (TM). C) Cambios entre el núcleo y formas asociadas a la membrana. D) Generación de formas solubles secretadas por cambios en la TM. E) Localización en diferentes membranas internas. F) Localización en mitocondrias mediante la inserción de una señal de localización mitocondrial (Kelemen *et al.*, 2013).

Existen diferentes formas en las que se lleva a cabo el *splicing* alternativo, las más frecuentes se esquematizan en la Figura 10 y se describen a continuación:

- Ⓢ **Inserción u Omisión de Exones:** es el mecanismo más común de *splicing* alternativo, en el cual el exón o exones pueden ser incluidos o excluidos del transcrito final que conduce a generar un ARNm extendido u acortado (Howe *et al.*, 2003).

- Ⓢ **Retención de Intrón:** las secuencias no codificantes se conservan hasta la transcripción final. Datos indican que en los seres humanos se retienen del 2 al 5% de los intrones (Bell *et al.*, 2010).
- Ⓢ **Sitios de corte y empalme 5' ó 3':** puede crearse diversidad o competencia en los sitios de corte y empalme.
- Ⓢ **Exones mutuamente excluyentes:** dos exones pueden competir para ser incluidos en el transcrito final (Nilsen & Graveley., 2010).
- Ⓢ **Splicing 3'-UTR:** el codón de terminación puede ser detectado como un codón de paro prematuro si están presentes intrones menores de 55 nt en el 3'-UTR (Hughes, 2006).
- Ⓢ **Promotores alternativos creando ORF sensibles a NMD:** la inserción de un ORF puede conducir a la vía NMD debido a que el codón de terminación se encuentra “rio-arriba” del exón correspondiente (Behm & Izaurralde, 2006).

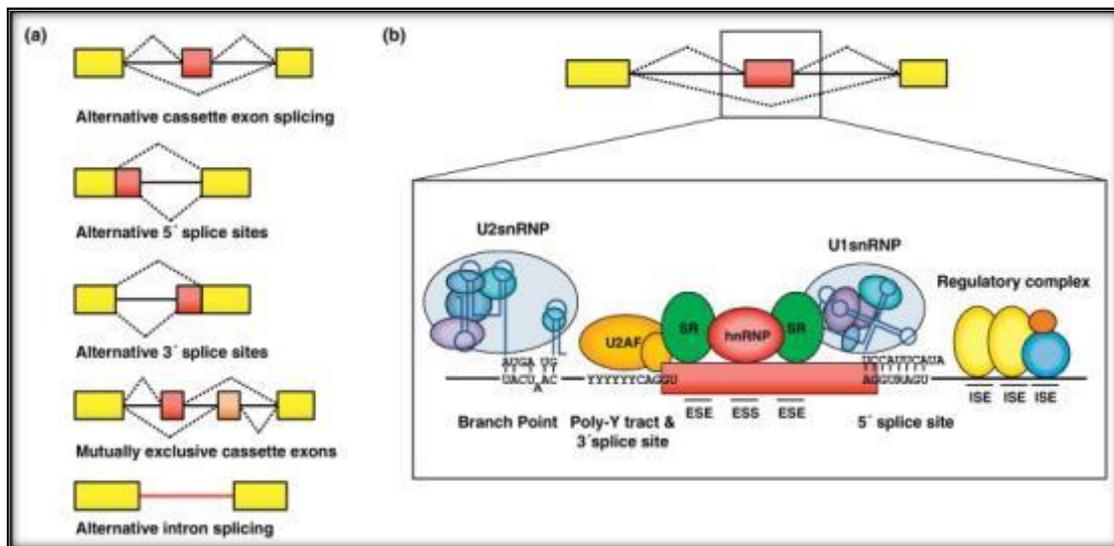


Figura 10. Tipos de *splicing* alternativo. La imagen representa las regiones que se pueden excluir o incluir del ARNm maduro. Los exones están representados por rectángulos y los intrones como líneas. Se esquematizan los elementos reguladores que actúan *in cis* y las proteínas que se asocian *in trans*.

Estudios recientes indican que la selección incorrecta de los sitios de *splicing* alternativo, mutaciones o alteraciones de algunos componentes de este mecanismo, pueden estar implicadas en la producción de distintas enfermedades y/o patologías en el humano (Barta & Schumperli, 2010), distintos tipos de cáncer como el de ovario (Klinck *et al.*, 2008), enfermedades neurodegenerativas como la atrofia muscular espinal (Wirth *et al.*, 2006), síndrome de Hutchinson-Gilford (Scaffidi & Misteli, 2005), síndrome Prader-Willi (Sahoo *et al.*, 2008), Tauopatías (Gallo *et al.*, 2007), distrofia miotónica (Kuyumcu-Martinez *et al.*, 2007), demencia fronto-temporal (Wang *et al.*, 2004), Alzheimer (Ingelsson *et al.*, 2006), etc.

En algunos órganos o tejidos con actividades complejas como el cerebro, cualquier defecto en el *splicing* alternativo puede causar grandes problemas al no codificarse completamente las proteínas necesarias y por consiguiente los productos realizarán funciones diferentes a las necesitadas en este órgano humano. Por ejemplo, la forma autosómica dominante en la retinitis pigmentosa es causada por la mutación de los factores de *splicing* PRPF31/U4-61K y PRP8 (Wilkie *et al.*, 2008).

Se ha observado que los defectos en la maquinaria general del *splicing* constitutivo no resultan compatibles con la vida, mientras que los cambios provocados en el *splicing* alternativo pueden ser tolerados por un organismo, aunque los mismos son manifestados por una enfermedad.

1.3 PROCESO DE NMD.

Existe un sistema celular encargado de vigilar el reconocimiento y degradación de los ARNm que contienen codones prematuros de terminación (PTC, por sus siglas en inglés), por lo tanto evita la expresión de proteínas erróneas o truncadas (Maquat, 2004); este evento de compensación de errores ocurre luego del *splicing* en el citoplasma y se denomina NMD (del inglés: nonsense-mediated mRNA decay) o decaimiento del ARNm sin sentido (Gardner, 2010).

Se ha reportado que del 60-70% de los pre-ARNm que se someten a *splicing* alternativo, 45% generan un sustrato para la vía NMD (Stalder & Mühlemann, 2008).

La vía de NMD es activada por una terminación prematura de la traducción actuando como un complejo de “vigilancia” y su función consiste en “marcar” un transcrito prematuro para su inmediata degradación. En este proceso interaccionan los factores de terminación de la traducción en eucariotas (eRF1 y eRF3) así como la maquinaria de degradación del ARN (Ivanov *et al*, 2008); lo que provoca una aceleración para la remoción de ARNm aberrantes o transcritos “sin sentido”, lo que inducirá la producción de proteínas truncas y efectos negativos celulares (Popp & Maquat, 2014).

Se ha propuesto también que NMD no sólo remueve transcritos defectuosos, sino que también es asociado a la regulación del nivel estacionario de ARNm involucrado en la reparación del ADN, ciclo y metabolismo celular (Rehwinkel *et al*, 2005).

Los codones prematuros de terminación (PTCs) pueden surgir a partir de mutaciones a nivel del ADN (mutaciones sinsentido, deleciones, inserciones o cambios de marcos de lectura) y se estima que un 30% de las enfermedades genéticas son asociadas a transcritos con PTCs (Khajavi *et al*, 2006). Se han propuesto mecanismos de reconocimiento de PTCs en organismos modelos que presentan conservación entre ellos tales como: *Saccharomyces cerevisiae*, *Drosophila melanogaster*, *C. elegans*, plantas y algunos mamíferos (Longman *et al*, 2007).

1.3.1. NMD EN MAMÍFEROS.

En el caso de mamíferos (Lejeune & Maquat, 2005), la vía de NMD se desencadena de acuerdo a las condiciones enumeradas a continuación y plasmadas en la Figura 11.

1.- El Complejo de Unión Exón (EJC), depositado durante el *splicing*, se encuentra ubicado de 50 a 55 nt “rio-abajo” del codón “sin sentido” o PTC.

2.- El ribosoma se encuentra con el PTC ubicado a la distancia mencionada del EJC y lo reconoce como un codón de paro, formando un complejo de terminación.

3.- Al existir la interacción entre el Complejo de Terminación (TC) y el EJC; se activa la vía NMD (Chang *et al.*, 2007).

Dos pasos críticos e importantes en la vía NMD han atraído mucha atención en años recientes: el primero es conocer el mecanismo por el cual codones prematuros de terminación son reconocidos y discriminados de los codones de paro naturales y el segundo es estudiar el mecanismo por el cual los ARNm que contienen PTCs son objeto de rápida degradación.

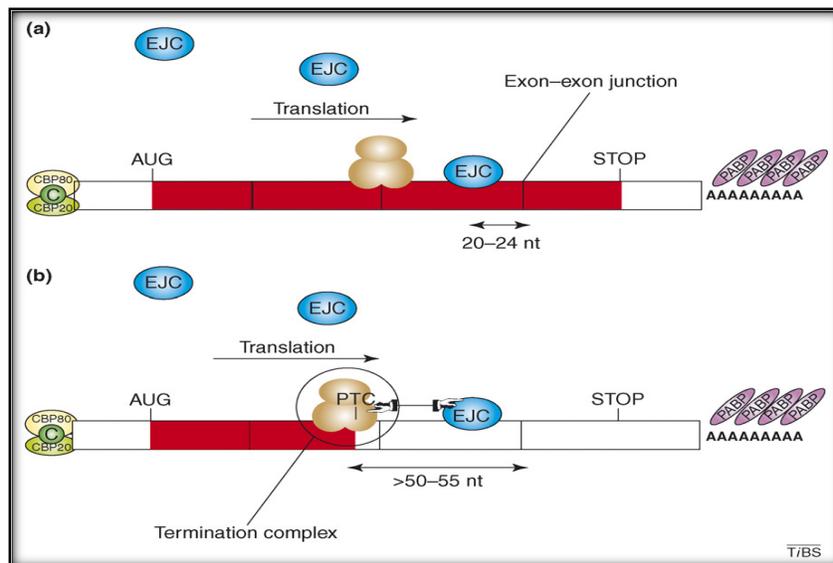


Figura 11. Mecanismo general de NMD en mamíferos. a) ARNm sin PTC; el EJC es depositado durante el *splicing* y se ubica de 20-24 nt “río-arriba” de la última unión Exón-Exón; cuando se alcanza el codón de paro normal, el ribosoma prosigue con la síntesis de proteínas. b) Cuando el ARNm contiene un PTC unido 50-55nt río arriba del EJC, se forma el complejo de terminación para activar la vía NMD (McGlinicy & Smith, 2008).

Un modelo para el reconocimiento de PTCs, conocido como *faux* de 3'-UTR, postula que la terminación de la traducción adecuada, requiere una señal de promoción de la terminación y que la ausencia de esta señal alerta a una traducción

aberrante, que a su vez conduce a la degradación de los ARNm (Kervestin *et al.*, 2012).

Se han identificado nuevos blancos que activan la vía NMD (Rehwinkel *et al.*, 2006), lo cual está dado por los siguientes eventos:

- ✓ Retención de Intrones.
- ✓ ARNs no-codificantes
- ✓ ORFs pequeños consecutivos
- ✓ Eventos de splicing en regiones 3'-UTR
- ✓ Exones alternativos que incluyan PTCs
- ✓ Selenoproteínas
- ✓ Secuencias 3'-UTR muy largas.

La vía de NMD regula aproximadamente el 10% de los ARNm humanos y su importancia fisiológica radica en el hecho de que el 30% de las enfermedades están asociadas a mutaciones generadas por PTCs (Bhuvanagiri *et al.*, 2010). La variación en la gravedad clínica causada por diferentes mutaciones en un solo gen a menudo se puede definir por los efectos de la proteína mutada (Khajavi *et al.*, 2006). Alteraciones en la vía de NMD pueden ocasionar un resultado clínico alterando patrones de herencia, causando manifestaciones distintas en respuesta a mutaciones diferentes en el mismo gen, o bien modificando el fenotipo clínico específico (Holbrook *et al.*, 2004).

Los factores centrales de la vía de NMD corresponden a las proteínas Upf1, Upf2 y Upf3 (Kuroha *et al.*, 2009), las cuales fueron identificadas inicialmente en *Saccharomyces cerevisiae* y algunos efectores de esta vía en *Caenorhabditis elegans* (SMG 1-7) (Conti & Izaurralde, 2005).

El análisis bioinformático de secuencias proteicas reveló que SMG2 es homóloga a Upf1, SMG3 a Upf2 y SMG4 a Upf3. Upf1, Upf2 y Upf3 se encuentran conservadas en *C. elegans*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Drosophila melanogaster*, *Homo sapiens* y *A. thaliana* (Metzstein & Krasnow, 2006).

Organism					
	Yeast (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)	Nematodes (<i>Caenorhabditis elegans</i>)	Fruitfly (<i>Drosophila melanogaster</i>)	Mammals (<i>Mus musculus</i>)	Plant (<i>Arabidopsis thaliana</i>)
Effectors	Upf1 Upf2 Upf3	SMG-2(UPF1) SMG-3(UPF2) SMG-4(UPF3) SMG-1 SMG-5 SMG-6 SMG-7	UPF1 UPF2 UPF3 SMG1 SMG5 SMG6	UPF1(REN1) UPF2 UPF3a/b SMG1 SMG5 SMG6 SMG7	UPF1(IBA1) UPF2 UPF3 nd nd nd nd

Figura 12. Componentes principales y efectores proteicos de la vía NMD que se encuentran conservados en distintos organismos (Behm-Ansmant *et al.*, 2013).

1.3.2. UPF 1

La proteína Upf1 es una ARN helicasa; en levaduras su peso aproximado es de 109 kDa y en humano de 130 kDa, es dependiente de la hidrólisis de ATP y forma parte de la familia SFI (Súper Familia I) (Cheng *et al.*, 2007), incluye dos dominios denominados RecA1 y RecA2. RecA1 comprende a su vez 2 regiones denominadas 1B y 1C; otro dominio presente en UPF1 es el dominio CH (Cisteína-Histidina) que está próximo al N-terminal (Gleghorn & Maquat, 2011).

La función de UPF1 es activar la vía de NMD de tal manera que puede reprimir o detener la traducción y/o reclutar enzimas de degradación (He *et al.*, 2013). La actividad de UPF1 es regulada por ciclos de fosforilación y defosforilación (Isken *et al.*, 2008). Su fosforilación es catalizada por SMG1 (proteína cinasa relacionada a fosfoinositol-3-cinasa) que fosforila numerosos residuos de Serina cerca del C-terminal y su defosforilación se lleva a cabo por las proteínas SMG5, SMG6 y SMG7 que actúan como adaptadores entre Upf1 fosforilada y la proteína fosfatasa 2A (Fukuhara *et al.*, 2005). UPF1 es una proteína larga que se encuentra en el citoplasma y tiene la capacidad de interactuar con UPF2 a través del dominio CH (Wang *et al.*, 2006).

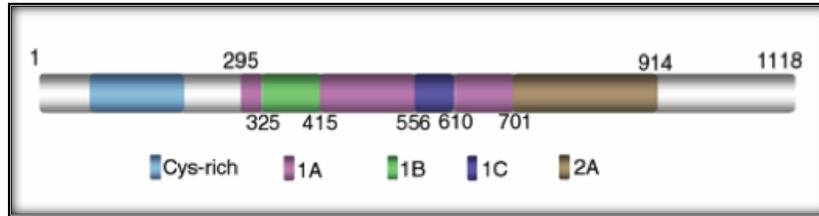


Figura 13. Dominios estructurales presentes en Upf1 humana (Cheng *et al.*, 2007)

1.3.3. UPF 2

Upf2 humana es una proteína de aproximadamente 140 KDa que contiene 3 dominios conservados MIF4G (porción media de eIF4G), los cuales se encuentran también en proteínas que participan en el metabolismo de ARN como CBP80 y eIF4G (Clerici *et al.*, 2014).

Upf2 se encuentra en la zona perinuclear, su función principal es la de detectar ARNm truncados o con marcos de lectura abierta aberrantes que desencadenen la vía NMD (Chamieh *et al.*, 2008). Esta proteína también está relacionada con los factores de traducción y las proteínas que son homólogas a UPF1p y UPF3p de *Saccharomyces cerevisiae* (Serin *et al.*, 2001).

Upf2 es una proteína de transporte nucleocitoplasmática y puede interactuar con el EJC, de tal manera que actúa como puente entre Upf1 y Upf3 y en cooperación con Upf3b estimula la actividad de ATPasa y de ARN helicasa de Upf1. La fosforilación de Upf2 es un evento conservado en eucariotas y se ha evidenciado que es un paso crucial para la vía NMD (Wittmann *et al.*, 2006).

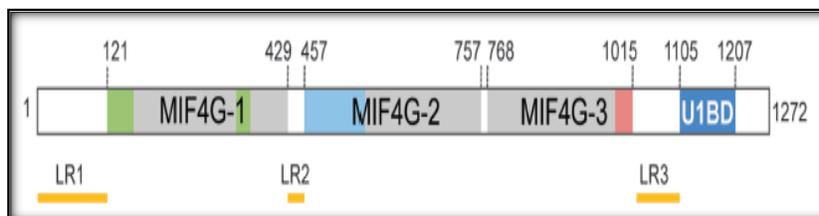


Figura 14. Representación esquemática de los dominios estructurales presentes en Upf2 (Clerici *et al.*, 2013).

1.3.4. UPF 3

Es una proteína que puede encontrarse en el citoplasma (Gehring *et al.*, 2003) o en el núcleo ya que forma parte del EJC. Esta proteína tiene un papel esencial en la vía NMD de organismos como *Saccharomyces cerevisiae*, *Caenorhabditis elegans* y *Drosophila melanogaster* y cuenta con dos parálogos en humanos (UPF3 a y UPF3 b o hUpf3 y hUpf3X, respectivamente) (Lykke-Andersen *et al.*, 2000).

La estructura cristalina de los dominios de interacción de hUpf3b y hUpf2 reveló que el dominio RNP presente en el extremo N-terminal de hUpf3 se une hidrofílicamente con el dominio MIF4G del C-terminal de hUpf2 (Kadlec *et al.*, 2004); esta interacción entre Upf3 y Upf2 es evolutivamente conservada.

El dominio C-terminal de hUpf3 es esencial para NMD y se requiere para formar un complejo que incluye al heterodímero Y14/Magoh (Kim *et al.*, 2001). hUpf3a es mucho menos eficiente que hUpf3b para desencadenar NMD y estimular la traducción (Kunz *et al.*, 2006).

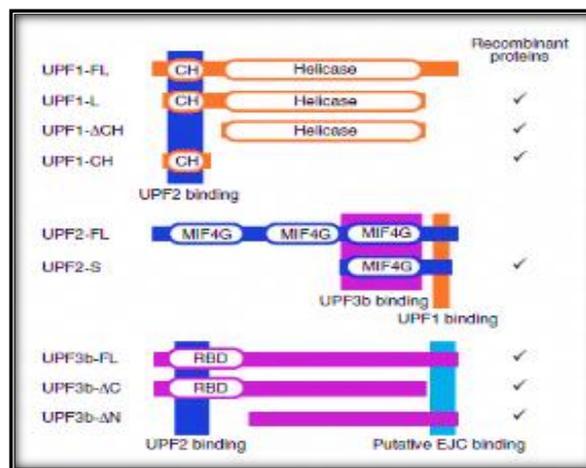


Figura 15. Representación esquemática de las diferentes isoformas de UPF1, UPF2 Y UPF3b.

1.4 BIOLOGÍA CELULAR DEL ARNm.

La localización de la maquinaria de degradación para los transcritos defectuosos se ha asociado a regiones específicas en el citoplasma celular eucariote, estos pseudo-

compartimentos son los llamados cuerpos de procesamiento o *p-bodies*, que en *Saccharomyces cerevisiae* se han denominado como sitios de NMD, los cuales contienen principalmente enzimas de degradación de RNA, así como enzimas involucradas en el *decapping* o en la deadenilación.

1.4.1. P-BODIES.

Los cuerpos de procesamiento o *p-bodies* son regiones específicas en el citoplasma celular eucariote (Olszewska *et al.*, 2012), localizados y observados en células somáticas de vertebrados e invertebrados, incluyendo a plantas, levaduras (Texeira & Parker, 2007), mamíferos y *Caenorhabditis elegans*; constan de múltiples enzimas que participan en los siguientes procesos:

- ◆ Degradación de ARNm.
- ◆ Vía NMD.
- ◆ Procesos post-transcripcionales.
- ◆ Paro o represión de la traducción.
- ◆ Silenciamiento mediado por ARN.
- ◆ Defensa del huésped contra la infección viral.

Los *p-bodies* están involucrados básicamente en la regulación de la traducción, sirviendo como depósitos de almacenamiento, en los cuales no todos los ARNm que se introducen son degradados; se ha demostrado que algunos ARNm pueden salir de estas regiones e iniciar su traducción (Chan & Slack, 2006).

Se conoce también que el movimiento de los *p-bodies* en el citoplasma depende de los microtúbulos. Se ha demostrado que estos cuerpos se encuentran también en neuronas en donde se denominan “gránulos neuronales” (localizados en las dendritas) y se han observado también en espermatozoides maduros.

Estos cuerpos de almacenamiento están constituidos por los siguientes componentes (Zheng *et al.*, 2008):

- **Enzimas de degradación de ARN:** responsables de la degradación, *decapping* (incluyendo activadores como: Lsm1p-7p y Dhh 1p/Rck) y deadenilación.
- **Represores traduccionales:** (CPEB, proteínas Y-box).
- **Factores de elongación de la traducción:** (eIF4E, eIF4G, eIF4A, eIF3, eIF2 y 4E-T).

1.5. USTILAGO MAYDIS.

Los Ustilaginales incluyen hongos fitopatógenos que infectan alrededor de 4,000 plantas monocotiledóneas (Agrios, 2005) tales como el maíz y el teozintle (*Ustilago maydis*), la cebada (*Ustilago nuda*), la avena (*Ustilago nigra*), el trigo (*Ustilago tritici*), y la caña de azúcar (*Tilletia indica*), principalmente (Martínez-Espinoza *et al.*, 2002). Este grupo incluye más de 50 géneros y 1,200 especies que ocasionan daños económicos a nivel mundial (Djamei & Kahmann, 2012).

Ustilago maydis es un basidiomiceto que produce la enfermedad conocida como cuitlacoche o carbón común en el maíz y el teozintle (Ruíz, 2008); ésta se caracteriza por la formación de tumores o agallas, clorosis, distorsiones y enanismo de la planta, la mayor parte del crecimiento de este hongo dimórfico puede desarrollarse en hojas, espigas, tallos y mazorcas (Banuett, 2002), es decir, en los tejidos meristemáticos, donde esporula para ocasionar los síntomas mencionados.



Figura 16. Tumor característico de *U. maydis* en la mazorca del maíz.

Las teliosporas están recubiertas por una membrana blanca y verdosa que más tarde oscurece y forma una masa polvorienta color café-olivo. La membrana grisplateada se rompe y es así cuando existe liberación de dichas esporas, principal mecanismo de diseminación de los carbones (Estrada *et al.*, 2010). Al ser liberadas al medio ambiente germinan, sufriendo una ronda de meiosis y produciendo 4 basidiosporas, que al germinar reinician el ciclo de vida del hongo.

A diferencia de la mayoría de los hongos que causan tizón, *Ustilago maydis* puede infectar a todas las partes aéreas de la planta del maíz, pero no logra extenderse de manera sistémica (Bauer *et al.*, 1997). Skibbe y colaboradores en el 2010, sugieren que la capacidad de *Ustilago maydis* para inducir tumores en diferentes órganos del maíz, es en primera instancia debido al uso de proteínas “efectoras-centrales” las cuales suprimen la respuesta de defensa de la planta durante la invasión, efecto seguido de la actividad de proteínas “efectoras específicas” para cada órgano afectado.

1.5.1 CICLO DE VIDA DE USTILAGO MAYDIS

Ustilago maydis es un hongo biotrófico, es decir, con capacidad de nutrirse del tejido vivo de la planta (Brefort *et al.*, 2009) y dimórfico al tener la capacidad de presentar tanto la fase micelial como la fase levaduriforme. Es importante mencionar que *Ustilago maydis* no es un parásito obligado, pero que sí requiere uno de sus dos huéspedes naturales para realizar su ciclo sexual.

Las dos fases que presenta *Ustilago maydis* en su ciclo de vida son:

⊕ **Fase saprofítica:** Durante esta fase haploide, *Ustilago maydis* crece como levaduras unicelulares, reproduciéndose principalmente por gemación (Bölker, 2001), es decir, un tipo de reproducción asexual, donde se forman prominencias o brotes sobre el individuo progenitor y las zonas de máxima curvatura forman ángulos de 30 a 45° con relación a la célula madre.

Se ha observado que *Ustilago maydis* no utiliza con eficiencia las fuentes de carbono de los nichos naturales y por lo tanto su colonización en los mismos no es muy exitosa (Caltrider & Gottlieb, 1965). Su forma de reproducción en la fase saprofitica por gemación bipolar (Basse & Steinberg, 2004) es muy parecida a la de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*.

Ⓢ **Fase micelial:** Es la forma patogénica e infectante del hongo, también conocida como fase diploide o sexual, en la cual se observa que las células empiezan a formar filamentos estrechos, denominados hifas dicarióticas (Bannuet & Herskowitz, 1996), que sólo se desarrollan en el interior de los tejidos meristemáticos de la planta. Esta fase se regula por dos locus de apareamiento sexuales (*a* y *b*).

El locus *a* contiene en su secuencia de ADN dos regiones (*a1* y *a2*) de 4.5 y 8 Kb; participa en la complementación sexual y la fusión de células haploides, ésto al codificar un sistema de reconocimiento feromona-receptor el cual desencadena la formación de tubos de complementación y la fusión de células compatibles (Urban *et al.*, 1996).

El locus *b* induce el desarrollo del dicarion patogénico y controla el crecimiento filamentoso de *Ustilago maydis*; codifica para las proteínas bE y bW, que son factores de transcripción involucrados en el crecimiento intracelular y en el encendido de genes requeridos para la patogenicidad (Whal *et al.*, 2010).

Inicialmente ocurre la formación de filamentos delgados, denominadas hifas de apareamiento o tubos de conjugación (Trueheart & Herskowitz, 1996), que se atraen uno hacia el otro por una reacción quimiotrópica, dando lugar a la formación de una hifa que contiene dos núcleos alargados, lo que constituye la forma dicariote infecciosa.

Por consiguiente, al formarse las estructuras infecciosas dicariotes, se inicia la invasión o infección del huésped (Yee & Kronstad, 1998), probablemente iniciando en los estomas, siguiendo con los órganos florales y formando estructuras denominadas apresorios responsables de la invasión de la célula vegetal. Durante el

ciclo de vida del hongo, se ha notado que las células haploides son incapaces de invadir a la planta, al contrario de las células diploides. Al finalizar este ciclo, las esporas maduras denominadas teliosporas son liberadas cuando las agallas se secan y se abren (Bakkeeren *et al.*, 1992).

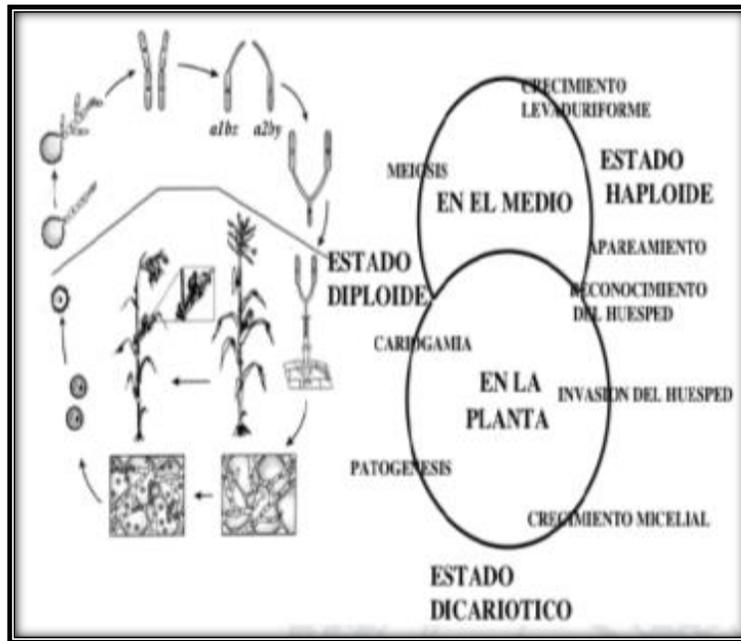


Figura 17. Ciclo de vida de *Ustilago maydis*.

1.5.2. USTILAGO MAYDIS COMO MODELO GENÉTICO-MOLECULAR.

Recientemente, la importancia de *Ustilago maydis* como modelo de estudio biológico ha tomado relevancia, en comparación con el modelo de estudio clásico fúngico *Saccharomyces cerevisiae*. Existen múltiples razones para que este hongo basidiomiceto sea atractivo para ser utilizado como modelo experimental, algunas de estas razones son:

- ◆ Su genoma está totalmente secuenciado (20.5 Mb) y liberado para su análisis.: (<http://mips.gsf.de/genre/proj/ustilago>).
- ◆ Estudio de organismos que presentan dimorfismo.
- ◆ Modelo para dilucidar la interacción planta-patógeno.

- ◆ Se pueden realizar exámenes de dominancia y complementación, al poder construir diploides en el laboratorio.
- ◆ Permite generar *knockouts* por recombinación homóloga (Holloman *et al.*, 2009).
- ◆ Se calcula más de 20% de identidad entre *Ustilago maydis* y el humano (aproximadamente 777 proteínas) (Münsterkötter, 2007). Se ha encontrado que el proteoma de *Ustilago maydis* está más estrechamente relacionado con el de humano, a diferencia de la levadura clásica *Saccharomyces cerevisiae*.
- ◆ Generación de procesos moleculares complejos como el *splicing*.
- ◆ Estudio de los microtúbulos (componentes del citoesqueleto) y la mitosis (Steinberg, 2007).
- ◆ Existencia de múltiples marcadores de selección para la manipulación genética.
- ◆ Permite realizar análisis de segregación por la existencia de meiosis en su ciclo de vida.
- ◆ Capacidad para completar su ciclo de vida en plantas de maíz jóvenes de tres semanas de edad o menos (Villanueva *et al.*, 2007).

Estudios “*in silico*”, muestran que *Ustilago maydis* comparte con el humano proteínas implicadas en funciones tales como: *splicing*, modificación y degradación de proteínas, señalización mediada por proteínas G, degradación de aminoácidos, oxidación de ácidos grasos, etc. (Münsterkötter & Steinberg, 2007).

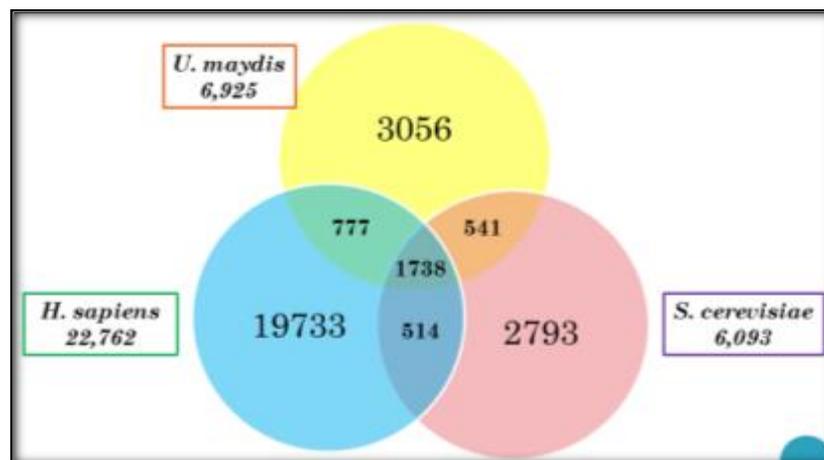


Figura 18. Análisis comparativo del proteoma de *Ustilago maydis*, *S. cerevisiae* y *H. sapiens* (Münsterkötter, 2007)

2. JUSTIFICACIÓN.

Las proteínas centrales del proceso de NMD (Upf1, Upf2 y Upf 3), son ampliamente estudiadas en la actualidad, al conocerse que pueden funcionar para compensar o evitar errores durante la traducción de proteínas, específicamente, degradando o eliminando proteínas truncas con codones prematuros de terminación, que tendrán consecuencias perjudiciales para la célula; se ha observado que estos errores pueden ocasionar enfermedades en el ser humano tales como ciertos tipos de cáncer, o enfermedades neurodegenerativas.

Nuestro modelo de estudio para dicha investigación fue el hongo dimórfico *Ustilago maydis*, en el que se pretendió ubicar la localización celular de las proteínas centrales de NMD. Los hallazgos de este trabajo podrán contribuir al conocimiento total de esta vía en *Ustilago maydis* y quizá en un futuro en aplicaciones terapéuticas contra enfermedades.

3. OBJETIVOS.

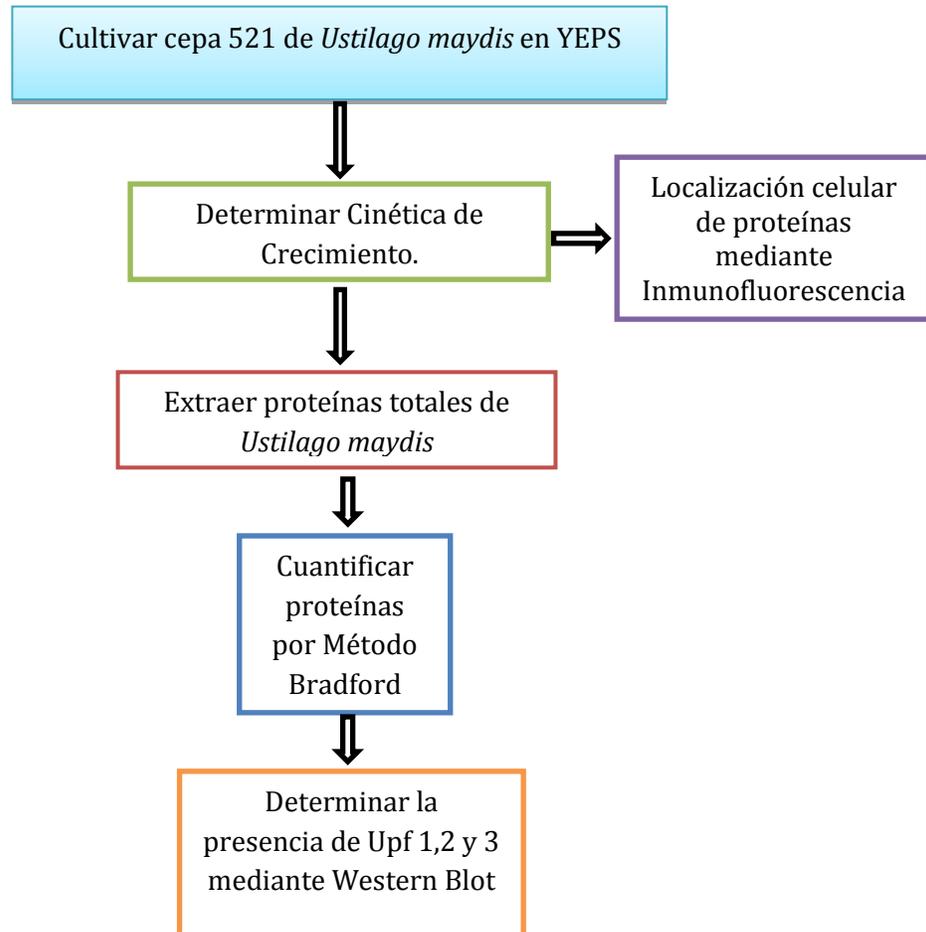
OBJETIVO GENERAL:

- ◆ Conocer la localización celular de las proteínas de NMD Upf1, Upf2 y Upf3 en *Ustilago maydis*.

OBJETIVOS PARTICULARES:

- ◆ Realizar el análisis informático para comparar los epítotos antigénicos de las proteínas de NMD en humano y *Ustilago maydis*.
- ◆ Validar mediante Western-Blot e inmunofluorescencia la reactividad cruzada de los anticuerpos comerciales para Upf1, Upf2 y Upf3.

4. DIAGRAMA DE TRABAJO



5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. CEPA EXPERIMENTAL Y CONDICIONES DE CULTIVO.

La cepa de *Ustilago maydis* empleada para este proyecto fue la 521. La cepa se mantuvo en ultracongelación a -70°C en glicerol. Dependiendo de la naturaleza del experimento que se realizó se cultiva en medio YEPS sólido (placas) o líquido (tubos).

5.2. DROP-PLATE.

Antes de iniciar a estandarizar las pruebas para dicho proyecto, se realizó un monitoreo de la cinética de crecimiento de *Ustilago maydis* contabilizando las UFC/ml cada 2 horas, cubriendo un tiempo total de 24 horas. Se inoculó 5 ml de medio YEPS con una "asada" de *U. maydis* 521, incubar a 30°C en agitación (1,500 rpm) por 12 horas. Se midió DO_{600} del cultivo; con el uso de la fórmula $C_1V_1=C_2V_2$ ajustar la DO a 1.0 en 30 mls de YEPS y calcular el volumen necesario del pre-inóculo. Se realizó lectura de DO_{600} al tiempo "0" y se efectuó diluciones seriadas de - 5 a -10, sembrando 20 μl en placas de YEPS. Se incubó a 24 h/ 30°C y se calculó en número de UFC/ml. Dicho ensayo se realizó por triplicado y se monitorizó 24 horas del crecimiento de dicho microorganismo fúngico.

5.3. OBTENCIÓN DE EXTRACTOS PROTEICOS.

Cuando 20 ml de un cultivo de *Ustilago maydis* cepa 521 alcanzó una $\text{DO}_{600} = 0.6 - 0.8$, se centrifugó a 5,000 rpm/5 minutos. Resuspender pellet en 200 μl de buffer de lisis RIPA. Se sonicó pastilla a 50 mV por 10 segundos, se repitió por 4 veces. Se incubó en hielo durante 30 minutos. Centrifugar a 14,000 rpm durante 20 minutos para eliminar restos celulares. Se recuperó el sobrenadante, alicuotó y almacenó a -70°C .

5.4. DETERMINACIÓN DE CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS.

Se determinó por medio de la técnica de Bradford (Bradford, 1976) utilizando el reactivo comercial Sigma Aldrich, empleando albúmina sérica bovina (1 mg/ml) para construir la curva de calibración. Las absorbancias fueron medidas a 595 nm y los volúmenes que se emplearon para preparar las diluciones fueron las siguientes:

µl BSA (1 mg/ml)	Agua Desionizada(µl)	Reactivo Bradford (ml)
0	500	1
10	490	1
20	480	1
40	460	1
60	440	1
80	420	1
100	400	1

Tabla 1. Construcción de curva de calibración con BSA 1mg/ml.

5.5. ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS

Los extractos proteicos se sometieron a una electroforesis desnaturalizante (SDS-PAGE) en geles de poliacrilamida al 12%. Según la concentración determinada para el extracto proteico realizada por el método Bradford, se tomaron de 20 a 50 µg (según las indicaciones para cada anticuerpo) calculando los microlitros requeridos y tomar un volumen equivalente al buffer de carga (Laemli); se mezcló para homogenizar. Ya preparadas las muestras, hervirlas a 95°C /10 minutos y se trasladó inmediatamente a hielo. Se depositó toda la muestra en los pozos. Se realizó un corrimiento a 80 mV, el tiempo de migración variará dependiendo del tamaño de la proteína de interés, asegurando la resolución del rango correspondiente.

5.6 WESTERN BLOT.

Para la inmunodetección, se utilizaron membranas de PVDF, las cuales fueron activadas con metanol y posteriormente sumergidas al buffer de transferencia. Se preparó el sándwich y se realizó una transferencia en semiseco a 15v/1h. La membrana se sometió a tinción con Rojo de Ponceau para comprobar dicha transferencia.

La membrana fue bloqueada en una solución al 5% de leche en polvo libre de grasa, diluida en TBS/ 1h en agitación. Para el anticuerpo primario se utilizó una dilución de 1:750 y para el anticuerpo secundario 1:2000 (las características de los anticuerpos empleados se resumen en la **Tabla #2**, dichos anticuerpos comerciales fueron fabricados por Santa Cruz Biotechnology, Inc).

La detección se realizó mediante el sistema de quimioluminiscencia con el kit de Santa Cruz Biotechnology, Inc “Western Blotting Luminol Reagent” y la impresión se realizó en papel fotográfico Kodak Medical X-ray Film. La película fotográfica, fue expuesta a quimioluminiscencia, se reveló en cuarto oscuro, pasando el film por la solución reveladora (15 segundos), agua (quitar exceso de revelador) y solución fijadora (15 segundos).

ANTICUERPO PRIMARIO	TIPO/HUÉSPED	PEPTIDO (kDa)	ANTICUERPO SECUNDARIO	REGIÓN DE EPÍTOPE DETECTABLE
<i>Rent1 (H-300): SC-48802</i>	Ac. policlonal de conejo	130 kDa	Anti-conejo	aa 70 al 370 cerca del N-terminal
<i>Rent2 (H-300): SC-48801</i>	Ac. policlonal de conejo.	147 kDa	Anti-conejo.	aa 121 al 420 de la región interna.
<i>Rent3 (H-190): SC-48800</i>	Ac. policlonal de conejo.	58 kDa	Anti-conejo.	aa 51 al 240 cerca del N-terminal
<i>snRNP U1 70K (C-18):SC-9571.</i>	Anticuerpo policlonal de cabra.	70 kDa	Anti-cabra.	Péptido cercano al C-terminal
<i>hnRNP A1 (N-15): SC-10029.</i>	Ac. policlonal de cabra.	32 kDa	Anti-cabra.	Péptido cercano al N-terminal
<i>SR (1H4): SC-13509</i>	Ac. monoclonal de ratón	58 kDa	Anti-ratón	Región completa de aa.
<i>MAGOH (N17): SC-48240</i>	Ac. policlonal de cabra.	17 kDa	Anti-cabra.	Péptido cercano al N-terminal

Tabla 2. Características de los anticuerpos comerciales utilizados en esta investigación.

5.7. OBTENCIÓN DE PROTOPLASTOS.

Para la aplicación de los agentes líticos, se hizo una selección del cultivo en fase logarítmica (DO: 1-1.2), se centrifugó el mismo (1200 rpm/5'), el sobrenadante se resuspendió en solución SCS (Sorbitol 1M, Citrato de Sodio 50 Mm, pH:5.8), se lavó 2 veces, en este momento se agregaron 100 µl de la enzima liticosa para degradar la pared celular del *Ustilago maydis* y por último se incubó a 37°C/10'.

5.8. INMUNOCITOQUÍMICA.

Para el análisis de inmunoexpresión, se llevó a cabo el método indirecto de Inmunoperoxidasa (ABC). Primeramente, se realizó la obtención de protoplastos de *Ustilago maydis* en placas estériles para cultivos celulares de 6 pocillos "Corning Incorporated, Costar ®", se retiró el medio de cultivo, se lavaron las células 2 veces con PBS, las células se fijaron con gliceraldehído al 2%/ 30 minutos, se lavaron 4 veces con sucrosa al 4.5 % en PBS, se trataron las células con 0.3% de Peróxido de Hidrógeno en PBS/30': dicho paso inhibe la actividad de la peroxidasa endógena, lavar con PBS dos veces, se incubaron las células con solución permeabilizadora (Tritón X-100)/ 15': este paso permite que el anticuerpo penetre con mayor facilidad a las proteínas intracelulares que se requieran detectar, lavar con PBS dos veces, se incubó con solución bloqueadora durante 3 horas, se incubó el Anticuerpo primario a 4°C durante toda la noche, se lavaron 3 veces con PBS, incubar por 60 minutos con el Anticuerpo secundario biotinilado, lavar 3 veces con PBS durante 5 minutos, se incubó por 30 minutos con el reactivo ABC, lavar 3 veces con PBS y por último se incubó con el sustrato de peroxidasa hasta que se obtuvo la intensidad deseada/30 minutos.

Al final, se lavó 4 veces con agua destilada y se observó al microscopio para observar la inmunoreactividad de los anticuerpos utilizados contra *Ustilago maydis*.

5.9. INMUNOFLUORESCENCIA

Para este ensayo, los portaobjetos utilizados fueron lavados con jabón para instrumental (desinfectante, bactericida), se secaron y se esterilizaron a 121°C, 15 lb por 15 minutos. Después, fueron lavados con NaOH 0.2% y por último enjugados con agua estéril, esto último en campana de flujo laminar utilizando pinzas de disección estériles. Se secan los portaobjetos y por consiguiente se fijan con grenetina al 2%. Se inoculó *Ustilago maydis* sobre los portaobjetos para su fijación y posterior tratamiento.

Se lavaron las células fúngicas 2 veces con PBS, se fijaron con glutaraldehído al 2%/ 30 minutos, se retiró la solución fijadora y se lavó 4 veces con fructosa al 4.5 %, se incubó con solución permeabilizadora (NP-40 0.25% en PBS) por 30 minutos a temperatura ambiente, después, se lavó con PBS durante 5 minutos.

Se incubó con solución bloqueadora (suero normal de cabra o conejo 10%, NP-40 0.25%, SDS 0.25% en PBS) durante toda la noche en refrigeración. Después, se incubó con el Anticuerpo primario (dilución con solución bloqueadora), durante 12 horas en refrigeración, la dilución empleada fue de 1:200.

Se lavó con PBS durante 5 minutos por tres veces, se incubaron con los anticuerpos secundarios acoplados a Rodamina (Upf1, Upf2 y Upf3) y a Rojo Texas (U1 snRNP 70K, hnRNP A1 y MAGOH), la dilución empleada para el anticuerpo secundario fue 1:600. La incubación fue en total ausencia de luz.

Pasado el periodo de incubación se lavan 3 veces las preparaciones con PBS, se introducen en cámara húmeda y por último se observan en el microscopio confocal.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

6.1 ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO.

Para comparar los epítomos antigénicos de las proteínas implicadas en NMD, se realizó inicialmente la búsqueda de la secuencias de dichas proteínas; las cuales fueron obtenidas de la base de datos KEGG (Enciclopedia de Genes y Genomas de Kyoto).

PROTEÍNA	FUNCIÓN	# aa <i>Homo sapiens</i> (# de acceso)	# aa <i>Ustilago maydis</i> (prot. homóloga) (# de acceso)
Rent1	Regulación transcritos en vía NMD.	1118 aa. (NP_002902.2)	1028 aa (Upf1) (XP_756384.1)
Rent 2	Detecta y degrada proteínas truncas (vía NMD).	1272 aa (NP_056357.1)	1235 aa (Upf2) (XP_759696.1)
Rent 3	Vía NMD (Regulación).	470 aa (NP_075386.1)	559 aa (Upf3) (XP_756380.1)

Tabla 3. Resumen comparativo de las proteínas de NMD en humano y *Ustilago maydis*. Se presenta su función, así como el número de aminoácidos de las mismas.

En esta investigación además, decidimos incluir algunas de las proteínas participantes en el *splicing* (**Tabla 4**), las cuales nos servirán como un control necesario para distinguir y contrastar la localización celular de las proteínas de NMD.

Es importante conocer la estructura de aminoácidos de una proteína, ya que cada una de éstas tiene un número de residuos y secuencias características y que en base a esta estructura primaria se determina la estructura tridimensional, todo ello relacionado a su función.

PROTEÍNA	FUNCIÓN	# aa <i>Homo sapiens</i> (# de acceso)	# aa <i>Ustilago maydis</i> (prot. homóloga) (# de acceso)
snRNP U1 70	Componente del complejo Spliceosoma.	437 aa (NP_003080.2)	342 aa (XP_760922.1)
hnRNP A1	Procesamiento de pre-ARNm, transporte ARNm maduro al citoplasma.	320 aa (NP_002127.1)	588 aa (XP_758567.1)
SR	Reconocimiento de sitios de splicing.	221 aa (EAW89443.1)	192 aa (XP_758559.1)
MAGOH	Procesamiento post-splicing: exportación nuclear y localización en citoplasma de ARNm	146 aa (NP_001287668.1)	145 aa (XP_761976.1)

Tabla 4. Comparación de proteínas de *Splicing* en humano y *Ustilago maydis*. Se denota su función y número de aminoácidos de las mismas.

A continuación, se realizó un alineamiento de las secuencias en el programa MUSCLE (**Figuras 19-21**); es necesario realizar este tipo de análisis bioinformático ya que mediante algoritmos, se nos permite conocer el grado de homología o zonas conservadas entre las secuencias analizadas, y con esto llegar a detectar en todo caso, algunos orígenes evolutivos similares o alguna función conservada para dichas proteínas. También se realizó un alineamiento de dichas secuencias en el NCBI, y se analizaron los datos arrojados como el Max Score, Máxima identidad, Query Cover, E value y Total Score, los cuales nos ayudan a reconocer las zonas de máxima identidad en estas proteínas, y en base a ello proponer la posibilidad de unión de los anticuerpos a utilizar.

En este análisis se tomó en cuenta la secuencia reportada por el fabricante que corresponde al epítotope que reconoce el anticuerpo para las proteínas en estudio. Puesto que el anticuerpo comercial es policlonal pero basado en la secuencia

reportada para el péptido de origen humano, dicha secuencia se tomó como base y se comparó con sus respectivas identidades en *U. maydis*.

Los resultados del alineamiento en el programa MUSCLE muestran en azul la región conservada entre el epítipo del anticuerpo, la proteína Rent1 en humano y la Upf1 putativa en *U. maydis* (**Figura 18**); las regiones en gris indican los aminoácidos que no se comparten entre humano y *Ustilago maydis*.

A)



B)

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Max ident	Accession
<input type="checkbox"/> Ac. Rent1 (H300)	623	623	100%	0.0	100%	21925
<input type="checkbox"/> U. maydis UM00237.1	409	442	87%	8e-138	71%	21926
<input type="checkbox"/> Rent1	637	637	100%	0.0	100%	21927

Figura 19. Alineamiento de proteínas que incluyen: Anticuerpo Rent1, proteína Upf1 putativa de *U. maydis* y proteína Rent 1 de origen humano. **A)** Análisis en programa MUSCLE. **B)** Análisis de secuencias en NCBI.

En el análisis bioinformático realizado en el NCBI, podemos observar que: *U. maydis* tiene un porcentaje de identidad del 71 % respecto a la proteína Rent1 de humano, lo que indica una alta probabilidad que este anticuerpo comercial detecte al epítopo del homólogo en *U. maydis*.

Para el alineamiento de la proteína Upf2 (**Figura 20**), se observa que de un 69% de cobertura de la secuencia para *U. maydis*, existe sólo un 23% de máxima identidad. Dicho porcentaje no es tan determinante como el que se observó para la proteína Upf1; sin embargo, representa una posibilidad de reconocimiento por parte del anticuerpo comercial.

A)

Ac. Rent2	MKEKEESIQLHQEAWERHHLRKELRSKnQNAPDSrPEENFFSRLDSSLKKNtAFVKKLKT
Rent2	MKEKEESIQLHQEAWERHHLRKELRSKnQNAPDSrPEENFFSRLDSSLKKNtAFVKKLKT
<i>U. maydis</i>	-----SrcltAkDcfaaaeilSafh-----
Ac. Rent2	ITEQQRDSLShDFNGLNLSKYiAEAVASiVEaKlKISDVNCAVHLCSLFHQRYADfAPsL
Rent2	ITEQQRDSLShDFNGLNLSKYiAEAVASiVEaKlKISDVNCAVHLCSLFHQRYADfAPsL
<i>U. maydis</i>	-----vrfggkAfsSpltnaLelS-----lAPps
Ac. Rent2	lQVWKKHFEARKE-EKTPNITklRtGdLRFIAELTI---VGiFTDKEGLSliYEQLKNIIN
Rent2	lQVWKKHFEARKE-EKTPNITklRtGdLRFIAELTI---VGiFTDKEGLSliYEQLKNIIN
<i>U. maydis</i>	ktlyqdataeqKErdeaarvarqRhllLRavgELalvkaVGHssestGapwlfdvLKHlla
Ac. Rent2	ADRESHThVSVVIsFCRHCGDDIAGLVPRKVKSAAEKFN-----L
Rent2	ADRESHThVSVVIsFCRHCGDDIAGLVPRKVKSAAEKFN-----L
<i>U. maydis</i>	tDRE-HsnapllIailkglGqsf--LaPldtqdAAsglsdtlnstltlgdavnvdqiqai
Ac. Rent2	SfPPSEIISPEkQQPFQNLlKEYFTSLTKHLKRDHRELQNTERQNRRIlHsKGELsEDRH
Rent2	SfPPSEIISPEkQQPFQNLlKEYFTSLTKHLKRDHRELQNTERQNRRIlHsKGELsEDRH
<i>U. maydis</i>	dpssaplvSPawQtKFreLietYFrtLvnrivkeHRRlQdhdRrNheayirsGqifEDRq
Ac. Rent2	KQYEEFAMSYQKlIAnSqsLADLL-----
Rent2	KQYEEFAMSYQKlIAnSqsLADLL-----
<i>U. maydis</i>	qrYErmtkSferirewgciLseLLgvpmpkldsseassnsvglgvnldksafdradeef

B)

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Max ident	Accession
<input type="checkbox"/> Ac. Rent2	617	617	100%	0.0	100%	34179
<input type="checkbox"/> U. maydis UM03549.1	68.6	68.6	69%	1e-17	23%	34180
<input type="checkbox"/> Rent 2 Humano	617	617	100%	0.0	100%	34181

Figura 20. Alineamiento del Anticuerpo Rent2, proteína Upf2 putativa de *U. maydis* y proteína Rent 2 de origen humano. **A)** Análisis en programa MUSCLE. **B)** Análisis de secuencias en NCBI.

El mismo análisis bioinformático se llevó a cabo para la proteína Upf3 (Figura 21) y se plantea que existe una buena probabilidad para el reconocimiento del Anticuerpo Rent3 a la proteínas Upf3 putativa de *U. maydis*. Esto al observar el porcentaje de máxima identidad de dicho organismo fúngico, que cuenta con un 52% respecto a las otras secuencias.

A)



B)

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Max ident	Accession
<input type="checkbox"/> AC. Rent 3	383	383	100%	2e-141	100%	8327
<input type="checkbox"/> U. maydis UM00233.1	26.9	60.8	34%	9e-05	52%	8328
<input type="checkbox"/> Rent 3 Humano	383	383	100%	2e-141	100%	8329

Figura 21. Alineamiento del Anticuerpo Rent3, proteína Upf3 putativa de *U. maydis* y proteína Rent 3 de origen humano. **A)** Análisis en programa MUSCLE. **B)** Análisis de secuencias en NCBI.

Al inicio de esta investigación, nosotros pretendíamos detectar la localización celular de las 3 proteínas principales de la vía NMD: Upf1, Upf2 y Upf3. Para validar

dicha localización, se pretendía contrastar la ubicación de los factores de NMD con la de algunas proteínas que participan en el *splicing*; por lo que fue necesario realizar el análisis bioinformático también para los factores de *splicing* que se van a utilizar. A continuación se presenta la siguiente tabla sintetizando los alineamientos obtenidos en el NCBI para algunos factores de *splicing* y NMD(**Tabla 5**).

Description	Max Score	Total Score	Query cover	E-value	Max Ident	Accesion
U1 snRNP 70/ UM04775.1	151	199	72 %	7e-46	44 %	40787
hnRNP A1/ UM02420.1	135	135	34 %	6e-40	35 %	59759
SC35/ UM02412.1	66.6	79.7	44 %	2e-18	42 %	62445
MAGOH/ UM05829.1	209	209	98 %	2e-74	67	53799

Tabla 5. Resumen de alineamientos de las proteínas involucradas en el *splicing* (de origen humano y de *Ustilago maydis*). Con respecto a los anticuerpos comerciales a utilizar para la detección de las mismas.

Los porcentajes de máxima identidad que se muestran para cada uno de los alineamientos de las proteínas implicadas en el *splicing*, se observa que varían de un 35 a un 67%, es decir, que es probable que exista el reconocimiento para las proteínas de interés.

Con los anteriores alineamientos nos pudimos dar un panorama, si la unión Antígeno-Anticuerpo podrá ser presenciada en las pruebas posteriores (Western Blot, Inmonocitoquímicas e Inmunofluorescencias).

Para detallar e ilustrar los epítopos de las proteínas de NMD que detectarán los anticuerpos utilizados, realizamos un modelaje de la estructura tridimensional del mismo en el servidor SWISS-MODEL, los cuales se representan en la **Tabla 6**.

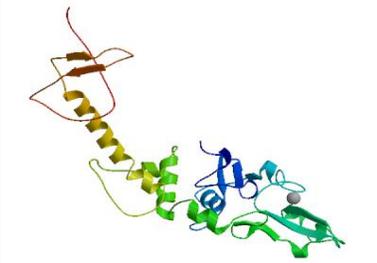
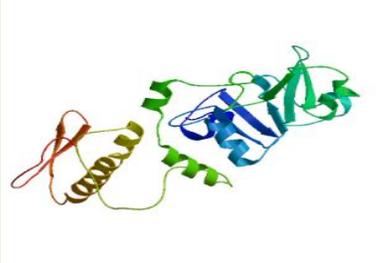
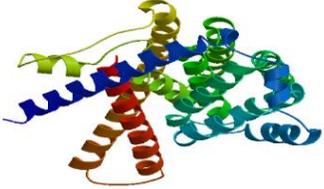
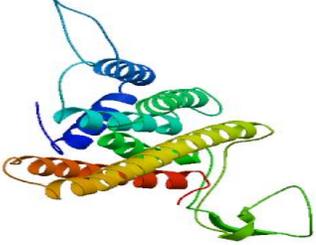
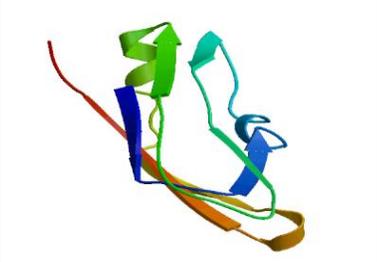
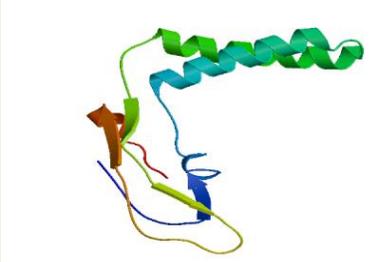
EPÍTOPE DE PROTEÍNAS DE NMD EN HUMANO	EPÍTOPE DE PROTEÍNAS DE NMD EN <i>Ustilago maydis</i>
<p>Rent1:</p> 	<p>Upf1:</p> 
<p>Rent2</p> 	<p>Upf2</p> 
<p>Rent3</p> 	<p>Upf3</p> 

Tabla 6. Representación tridimensional de epítopos a detectar. Se compara la zona de reconocimiento en proteínas de NMD tanto en proteínas de humano como de *Ustilago maydis*.

6.2 CURVA DE CRECIMIENTO Y *DROP PLATE*.

Para lograr estandarizar técnicas como el Western Blot, Inmunocitoquímica y demás técnicas empleadas en esta investigación, en primera instancia se realizó una curva de crecimiento del *Ustilago maydis*, para determinar las condiciones en que debería estar nuestro microorganismo. En este caso se detectó la fase *lag* o de adaptación donde apenas nuestro hongo está madurando y su división celular es muy lenta, contrario de la fase *log* o exponencial.

En dicha curva se realizó el seguimiento del crecimiento microbiano a una Densidad Óptica de 600 nm y se fue midiendo la absorbancia cada 2 horas con la ayuda del espectrofotómetro. Cabe destacar que el volumen empleado para realizar dicha prueba fue en 30 ml de medio YEPS y que este experimento fue realizado por triplicado para que la construcción de la curva fuera estadísticamente representativa. Estos resultados se muestran en la **Figura 22**.

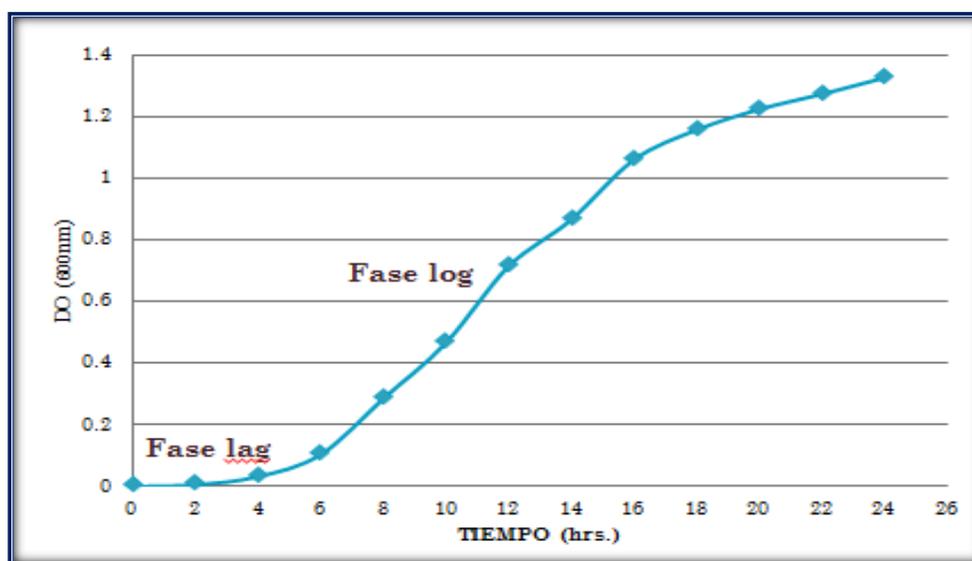


Figura 22. Curva de crecimiento de *U. maydis*. Se distingue su fase de adaptación y su fase exponencial.

A la par de la cinética microbiana, se realizó un conteo de UFC/ml por el método *Drop Plate* o goteo en placa, ésto desde un tiempo 0 hasta las 24 horas que duró el monitoreo.

Para este método primeramente se ajustó la densidad óptica a 1.0, se inocularon 3 tubos con 30 ml de YEPS calculando la cantidad de pre-inóculo necesaria para llegar a dicho ajuste, empleando la fórmula $C_1V_1=C_2V_2$.

Se realizaron diluciones seriadas que iban desde 1×10^{-5} a 1×10^{-10} , y de las mismas se sembraron 20 μl en placas sólidas de medio YEPS. Se incubó a 30°C por 24 horas y se realizaron los cálculos pertinentes para saber finalmente el número de UFC de *U. maydis* por cada ml.

Concluyendo con el experimento, observamos un aumento en UFC/ ml de 5 exponentes (**Tabla 7**), durante este periodo, y recordando también que este método es considerado de mayor certeza comparado con la lectura de la densidad óptica que nos pudiera dar datos erróneos al haber productos de degradación o metabolitos secundarios del microorganismo analizado.

A)

TIEMPO (hrs)	UFC/ml
0	1.553×10^5
2	1.89×10^5
4	2.11×10^6
6	6.56×10^6
8	3.77×10^7
10	6.1×10^7
12	2×10^8
14	2.44×10^8
16	2.99×10^8
18	1×10^9
20	1.11×10^{10}
22	1.44×10^{10}
24	1.77×10^{10}

B)



Tabla 7. Datos obtenidos del análisis *Drop-plate* a *Ustilago maydis*. En la figura **B)** se observan los crecimientos del microorganismo para cada una de las diluciones empleadas.

6.3 EXTRACCIÓN Y CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS.

Lo siguiente que se realizó fue la extracción de proteínas de *Ustilago maydis* en un cultivo que tuviera una densidad óptica de 0.8 a 1.0, utilizando el buffer de lisis RIPA (Buffer de Ensayo de Radio Inmuno-Precipitación) el cual contiene NaCl 150 mM, Tritón X-100 1%, Desoxicolato de Sodio 0.5 %, SDS (Dodecil Sulfato de Sodio) 0.1% y Tris pH: 8.0; se sonicó para romper membranas, se hizo una centrifugación para separar los restos celulares y por último se separó el sobrenadante que es la fracción con la que se trabajó posteriormente.

Siguiendo con los experimentos, se realizó la determinación de proteínas en este caso, en la fase de adaptación y fase *log*, para observar cómo se iba comportando la concentración de dichas proteínas y la cantidad precisa para realizar el SDS-PAGE seguido del Western Blot, esta determinación se realizó por el método Bradford.

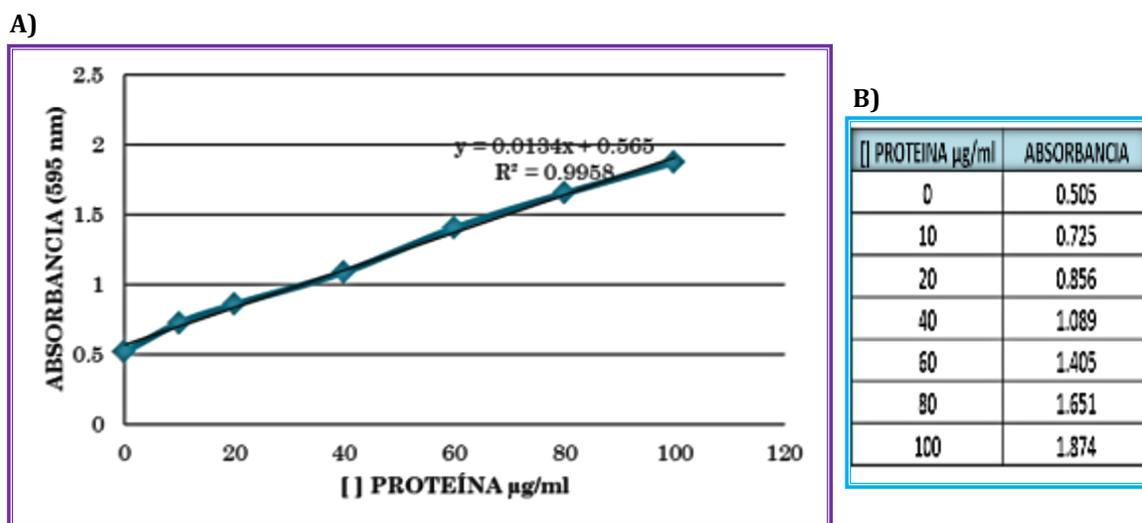


Figura 23. Curva de calibración con Albúmina de Suero Bovino (BSA 1mg/ml). En la tabla **B)** se muestran las absorbancias obtenidas para dicha curva.

En la **Figura 23** se muestra la curva de calibración hecha con Albúmina de suero bovino, la concentración en µg/ml a 0, 10, 20, 40, 60, 80, y 100 µg/ml y las absorbancias obtenidas de las mismas. La línea obtenida no varía mucho de acuerdo

a la línea de tendencia, la concentración se determinó mediante el uso del programa Excel y la ecuación de la pendiente.

# MUESTRA	DO	ABSORBANCIA	∏ PROT. µg/ml
1	0.285	1.425	64.2
2	0.301	1.505	70.1
3	0.263	1.315	56.0
4	0.294	1.47	67.5
5	0.315	1.575	75.4
6	0.253	1.265	52.2
7	0.275	1.375	60.4
8	0.324	1.62	78.7
9	0.257	1.285	53.7
10	0.342	1.71	85.4

Tabla 8. Concentración de proteínas en fase *lag*. Se muestra la densidad óptica de los cultivos analizados y la absorbancia obtenida por el método Bradford.

En la **Tabla 8**, se indica la DO de las 10 muestras obtenidas para dicho procedimiento, la absorbancia obtenida en el método de Bradford y por último la concentración en µg/ml del extracto proteico.

# MUESTRA	DO	ABSORBANCIA	∏ PROT. µg/ml	∏ PROT TOTAL µg/ml DIL 1/5
1	0.87	1.17	60.3	301.4
2	0.904	1.212	64.1	320.6
3	0.801	0.993	44.0	220.2
4	0.88	1.181	61.3	306.4
5	0.877	1.177	60.9	304.6
6	0.873	1.173	60.6	302.8
7	0.883	1.184	61.6	307.8
8	0.866	1.165	59.8	299.1
9	0.986	1.321	74.1	370.6
10	0.976	1.308	72.9	364.7

Tabla 9. Concentración de proteínas (µg/ml) en fase *log* o exponencial. La determinación es del extracto proteico en *Ustilago maydis*.

En el ensayo anterior, tuvo que utilizarse una dilución 1:5, para que la medición no se saliera del rango de lectura que puede obtenerse en el espectrofotómetro.

En esta determinación se concluye que existe una cantidad suficiente de proteínas en la fase de crecimiento *log*, por lo tanto es la fase ideal para estandarizar la técnica de Western Blot que se realizó.

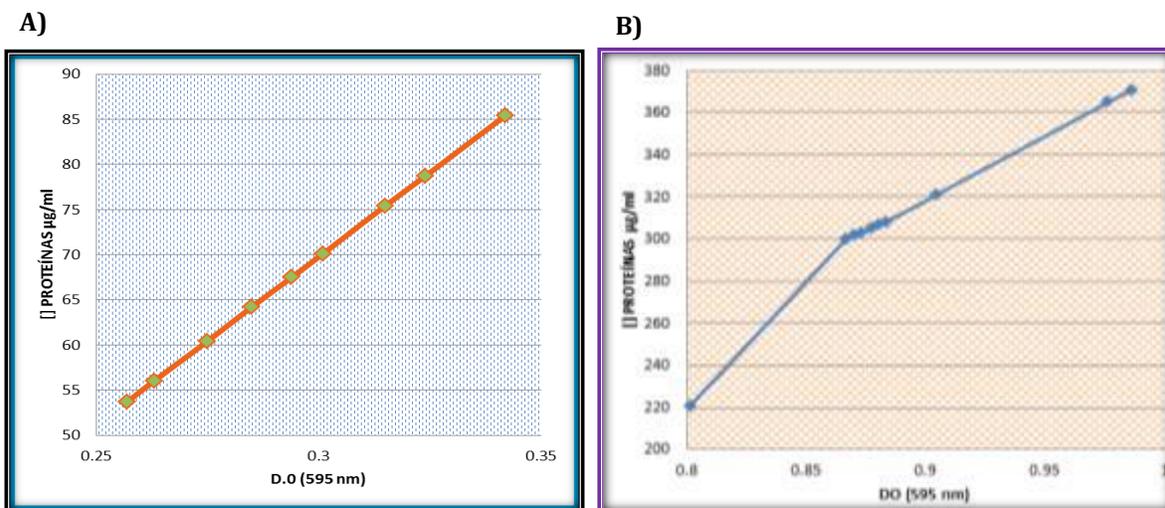


Figura 24. Comportamiento de concentración de proteínas en base a la densidad óptica del cultivo extraído. **A)** Fase *lag* o de adaptación. **B)** Fase *log* o logarítmica.

Es necesario puntualizar que la determinación de la concentración de proteínas es muy necesaria por varias razones; tales como asegurar la cantidad en µg/ml de proteína que se cargará en el gel de SDS-PAGE, además que si cargamos más cantidad de proteínas en el Western-Blot pudieran existir más uniones inespecíficas y por último para realizar Western Blot que sean semi-cuantitativos.

6.4 ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS.

En el ensayo de electroforesis que se realizó, en el cual las proteínas se separan de acuerdo a su tamaño en el gel de poliacrilamida, se observó que el cultivo más representativo para obtener las proteínas deseadas es cuando el cultivo está a una densidad óptica de aproximadamente 1.0, esto se apoya con lo observado en el carril #9 en el cual el cultivo tenía una DO de 0.986.

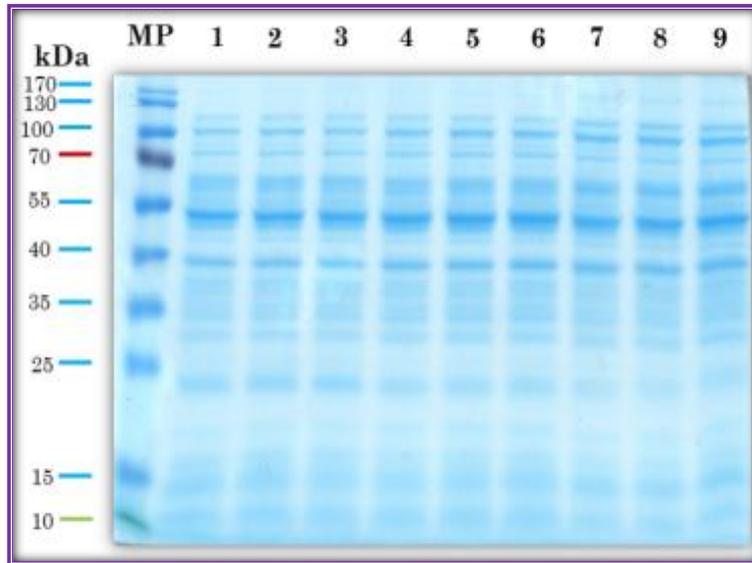


Figura 25. Gel de SDS-PAGE de extractos proteicos de *Ustilago maydis*. En el lado izquierdo se muestra la referencia del marcador de peso molecular y en cada carril las bandas obtenidas para cada extracto proteico.

6.5 WESTERN BLOT.

Una vez realizada la electroforesis, las proteínas se transfirieron a una membrana de PVDF, esto para inmovilizarlas y permitir su detección con anticuerpos específicos.

Los primeros Western Blot que se realizaron fueron para detectar las proteínas centrales de la vía NMD, es decir las proteínas Upf1, Upf2 y Upf3 en *Ustilago maydis*, para los cuales se utilizaron anticuerpos policlonales contra las proteínas para humanos Rent1, Rent2 y Rent3.

Para la detección de estas proteínas y la estandarización de esta técnica, se utilizó una dilución del anticuerpo primario 1:750 y del anticuerpo secundario de 1:2000, recordemos que este último debe ser más diluido para evitar uniones inespecíficas y debe ser “anti-especie”.

Es importante mencionar también que los anticuerpos primarios utilizados son policlonales; por lo que se establecieron condiciones ideales para la unión

inespecífica de los mismos, tales como, diluir más el anticuerpo primario, realizar por más tiempo el proceso de bloqueo con leche y subir la concentración de Tween 20 cuando se realizaban los lavados. Dichos anticuerpos reconocen múltiples epítopes y son frecuentemente utilizados para la detección de proteínas desnaturalizadas, como en esta investigación.

En la **Figura 26** se muestran los resultados de dicho ensayo, donde se utilizó la línea celular PC-3 como control positivo y la cepa de *Escherichia coli* DH5 α como control negativo.

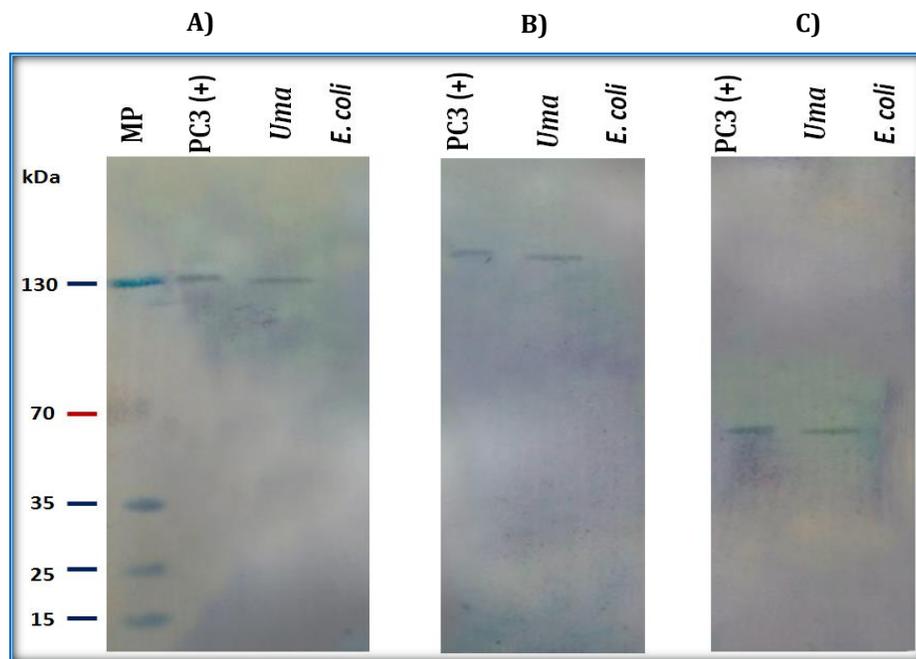


Figura 26. Western Blot para proteínas Up1, Upf2 y Upf3 en *Ustilago maydis*. **A)** Se utilizaron anticuerpos comerciales de humano Rent1 para detectar la presencia de Upf1 en *Ustilago maydis*. **B)** Western Blot para la detección de proteína Upf2 en *Ustilago maydis*. **C)** Inmunodetección de Upf3 *Ustilago maydis*.

El objetivo de estos ensayos de Western Blot, se cumple al observar la reactividad cruzada que existe entre los anticuerpos para humano, para la detección de proteínas que son centrales en la vía de NMD esto en *Ustilago maydis*.

6.6 INMUNOCITOQUÍMICA EN LÍNEA CELULAR PC-3.

Con base a cumplir el objetivo principal de esta investigación, en el cual se pretende hacer la localización celular de las proteínas centrales de NMD y algunas que participan en el *splicing*, se empleó en primera instancia la técnica de Inmunocitoquímica o Inmunotinción, que nos permitió demostrar la presencia de las regiones antigénicas de las proteínas que buscamos, en base a la unión de los anticuerpos ya mencionados (**Tabla 2**).

En primera instancia se validaron los anticuerpos comerciales en la línea celular PC-3 que es representativa de un estado andrógeno-independiente y de alto potencial metastásico de cáncer de próstata. Dichos ensayos realizaron en el Instituto de Fisiología de la BUAP, con la ayuda del DC Eduardo Monjaraz Guzmán.

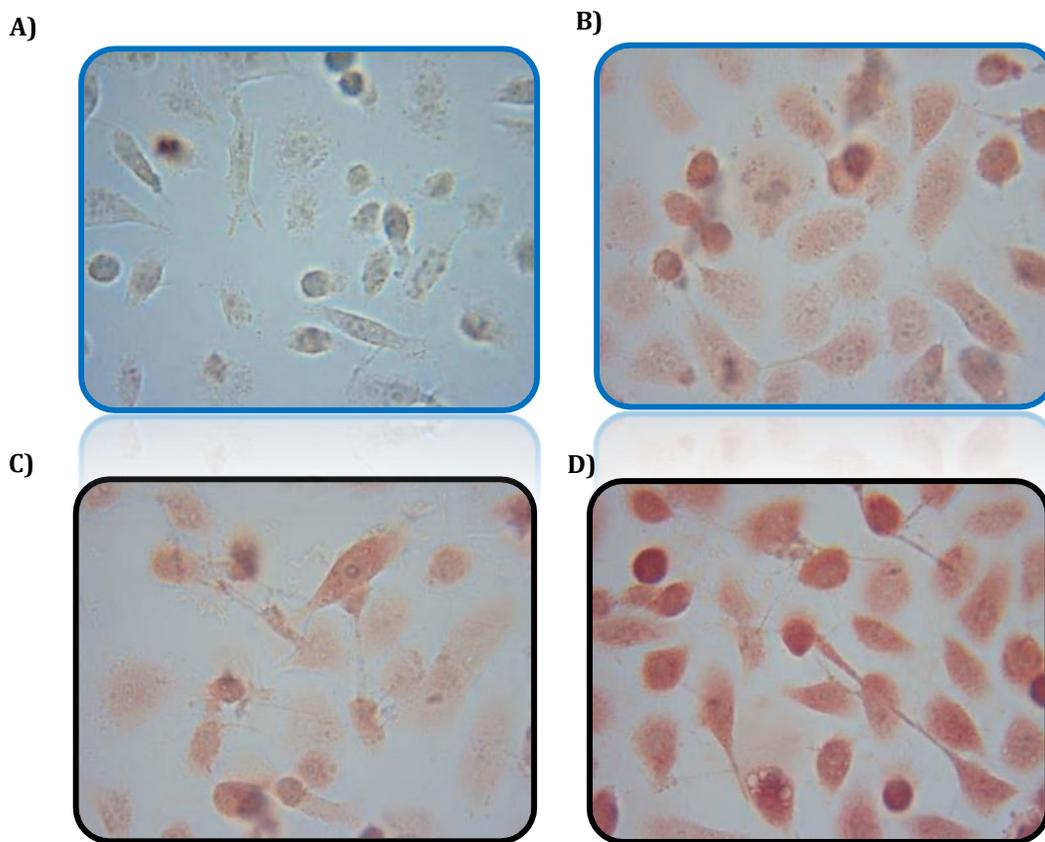


Figura 27. Inmunocitoquímica (ICC) de proteínas de NMD en línea celular PC-3. **A)** Control negativo. **B)** ICC empleando Anticuerpos Rent1. **C)** Inmunoreactividad de anticuerpos Rent2. **D)** Ensayo utilizando Anticuerpo Rent 3. Imágenes 40x.

En la **Figura 27-A**, se observa que no existe interacción Antígeno-Anticuerpo, por lo tanto, esta imagen nos servirá como control negativo para este ensayo. Esta preparación no tenía presencia del anticuerpo primario, por lo tanto no hubo inmunoreactividad.

En el apartado B, C y D; en los cuales, se utilizaron los anticuerpos Rent 1, Rent2 y Rent3, respectivamente, observamos en los tres casos una inmunoreactividad positiva, es decir, que existió una reacción antígeno-anticuerpo.

Concluimos que esta línea celular de cáncer de próstata nos sirve de referencia para puntualizar el uso como control positivo para detectar las proteínas principales de NMD en humano, recordemos que los mismos anticuerpos se utilizarán para detectar la localización celular de estas proteínas en *Ustilago maydis*.

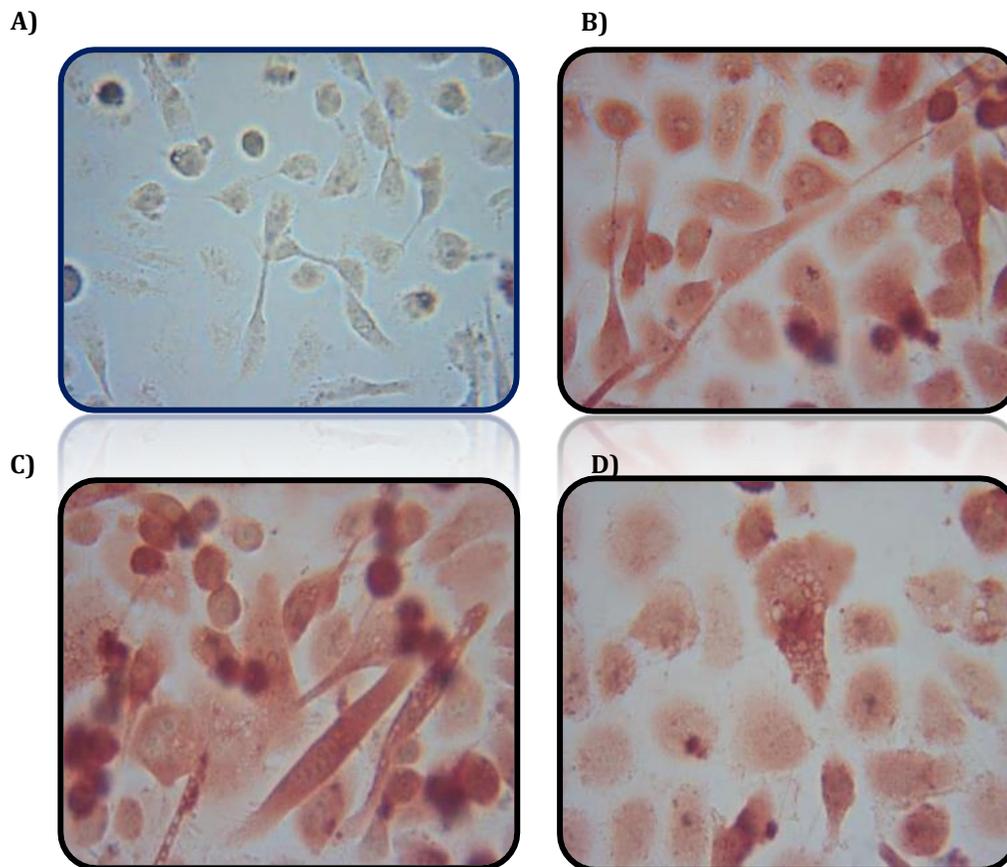


Figura 28. Inmunocitoquímica en línea celular PC-3 para proteínas que participan en el *splicing*. **A)** Control negativo, **B)** Anticuerpos para detectar la proteína U1 snRNP A1. **C)** Inmunoreactividad positiva para hnRNP A1. **D)** Se probaron anticuerpos para detectar la proteína MAGOH. Imágenes 40x.

Al observar el resultado del ensayo de Inmunocitoquímica realizado sobre la línea celular de cáncer de próstata PC-3 para detectar proteínas participantes en el *splicing* (las cuales nos servirán de control en la localización), se concluye que tanto en el apartado B), C) y D) de la **Figura 28**, en los cuales se pretendía detectar las proteínas U1 snRNP 70k, hnRNP A1 y MAGOH, respectivamente, existe una reacción antígeno-anticuerpo, por lo cual se considera como una inmunoreactividad positiva.

En la **tabla 10**, se muestra en resumen los resultados obtenidos mediante este ensayo en la línea celular analizada, así como una localización teórica propuesta para tener un punto de referencia de lo que se pretende encontrar en *Ustilago maydis*.

ANTICUERPO	LOCALIZACIÓN PROPUESTA	REACTIVO EN HUMANOS (PC-3)	NO REACTIVO
<i>Rent1</i>	<i>P-bodies</i>	✓	
<i>Rent 2</i>	<i>P-bodies</i>	✓	
<i>Rent 3</i>	<i>P-bodies</i>	✓	
<i>U1 snRNP 70</i>	Núcleo	✓	
<i>hnRNP A1</i>	<i>Transporte nuclear</i>	✓	
<i>MAGOH</i>	<i>P-bodies</i> <i>Control (+)</i>	✓	

Tabla 10. Resumen de localización celular propuesta y ensayo en línea celular PC-3.

6.7. OBTENCIÓN DE PROTOPLASTOS.

Para emplear la técnica de Inmunocitoquímica para *U. maydis*, varios pasos importantes se tienen que cuidar para asegurarnos que no existan factores que provoquen falsos negativos en la técnica y en nuestro caso como utilizaremos anticuerpos necesitamos facilitar la entrada de los mismos y optimizar el reconocimiento de las proteínas de interés.

Por lo anterior, decidimos obtener protoplastos, para remover la pared celular de nuestro modelo fúngico, esto mediante la enzima liticasa, y los resultados se muestran en la **Figura 29**.

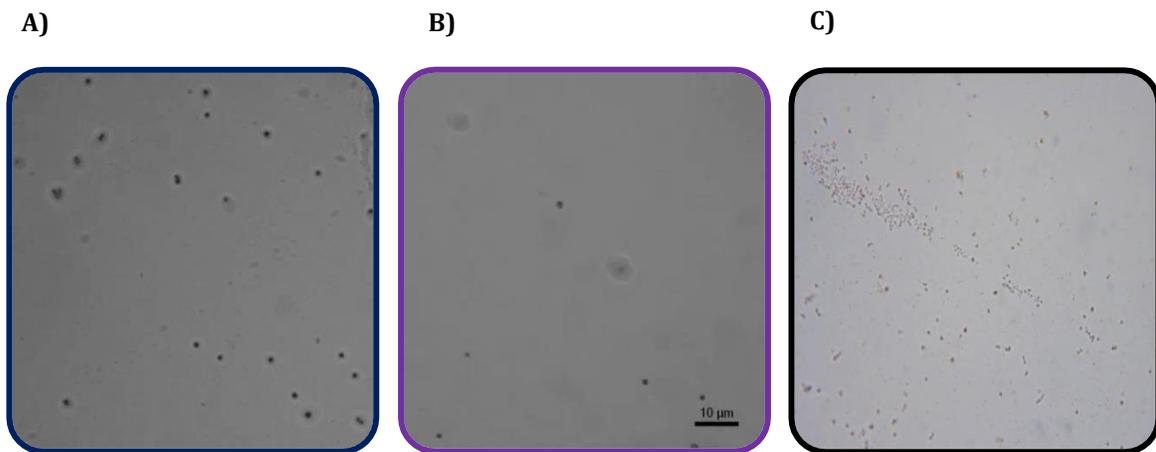


Figura 29. Inducción para la formación de Protoplastos en *Ustilago maydis*. **A)** y **B)** se observa la morfología de este microorganismo, se puede observar su gran pared celular. **C)** inducción de protoplastos. Imágenes 63x.

6.8 ENSAYOS DE PERMEABILIZACIÓN.

Otro paso que hubo que cuidar es la permeabilización, este paso puede resultar decisivo en el éxito o fracaso de la técnica. Es muy importante, ya que le ayuda al anticuerpo a penetrar a las proteínas intracelulares y unirse a ellas.

En este ensayo se probaron distintas concentraciones de Triton X-100 que es un detergente no iónico que sirve para solubilizar proteínas en su estado nativo, las concentraciones probadas fueron: 0.1%, 0.25%, 0.5% y 1%.

Se llegó a la conclusión, de que cualquiera de estas concentraciones no afectaba en la técnica.

6.9 INMUNOCITOQUÍMICA EN *USTILAGO MAYDIS*.

Lo siguiente que se realizó fueron ensayos de Inmunocitoquímica para probar los anticuerpos en nuestro modelo de estudio *Ustilago maydis*. En la **Figura 34** observamos como existe una inmunoreactividad positiva cuando se utilizó el anticuerpo Rent1 para humanos en esta levadura, entonces detectamos la presencia de la proteína homóloga la cual es Upf1.

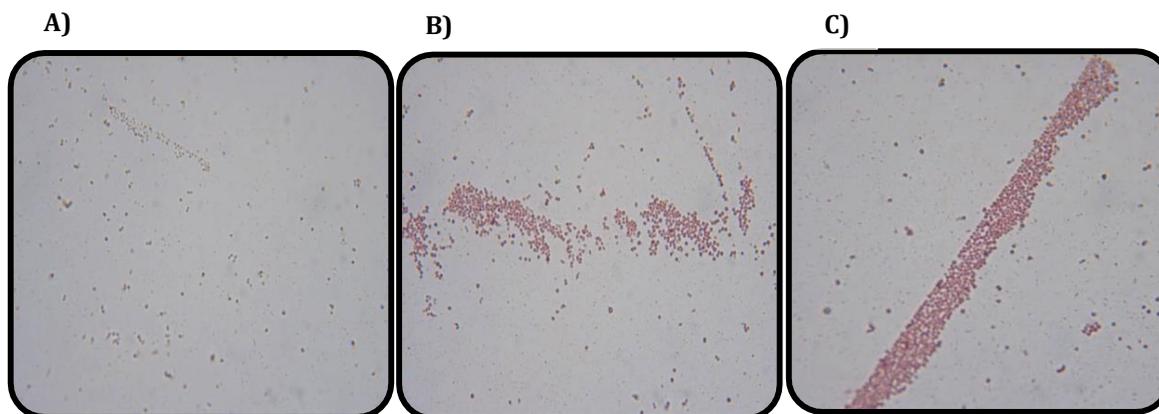


Figura 30. Inmunocitoquímica en *Ustilago maydis*, validación del anticuerpo Rent1.

A) Control negativo. B) y C) Inmunoreactividad contra el anticuerpo Rent1.

Imágenes 63x.

6.10 INMUNOFLUORESCENCIA EN *USTILAGO MAYDIS*.

Para este último experimento de la investigación, el cual es la localización celular de las proteínas de NMD en *Ustilago maydis*, en primera instancia se validaron los

anticuerpos a utilizar, empleándose una dilución 1:200 para el anticuerpo primario y una dilución 1:600 para el anticuerpo secundario, este último acoplado a Rodamina.

En la **Figura 31** se muestran las imágenes obtenidas en este ensayo, las cuales fueron observadas con el microscopio de Epifluorescencia y en los cuales se observa la inmunoreactividad positiva para la detección de Upf1, Upf2 y Upf3 en dicho organismo fúngico.

El soporte para las levaduras fue Grenetina al 2%, la cual en primera instancia se visualizó al microscopio para observar que no tuviera fluorescencia por sí misma y nos fuera a dar falsos positivos en la prueba.

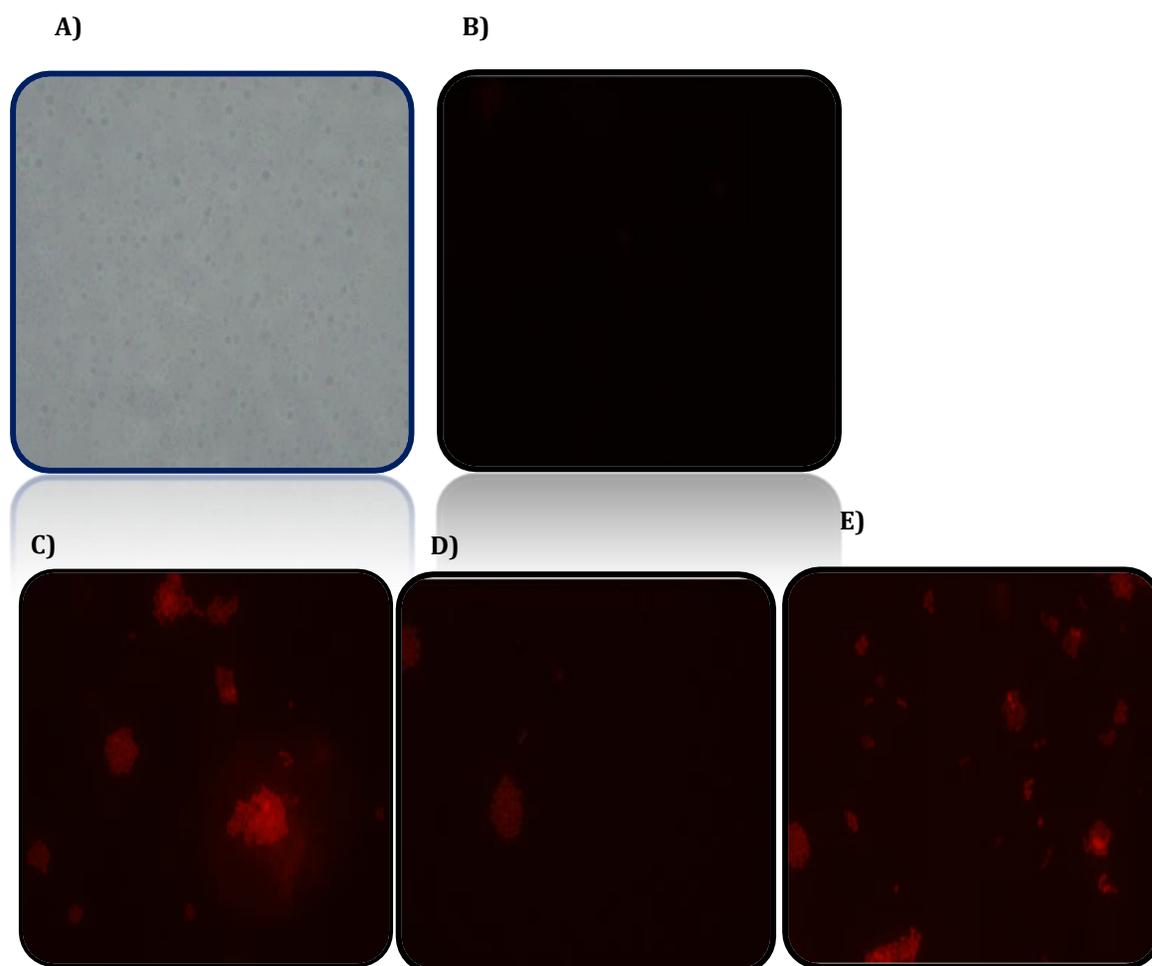


Figura 31. Epifluorescencia de proteínas de NMD en *Ustilago maydis*. **A)** Microscopía de campo claro de *U. maydis*. **B)** Control negativo, **C)** Inmunodetección de proteína Upf1. **D)** Inmunoreactividad positiva para Upf2. **E)** Se probaron anticuerpos para detectar la proteína Upf3. Imágenes 100x.

Este ensayo también se realizó para las proteínas que participan en el *splicing*, las diluciones de los anticuerpos fueron las mismas antes mencionadas; sólo que en este caso el anticuerpo secundario, estaba unido a Rojo Texas.

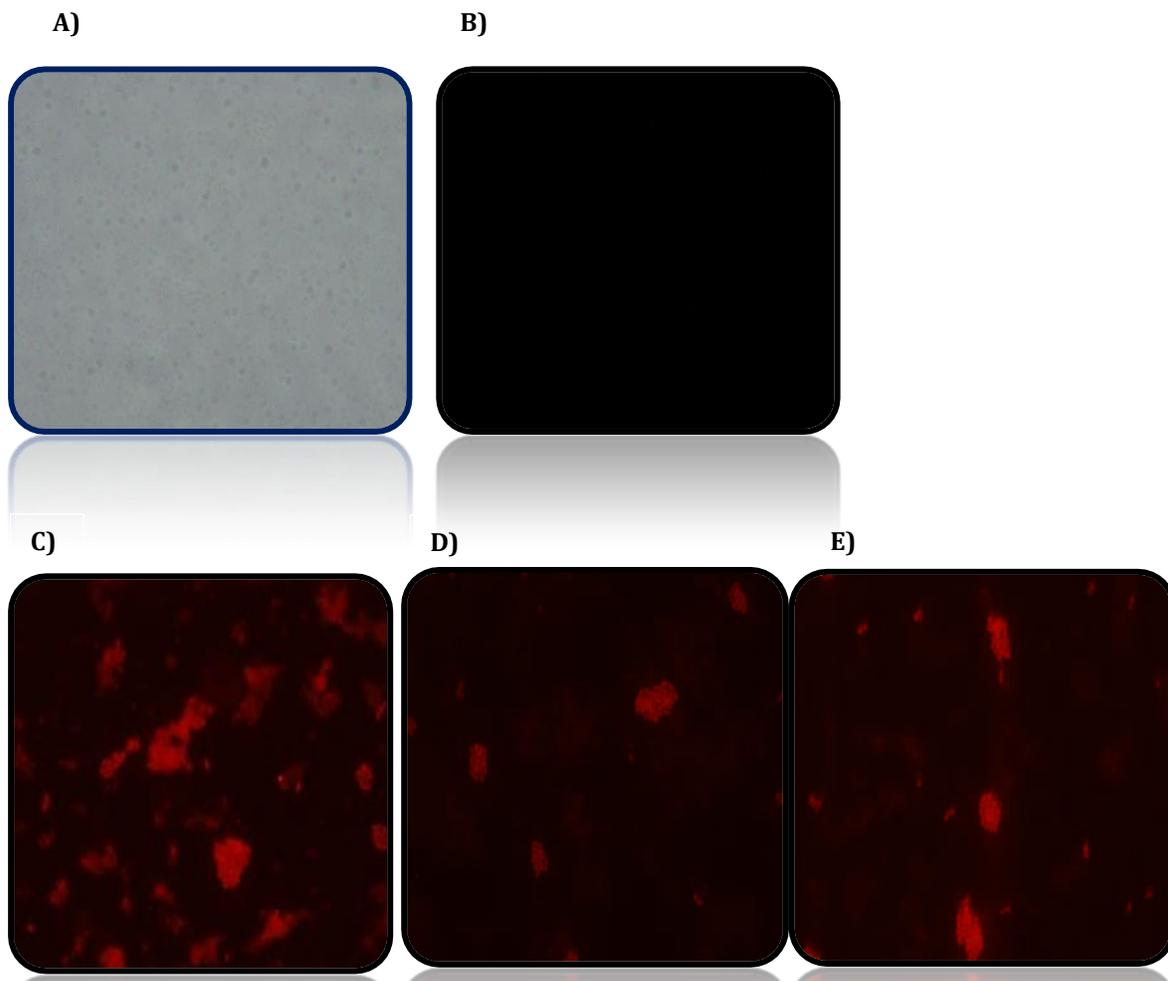


Figura 32. Inmunofluorescencia de proteínas de *splicing* en *Ustilago maydis*. **A)** Microscopía de campo claro de *U. maydis*. **B)** Control negativo, **C)** Inmunoreactividad de la proteína U1 snRNP A1. **D)** Detección de hnRNP A1. **E)** Proteína MAGOH localizada en *Ustilago maydis*. Imágenes 100x.

7. CONCLUSIONES

- Los epítomos antigénicos de las proteínas de NMD y *splicing* estudiadas se conservan entre humano y *Ustilago maydis*.
- Existe reactividad cruzada de los anticuerpos comerciales para Upf1, Upf2 y Upf3 y proteínas de *splicing* en *Ustilago maydis*.
- Se establecieron las condiciones experimentales para estudiar la localización celular de las proteínas de NMD en *Ustilago maydis*.

8. PERSPECTIVAS

- Generar anticuerpos monoclonales en animales de experimentación para detectar las proteínas de NMD y así disminuir reacciones inespecíficas.
- Utilizar microscopía electrónica para determinar exactamente la localización celular de las proteínas de NMD en *Ustilago maydis*.
- Emplear anticuerpos específicos contra proteínas contenidas en los *p-bodies*.

9. BIBLIOGRAFÍA

1. Agrios G.N. (2005). Plant pathology. 5th Edition. Ed Elsevier Academic Press. USA. Pp: 922
2. Ahmed F., Benedito V.A., Zhao P.X. (2011). Mining functional elements in messenger RNAs overview, challenges and perspectives. *Frontiers in Plant Science* 2: 1-16.
3. Allemand E., Batsché E., Muchardt C. (2008): *Splicing*, transcription and chromatin: a ménage á trois. *Current Opinion in Genetics & Development*. 18: 145-151.
4. Bailey-Serres J., Sorensen R., Juntawong P. (2009). Getting the message across: cytoplasmic ribonucleoprotein complex. *Trends Plant Sci*. 14: 443-453.
5. Bakkeren G., Gibbard B, Yee A, Froeliger E., Leong S., Kronstad J. (1992). The a and b loci of *Ustilago maydis* hybridize with DNA sequences from other smut fungi. *Mol plant Microbe Interact*. 5 (14): 347-355.
6. Bannuett F. (2002). Pathogenic development in *Ustilago maydis* a progression of morphological transitions that result in tumor formation and teliospore production. *Molecular Biology of fungal development*. pp: 349-398.
7. Bannuett F., Herskowitz. (1996). Discrete developmental stages during teliospore formation in the corn smut fungus, *Ustilago maydis*. *Development*. 122: 2965-2976.
8. Barta A., Schumperli D. (2010). Editorial on alternative *splicing* and disease. *RNA Biol*. 7: 388-389.
9. Basse C.W., Steinberg G. (2004). *Ustilago maydis*, model system for analysis of the molecular basis of fungal pathogenicity. *Mol Plant Patho*. 5: 83-92
10. Bauer R., Oberwinkler F., Vanky K. (1997). Ultrastructural markers and systematics in smut fungi and allied taxa. *Can J Bot*. 75: 1273-1314.
11. Behm-Ansmant I, Izaurralde E. (2006). Quality control of gene expression: A stepwise assembly pathway for the surveillance complex that triggers nonsense-mediated mRNA decay. *Genes & Dev*. 20: 391-398.

12. Bell, T.J. (2010) Intron retention facilitates splice variant diversity in calcium-activated big potassium channel populations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107: 21152–21157.
13. Berg J.M., Tymoczko J.L., Stryer L. (2010). *Bioquímica*. Editorial Reverté SA. México DF. 7a. Edición. pp: 840-851.
14. Bölker M. (2001). *Ustilago maydis*, a valuable model system for the study of fungal dimorphism and virulence. *Microbiology* 147: 1395-1401.
15. Busch A., Hertel K.J. (2012). Evolution of SR protein and hnRNP *splicing* regulatory factors. *Wiley Interdiscip Rev RNA*. 3(1): 1–12
16. Bhuvanagiri M., Schlitter A.M., Hentze M.W., Kulozik, A.E. (2010). NMD: RNA biology meets human genetic medicine. *Biochem J.* 430: 365-377.
17. Black D.L. (2003). Mechanisms of alternative pre-messenger RNA *splicing*. *Annu Rev Biochem.* 72: 291-336.
18. Bradford M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72: 248-254.
19. Brefort T., Doehlemann G., Mendoza-Mendoza A., Reissmann S., Djamei A. (2009). *Ustilago maydis* as a pathogen. *Annu Rev Phytopathol.* 47: 423-445.
20. Brow D.A. (2002). Allosteric cascade of *spliceosome* activation. *Annu Rev Genet.* 36: 333-360.
21. Caltrider P.G., Gottlieb D. (1965). Effect of sugar on germination and metabolism of *Ustilago maydis*. *Pathology.* 56: 479-484.
22. Cammas A., Pileur F., Bonnal S., Lewis SM., Leueque N., Holcik M., Vagner S. (2007). Cytoplasmic relocalization of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 controls translation initiation of specific mRNAs. *Mol Biol Cell.* 18: 5048-5059.
23. Coelho ML., Espinosa J., Islam S., Martínez O., Thanki J., Mazariesgos S., Nguyen T., Larina M., Xue B., Uversky V. (2013). Malleable ribonucleoprotein machine: protein intrinsic disorder in the *Saccharomyces cerevisiae* spliceosoma. *Peer J.* 1-58.

24. Conti E., Izaurraide E. (2005). Nonsense-mediated mRNA decay: molecular insights and mechanistic variations across species. *Current Opinion in Cell Biology*. 17: 316-325.
25. Cowling H. (2010). Regulation of mRNA cap methylation. *Biochem Journal*. 425 (Pte. 2): 295-302.
26. Cultberson M., Leeds P. (2003). Looking at mRNA decay pathways through the window of molecular evolution. *Current opinion en Genetics and development*. 13:207-214.
27. Chamieh H., Ballut L., Bonneau F., Le Hir H. (2008). NMD factors UPF2 and UPF3 bridge UPF1 to the exon junction complex and stimulate its RNA helicase activity. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 15: 85–93.
28. Chang Y.F., Imam JS., Wilkinson MF. (2007). The nonsense-mediated decay RNA surveillance pathway. *Annu. Rev. Biochem.* 76: 51–74
29. Chen H-C, Cheng S-C. (2012). Functional roles of protein splicing factor. *Bioscience Reports*. 32: 345-354.
30. Chen M., Manley JL. (2009). Mechanisms of alternative *splicing* regulation: insights from molecular and genomics approaches. *Nat Rev Mol Cell Biology*. 10 (11): 741-754.
31. Cheng Z., Muhlrud D., Lim MG., Parker R, Song H. (2007). Structural and functional insights into the human Upf1 helicase core. *EMBO Journal*. 26: 253-264.
32. Clerici M., Deniaud A., Bochm V., Gehring NH., Schaffitzel C., Cusack S. (2014). Structural and functional analysis of the three MIF4G domains of nonsense-mediated decay factor Upf2. *Nucleic Acids Research*. 42 (4): 2673-2686.
33. Dey S.K., Ganguli S., Basu P., Roy P., Datta A. (2010). Lysine richness in human snurps- possible sites for electrophile attacks. *Bioinformatics*. 31; 4(9): 409-411
34. Ding J., Hayashi M.K. , Zhang Y, *et al.* (1999). Crystal structure of the two-RRM domain of hnRNP A1 (UP1) complexed with single-stranded telomeric DNA. *Genes & development* 13:1102–1115.

35. Doyle C.E., Donaldson M.E., Morrison E.N., Saville B. (2011). *Ustilago maydis* transcript features identified through full-length cDNA analysis. *Mol Genet Genomics*. 286: 143-159.
36. Durand S., Cougot N., Mahuteau F., Nguyen C., Griersen D., Bertrand E., Tazi J., Lejeune F. (2007). Inhibition of nonse-mediated mRNA decay (NMD) by a new chemical molecule reveals the dynamic of NMD factors in p-bodies. *Vol 8. No 7. Pp: 1145-1160.*
37. Djamei A., Kahmann R. (2012). *Ustilago maydis*: dissecting the molecular interface between pathogen and plant. *Plos pathogens*. 8 (11).
38. Dhir A., Buratti E. (2010). Alternative *splicing*: role of pseudoexons in human disease and potential therapeutic strategies. *FEBS J*. 277: 841–855.
39. Eckmann C.R., Rammelt C., Wahle E. (2011). Control of poly (A) tail length. *Wires RNA*. Vol. 8 (3): 348-361
40. Eliseeva I.A., Lyabin D.N., Ouchinnikov L.P. (2013). Poly(A)- binding proteins: structure, domain organization and activity regulation. *Biochemistry (Moscow)*. 78 (13): 1377-1391.
41. Estrada AA., Chagolla A., Ramos HE., Guerrero A., Ruíz J. (2010). Identificación de las proteínas secretadas por el hongo *Ustilago maydis* (DeCandole) Corda (basidiomiceto), cultivado en condiciones in vitro. *Nova Scientia*. Vol 2. No 4. pp: 104-130.
42. Fabrizio P., Dannenberg J., Dude P., Kastner B., Stark H., Urlaub H., Luhrmann R. (2009). The evolutionarily conserved core design of the catalytic activation step of the yeast spliceosome. *Molecular cell*. 36: 593-608.
43. Falcón A., Small I., Lurin C. (2010). Nuclearly encoded splicing factors implicated in RNA splicing in higher plant organelles. *Molecular Plant*. Vol 3. No 4. pp: 691-705.
44. Fukuhara N., Ebert J., Unterholzner L., Lidner D., Izaurralde E., Conti E. (2005). SMG7 is a 14-3-3 like adaptor in the nonsense-mediated Mrna decay pathway. *17 (4): 537-547.*
45. Franks T., Andersen J. (2008). The control of mRNA decapping and p-bodies formation. *Molecular Cell*. Vol 32. Pp: 605-615.

46. Frischmer PA., Dietz H.C. (1999). Nonsense- mediated mRNA decay in health and disease. *Human Molecular Genetics*. Vol. 8. No. 10. Pp: 1893-1900.
47. Gallo J.M., Noble W., Martin T.R. (2007). RNA and protein-dependent mechanisms in tauopathies: consequences for therapeutic strategies. *Cell. Mol. Life Sci.* 64: 1701–1714.
48. García MA., Baraniak A., Lasda E. (2004). Alternative splicing in disease and therapy. *Nature biotechnology*. Vol 22. No. 5. pp: 535-546.
49. Gardner L.B. (2010). Nonsense Mediated RNA Decay Regulation by Cellular Stress; Implications for Tumorigenesis. *Mol Cancer Res.* 8(3): 295–308
50. Goldstrohm AC., Greenleaf AL. García MA. (2001): Co- transcriptional *splicing* of pre-messenger RNAs: considerations for the mechanism of alternative *splicing*. *Gene.* 277: 31-47.
51. Gonatopoulos T., Cowling V. (2014). Cap-binding complex (CBC). *Biochem Journal.* 457 (Pte. 2): 231-242.
52. Goren A., Ram O., Amit M., Keren H., Lev-Maor G., Vig I., Pupko T., Ast G. (2006). Comparative analysis identifies exonic *splicing* regulatory sequences- the complex definition of enhancers and silencers. *Mol Cell.* 22: 769-781.
53. Gleghorn ML., Maquat LE. (2011). Upf1 learns to relax and unwind. *Molecular cell.* 41: 621-623.
54. Han S.P., Tang Y.H., Smith R. (2010). Functional diversity of hnRNPs: past, present and perspectives. *Biochem J.* 430: 379-392.
55. He F., Ganesan R., Jacobson A. (2013). Intra- and intermolecular regulatory interactions in Upf1, the RNA helicase control to nonsense-mediated mRNA decay in yeast. *Molecular and Cellular Biology.* 33 (23): 4672-4684.
56. Hemetsberger C., Herrberger C., Zechmann B., Hillmer M. (2012). The *Ustilago maydis* effector Pep1 suppresses plant immunity by inhibition of host peroxidase activity. *Plos Pathogens.* Vol. 8 (5): pp 1-15.
57. Heyd F., Lynch KW. (2011): Degrade, move, regroup: signaling control of *splicing* proteins. *Trends in Biochemical Sciences.* 36(8): 397-404.

58. Ho E., Cahill M., Saville B. (2007). Gene discovery and transcript analyses in the corn smut pathogen *Ustilago maydis*: expressed sequence tag and genome sequence comparison. *BMC Genomics*. 8:334. pp: 1-22.
59. Holbrook JA, Neu-Yilik G, Hentze MW, Kulozik AE. (2004). Nonsense mediated decay approaches the clinic. *Nat Genet*. 36: 801–808.
60. Holloman W., Schirawski J., Holliday R. (2009). The homologous recombination system of *Ustilago maydis*. *Fungal Genetic Biology*. 45 (1): 31-39.
61. Hossain M.A., Rodríguez C.M., Johnson T.L. (2011). Key features of the two-intron *Saccharomyces cerevisiae* gene *SUS1* contribute to its alternative splicing. *Nucleic Acids Research*. 39 (19): 8612-8627.
62. Hosking A., Friedman L., Gallegher S., Crawford D, Anderson E., Wombacher R., Ramírez N., Cornish V., Gelles J., Moore M. (2011). Ordered and dynamic assembly of single spliceosomes. *Science*. 331: 1289-1295.
63. Howe KJ, Kane CM, Ares M Jr. (2003). Perturbation of transcription elongation influences the fidelity of internal exon inclusion in *Saccharomyces cerevisiae*. *RNA*. 9: 993- 1006.
64. Hughes, T.A. (2006) Regulation of gene expression by alternative untranslated regions. *Trends Genet*. 22: 119–122.
65. Ingelsson M., Ramasamy K., Cantuti-Castelvetri I., Skoglund L., Matsui T., Orne J., Kowa H., Raju S., Vanderburg C.R., Augustinack J.C., De Silva R., Lees A.J., Lannfelt L., Growdon J.H., Frosch M.P., Standaert D.G., Irizarry M.C., Hyman B.T. (2006). No alteration in tau exon 10 alternative splicing in tangle-bearing neurons of the Alzheimer's disease brain. *Acta Neuropathol*. 112: 439–449.
66. Isken O, Kim YK, Hosoda N, Mayeur GL, Hershey JW, Maquat LE. (2008). Upf1 phosphorylation triggers translational repression during nonsense-mediated mRNA decay. *Cell*. 133:314–327.
67. Ivanov P.V., Gehring NH., Kunz JB., Hentze MW, Kulozik AE. (2008). Interactions between UPF1, eRFs, PABP and the exon junction complex suggest an integrated model for mammalian NMD pathways. *EMBO J*. 27: 736–747.

68. Jianzhong D., Mariko K., Ying Z. (1999). Crystal structure of the two-RRM domain of hnRNP A1 (UP1) complexed with single-stranded telomeric DNA. *Genes & Development*. 13: 1102-1115.
69. Jiménez LF., Lara R., Chavarría I., Zamora L., Salcedo M., Agredano ML., Moncayo JJ., Segura ML. (2007). *Biología Celular del splicing*. Mensaje Bioquímico. Vol. XXXI. pp: 141-156
70. Juárez M., Ruiloba S., Chávez G., Hernández C., Villa L. (2011). Huitlacoche (corn smut), caused by the phytopatogenic fungus *Ustilago maydis*, as a functional food. *Revista Iberoamericana de Micología*. 28 (2): pp 69-73.
71. Kashyap L., Tripathi P. (2008). Alternative splicing. How one gen can make many proteins. Vol. 4. No. 1. pp:1-10.
72. Kelemen O., Convertini P., Zhang Z., Wen Y., Shen M. Falaleeva M. Stamm S. (2013): Function of alternative *splicing*. *Gene*. 514: 1-30.
73. Kervestin S., Li C., Buckingham R., Jacobson, A. (2012). Testing the faux-UTR model for NMD: analysis of Upf1p and Pab1p competition for binding to eRF3/Sup35p. *Biochimie*. 94: 1560-1571.
74. Kunz J.B., Neu-Yilik G., Hentze M.W., Kulozik A.E., Gehring N.H. (2006). Functions of hUpf3a and hUpf3b in nonsense-mediated mRNA decay and translation. *RNA Society*, 12: 1015-1022.
75. Kuroha K., Tatematsu T., Inada T. (2009). Upf1 stimulates degradation of the product derived from aberrant messenger RNA containing a specific nonsense mutation by the proteasome. *European Molecular Biology Organization EMBO*. Vol 10. No 11. pp:1265-1271.
76. Kuperwasser N., Brogna S., Dower K., Rosbash M. (2004). Nonsense-mediated decay does not occur with the yeast nucleus. *RNA* 10, 1907-1915.
77. Kuyumcu-Martinez N.M., Wang G.S., Cooper T.A. (2007). Increased steady-state levels of CUGBP1 in myotonic dystrophy 1 are due to PKC-mediated hyperphosphorylation. *Mol. Cell*. 28: 68-78.
78. Khajavi M., Inoue K., Lupski J.R. (2006). Nonsense-mediated mRNA decay modulates clinical outcome of genetic disease. *European Journal of Human Genetics* .14, 1074-1081. Lenzken S.C., Loffreda A., Barabino S.L. (2013). RNA

Splicing: A New Player in the DNA Damage Response. Hindawi Publishing Corporation International Journal of Cell Biology. Volume 2013, Article ID 153634, 12 pages.

79. Klinck, R., *et al.* (2008). Multiple alternative *splicing* markers for ovarian cancer. *Cancer Res.* 68, 657–663.
80. Krecic A., Swanson M. (1999). HnRNP complexes: composition, structure and function. *Curr Opin Cell Biol.* 11: 363-371.
81. Lenzken S., Loffreda A., Barabino S. (2013): RNA *splicing*: a new player in the DNA damage response. *International Journal of Cell Biology.* (13): 12 pages.
82. Lejeune F., Maquat, L.E. (2005). Mechanistic links between nonsense-mediated mRNA decay and pre-mRNA splicing in mammalian cells. *Curr. Opin. Cell Biol.* 17: 309–315.
83. Longman D., Plasterk R.H., Johnstone I.L., Caceres J.F. (2007). Mechanistic insights and identification of two novel factors in the *C. elegans* NMD pathway. *Genes & Dev.* 21: 1075–1085.
84. Liu J.L., Gall J.G. (2007). U bodies are cytoplasmic structures that contain uridine-rich small nuclear ribonucleoproteins and associate with p-bodies. *Proc Natl Acad Sc USA.* 104: 11655-11659.
85. Long J.C., Caceres J.F. (2009). The SR protein family of *splicing* factors: master regulators of gene expression. *Biochem J.* 417: 15-27.
86. Luco R.F., Misteli T. (2011). More than a *splicing* code: integrating the role of RNA, chromatin and non-coding RNA in alternative *splicing* regulation. *Current opinion in Genetics & Development.* 21: 366-372.
87. Martínez-Contreras R., Fiset J.F., Nasim F.J., Madden R., Cordeau M., Chabot B. (2006). Intronic binding sites for hnRNP A/B and hnRNP F/H proteins stimulate pre-mRNA *splicing*. *PLoS Biology.* 4 (2): 172-185.
88. Martínez-Espinoza A.D., García-Pedrejas M.D., Gold S.E. (2002). The Ustilaginales as plant pests and model systems. *Fungal Genetics and Biology.* 35: 1-20.
89. Maquat L. E. (2004). Nonsense-mediated mRNA decay: *splicing*, translation and mRNP dynamics. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 5: 89-99.

90. Matlin A.J., Clark F., Smith C.W.J. (2005). Understanding alternative splicing: towards a cellular code. *NATURE*. Vol 6. Pp 386-398.
91. Matlin A.J., Moore M.J. (2007). *Spliceosome* assembly and composition. *Adv Exp Med Biology*. 623: 14-35.
92. Meister G., Eggert C., Fischer U. (2002). SMN-mediated assembly of RNPs: a complex story. *Trends Cell Biol*. 12 (10):472-478
93. Méndez L., Ruíz H. (2008). Estudio de genes diferenciales durante el proceso patogénico de *Ustilago maydis* en *Arabidopsis thaliana* un huésped no natural. Avance de la investigación científica en el CUCBA. ISBN; 978-607-00-2083-4. pp: 407-414.
94. Metzstein M.M., Krasnow, M.A. (2006). Functions of the nonsense-mediated mRNA decay pathway in *Drosophila* development. *PLoS Genet*. 2, e180.
95. Münsterkötter M., Steinberg G. (2007). The fungus *Ustilago maydis* and humans share disease-related proteins that are not found in *Saccharomyces cerevisiae*. *BMC Genomics*. 8: 473.
96. McGlincy N.J., Smith C.W.J (2008). Alternative splicing in nonsense-mediated mRNA decay: what is the meaning on nonsense?. *Cell Press*. Vol. 33. No. 8. pp:385-393.
97. McGlincy NJ., Tan LY., Paul N., Zavolan M., Lilley KS., Smith C.W.J. (2010). Expression proteomics of UPF1 knockdown in HeLa cells reveals autoregulation of hnRNP A2/B1 mediated by alternative splicing resulting in nonsense-mediated mRNA decay. *BMG Genomics*. 11:565.
98. Nilsen, T.W. and Graveley, B.R. (2010) Expansion of the eukaryotic proteome by alternative *splicing*. *Nature*. 463: 457–463
99. Orengo JP., Cooper TA. (2007). Alternative *splicing* in disease. *Adv Exp Med Biol*. 623: 212-223.
100. Papadodima O., Chatziioannou A., Patrinoú-Georgoúla M., Kolisis F.N., Pletsa V, Guialis A. (2013). HuR-Regulated mRNAs Associated with Nuclear hnRNP A1-RNP Complexes. *International Journal of Molecular Sciences*. 14, 20256-20281

101. Patel B. S., Bellini M. (2008). The assembly of a spliceosomal small nuclear ribonucleoprotein particle. *Nucleic Acids Research*. Vol 36. No 20. Pp 6482-6493.
102. Patel A., Steitz J. (2003). *Splicing* double: insights from the second spliceosome. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 4: 960-970.
103. Peterfy, M., Phan, J., Reue, K., (2005). Alternatively spliced lipin isoforms exhibit distinct expression pattern, subcellular localization, and role in adipogenesis. *J. Biol. Chem.* 280: 32883–32889.
104. Pop M., Maquat LE. (2014). The darma of nonsense-mediated mRNA decay in mammalian cells. *Molecules & Cells*. 37 (1): 1-8.
105. Reed R. (2000). Mechanisms of fidelity in pre-mRNA *splicing*. *Curr Opin Cell Biol*. 12: 340-345.
106. Rehwinkel J., Letunic I., Bork P., Izaurralde E. (2005). Nonsense-mediated mRNA decay factors act in concert to regulate common mRNA targets. *RNA*. 11: 1530–1544.
107. Rehwinkel J., Raes J., Izaurralde, E. (2006). Nonsense mediated mRNA decay: target genes and functional diversification of effectors. *Trends Biochem. Sci*. 31: 639–646.
108. Ruiz J. (2008). *Ustilago maydis*: Ascenso de un hongo mexicano, de la gastronomía local al mundo científico. *Revista electrónica Nova Scientia*. No. 1. Vol 1 (1): pp 118-135.
109. Sahoo T., Del Gaudio D., German J.R., Shinawi M., Peters S.U., Person R.E., Garnica A., Cheung S.W., Beaudet A.L. (2008). Prader–Willi phenotype caused by paternal deficiency for the HBII-85 C/D box small nucleolar RNA cluster. *Nat. Genet.* 40:719–721.
110. Sayani S., Chanfreau GF. (2012). Sequential RNA degradation pathways provide a fail-safe mechanism to limit the accumulation of unspliced transcripts in *Saccharomyces cerevisiae*. *RNA Society*. 18:1563–1572
111. Séraphin B., Rosbash M. (1991). The yeast branchpoint sequence is not required for the formation of a stable U1 snRNA- pre-mRNA complex and is

- recognized in the absence of the U2 snRNA. *The EMBO journal*. 10 (5): 1209-1216.
112. Serin G., Gersappe A., Black J.D., Aronoff R., Maquat L.E. (2001). Identification and characterization of human orthologues to *Saccharomyces cerevisiae* Upf2 protein and Upf3 protein (*Caenorhabditis elegans* SMG-4). *Mol. Cell. Biol.* 21: 209–223.
 113. Scaffidi P., Misteli T. (2005). Reversal of the cellular phenotype in the premature aging disease Hutchinson–Gilford progeria syndrome. *Nat. Med.* 11: 440–445.
 114. Schwer B., Chang J., Shuman S. (2013). Structure-function analysis of the 5′ end of yeast U1 snRNA highlights genetics interactions with the Msl5*–Mud2 branchpoint-binding complex and other spliceosome assembly factors. *Nucleic Acids Research*. 41 (15): 7485-7500.
 115. Shen H., Green MR. (2006). RS domains contact *splicing* signals and promote *splicing* by a common mechanism in yeast through humans. *Genes Dev.* 20: 1755-1765.
 116. Shmidt M.J., Norbury C.J. (2010). Polyadenylation and beyond: emerging roles for noncanonical poly (A) polymerases. *Wires RNA*. 1 (1): 142-151
 117. Shukla S., Oberdoerffer S. (2012). Co-transcriptional regulation of alternative pre-mRNA *splicing*. *Biochem Biophys Acta*. 1819 (7): 673-683.
 118. Skibbe DS., Doehlemann G., Fernandez J., Walbot V. (2010). Maize tumors caused by *Ustilago maydis* require organ-specific genes in host and pathogen. *Science*. 328: 89-92.
 119. Sperling J., Azubel M., Sperling R. (2008). Structure and function of the pre-mRNA *splicing* machine. *Structure*. 16: 1605-1615.
 120. Stalder L., Mühlemann O. (2008). The meaning of nonsense. *Cell Press*. 18 (7): 315-321.
 121. Stalder L., Mühlemann O. (2009). Processing bodies are not required for mammalian nonsense-mediated mRNA decay. *RNA Society*. 15: 1265–1273.

122. Stamm S., Ben S., Rafalska I., Tang Y., Zhang Z., Toiber D., Thanaraj T., Sorea H. (2005). Function of alternative splicing. *GENE*. 344. pp: 1-20.
123. Stanek D., Neugebauer K.M. (2006). The cajal body: a meeting place for spliceosomal snRNPs in the nuclear maze. *Chromosoma*. 115: 343-354.
124. Steinberg G. (2007). Tracks for the traffic: microtubules in the plant pathogen *Ustilago maydis*. *New Phytol*. 174 (4): 721-733.
125. Tardiff D.F., Rosbash M. (2006). Arrested yeast *splicing* complexes indicate stepwise snRNP recruitment during *in vivo spliceosome* assembly. *RNA*. 12:968-979.
126. Tazi J., Bakkour N., (2008). Stamm S. Alternative splicing and disease. *Bioquímica et Biophysica Acta* 1792. Pp 14-26.
127. Trueheart J., Herskowitz J. (1992). The a locus governs cytoinduction in *Ustilago maydis*. *Journal Bacteriology*. 174: 7831-7833
128. Unoki, M., Shen, J.C., Zheng, Z.M., Harris, C.C. (2006). Novel splice variants of ING4 and their possible roles in the regulation of cell growth and motility. *J. Biol. Chem*. 281: 34677-34686.
129. Urban M., Kahmann R., Bölker M. (1996). Identification of the pheromone response element in *Ustilago maydis*. *Mol Gen Geneti*. 25: 31-37
130. Valadkhan S., Jaladat Y. (2010). The spliceosomal proteome: at the heart of the largest cellular ribonucleoprotein machine. *Proteomics*. 10. pp:4128-4141
131. Valadkhan S., Mohammad A., Jaladat Y., Geisler S. (2009). Protein-free small nuclear RNAs catalyze a two step *splicing* reaction. *Proc. Natl . Acad. SC*. 106: 11901-11906.
132. Van der Feltz C., Kelsey A., Brilot A., Pomeranz D. (2012). Architecture of the spliceosome. *Biochemistry*. 51: 3321-3333.
133. Villanueva C., Sánchez E., Villanueva E. (2007). El huitlacoche y su cultivo. Ed. Mundi-Prensa México, SA de CV. México DF. pp: 26.
134. Wahl MC., Will CL., Lührmann R. (2009). The *spliceosome*: design principles of a dynamic RNP machine. *Cell*. 136: 701-718.

135. Wang J., Gao Q.S., Wang Y., Lafyatis R., Stamm S., Andreadis A. (2004). Tau exon 10, whose missplicing causes frontotemporal dementia, is regulated by an intricate interplay of *cis* elements and trans factors. *J. Neurochem.* 88: 1078–1090.
136. Wang W., Cajigas I., Peltz SW., Wilkinson MF., González CI. (2006). Role for Upf2p phosphorylation in *Saccharomyces cerevisiae* nonsense-mediated mRNA decay. *Mol CEL Biol.* 26 (9):3390-3400.
137. Wang Z., Burge C. (2008). *Splicing* regulation: from a parts list of regulatory elements to an integrated *splicing* code. *RNA.* 14 (5): 802-813.
138. Warlocki Z., Odenwalder P., Schmitzová J., Platzmann F., Stark H., Urlaub H., Ficner R., Fabrizio P., Lührmann F. (2009) Reconstitution of both steps of *Saccharomyces cerevisiae* *splicing* with purified spliceosomal components. *Nat Struct Mol BIOL.* 16: 1237-1243.
139. Wen J., Brogna S. (2010). Splicing-dependent NMD does not require the EJC in *Schizosaccharomyces pombe*. *The EMBO journal.* 29: pp 1537-1559.
140. Wilkie S.E., Vaclavik V., Wu H., Bujakowska K., Chakarova C.F., Bhattacharya S.S., Warren M.J., Hunt D.M. (2008). Disease mechanism for retinitis pigmentosa (RP11) caused by missense mutations in the *splicing* factor gene PRPF31, *Mol. Vis.* 14: 683–690.
141. Will C.L., Lührmann R. (2011). Spliceosome Structure and Function. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* Volumen 3, capítulo 7. 3:a003707.
142. Will C.L., Lührmann R. (2005). *Splicing* of rare class of introns by the U12 dependent *spliceosoma*. *Biology Chem.* 368 (8): 713-724.
143. Wirth B., Brichta L., Hahnen E. (2006). Spinal muscular atrophy and therapeutic prospects. *Prog. Mol. Subcell. Biol.* 44:109–132.
144. Whal R., Zahiri A., Kämper J. (2010). The *Ustilago maydis* b mating type locus control hyphal proliferation and expression of secreted virulence factors in plant. *Mol Microbiology.* 75 (1): 208-228.
145. Xie H, Vucetic S, Iakoucheva LM, Oldfield CJ, Dunker AK, Obradovic Z, Uversky VN. (2007). Functional anthology of intrinsic disorder. 3. Ligands,

post-translational modifications, and diseases associated with intrinsically disordered proteins. *Journal of Proteome Research*. 6:1917–1932.

- 146.** Yee A., Kronstad J. (1998). Dual sets of chimeric alleles identify specificity sequences for the bE and bW mating and pathogenicity genes of *Ustilago maydis*. *Mol Cell Biology*. 18: 221-232.
- 147.** Zhou Z, Licklider LJ, Gygi SP, Reed R. Comprehensive proteomic analysis of the human spliceosome. *Nature*. 2002; 419:182–185
- 148.** Zhu H., Zhou HI, Hasman RA., Lou H. (2007). Hu proteins regulate polyadenylation by blocking sites containing U-rich sequences. *J. Biol. Chem.* 282: 2203-2210.

10. ANEXOS.

10.1. SOLUCIONES PARA ELECTROFORESIS.

a) Acrilamida 30% (29:1) :

- Acrilamida → 29 g
- Bis-acrilamida → 1 g

Aforar a 100 ml con Agua destilada.

b) Laemil (Buffer de carga 2x):

- Glicerol (20%) → 10 ml
- β- mercaptoetanol → 5 ml
- Tris base → 0.756 g
- SDS → 2.3 g
- Azul de Bromofenol → 0.05 g

Ajustar a un pH de 6.8

Aforar con Agua destilada a 50 ml

Alicuotar 10 ml/tubo Eppendorf de 1.5 ml, almacenar a -20°C.

c) Buffer de corrimiento electroforesis (2 litros):

- Tris base → 6.04 g
- Glicina → 37.6 g
- SDS 10% → 20 ml

Aforar a 2 litros con Agua destilada.

d) Azul de Coomassie (solución para teñir gel)

- Azul Brillante Coomassie R250 0.1% → 0.3 g
- Metanol 45% → 135 ml
- Ácido acético 10% → 30 ml

Completar a 300 ml con Agua destilada.

e) Solución para Desteñir gel:

- Metanol 10 % → 200 ml
- Ácido acético 5% → 100 ml

Aforar a 2 litros con Agua destilada

10.2. PREPARACIÓN DEL GEL DE ACRILAMIDA.

a) Gel SEPARADOR 12 %:

- Agua → 3.3 ml
- Acrilamida 30% → 4.0 ml
- Tris 1.5 M pH= 8.8 → 3.3 ml
- SDS 10 % → 100 µl
- Persulfato de Amonio 30% → 166 µl
- TEMED → 20 µl

b) Gel CONCENTRADOR 5 %:

- Agua → 2.1 ml
- Acrilamida 30% → 0.5 ml
- Tris 1.0 M pH= 6.8 → 0.38 ml

- SDS 10 % → 30 µl
- Persulfato de Amonio 30% → 45 µl
- TEMED → 11 µl

10.3. SOLUCIONES ADICIONALES PARA WESTERN BLOT

f) Buffer de Tranferencia WB:

- Tris base 25 nM → 1.51 g
 - Glicina 192 nM → 7.02 g
 - Metanol 20% → 100 ml
- c.b.p 500 ml, con agua destilada.

g) PBS 0.1 M pH= 7.4

- NaH₂PO₄ * 1 H₂O → 13.799 g
 - K₂HPO₄ → 17.418 g
 - NaCl 500 mM → 29.2 g
 - Tween 20 0.1% → 1 ml
- Aforar a 1 litro con Agua destilada.

10.4. REACTIVOS EMPLEADOS EN INMUNOCITOQUÍMICA.

a) Solución fijadora al 2% (6 ml):

- Gliceraldehído acuoso 50% → 120 µl
- PBS → 5,880 µl

b) Peróxido de Hidrógeno al 0.3% (6 ml):

- H₂O₂ 30% → 60 µl
- PBS → 5,940 µl

c) Sucrosa al 4.5% (20 ml):

- Sucrosa → 900 mg
- PBS → 20,000 µl

d) Solución Permeabilizadora al 0.25% (6 ml):

- Tritón X-100 (Stock 10%) → 150 µl
- PBS → 5,850 µl

e) Solución Bloqueadora (6 ml)

- Suero Normal → 600 µl
- Tritón X-100 (10%) → 150 µl
- BSA 1% → 600 µl
- PBS → 4,650 µl

f) Anticuerpo Primario (dilución 1:200):

Se prepara el anticuerpo primario en la misma solución bloqueadora. Para 1 ml:

- Solución Bloqueadora → 995 µl
- Anticuerpo → 5 µl

g) Anticuerpo Secundario biotinilado (dilución 1:500):

Se prepara el anticuerpo secundario biotinilado en la misma solución bloqueadora. Para 1 ml:

- Solución Bloqueadora → 998 µl
- Anticuerpo → 2 µl

h) Conjugado Streptoavidina-HRP (Reactivo ABC). Dilución 1:500 (6ml)

- Streptoavidina -HRP Conjugado → 12 µl
- PBS → 5,998 µl

Mezclar inmediatamente y dejar reposar 30 minutos antes de usar.

i) Cromógeno y sustrato de peroxidasa (4 ml), depende del kit comercial:

- Buffer acetato → 2 gotas
- Cromógeno → 1 gota
- H₂O₂ 3% → 1 gota
- Agua destilada → 4 ml

10.5. MEDIOS DE CULTIVO.

a) YEPS (Extracto de Levadura, Peptona, Sacarosa).

Formulación (g/l):

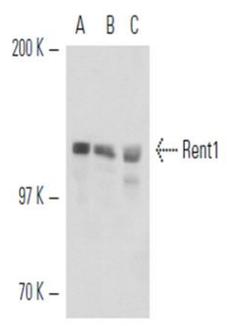
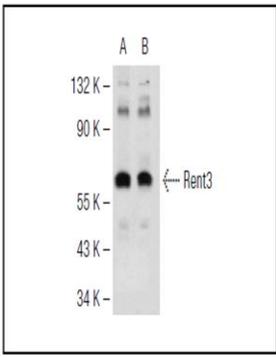
- Extracto de Levadura..... 10 g
- Peptona..... 5 g
- Glucosa..... 20 g
- Agar..... 16 g

Aforar a 1 litro, y esterilizar a 10 lbs de presión por 10 minutos para evitar que la glucosa del medio se caramelicé.

Mezclar o disolver para una mejor disolución (evitar grumos).

10.6 ANTICUERPOS UTILIZADOS.

RENT 1, RENT 2, RENT3:

CARACTERISTICAS DEL PRODUCTO	DESCRIPCIÓN.	IMÁGENES.
<p>⊗ El anticuerpo Rent1 (H:300) es un anticuerpo policlonal de conejo, su región de epítipo detectable es del aminoácido 70 al 370 cerca del N-terminal.</p> <p>⊗ El anticuerpo Rent2 (H:300) es un anticuerpo policlonal de conejo, su región de epítipo detectable es del aminoácido 121 al 420 de la región interna.</p> <p>⊗ El anticuerpo Rent3 (H:190) es un anticuerpo policlonal de conejo, su región de epítipo detectable es del aminoácido 51 al 240 cerca del N-terminal.</p>	<p>⊗ En eucariotas, es fundamental contar con la capacidad de detectar y degradar transcritos prematuros perjudiciales para las células. La vía NMD (decaimiento del ARNm mediada por sinsentido) protege el organismo evitando la traducción de péptidos truncados con efectos negativos o pérdida de la función proteica.</p> <p>⊗ Rent 1, un ortólogo en mamífero o Upf1p, es esencial para la viabilidad embrionaria. Rent1 (también designado regulador de transcritos "sin sentido" y hUpf1) contiene un N-terminal con dominios tipo finger-Zn , NTPasa y una región compuesta de dominios que definen a Rent1 de la superfamilia del grupo I ARN helicasa.</p> <p>⊗ La proteína Rent1 tiene actividad ATPasa y actividad helicasa 5 'a 3'. Adicionalmente, Rent1 es una proteína de unión al ARN cuya actividad está modulada por la ATP e interactúa directamente con Rent2, que es un homólogo de mamífero de Upf2p.</p> <p>⊗ Dos ortólogos de mamíferos: Upf3p, Rent3a y Rent3b, son codificadas por dos genes separados. Rent3b (también conocido como Rent3X) está codificado por un gen ligado X, se localiza principalmente en el núcleo, mientras que en Rent 1 y Rent2 son localizados principalmente en el citoplasma.</p>	 <p>Rent1 (H:300): Western Blot de la expresión se Rent1 en Sol8 (A) SK-N-SH (B) L6, C) lisados de células enteras.</p>  <p>Rent3 (H: 190): Western Blot de la expresión se Rent3 en SH-SY5Y (A) MES-SA/Dx5 (B) lisados de células enteras.</p>