



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA



INSTITUTO DE CIENCIAS

**CENTRO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS
MICROBIOLOGICAS**

MAESTRÍA EN MICROBIOLOGIA

**“Estudio de los factores de *splicing* y decaimiento del ARNm
sin sentido (NMD) en *Ustilago maydis*”**

TESIS

Que para obtener el grado de:
Maestra en Ciencias (Microbiología)

Presenta:

L.B.M. Kate Ariadna Rossano Gutiérrez

Directora de Tesis:

D. C. Rebeca Débora Martínez Contreras

Enero 2026



Puebla, Pue. a 20 de enero 2026.

A LA ACADEMIA DEL POSGRADO
EN MICROBIOLOGÍA
CICM-ICUAP
PRESENTE.

Por este conducto los abajo firmantes, integrantes del Comité revisor de tesis de Maestría de la alumna **Kate Ariadna Rossano Gutiérrez**, les informamos que hemos revisado el escrito titulado:

"Estudio de los factores *splicing* y decaimiento del ARNm sin sentido (NMD) en *Ustilago maydis*"

A nuestro juicio, la alumna **Kate Ariadna Rossano Gutiérrez** puede proceder a la digitalización de la tesis y a la presentación del examen de grado correspondiente.

Sin más que agregar, nos despedimos afectuosamente de ustedes.

Atentamente.
"Pensar Bien Para Vivir Mejor"


D.C. Lucía Soto Urzúa


D.C. Ricardo Carreño López


D.C. Sandra Raquel Reyes Carmona


D.C. María del Rocío Bustillos Cristales

Posgrado en Ciencias Microbiológicas
Instituto de Ciencias (ICUAP)

Edificio IC11,
Ciudad Universitaria
Col. San Manuel, Puebla, Pue. C.P. 72570
01 (222) 229 55 00 Ext. 2522
posgrado.microbiologia@correo.buap.mx

A JM y mi familia

Este trabajo de investigación fue realizado en el laboratorio de Ecología Molecular Microbiana dentro del grupo de investigación Biología Molecular y Celular de Hongos liderado por la D.C. Rebeca D. Martínez Contreras, Profesora e Investigadora Titular del Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas del Instituto de Ciencias de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (CICM-ICUAP-BUAP).

Así como deseo expresar mi más sincero agradecimiento a la **Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación (SECIHTI)** por el apoyo brindado a través de la beca 1281553, fundamental para la realización de este proyecto de investigación.

AGRADECIMIENTOS

A la D.C. Rebeca Martínez Contreras y la D.C. Nancy Martínez Montiel por permitirme trabajar en el laboratorio, así como brindarme la oportunidad de realizar una estancia en el Cinvestav. Gracias a ello, pude ampliar mis conocimientos, mejorar mis habilidades, crecer como persona y, sobre todo, conocer personas admirables. Sin esta experiencia, nada habría sido igual.

A mi comité tutorial por asesorarme durante mi trabajo de investigación

Al D.C. Jesús Valdés Flores del Departamento de Bioquímica del Cinvestav por recibirme y permitirme concluir mis experimentos en su laboratorio. Así como su asesoramiento durante mi estancia.

A la D.C. Elba por guiarme y aconsejarme junto con JM durante mis experimentos de Western blot. Así como corroborar mis experimentos y darme otra visión con respecto a mis estudios.

Al Técnico Martín por lavar y esterilizar todo mi material durante mi estancia en Cinvestav. Te ofrezco una disculpa por ensuciarte tanto material, en especial tubos, pero necesitaba trabajar jaja. Muchas gracias por tu amistad y por colocar el café en las mañanas cuando estaba saturada de trabajo.

Al Maestro Pedro por facilitarme equipos y reactivos durante mi estancia en Cinvestav cuando los requería. Fue un gusto conocerlo y haber desayunado con usted.

A Javier y Janiel por facilitarme el sonicador cuando lo requería.

A mi mejor amigo Gil porque cada vez que me sentía mal o necesitaba de un consejo, siempre estuvo para escucharme y terapiarme incluso estando a cientos de kilómetros. Además que me ha demostrado el verdadero significado de la amistad, perdonar todas mis burradas en el salón de clases y soportarme, que no es sencillo. Te quiero mucho amigo.

A la Diana, que se convirtió en una gran amiga cuando nunca lo fue en la licenciatura debido a que jamás interactuamos. Ella asegura que la odiaba, pero no es así. De ella aprendí a llevarme todo más tranquilo y disminuir mi locura por la perfección. Gracias por cuidarme cuando fue necesario, los viajes, las anécdotas y los momentos de diversión.

A Ana Karen, Mariana, que junto con Diana y Gil nos convertimos en un grupo de supervivencia en esta dura travesía llamada "Maestría", pues cuando era necesario nos reuníamos en nuestras tardes de juegos para desestresarnos y contar todas

nuestras tragedias en el laboratorio. Los voy a extrañar a todos ustedes y a nuestras reuniones.

A Monse y Citlali, mis amigas tanto en clase como en el laboratorio, que cada que necesitábamos algo en el laboratorio, nos ayudábamos. Además que aprovechaba cualquier oportunidad para irles a platicar jaja :)

A mi perruna Kira por acompañarme todas las noches de desvelo durante la maestría. Ella representa el verdadero símbolo de la lealtad.

Al Q.F.B José Manuel Galindo, mi buen estimado JM. No existen palabras suficientes para agradecer todo lo que hizo por mí durante mi estancia en Cinvestav. Usted desempeña un papel fundamental tanto en este proyecto como en mi crecimiento académico. Agradezco infinitamente el tiempo invertido en enseñarme todas las metodologías, consejos y tips de la biología molecular.

Índice

Dedicatoria.....	3
Agradecimientos	4
Índice	7
Lista de Tablas.....	11
Lista de Figuras	12
Lista de Gráficas	14
Lista de Anexos	14
Lista de Abreviaturas y/o Siglas	15
RESUMEN	18
ABSTRACT	19
1. INTRODUCCIÓN	20
2. ANTECEDENTES GENERALES	22
2.1 Regulación de la expresión genética	22
2.2 <i>Splicing</i> como regulador de la expresión génica	22
2.3 Decaimiento del ARNm sin sentido (NMD).....	24
2.4 Sustratos reconocidos por la vía NMD	25
2.5 Factores involucrados en la activación de la vía de decaimiento del ARNm sin sentido	27
2.5.1 Factores centrales	28
2.5.1.1 UPF1.....	28
2.5.1.2 UPF2.....	29
2.5.1.3 UPF3.....	29
2.5.1.4 Proteínas homólogas a los factores centrales en otros organismos	31
2.5.2 Factores asociados a la vía NMD	31
2.5.2.1 Factores asociados al complejo CAP y NMD	31
2.5.2.2 Fosfatasas y cinasas.....	32
2.5.2.3 Componentes del núcleo de EJC	32
2.5.2.4 Componentes periféricos del EJC	33
2.6 Mecanismo de activación de la vía de decaimiento del ARNm sin sentido en levaduras	35

2.7	Mecanismo de activación de la vía de decaimiento del ARNm sin sentido en mamíferos	37
2.8	Enfermedades humanas relacionadas a la alteración en la vía de decaimiento del ARNm sin sentido	39
2.9	<i>Mycosarcoma maydis</i> como modelo de estudio	40
3.	Antecedentes Específicos	42
4.	Justificación	49
5.	Hipótesis	50
6.	Objetivos	51
6.1	Objetivo General	51
6.2	Objetivos específicos.....	51
7.	Materiales y Métodos	52
7.1	Análisis Bioinformático	52
7.2	Material biológico y metodología experimental	52
7.2.1	Cepas de <i>Escherichia coli</i> y plásmidos utilizados	52
7.2.2	Medios de cultivo	53
7.2.3	Técnicas de transferencia génica	55
7.2.3.1	Transformación de células de <i>E. coli</i> DH5- α con Cloruro de calcio.....	55
7.2.3.1.1	Preparación de células competentes.....	55
7.2.3.1.2	Transformación de células por choque térmico	55
7.2.3.2	Transformación de células de <i>E. coli</i> BL21 y variantes con Cloruro de Rubidio	56
7.2.3.2.1	Preparación de células competentes.....	56
7.2.3.2.2	Transformación de células competentes por choque térmico	56
7.2.4	Técnicas Generales de Biología Molecular.....	57
7.2.5	Técnicas Experimentales con ácidos nucleicos	57
7.2.5.1	Extracción de ADN plasmídico de <i>E. coli</i> DH5- α mediante lisis alcalina	57
7.2.5.2	Extracción de ADN plasmídico de <i>E. coli</i> DH5- α y BL21 mediante CTAB	57
7.2.5.3	Extracción de ARN de <i>M. maydis</i> con trizol	58

7.2.5.4	Electroforesis de ADN y ARN de <i>M. maydis</i> en geles de agarosa	59
7.2.5.5	Retrotranscripción a partir de ARN de <i>M. maydis</i>	59
7.2.5.6	Amplificación de Fragmentos de ADN mediante PCR	59
7.2.5.7	Uso de Enzimas de Restricción para el análisis del ADN plasmídico ..	61
7.2.5.8	Purificación y concentración de ADN plasmídico.....	62
7.2.5.9	Secuenciación de las construcciones Upf1 pProEX-HTb y Upf2 pProEX-HTb	62
7.2.6	Técnicas para la síntesis de proteínas recombinantes.....	62
7.2.6.1	Inducción de las proteínas recombinantes RNPS1 y UPF1CH.....	62
7.2.6.2	Electroforesis de las proteínas recombinantes RNPS1 y UPF1-CH	63
7.2.6.3	Tinción de geles de Poliacrilamida con Azul de Coomassie	63
7.2.7	Purificación de las proteínas recombinantes RNPS1 y UPF1-CH	64
7.2.8	Técnicas para solubilización de proteínas	65
7.2.8.1	Solubilización de proteínas con Sarkosyl.....	65
7.2.8.2	Desnaturalización de las proteína recombinante RNPS1 con urea.....	65
8.	Resultados	67
8.1	Análisis comparativo de la maquinaria de NMD en hongos	67
8.1.1	Factores centrales de la vía NMD	70
8.1.2	Factores asociados al complejo CAP	71
8.1.3	Fosfatasas y cinasas	72
8.1.4	Factores asociados al complejo EJC	73
8.1.5	Proteínas transitorias y asociadas al complejo EJC	75
8.1.6	Factores que participan en la disociación del ribosoma	76
8.1.7	Factores que participan en la degradación del ARNm	76
8.1.8	Factores implicados en la activación de la vía NMD en <i>Mycosarcoma maydis</i>	77
8.2	Expresión de los transcritos Rnps1, Upf1, Upf2, Upf3, Hbs1 y Magoh en <i>Mycosarcoma maydis</i>	78
8.3	Comprobación por PCR de las construcciones umUpf1, umUpf2 y umUpf3.	80
8.4	Comprobación por digestión con enzimas de restricción de las construcciones umUpf1, umUpf2 y umUpf3	81

8.5	Secuenciación de las proteínas recombinantes para los homólogos de UPF1-CH y UPF2 en <i>Mycosarcoma maydis</i>	82
8.6	Sobreexpresión de la proteína recombinante homóloga UPF1-CH	85
8.7	Sobreexpresión de la proteína recombinante homóloga RNPS1	91
9.	Discusión de resultados	99
9.1	Análisis comparativo de la maquinaria NMD en hongos	99
9.2	Sobreexpresión de los transcritos Rnps1, Upf1, Upf2, Upf3, Magoh y Hbs1 en <i>Mycosarcoma maydis</i>	101
9.3	Comprobación de la integridad de las construcciones UPF1-CH y UPF2	101
9.4	Análisis de la expresión de las proteínas recombinantes UPF1-CH y RNPS1	102
10.	Conclusiones	106
11.	Perspectivas	107
	Bibliografía	108
	Anexos	116

Lista de Tablas

Tabla 1. Clasificación funcional de las proteínas de *M. maydis* y humano

Tabla 2. Cepas utilizadas para clonación y expresión de proteínas recombinantes

Tabla 3. Cepas fúngicas utilizadas

Tabla 4. Vectores utilizados para la producción de proteínas recombinantes

Tabla 5. Medio de cultivo Luria Bertani

Tabla 6. Medio de cultivo SOB

Tabla 7. Medio de cultivo Terrific Broth

Tabla 8. Medio de cultivo YEPS

Tabla 9. Oligonucleótidos y condiciones de PCR

Tabla 10. Condiciones de uso de las enzimas de restricción

Tabla 11. Características de los oligonucleótidos utilizados para secuenciación

Tabla 12. Características y funciones de los factores asociados a NMD

Lista de Figuras

- Figura 1. Modificaciones moleculares en la maduración del ARNm.**
- Figura 2. Mecanismo general del *splicing* constitutivo.**
- Figura 3. Señal de activación de la vía NMD.**
- Figura 4. Principales sustratos reconocidos por la vía NMD.**
- Figura 5. Estructuras y sitios de interacción entre los factores centrales de la vía NMD.**
- Figura 6. Maquinaria involucrada en la activación de la vía NMD.**
- Figura 7. Mecanismo NMD en levaduras.**
- Figura 8. Mecanismo NMD en mamíferos.**
- Figura 9. Comparación del proteoma de *S. cerevisiae*, *M. maydis* y *H. sapiens*.**
- Figura 10. Enfermedad del carbono en el maíz.**
- Figura 11. Comparación estructural en UPF1 de *M. maydis* y *H. sapiens*.**
- Figura 12. Comparación de secuencias aminoacídicas de hUpf1 y umUpf1.**
- Figura 13. Interacción de UPF1 con diferentes proteínas.**
- Figura 14. Presencia de los genes umUpf1, umUpf2 y umUpf3 en *M. maydis* FB1.**
- Figura 15. Construcción de los vectores para las proteínas recombinantes umUpf1-CH, umUpf2 y umUpf3.**
- Figura 16. Transcritos regulados por NMD en *M. maydis* FB1.**
- Figura 17. Interrupción de Upf1 en la cepa FB1 de *M. maydis*.**
- Figura 18. Factores involucrados en la activación de la vía NMD en hongos.**
- Figura 19. Factores asociados a la vía NMD en *M. maydis*.**
- Figura 20. Verificación de la extracción de ARN total de *M. maydis*.**
- Figura 21. Expresión de los genes umRnps1, umUpf1, umUpf2, umUpf3, umMagoh y umHbs1.**
- Figura 22. Identificación de la inserción de los genes umUpf1, umUpf2 y umUpf3 en vectores de expresión.**
- Figura 23. Identificación de los insertos por digestión con enzimas de restricción.**

Figura 24. Secuenciación de la proteína recombinante Upf1CH pProEx-HTb.

Figura 25. Secuenciación de la proteína recombinante Upf2 pProEx-HTb.

Figura 26. Sobreexpresión de la proteína recombinante UPF1-CH en *E. coli* BL21.

Figura 27. Sobreexpresión de la proteína recombinante UPF1-CH en *E. coli* BL21 con diferentes concentraciones del inductor.

Figura 28. Sobreexpresión de la proteína recombinante UPF1-CH en *E. coli* BLCP.

Figura 29. Sobreexpresión de la proteína recombinante UPF1-CH en *E. coli* BLCP a baja temperatura de incubación.

Figura 30. Sobreexpresión de la proteína recombinante UPF1-CH en *E. coli* SoluBL21.

Figura 31. Purificación de la proteína recombinante UPF1-CH.

Figura 32. Sobreexpresión de la proteína recombinante RNPS1 en *E. coli* BL21.

Figura 33. Purificación de la proteína recombinante RNPS1.

Figura 34. Sobreexpresión de la proteína recombinante RNPS1 en *E. coli* BL21 a baja temperatura de incubación.

Figura 35. Sobreexpresión de la proteína recombinante RNPS1 en *E. coli* BL21 con distintas concentraciones del inductor.

Figura 36. Purificación de la proteína recombinante RNPS1.

Figura 37. Proteína recombinante RNPS1 tratada con sarkosyl al 0.3%, 0.5% y 1%.

Figura 38. Sobreexpresión de la proteína recombinante RNPS1 en *E. coli* SoluBL21 con diferentes concentraciones del inductor.

Figura 39. Sobreexpresión de la proteína recombinante RNPS1 en *E. coli* SoluBL21.

Figura 40. Proteína recombinante RNPS1 tratada con urea al 8M.

Lista de Gráficas

Gráfica 1. Número de hongos analizados con base a su clasificación por *phylum*.

Gráfica 2. Número de ascomicetos analizados con base a su clasificación por orden.

Gráfica 3. Número de basidiomicetos analizados con base a su clasificación por orden.

Lista de Anexos

Anexo 1. Vía de vigilancia del ARNm.

Anexo 2. Tamaño de los factores centrales y asociados a NMD en *M. maydis* y *H. sapiens*.

Anexo 3. Tabla de distribución de los diferentes factores relacionados en la activación de NMD en hongos.

Lista de Abreviaturas y/o Siglas

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN complementario
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
pre-ARNm	ARN mensajero prematuro
ARNt	ARN de transferencia
SA	Splicing alternativo
snRNP	Ribonucleoproteínas nucleares pequeñas
NMD	Degradación del ARNm sin sentido
PTC	Codon de terminación prematuro
EJC	Complejo unión exón-exón
UPFs	Proteínas up-frameshift
3'UTR	Región no traducida en el extremo 3'
5'UTR	Región no traducida en el extremo 5'
ORF	Marco de lectura abierto
uORF	Marco de lectura abierto río arriba
lncRNA	ARN no codificantes largos
ATP	Adenosín trifosfato
GTP	Guanosina trifosfato
SQ	Serina/Glutamina
CH	Cisteína/Histidina
Cap	Metilación en el extremo 5'
CBC	Complejo de unión al <i>cap</i>
CBP	Proteínas de unión al <i>cap</i>
PABPC1	Proteína citoplasmática de unión a la cola poliA
PABPN1	Proteína nuclear de unión a poliA
5' m ⁷ GpppN	Modificación 7'metilguanosina en el extremo 5'
eRFs	Factores de liberación
PP2A	Proteína fosfatasa 2A
NES	Señal de exportación nuclear
RRM	Motivo de Reconocimiento a ARN
SMG	Proteínas supresoras con efecto morfogénico, que participan en NMD
SR	Serina/Arginina
ASAP	Complejo proteico asociado al <i>splicing</i> y la apoptosis, conformado por ACIN1, SAP18 y RNPS1
DMD	Distrofia Muscular de Duchenne
HER2	Receptor del factor de crecimiento epidérmico humano 2
SURF	Complejo proteico conformado por SMG1, UPF1, eRF1 y eRF3
DECID	Complejo inductor de desintegración
Dcp1	Activador que recluta a Dcp2

Dcp2	Enzima que remueve el cap 5'
CCR4-NOT	Complejo proteico que regula el metabolismo del ARN
Xrn1	Exorribonucleasa en sentido 5' → 3'
Ski	Cofactor citoplasmático del exosoma que degrada el ARN en sentido 3' → 5'
Pab1	Proteína de unión a la cola poliA
QS	Glicina/Serina
MAGOH	Proteína homóloga de Mago
MLN51	Componente del complejo de unión exón-exón
SAP18	Proteína asociada a Sin3A
RNPS1	Proteína de unión a ARN con dominio rico en serina 1
Y14	Proteína que participa en la exportación nuclear del ARNm y NMD
ACIN1	Inductor de la condensación de cromatina apoptótica 1
HBS1	Proteína citoplasmática, homóloga a eRF3
Dom34	Proteína que detecta ribosomas retenidos
KEGG	Enciclopedia de Genes y Genomas de Kyoto
NCBI	Centro Nacional para la información Biotecnológica
BL21	Cepa de expresión derivada de <i>E. coli</i>
BLCP	Cepa de expresión derivada de <i>E. coli</i> BL21, Codon Plus
SoluBL21	Cepa de expresión derivada de <i>E. coli</i> BL21, que mejora la solubilidad de proteínas recombinantes
YEPS	Medio de cultivo Extracto de lavadura, Peptona y Sacarosa
TB	Medio de cultivo Terrific Broth
SOB	Medio de cultivo Super Optimal Broth
LB	Medio de cultivo Luria Bertani
Amp	Ampicilina
UFC	Unidad Formadora de Colonias
CaCl ₂	Cloruro de Calcio
RbCl ₂	Cloruro de Rubidio
MOPS	Ácido 3-(N-morfolino) propanosulfónico
CTAB	Cetiltrimetilamonio
EDTA	Ácido Etilendiaminotetraacético
NaCl	Cloruro de Sodio
STET	Buffer (Tris-HCl, EDTA, NaCl y Triton)
D.O	Densidad óptica
KOH	Hidróxido de potasio
TAE	Tris-acetato-EDTA
MgSO ₄	Sulfato de Magnesio
MnCl ₂	Cloruro de Manganeseo
HCl	Ácido clorhídrico
NaOH	Hidróxido de Sodio
SDS	Dodecil Sulfato de Sodio
PBS	Buffer salino de fosfatos

M-MuLV	Enzima Retrotranscriptasa M-MuLV
dNTP	Desoxirribonucleótidos trifosfato
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
Fwd	Oligonucleótido <i>Forward</i>
Rev	Oligonucleótido <i>Reverse</i>
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa
Tm	Temperatura de fusión
IPTG	Isopropil β -D-1-tiogalactopiranosido
SDS-PAGE	Electroforesis gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes
APS	Amonio Persulfato
TEMED	Tetrametiletilendiamina
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsufonilo (Inhibidor de proteasas)
DTT	Ditiotreitol
Ni-NTA	Niquel- ácido nitrilo acético- agarosa
NaH ₂ PO ₄	Fosfato monosódico
STO1	Proteína homóloga a CBP80 en levaduras
NAM7	Homólogo de UPF1
UAP56	Helicasa de ARN dependiente de ATP
SRM160	Proteína nuclear rica en serina/arginina
NTF2	Factor de transporte nuclear 2
PPP2R1	Subunidad 1 de la fosfatasa 2A
PPP2R2	Subunidad 2 de la fosfatasa 2A
PPP2R5	Subunidad 5 de la fosfatasa 2A
6xHis	Etiqueta de seis histidinas
kDa	kilodaltons
pb	pares de base
DEAE	dietilaminoetilo

RESUMEN

El proceso de decaimiento del ARNm sin sentido (NMD, por sus siglas en inglés Nonsense Mediated mRNA Decay) es una vía central de control de calidad que detecta y degrada transcritos que contienen codones de terminación prematuro (PTC, por sus siglas en inglés Premature Termination Codon), evitando así la síntesis de proteínas aberrantes. En *Mycosarcoma maydis* (anteriormente *Ustilago maydis*), aproximadamente el 40% de los genes contienen intrones y sufren eventos de *splicing* alternativo, principalmente eventos de retención de intrones, lo que puede generar PTC y activar la vía NMD. En este trabajo, realizamos un análisis comparativo de 32 factores relacionados con NMD en 187 especies fúngicas. Nuestros resultados muestran que algunos componentes como MLN51, SMG1 y SMG5 están ausentes en varios hongos y podrían no ser esenciales para el funcionamiento de la vía. Además que ascomicetos y basidiomicetos exhibieron la maquinaria NMD más compleja con hasta 21 factores centrales y asociados. Estos hallazgos indican que la composición de NMD es diferencial entre los diferentes grupos de hongos y que ciertos factores podrían ser reemplazados por proteínas homólogas o mecanismos alternativos. Experimentalmente, confirmamos la presencia y sobreexpresión de los genes *Upf1*, *Upf2*, *Upf3*, *Rnps1*, *Magoh* y *Hbs1* en *M. maydis*. También, logramos verificar que las construcciones *Upf1* y *Upf2* mantienen su integridad estructural para la correcta producción de las proteínas recombinantes. Asimismo, logramos sobreexpresar las proteínas recombinantes RNPS1 y UPF1-CH en *Escherichia coli* SoluBL21 a diferentes concentraciones del inductor. Las proteínas recombinantes generadas en este trabajo proporcionan una base para futuros estudios en la interacción de proteínas asociadas a la activación de la vía NMD.

ABSTRACT

Nonsense-mediated mRNA decay (NMD) pathway is a central quality control Mechanism that detects and degrades transcripts containing premature Termination codons (PTCs), thereby preventing the synthesis of aberrant proteins. In *Mycosarcoma maydis* (previously *Ustilago maydis*), approximately 40% of genes contain introns and undergo alternative splicing events, primarily intron retention, which can generate PTCs and activate the NMD pathway. In this study, we performed a comparative análisis of 32 NMD related factors across 187 fungal species. Our results show that some components, such as MLN51, SMG1 and SMG5, are absent in several fungi and may not be essential for pathway function. Additionally, ascomycetes and basidiomycetes exhibited the most complex NMD machinery, comprising up to 21 core and associated factors. These findings indicate that NMD composition varies among fungi and that certain factors may be replaced by homologous proteins or alternative mechanisms. Experimentally, we confirmed the presence and expression of the *Upf1*, *Upf2*, *Upf3*, *Rnps1*, *Magoh* and *Hbs1* genes in *M. maydis*. We also verified that the Upf1 and Upf2 constructs maintain their structural integrity, allowing proper production of the corresponding recombinant proteins. Furthermore, we successfully overexpressed the recombinant proteins RNPS1 and UPF1-CH in *Escherichia coli* SoluBL21 using different inducer concentrations. The recombinant proteins generated in this work provide a foundation for future studies on protein-protein interactions involved in NMD pathway activation.

1. INTRODUCCIÓN

La expresión génica de organismos eucariotas es un proceso altamente regulado por distintos mecanismos transcripcionales y traduccionales, que garantizan la formación de proteínas funcionales y estables, como lo es la vía del decaimiento del ARNm sin sentido (NMD, por sus siglas en inglés: Non sense Mechanism Decay). NMD es un mecanismo de control de calidad de los ARNm, que reconoce codones de terminación prematuros (PTC's, por sus siglas en inglés: Premature Termination Codons) y los lleva a su degradación, lo que previene la traducción de transcritos aberrantes. Existen factores centrales en *trans* que se encargan de esto, como las proteínas UPF1, UPF2 y UPF3 (UPF, por sus siglas en inglés UP-Frameshift). Otro tipo de factores asociados a NMD son RNPS1, U1-70K y SRm160, que participan en el *splicing*, sin embargo, se desconoce la relación entre estos dos mecanismos. Se ha visto que alrededor del 40% de los genes de *M. maydis* se encuentran interrumpidos por intrones, de manera que sufre eventos de *splicing* alternativo, que en su mayoría son la retención de intrones, lo cual podría llevar a la formación de PTC y la activación de la vía NMD. El estudio de los factores de NMD, así como su asociación con el *splicing* nos permitirá comprender su regulación y función en la degradación de transcritos aberrantes bajo condiciones celulares normales y de inhibición.

En este trabajo se realizó un análisis comparativo de la expresión de 32 factores, involucrados en la activación de la vía NMD, en 187 hongos donde se observó que factores como MLN51, SMG1 y SMG5 no están presentes y podrían no ser esenciales para la ruta. Además que los ascomicetos y basidiomicetos son los grupos que poseen la maquinaria NMD más compleja, pues se encontró la presencia de 21 factores implicados en la activación de esta vía. Experimentalmente, se demostró la sobreexpresión de los genes *Upf1*, *Upf2*, *Upf3*, *Rnps1*, *Magoh* y *Hbs1* por PCR en *M. maydis*. También, se realizó la construcción y sobreexpresión de las proteínas recombinantes UPF1, UPF2, UPF3 y RNPS1. Los resultados sugieren que no todos los factores de la vía NMD están presentes en hongos, pues algunos pueden ser sustituidos por proteínas homologas o

mecanismos alternos. Además de haber obtenido exitosamente las recombinantes de UPF1, UPF2, UPF3 y RNPS1 que serán de gran ayuda para estudiar sus interacciones en el futuro. De esta manera comprender más a cerca del mecanismo en el hongo y el humano para proponer terapias alternas contra cáncer y enfermedades genéticas.

2. ANTECEDENTES GENERALES

2.1 Regulación de la expresión genética

Las células contienen información genética necesaria para sintetizar nuevas proteínas, las cuales son fundamentales para el correcto desarrollo y funcionamiento del organismo. Este proceso se denomina expresión genética (Salazar-Montes y cols., 2016). Todos los organismos poseen genes cuya expresión debe ser regulada, ya que no todos se expresan simultáneamente ni en todas las células. La regulación de la expresión génica en eucariontes es un proceso que implica una serie de pasos interconectados, que se da en varios niveles; transcripcional, traduccional y postraduccional (Fatscher y cols., 2015; Karp y cols., 2019). Estos procesos abarcan, entre otros, el silenciamiento génico, la edición y el procesamiento por *splicing*, todos ellos fundamentales para garantizar una expresión precisa y controlada de genes (Martínez-Montiel, 2016).

2.2 *Splicing* como regulador de la expresión génica

Una vez que el ADN es transcrito a ARN mensajero (ARNm), este experimenta una serie de modificaciones que confieren estabilidad y funcionalidad al transcrito, entre ellas se encuentran: 1) la adición de la cubierta en el extremo 5', 2) la poliadenilación

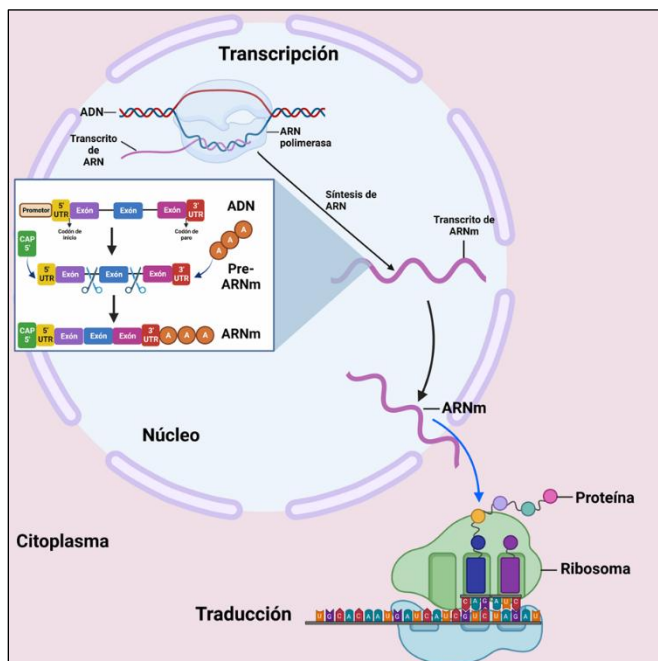
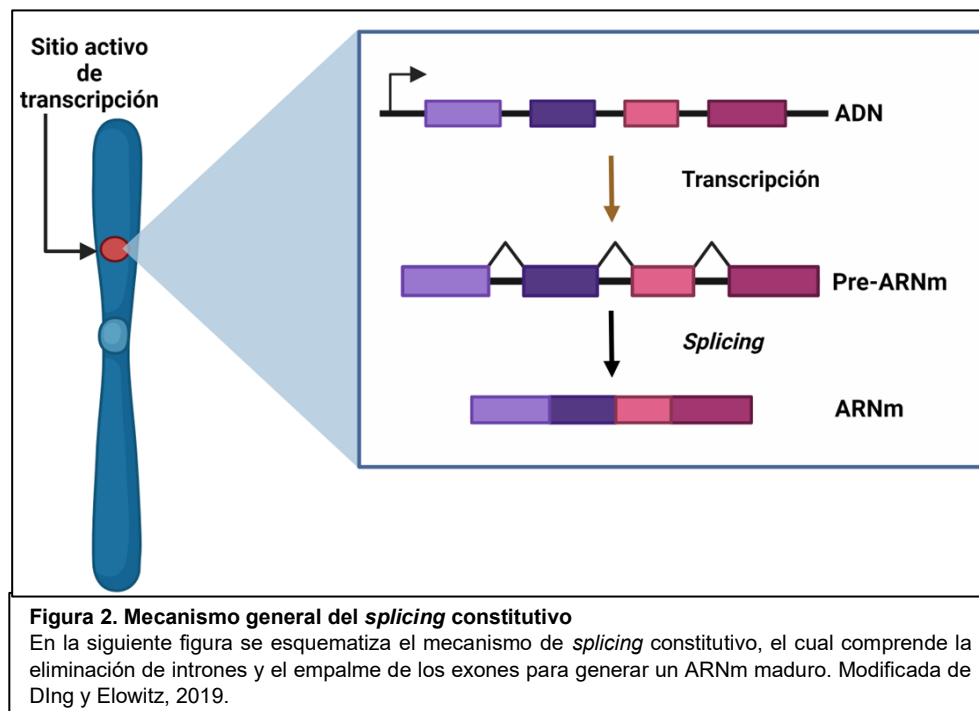


Figura 1. Modificaciones moleculares en la maduración del ARNm.

En el siguiente esquema se ilustran las modificaciones moleculares que sufre el pre-ARNm para dar lugar al ARNm maduro, incluyendo la adición de la caperuza en el extremo 5', la poliadenilación y el *splicing*. Modificada de Bartlett y cols., 2013

del extremo 3' y 3) el *splicing* (**Figura 1**) (Gutiérrez y cols., 2021; Martínez-Montiel y cols., 2018).

El *splicing* es el corte y empalme preciso de secuencias no codificantes (intrones) y secuencias codificantes (exones), respectivamente, proceso indispensable para generar un ARNm maduro que posteriormente será traducido a proteína (**Figura 2**) (Sciarrillo y cols., 2020). A menudo, este mecanismo suele ser tan preciso que no genera variabilidad proteica, aunque si regula los niveles de ARNm en la célula. Por ello, la diversidad de proteínas se debe principalmente al *splicing alternativo* (Ding y Elowitz, 2019).



El *splicing alternativo* (SA, por sus siglas en inglés: Splicing Alternative) es un mecanismo co-transcripcional, que regula la expresión génica mediante la eliminación y ligación diferencial de intrones y exones, permitiendo así la producción de múltiples transcritos y proteínas a partir de un mismo pre-ARNm (Baralle y Baralle, 2021). Este proceso es realizado por el espliceosoma, un complejo proteico dinámico conformado por ribonucleoproteínas nucleares pequeñas (snRNP, por sus siglas en inglés: Small Nuclear Ribonucleoproteins) U1, U2, U4, U5 y U6. Cabe resaltar que este mecanismo es exclusivo de organismos eucariotas, de hecho, se

estima que aproximadamente el 95% de los genes humanos experimentan al menos un evento de SA (Kim y cols., 2018).

Aunque el SA depende tanto de factores reguladores en *trans* como de secuencias reguladoras en *cis*, su precisión puede verse comprometida por mutaciones en estas regiones o por alteraciones en la expresión de los factores de SA. Dichas perturbaciones pueden conducir a la generación de isoformas aberrantes, las cuales se han asociado a diversas patologías, incluyendo enfermedades hepáticas, trastornos musculares y cáncer (Baralle y Baralle, 2021; Martínez-Montiel y cols., 2018; Sciarrillo y cols., 2020). Particularmente en cáncer de mama, se ha observado que la sobreexpresión de determinadas isoformas derivadas del SA favorece procesos como la proliferación celular, la invasión, la transición epitelio-mesénquima, la evasión de la apoptosis y la resistencia a antineoplásicos (Gutiérrez y cols., 2021).

Recientemente, se han descrito mecanismos moleculares capaces de detectar y eliminar transcritos aberrantes generados por SA, entre los cuales destaca la vía de decaimiento mediado por codones sin sentido (NMD, por sus siglas en inglés: Nonsense Mediated mRNA Decay) (Staszewski y cols., 2023). Tradicionalmente, el SA y el NMD son mecanismos que se han estudiado como independientes, sin embargo, podría existir una interrelación entre ambos. Por ejemplo, se ha identificado la participación de proteínas del complejo espliceosomal en la activación de NMD, como la snRNPS U1-70K. A pesar de ellos, aun no se ha determinado con certeza si esta relación ocurre de manera dependiente o independiente (Martínez-Montiel y cols., 2016).

2.3 Decaimiento del ARNm sin sentido (NMD)

NMD es un mecanismo de control de calidad de los ARNm, que reconoce codones de terminación prematuros (PTC's, por sus siglas en inglés: Premature Termination Codons) y desencadena la degradación del transcrito, evitando así la síntesis de proteínas truncadas (Embree y cols., 2022; Lejeune, 2022). Estos PTC's se localizan alrededor de 50-55 nucleótidos río arriba del último sitio de unión exón-

exón y se originan por mutaciones en el genoma, reordenamientos genómicos y errores en el SA e iniciadores de traducción alternativa (**Figura 3**) (Fatscher y cols., 2015; Nogueira y cols., 2021). Además, NMD cumple con una función reguladora en la expresión de los genes, pues modula los niveles de algunos transcritos (Lejeune, 2022). En humanos, se estima que regula alrededor del 10% del transcriptoma, lo cual se refleja en diferentes procesos celulares como: el desarrollo, la proliferación, la diferenciación, el estrés celular y las respuestas inmunitarias (Nagar y cols., 2023).

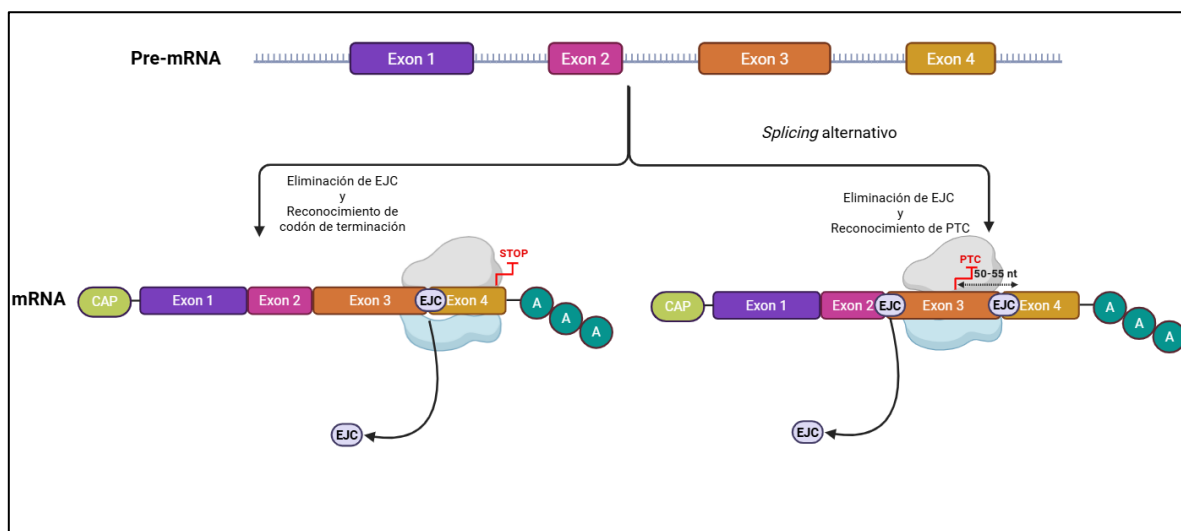


Figura 3. Señal de activación de la vía NMD.

En la figura se muestran dos escenarios posibles posteriores al procesamiento del transcrito: a) Durante la traducción normal, el ribosoma avanza a lo largo del ARNm retirando uno a uno los complejos de unión exón-exón (EJC) depositados durante el *splicing*, hasta reconocer el codón de parada. B) En contraste, la activación de la vía NMD ocurre cuando tras el avance del ribosoma, persiste un EJC localizado río abajo del codón de parada. Esta señal es interpretada como un codón de parada prematuro, lo que induce la detención del ribosoma y el reclutamiento de los factores asociados a la vía NMD. Modificada de Martínez-Montiel, 2016.

2.4 Sustratos reconocidos por la vía NMD

Para garantizar el correcto funcionamiento de la célula, la maquinaria de NMD supervisa los transcritos que son exportados del núcleo al citoplasma durante la primera ronda de traducción. Este proceso de vigilancia se basa, de manera clásica, en el reconocimiento de PTC, lo que conduce al arresto del transcrito, paro de la traducción y a la posterior degradación del ARNm aberrante (Barbarin-Bocahu y cols., 2024; Das y Panigrahi, 2024; Lejeune, 2022). No obstante, se ha demostrado

que la vía NMD, también, puede activarse en respuesta a otros tipos de sustratos o señales moleculares, tales como **(Figura 4)**:

- a) **PTC introducido por mutaciones y/o errores:** El ARNm presenta PTC localizados 50-55 nucleótidos río arriba de un EJC (Fatscher y cols., 2015).
- b) **3' UTR largo:** Los transcritos que presentan una región no traducida en el extremo 3' larga (3' UTR, por sus siglas en inglés: Three prime UnTranslated Region) tienen una mayor probabilidad de activar la vía, debido a que la proteína PABPC1 no logra interactuar con el complejo de terminación de la traducción. Esta falta de interacción favorece el reconocimiento del ARNm como aberrante y su posterior degradación (Nogueira y cols., 2021). Además, se ha sugerido que las regiones más largas pueden hacer distinción entre la terminación normal y prematura, lo que aumenta la probabilidad de reconocimiento de UPF1 con el ribosoma (Yi y cols., 2022).
- c) **ARN no codificantes:** Los ARN no codificantes largos (lncRNA, por sus siglas en inglés: Long non-coding RNA) también forman parte de los sustratos de la vía NMD, ya que aproximadamente el 17% de estos son detectados por este mecanismo (Behera y cols., 2024). A pesar de poseer codones de terminación canónicos (UAA, UAG, UGA), sus características estructurales los hacen susceptibles a la activación de NMD (Barbarin-Bocahu y cols., 2024).
- d) **Retención de intrones con PTC:** El ARNm presenta PTC localizados dentro de intrones retenidos. La inclusión de estas secuencias suele estar asociada a eventos de *splicing* alternativo, lo que da lugar a la generación de ARNm aberrantes susceptibles a la vía NMD (Das y Panigrahi, 2024).
- e) **uORF en 5'UTR:** El ARNm contiene un marco de lectura río arriba (uORF, por sus siglas en inglés: Upstream Open Reading Frames) en la región no traducida 5' (5' UTR, por sus siglas en inglés: Five prime UnTranslated Region) (Yi y cols., 2022).
- f) **Retención de exones con PTC:** Los PTC surgen a partir de la inclusión de exones durante el *splicing* alternativo, lo que altera el marco de lectura abierto (ORF, por sus siglas en inglés Open Reading Frame)(Das y Panigrahi, 2024).

- g) Selenoproteínas:** La selenocisteína es un aminoácido codificado por el triplete UAG. En ausencia de selenio o de los elementos necesarios para su recodificación, el UAG es reconocido como un PTC, lo cual favorece la activación de la vía (Lejeune, 2022).

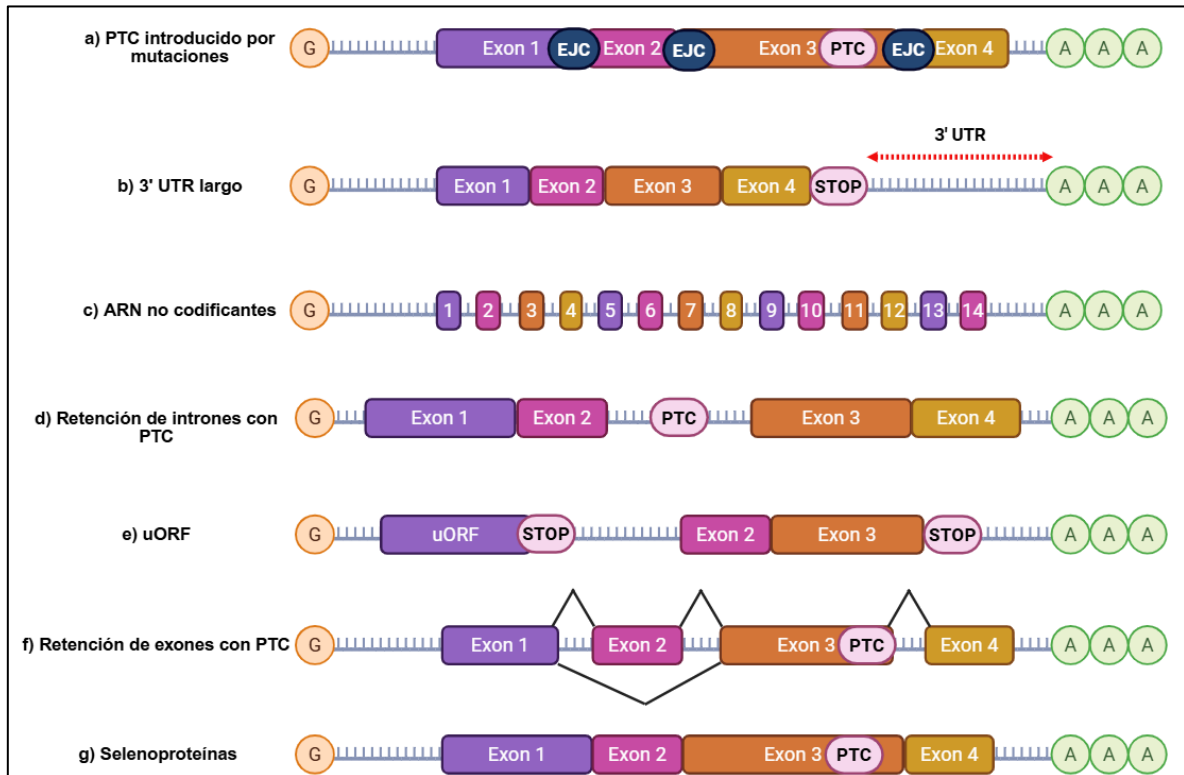


Figura 4. Principales sustratos reconocidos por la vía NMD.

La vía NMD puede activarse en respuesta a diversas señales moleculares, entre las que se incluye: a) PTC introducido por mutaciones, b) 3'UTR largo, c) ARN no codificante, d) Retención de intrones con PTC, e) uORF, f) Retención de exones con PTC y g) selenoproteínas. En todos los casos, el ARNm presenta una caperuza (círculo naranja) en el extremo 5'. Los rectángulos de colores representan regiones codificantes y/o exones, mientras que las líneas grises corresponden a intrones. Los rectángulos rojos indican codones de terminación (STOP) o codones de terminación prematuro (PTC). En el caso de las selenoproteínas, el codón "UAG" es reconocido como codón de terminación en ausencia de selenio, lo que puede desencadenar la activación de la vía NMD. Modificada de Martínez-Montiel, 2016.

2.5 Factores involucrados en la activación de la vía de decaimiento del ARNm sin sentido.

A pesar de los numerosos estudios realizados, el proceso de activación de la vía NMD aún no se comprende por completo en los distintos organismos y continúa siendo objetivo de estudio. Sin embargo, se ha logrado esclarecer la participación de diferentes componentes proteicos. La activación de NMD requiere el

reclutamiento de diversos factores, los cuales se clasifican en factores centrales y factores asociados. A continuación se describen cada uno de ellos (Barbarin-Bocahu y cols., 2024; Behera y cols., 2024).

2.5.1 Factores centrales

Los factores centrales son elementos en *trans* que forman parte del núcleo de la maquinaria de NMD. Hasta el momento se han descrito al menos tres de ellos: UPF1, UPF2 y UPF3 (UPF, por sus siglas en inglés UP-Frameshift) (Das y Panigrahi, 2024; Karousis y Mühlemann, 2019). Inicialmente, estos factores fueron identificados en *Saccharomyces cerevisiae* y *Caenorhabditis elegans*, y posteriormente caracterizados en otras especies como *Drosophila melanogaster*, *Arabidopsis thaliana* y mamíferos (Hug y cols., 2016).

2.5.1.1 UPF1

UPF1 es el principal factor central de la vía NMD y uno de los más estudiados, debido a su alta conservación entre diferentes organismos. Esta proteína que tiene un peso aproximado de 109 kDa, actúa como una ARN-helicasa dependiente de ATP. Posee un dominio rico en cisteína/histidina (dominio CH), seguido de dos dominios RecA (RecA1 y RecA2), un dominio con actividad helicasa 5'-3', un dominio ATPasa dependiente de ARN y una región rica en repeticiones serina/glutamina (SQ) en el carboxilo terminal (C-terminal) (**Figura 5**) (Behera y cols., 2024; Karousis y Mühlemann, 2019; Staszewski y cols., 2023). Estos residuos de serina/glutamina son susceptibles a ciclos de fosforilación y desfosforilación, los cuales son esenciales para la activación y regulación de la proteína. El proceso de fosforilación es llevado a cabo por el complejo SMG1-8-9, quien activa a SMG1 y promueve la modificación de UPF1 tanto en su región amino terminal (N-terminal) como en el dominio SQ. Una vez fosforilada, UPF1 favorece el reclutamiento de la endonucleasa SMG6, así como la asociación del complejo SMG5-SMG7 al sitio SQ fosforilado (Das y Panigrahi, 2024; Fritz y cols., 2022). Se ha observado que la fosforilación de UPF1 no solo es indispensable para su activación y regulación, sino que también desempeña un papel clave en el reciclaje de los ribosomas y en el

reclutamiento de los complejos de NMD necesarios para llevar a cabo la degradación del ARN (Behera y cols., 2024).

Por otra parte, el dominio CH juega un papel importante en UPF1, ya que funciona como una región adaptadora que permite la interacción con UPF2. Además que junto con el dominio helicasa conforma un canal alargado que estabiliza la unión al ARN (Behera y cols., 2024; Das y Panigrahi, 2024; Martínez-Montiel y cols., 2016). En levaduras, la interacción entre el dominio CH de UPF1 y el dominio de UPF2 genera una estructura similar a una horquilla, lo que desplaza el dominio RecA2 y reduce ligeramente la afinidad por el ARN, promoviendo así el desenrollamiento del ARN a través de la actividad helicasa de UPF1 (**Figura 5**) (Das y Panigrahi, 2024).

2.5.1.2 UPF2

UPF2 es un factor de aproximadamente 140 kDa que presenta tres dominios MIF4G (Clerici y cols., 2013). Se considera una proteína de andamiaje, pues permite la interacción entre UPF1 y UPF3 a través de dichos dominios. El tercer dominio (MIF4G-3) interactúa con el complejo SMG1-8-9 y UPF3b, lo que estimula la actividad cinasa de SMG1 y, en consecuencia, activa la vía NMD (Behera y cols., 2024; Das y Panigrahi, 2024). Además, esta interacción contribuye a potenciar la actividad helicasa de UPF1, promoviendo el desensamble de proteínas accesorias situadas río abajo del PTC, dejando así el ARNm expuesto para su degradación por diferentes ARNasas (Carrard y Lejeune, 2023). Por su parte, UPF1 interactúa con UPF2 mediante su extremo C-terminal (**Figura 5**) (Clerici y cols., 2013; Das y Panigrahi, 2024).

2.5.1.3 UPF3

UPF3 es la proteína menor descrita. En humanos, se han identificado los complejos UPF3A y UPF3B, los cuales desempeñan funciones diferenciadas dentro de la vía NMD (Behera y cols., 2024). UPF3B presenta un motivo de reconocimiento a ARN (RRM, por sus siglas en inglés RNA Recognition Motif), con baja afinidad por ARNm, debido a la ausencia de residuos aromáticos en el dominio. Sin embargo, se ha

propuesto que la presencia de residuos con carga positiva podría conferirle mayor estabilidad en su interacción con el ARN. Aun así, UPF3B es fundamental para la interacción con UPF1, eRF3, ARN y ribosomas (Das y Panigrahi, 2024). UPF3B es el responsable de la mayor actividad de UPF3 gracias a su gran capacidad de interacción con los componentes del complejo exón-exón (EJC, por sus siglas en inglés Exon Junction Complex). Mientras que se cree que UPF3A podría ejercer un efecto represor sobre la vía NMD, debido a su baja afinidad por el EJC y poca participación en la vía. En eucariontes inferiores, la ausencia de UPF3 altera de manera significativa la vía NMD, lo que resalta su importancia en la activación de este mecanismos (**Figura 5**) (Yi y cols., 2022).

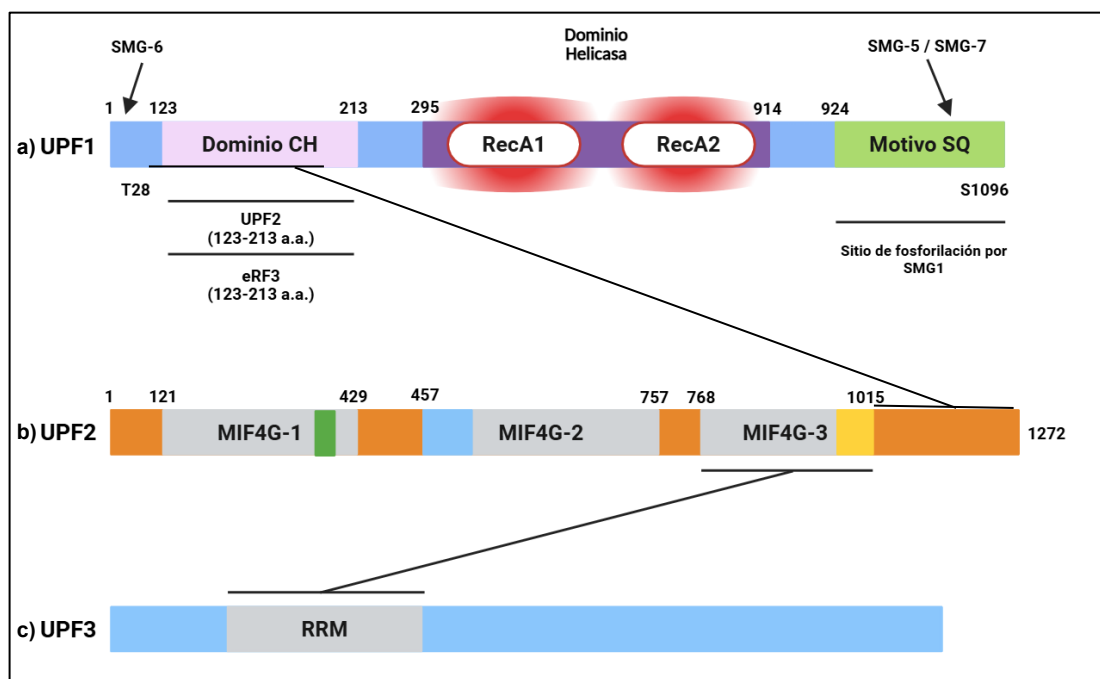


Figura 5. Estructuras y sitios de interacción entre los factores centrales de la vía NMD en eucariontes inferiores.

En la siguiente figura se muestra la organización estructural y los dominios de las proteínas centrales involucradas en la activación de la vía NMD. Los números indican la posición de los aminoácidos y el tamaño de la proteína. Las líneas señalan los sitios de interacción entre los distintos factores mientras que las flechas negras indican regiones específicas de unión con otras proteínas. a) UPF1 se caracteriza por presentar un dominio CH (cuadro rosa), dos dominios RecA (RecA1 y RecA2) que en conjunto conforman el dominio helicasa (cuadro morado), así como un motivo SQ (cuadro verde). El motivo SQ es el sitio de unión de SMG1, cuya interacción permite el reclutamiento del complejo SMG5-SMG7 para la fosforilación de UPF1. Por su parte, SMG6 interactúa con la región N-terminal. El dominio CH, que abarca los aminoácidos 123 a 213, funciona como el sitio de interacción con UPF2. c) UPF2 presenta tres dominios MIF4G, siendo el tercero el más importante por ser el sitio de unión de UPF3. c) UPF3 posee un motivo de unión a ARN (RRM) que permite la interacción con UPF2 y el ARNm, contribuyendo así a la estabilización del complejo. Modificada de Clereci y cols., 2013.

2.5.1.4 Proteínas homólogas a los factores centrales en otros organismos

En otros organismos eucariotas, la acción de NMD depende de proteínas homologas como las SMG's. En *C. elegans*, SMG2, SMG3 y SMG4 cumplen la actividad de la UPF's (Hug y cols., 2016). En este caso, SMG2 es el homólogo de UPF1 que actúa como una helicasa de ARN dependiente de ATP, por lo que requiere ser fosforilada por SMG1, SMG3 y SMG4. Mientras tanto SMG5, SMG6 y SMG7 desfosforilan a SMG2 (Longman y cols., 2007; Muir y cols., 2018).

2.5.2 Factores asociados a la vía NMD

La maquinaria NMD no solo depende de los factores centrales para su activación, sino también de proteínas accesorias que rodean y estabilizan el ARNm. Muchas de estas proteínas adquieren dualidad funcional, pues participan en otros procesos celulares, entre ellos, se incluyen proteínas que participan en la adición de la CAP, cinasas, fosfatasa, componentes del complejo EJC, proteínas que intervienen en la disociación del ribosoma y subunidades pertenecientes a la fosfatasa 2A (PP2A, por sus siglas en inglés Protein Phosphatase 2A) (Martínez-Montiel, 2016).

2.5.2.1 Factores asociados al complejo CAP y NMD

Los factores asociados al complejo CAP son proteínas que forman parte del complejo de proteínas asociadas a NMD. Estas dirigen al transcrito a su degradación y a su vez participan en el agregado de la cubierta en el extremo 5', de manera que se esperaría que todos los organismo presenten estas proteínas

CBP20 se une directamente al ARN como adaptador para otros factores mientras que CBP80 reconoce y estabiliza a CBP20. En la vía NMD, CBP80 interactúa directamente con el factor de exportación de ARNm Aly/Ref para activar la vía (Gebhardt y cols., 2015).

2.5.2.2 Fosfatasas y cinasas

Upf1 es uno de los factores centrales de la vía NMD que requiere ser fosforilado para su activación e iniciar el reclutamiento del resto del complejo proteico (Arias-Palomo y cols., 2011). Las cinasas involucradas en su fosforilación son los complejos SMG5/SMG7 y SMG1/SMG8/SMG9. En la etapa inicial de la fosforilación, SMG1 reconoce y se une al motivo SQ de UPF1, lo que incentiva el reclutamiento del complejo SMG8/SMG9 y la fosforilación de UPF1 en dicho sitio. También, se ha observado que UPF1 puede sufrir hiperfosforilación a través de la unión con SMG5-6 y 7. En este caso SMG6 escinde el ARNm cerca del PTC mientras que SMG7 contiene al dominio C-terminal rico en prolina. En conjunto, el reclutamiento de SMG5/6/7 son indispensables para la degradación del transcrito (Behera y cols., 2024; Fatscher y cols., 2015).

Estas proteínas, también, participan en la desfosforilación de UPF1 a través de su interacción con la PP2A. La PP2A interactúa con el complejo SMG5/SMG6/SMG7 mediante el dominio PiT C de SMG5, por lo que estas tres proteínas median la desfosforilación de UPF1 (Fatscher y cols., 2015).

2.5.2.3 Componentes del núcleo del EJC

El EJC, también, juega un papel importante en la activación de la vía NMD. Este es un complejo que se deposita en los límites exón-exón durante el *splicing*. Está conformado por un núcleo proteico central y un conjunto de proteínas periféricas que se ensamblan de manera transitoria (Gerbracht y cols., 2020). El centro del EJC está formado por las proteínas EIF4A3, MAGOH, Y14 y MLN51, que participan durante el *splicing*, la exportación de ARNm, la desintegración del ARNm por NMD y el inicio de la traducción (**Figura 6**) (Singh y cols., 2013).

MLN51 es una proteína citoplasmática, que posee un dominio RRM y una señal de exportación nuclear (NES, por sus siglas en inglés Nuclear Export Signal). Esta señal le permite transportarse del núcleo hacia el citoplasma, particularmente, esta región facilita su reclutamiento a los gránulos de estrés citoplasmáticos. Además,

se ha observado su presencia dentro de los cuerpos de procesamiento (cuerpos P/*P bodies*), y se ha reportado que su sobreexpresión promueve el desmontaje de estos cuerpos (Cougot y cols., 2014).

MAGOH es una proteína con varias funciones, pues se ha observado que no solo participa en la vía NMD y formación del complejo EJC, sino que también participa en la exportación del ARNm y la traducción. Además MAGOH junto con Y14 forma un heterodímero, que se une a EIF4A3 para evitar la disociación con el ARNm y facilitar el reclutamiento de factores de exportación de ARNm como TAP, Aly/REF y UAP56 (Mitra y cols., 2022).

EIF4A3 es una helicasa dependiente de ATP que puede adoptar dos conformaciones estructurales: abierta y cerrada. La conformación abierta se presenta cuando EIF4A3 interactúa con CW22, lo cual reduce de manera significativa su afinidad por el ARNm y el ATP. En contraste, la conformación cerrada favorece la unión estable al ARN y la asociación con los componentes MAGOH, Y14 y MLN51, promoviendo así el ensamblaje, la maduración y la estabilidad del complejo EJC (Fatscher y cols., 2015; Ryu y cols., 2019).

2.5.2.4 Componentes periféricos del EJC

Además de las proteínas que participan en el reconocimiento del complejo EJC, se han descrito otras proteínas, que rodean al EJC y se unen de manera transitoria, las cuales se describen en el siguiente apartado.

RNPS1 es un elemento del grupo de proteínas ricas en serina/arginina (SR), que se une directamente al ARNm a través de su RRM. Su principal función es regular y facilitar el *splicing*, además que participa en la formación del EJC mediante su asociación directa con el núcleo del complejo (**Figura 6**). La presencia de RNPS1 en transcritos susceptibles a NMD se ha asociado con una degradación más eficiente, favoreciendo así la eliminación de ARNm anómalos (Deja y Singh, 2022; Schlautmann y cols., 2022).

Se ha observado que TAP/P15 es un complejo que tiene contacto con el poro nuclear y facilita la exportación de los transcritos del núcleo hacia el citoplasma. Además, que se une a SAP18 para formar la capa externa de EJC (**Figura 6**) (Stubbs y Conrad, 2014).

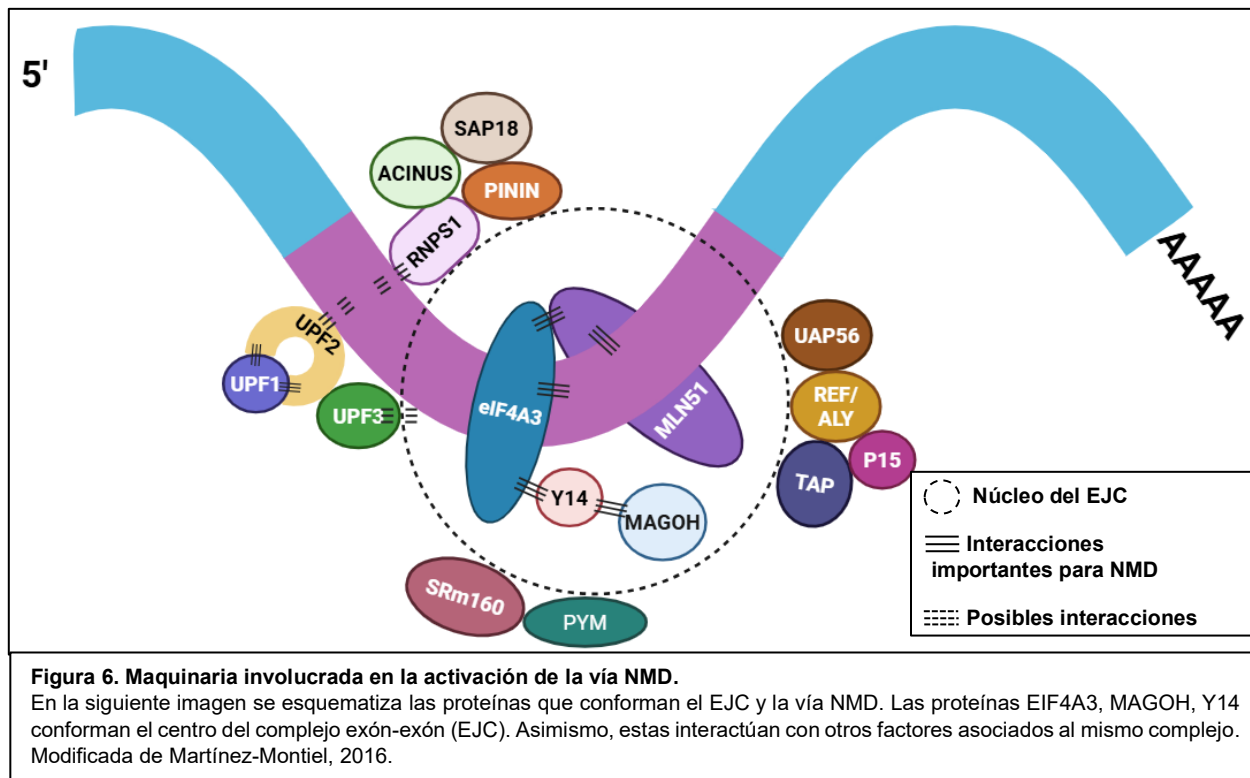
Por su parte, SAP18 es una proteína de 18 kDa que participa en el *splicing* y en la regulación transcripcional. En la modulación de la expresión génica, SAP18 es un correpresor del complejo Sin3- histona desacetilasa. También, puede interactuar con RNPS1 y ACINUS, lo que facilita su incorporación al complejo relacionado con apoptosis y *splicing* (ASAP), reforzando su actividad de regulación transcripcional y procesamiento del ARN. En NMD, interactúa con el EJC a través de la unión con el complejo TAP/P15 (Deka y Singh, 2017; Larran y cols., 2024).

ACIN1 es una proteína nuclear que participa en la condensación apoptótica de la cromatina, proceso inducido por la activación de la caspasa-3 que no induce la fragmentación del ADN, lo que distingue su función de otros mecanismos apoptóticos. Además que contribuye en la modulación de la expresión génica y el *splicing* a través de su unión al complejo ASAP, conformado por ACIN1, SAP18 y RNPS1. Asimismo, esta proteína interviene indirectamente en la activación de la vía NMD al asociarse con el complejo EJC junto con RNPS1, SAP18, TAP, P15, MAGOH, Y14 y MLN51 (**Figura 6**) (Deka y Singh, 2017; Larran y cols., 2024).

Pinin es un coactivador del *splicing* que interactúa directamente con SAP18 y RNPS1, los cuales tienen mayor afinidad que ACINUS (**Figura 6**). Recientemente, se ha propuesto que la asociación de ACINUS y Pinin con el EJC podría regular la transcripción y el *splicing* mientras que el reclutamiento podría depender del empalme de un subconjunto específico de transcritos. Bajo este contexto, la incorporación de los complejos ASAP al EJC durante el *splicing* podrían ser mutuamente excluyente (Deka y Singh, 2017).

Dom34 y Hbs1 son proteínas que en conjunto facilitan la disociación de las subunidades ribosomales en el ARNm. El proceso inicia con la unión del complejo Dom34-Hbs1 al sitio A del ribosoma, seguido de la hidrólisis de Guanósín Trifosfato

(GTP, por sus siglas en inglés Guanosine Triphosphate), la disociación de Hbs1 y la colocación de Dom34 en el ribosoma. En la vía general de supervivencia del ARNm, la liberación de ribosomas se da en aquellos que están anclados en el extremo 3' de los ARNm que carecen de codones de terminación. También, interviene en la disociación de las pre subunidades como un mecanismo de control de calidad durante la maduración de los ribosomas



2.6 Mecanismo de activación de la vía de decaimiento del ARNm sin sentido en levaduras

La activación de la vía NMD constituye un mecanismo fundamental que implica la participación coordinada de diversos factores, cuya composición puede variar entre organismos. Los primeros modelos de activación de esta vía fueron descritos en la levadura *S. cerevisiae*. De manera general, la activación de NMD ocurre en los polisomas donde las proteínas UPF se asocian con los ribosomas y se desencadena la degradación del ARNm.

El proceso inicia con el reconocimiento de una distancia anómala entre el codón de terminación y la proteína de unión a la cola poli(A)(Pab1), señal conocida como 3' UTR largo, lo que propicia la detención de la traducción y el reclutamiento de los factores de liberación eRF1 y eRF3, así como de las proteínas UPF1, UPF2 y UPF3 (Lu y cols., 2025; Meaux y cols., 2008). En este caso, UPF1 se asocia con eRF3, UPF2 y UPF3 mientras que estas dos últimas compite con eRF1 por la unión a eRF3 (Embree y cols., 2022). Una vez activado el complejo NMD, el ARNm puede ser degradado de dos maneras:

1. Remoción del cap y Degradación en sentido 5' → 3': Inicia con la remoción de la CAP mediante el complejo proteico Dcp1 y Dcp2 (ortólogos de CBP20 y CBP80 en mamíferos) para posteriormente sea degradado por la actividad de la exonucleasa citoplasmática Xrn1 en sentido 5' → 3' (**Figura 7**) He y Jacobson, 2022; Lu y Krebber, 2021).

2. Deadenilación y Degradación en sentido 3' → 5': La deadenilación es efectuada por el complejo CCR4-NOT seguido de la degradación en sentido

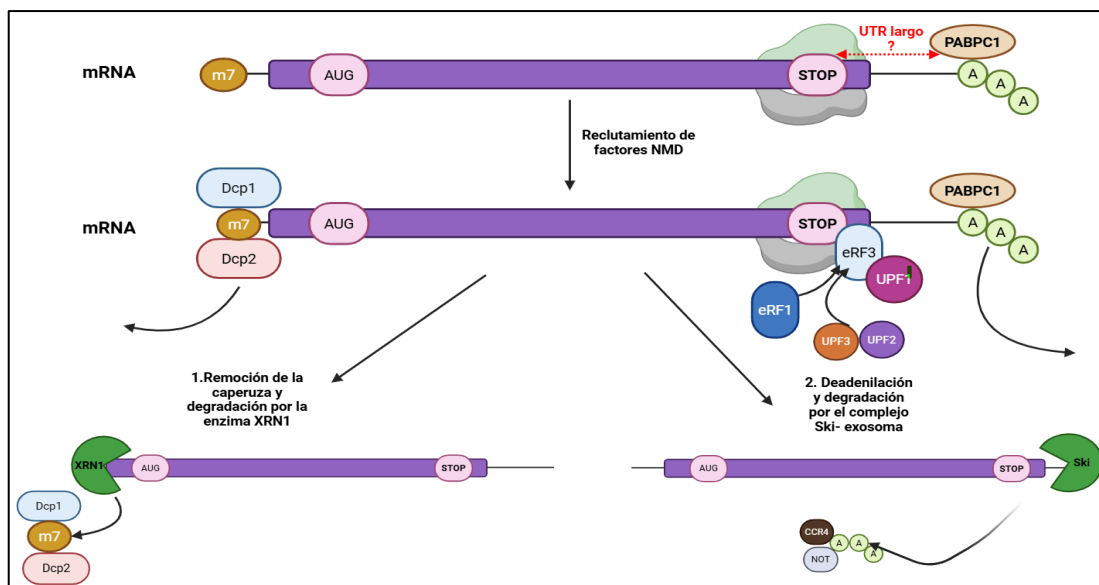


Figura 7. Mecanismo NMD en levaduras.

El mecanismo de activación de la vía NMD en levaduras depende del reconocimiento de una distancia anormal entre el codón de terminación y la proteína PABPC1. Esta señal favorece el reclutamiento de los factores de liberación; eRF1 y eRF3. eRF1 compite con UPF2 y UPF3 por el sitio de interacción de eRF3, lo que desencadena la degradación por dos vías principales; 1) la remoción de la caperuza en el extremo 5', seguida de la degradación por XRN1 y 2) la deadenilación del extremo 3', seguida de la degradación dependiente del complejo Ski-exosoma. Modificada de Burgos-Gámez, 2014.

dirección 3' → 5' por el complejo Ski- exosoma citoplasmático (**Figura 7**) (Iermak y cols., 2025; Lu y Krebber, 2021).

2.7 Mecanismo de activación de la vía de decaimiento del ARNm sin sentido en mamíferos

NMD es una vía de vigilancia y regulación postranscripcional que se activa durante la primera ronda de la traducción (Celik y cols., 2017). Al igual que en las levaduras, este proceso ocurre en los polisomas. En mamíferos, la vía NMD presenta una mayor complejidad y regulación, ya que a diferencia de lo observado en las levaduras, depende de la presencia del EJC. Además, su activación se basa principalmente en el reconocimiento de PTC, requiere la participación de componentes proteicos adicionales y está regulada por ciclos de fosforilación y desfosforilación mediado por cinasas y fosfatasas, como las SMG (Embree y cols., 2022; Nagar y cols., 2023).

El ARNm recién sintetizado es modificado por el complejo CBP80 y CBP20 quienes agregan la cubierta (5' m⁷ GpppN) en el extremo 5', el complejo PABPN1 y PABPC1 se unen a la cola poli(A) para brindarle estabilidad al ARN. Asimismo, el ARNm experimenta eventos de *splicing* alternativo, que incluye el corte de intrones y empalme de exones. Como resultado de esto, se depositan complejos EJC, conformados por eIF4A3, MAGOH, Y14 y MLN51, en las uniones exón-exón, localizados aproximadamente 20-24 nucleótidos río arriba del sitio de *splicing*, los cuales serán retirados poco a poco por el ribosoma durante la traducción (Behera y cols., 2024; Carrard y Lejeune, 2023). En caso de que el ribosoma detecte un EJC situado río abajo del codón de terminación, este es reconocido como un PTC, lo que promueve su detención y la activación de la vía NMD (Behera y cols., 2024).

Una vez que el ribosoma se detiene en el PTC, se inicia el reclutamiento y la asociación de UPF1 con el factor de liberación eRF1 y con el dominio GTPasa de eRF3 (Embree y cols., 2022). Posteriormente, se forma el complejo de vigilancia S U R E (SMG1- UPF1- eRF1- eRF3). A este complejo se unen UPF2 y UPF3B, lo cual facilita la formación del complejo inductor de desintegración (DECID, por sus

siglas en inglés Decay- Inducing Complex). Esta asociación promueve la hiperfosforilación de UPF1 y el reclutamiento de SMG5, SMG6, SMG7 y la PP2A (Hug y cols., 2016). En conjunto, estos eventos incentivan la eliminación de las estructuras protectoras del ARNm mediante procesos de *decapping* y deadenilación, efectuados por las proteínas DCP2 y el complejo CCR4-NOT, respectivamente (Behera y cols., 2024; Das y Panigrahi, 2024). Finalmente, el ARNm queda expuesto para su posterior degradación, el cual es realizado por la exonucleasa XRN1 en dirección 5' → 3' y/o el exosoma en sentido 3' → 5' (Figura 8) (Nagar y cols., 2023).

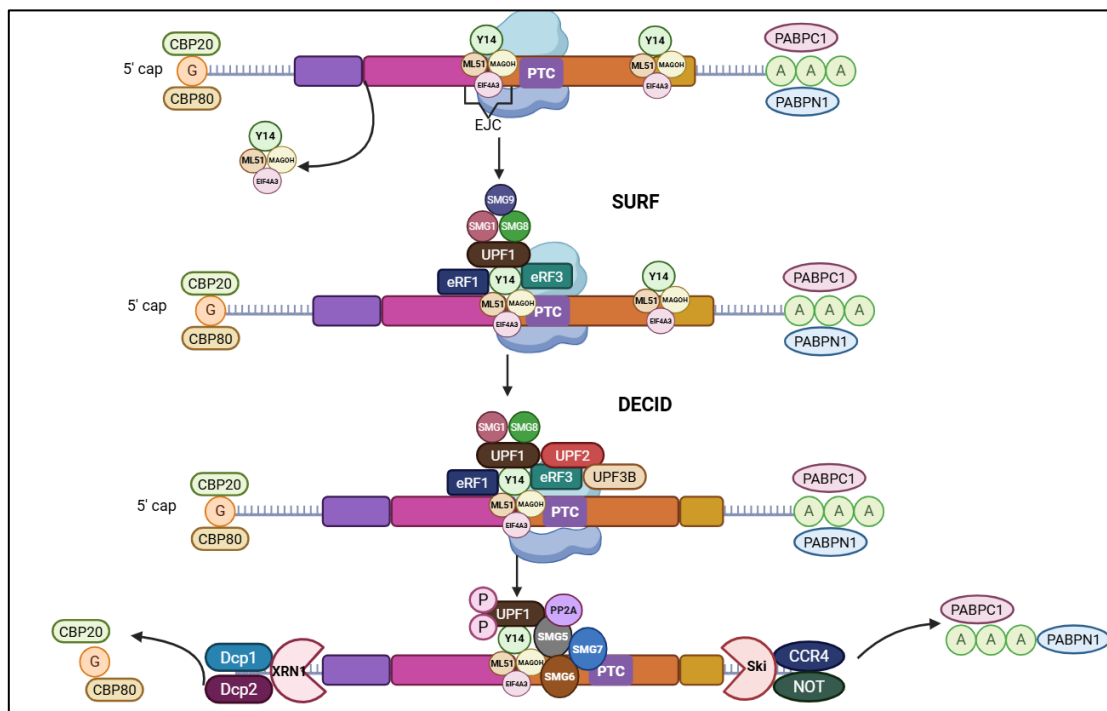


Figura 8. Mecanismo NMD en mamíferos.

La imagen ilustra el mecanismo de activación de la vía NMD en la mayoría de los mamíferos. Durante la primera ronda de la traducción, el ribosoma retira progresivamente las uniones exón-exón (EJC). Cuando el ribosoma detecta la presencia de un EJC río abajo de un codón de terminación, este es reconocido como un PTC, lo que provoca el arresto del ribosoma en dicho sitio y promueve el reclutamiento de UPF1. Posteriormente, UPF1 se une al complejo EJC e induce el ensamblaje del complejo SURF (SMG1, SMG8, SMG9, eRF1 y eRF3). La incorporación de UPF2 y UPF3B conduce a la formación del complejo DECID, lo que induce la hiperfosforilación de UPF1 y el reclutamiento de SMG5, SMG6, SMG7 y la fosfatasa PP2A. Finalmente, se produce la disociación de las subunidades ribosomales y se inicia la degradación del ARNm aberrante. La degradación del transcrito puede efectuarse mediante la deadenilación dependiente del complejo CCR4-NOT, seguida de la degradación por el complejo SKI-exosoma en sentido 3' → 5', o bien a través del *decapping* mediado por el complejo DCP1-DCP2 y la posterior degradación en sentido 5' → 3' por XRN1.

2.8 Enfermedades humanas relacionadas a la alteración en la vía de decaimiento del ARNm sin sentido

El principal objetivo de la vía NMD es prevenir la síntesis de proteínas truncas, que en su mayoría no son funcionales y en algunos casos pueden adquirir una función perjudicial para la célula. Sin embargo, la NMD puede verse afectada a través de modificaciones en el genoma, alteraciones en los transcritos y la desregulación de sus factores, lo que contribuye al desarrollo de enfermedades (Behera y cols., 2024).

En cáncer, las células oncogénicas pueden modular de manera diferencial la activación o inhibición de la vía, utilizándola como un mecanismo que favorece la progresión tumoral y el crecimiento celular descontrolado. Experimentos basados en el análisis de inestabilidad de microsatélites, han evidenciado niveles elevados de transcritos que contienen PTC en cáncer colorrectal, lo que sugiere una alteración en la vía (Nagar y cols., 2023).

La sobreexpresión de algunos factores asociados a NMD contribuye a la oncogénesis. Por ejemplo UPF3A, una subunidad que actúa como inhibidor de la NMD a través del secuestro de UPF2. En este contexto, la sobreexpresión de UPF3A se ha asociado con el incremento de la agresividad tumoral en cáncer de mama triple negativo y en tumores positivos al receptor HER2 (Nogueira y cols., 2021).

En algunos trastornos genéticos, la traducción de péptidos aberrantes puede dar lugar a fenotipos leves debido a la producción de proteínas parcialmente funcionales. Sin embargo, la activación de la vía NMD puede agravar la enfermedad al promover la eliminación de ARNm funcionales y reduciendo aún más los niveles proteicos disponibles. En la Distrofia Muscular de Duchenne (DMD, por sus siglas en inglés Duchenne Muscular Dystrophy), el gen de la distrofina presenta una mutación en el extremo 3', lo que promueve una proteína aberrante y da lugar a una enfermedad más leve (Behera y cols., 2024).

2.9 *Mycosarcoma maydis* como modelo de estudio

Los procesos moleculares y celulares de animales han sido ampliamente descritos y adaptados a partir de diferentes modelos fúngicos simples como *S. cerevisiae* y *M. maydis* (Steinberg y Pérez-Martin, 2008). Durante años, *S. cerevisiae* ha sido uno de los modelos experimentales más sobresalientes, debido a que la mayoría de sus genes están asociados a funciones celulares esenciales. No obstante, este organismo cuenta con limitaciones importantes, ya que carece de ciertos procesos celulares característicos de las células animales, como la desintegración de la envoltura nuclear durante la mitosis y el transporte intracelular de larga distancia a lo largo del citoesqueleto, por lo que se ha propuesto la búsqueda de nuevos modelos fúngicos que permitan estudiar estos procesos con mayor fidelidad; un claro ejemplo de ello es el hongo *M. maydis* (Münsterkötter y Steinberg, 2007).

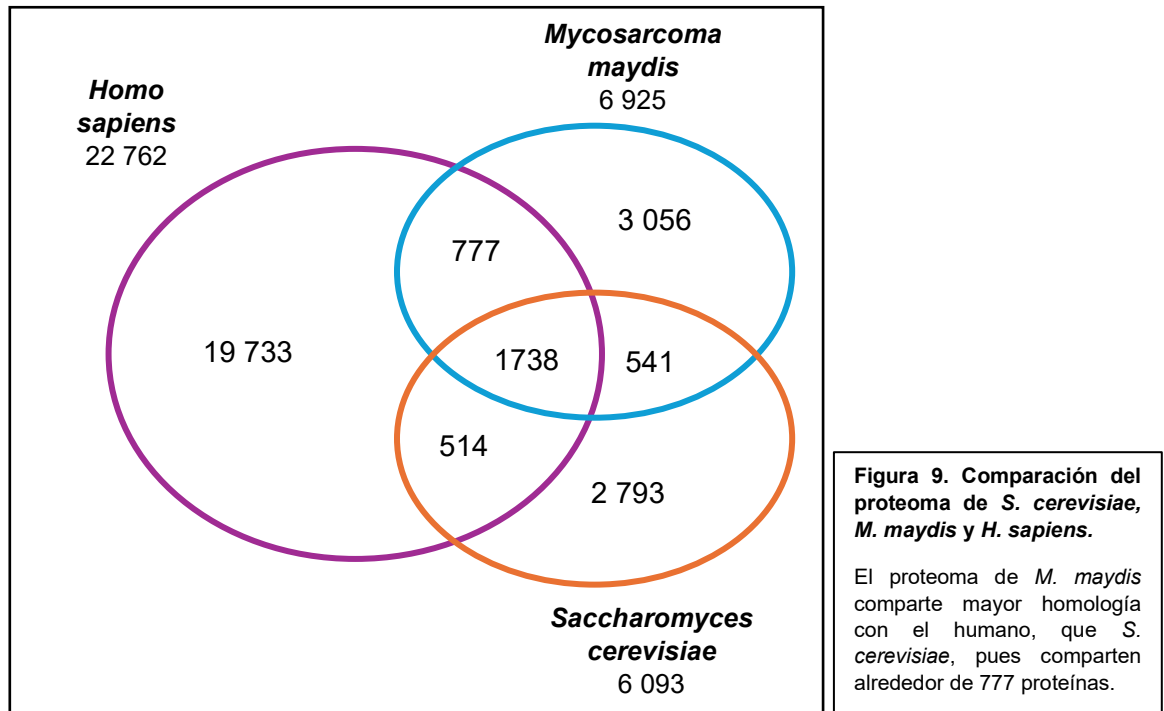
Estudios previos basados en análisis comparativo de proteomas, han descrito que existe una gran homología proteica entre *M. maydis* y *Homo sapiens*, pues comparten por lo menos 777 proteínas, las cuales están implicadas en

Clasificación funcional de las proteínas de <i>M. maydis</i> y humano	
Función	Numero de proteínas
<i>Splicing</i> del ARNm	38
Modificación y degradación de proteínas	29
Señalización mediada por proteínas G	17
Degradación de aminoácidos	14
β -oxidación de ácidos grasos	10
Función desconocida	222

Tabla 1.
Clasificación funcional de las proteínas de *M. maydis* y humano

diferentes procesos celulares como la β -oxidación de ácidos grasos, la señalización por proteínas G y el *splicing* por mencionar algunos (**Tabla 1**). Cabe resaltar que muchas de estas proteínas no están presentes en la levadura *S. cerevisiae*, lo cual

refuerza la relevancia de *M. maydis* como un modelo fúngico idóneo para el estudio de mecanismos celulares con gran similitud en humanos (**Figura 9**) (Münsterkötter y Steinberg, 2007).



M. maydis es un hongo dimórfico que ocasiona la enfermedad del carbono en el maíz o lo que comúnmente conocemos como “huitlacoche” en México (**Figura 10**) (Agrios, 2005). Este basidiomiceto puede optar dos formas morfológicas: levadura y micelio. La fase micelial es el estado patógeno, capaz de invadir los tejidos del maíz a través de la fusión de dos células haploides compatibles, lo que da lugar a un dicarión infeccioso. Mientras que la forma de levadura es haploide, saprofita y no patógena. Esta crece en condiciones de pH cercanos a 7 y a una temperatura de 37°C (Pérez-Rodríguez y cols., 2023). La capacidad de *M. maydis* para crecer en fase de levadura representa una ventaja en el laboratorio, debido a su fácil manipulación y rápido crecimiento. Además, se ha reportado que aproximadamente el 40% de sus genes contienen intrones y están sujetos a eventos de SA, principalmente eventos de tipo de retención de intrones, lo que puede conducir a la formación de PTC, favoreciendo así la activación de la vía NMD (Martínez-Montiel, 2016).



Figura 10. Enfermedad del carbono en el maíz.

En la imagen, se muestra una mazorca infectada por *Mycosarcoma maydis*, generando tumores y la enfermedad del carbono en el maíz o lo que comúnmente se conoce como “huitlacoche” en México.

3. ANTECEDENTES ESPECIFICOS

Con el paso del tiempo se han realizado diferentes estudios para la identificación de los factores involucrados en el proceso de NMD. En este caso, abordaremos aquellos que han sido descritos en *M. maydis*.

En 2016, Martínez-Montiel y cols utilizaron diferentes herramientas bioinformáticas para el análisis de la estructura primaria del factor homólogo putativo UPF1 en *M. maydis* (umUPF1), donde identificaron dominios estructurales y funcionales similares, que se han reportado para otras especies. Dentro de los dominios encontrados, resaltan un dominio CH rico en cisteínas e histidinas, dos dominios RecA; RecA1 y RecA2, y regiones reguladoras que incluyen el dominio 1B y 1C. Al realizar una comparación con el factor homólogo Upf1 en *H. sapiens* (hUPF1), observaron que presentan dominios similares donde la posición relativa de los diferentes dominios se encuentra altamente conservada. Del mismo modo, observaron que ambas proteínas tienen una longitud comparable, ya que umUpf1 cuenta con 1088 aminoácidos, mientras que hUpf1 posee 1129 aminoácidos (**Figura 11**) (Martínez-Montiel y cols., 2016).

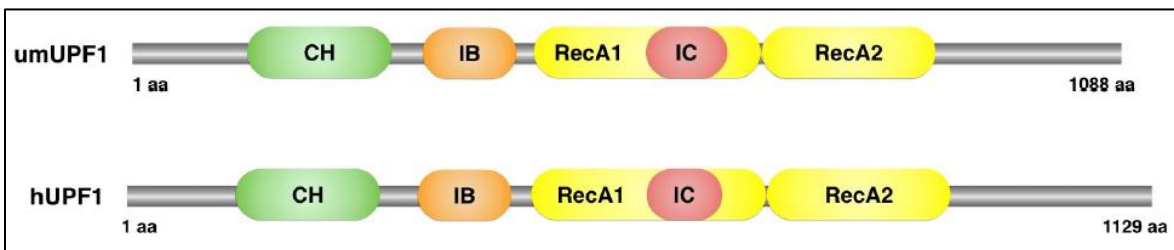


Figura 11. Comparación estructural en UPF1 de *Mycosarcoma maydis* y *Homo sapiens*

Representación esquemática de los dominios presentes en UPF1 de *M. maydis* (umUPF1) y de *H. sapiens* (hUPF1). El dominio CH (verde) es responsable de la interacción con UPF2, eRF1 y eRF3. La región helicasa incluye dos dominios RecA (amarillo). Otras regiones reguladoras incluyen el dominio 1B (naranja) y el dominio 1C (rojo). Se indica el aminoácido correspondiente al inicio y al final de cada péptido (Martínez-Montiel, 2016).

También, realizaron alineamientos de ambas secuencias aminoacídicas encontrando que los aminoácidos situados dentro de los dominios RecA y dominio CH son los más conservados, pues presentan un 75% de homología mientras que los dominios 1B y 1C mostraron 50% y 58% de identidad, respectivamente. Además identificaron la presencia de motivos en umUpf1 como: el motivo rico en glicina/serina (QS), el asa 349-355 y los motivos helicasa I-VI, los cuales se localizan dentro de los dominios RecA (**Figura 12**) (Martínez-Montiel y cols., 2016).



Figura 12: Comparación de secuencias aminoacídicas de hUpf1 y umUpf1.

En el siguiente esquema se muestra los alineamientos de las secuencias aminoacídicas completas de hUpf1 y umUPF1. Dentro de la secuencia se esquematiza con colores la localización de los diferentes dominios como: dominio CH (verde), dominio regulador 1C (naranja), dominio regulador 1B (rojo) y dominios RecA (amarillo). A su vez, en recuadros grises se localizan los seis motivos helicasa y en el recuadro azul el motivo QS. Modificada de Martínez-Montiel y cols., 2016.

Utilizando bases de datos como STRING, analizaron y compararon la capacidad de interacción de umUPF1 y hUPF1 con otras factores asociados a NMD donde seleccionaron diez interacciones predichas basadas en características específicas como asociaciones físicas y funcionales. En esta simulación, identificaron la interacción de hUPF1 con UPF2, UPF3A, UPF3B SMG1, EIF4A3, SMG7, SMG5, eRF1, eRF3 y DCP2. En cambio umUPF1 podría estar interactuando con UPF2, eRF3, UPF3, eRF1, DCP2, mTOR, CBP80, RUBV, Y14 e EIF4A3 (**Figura 13**) (Martínez-Montiel y cols., 2016).

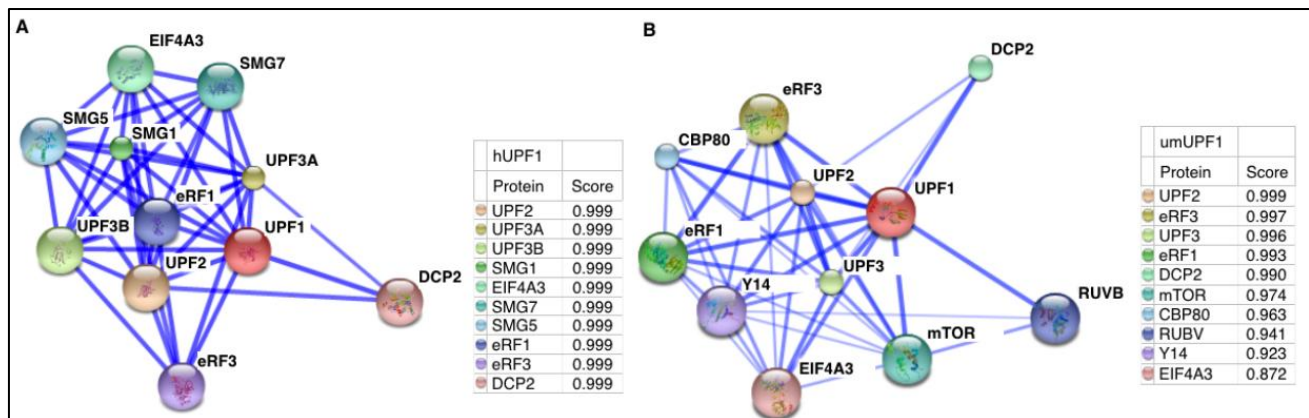
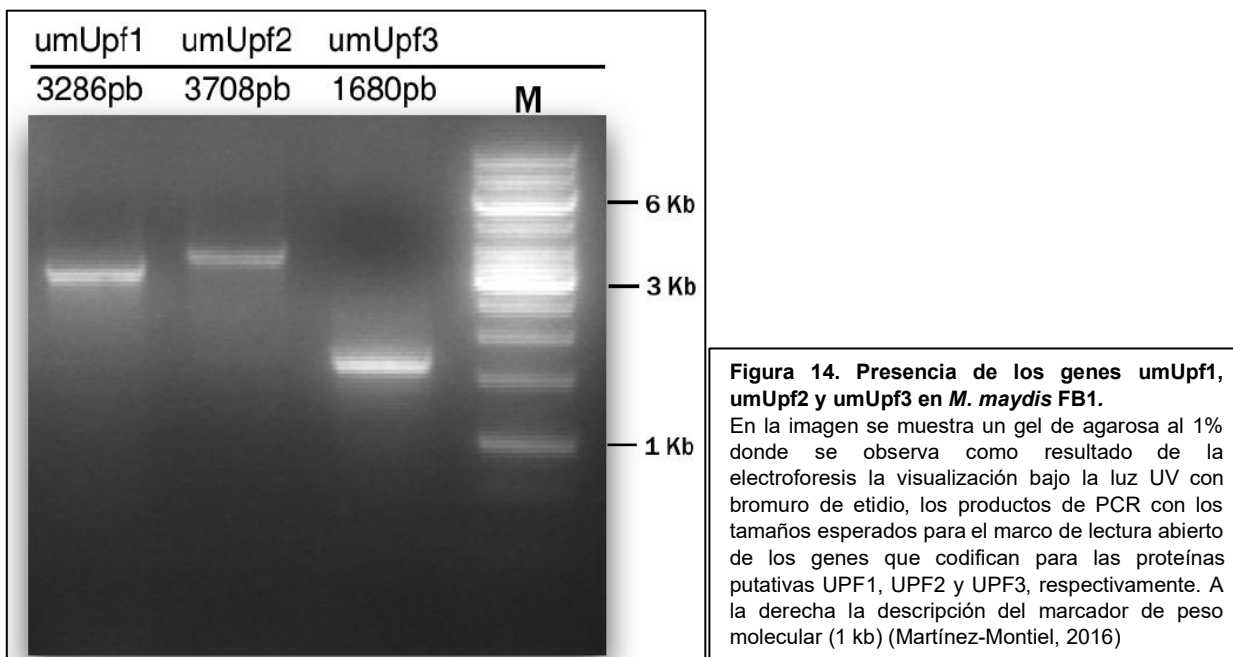


Figura 13. Interacción de UPF1 con diferentes proteínas.

a) Interacciones proteicas conocidas para hUPF1 ilustradas empleando STRING. B) Interacciones predichas para umUPF1. En ambas representaciones, las líneas azules se emplean para unir a las dos proteínas involucradas en la interacción. Si la línea es sólida indica que la interacción es confiable. El puntaje determinado empleando STRING se muestra para cada interacción (Martínez-Montiel y cols., 2016).

En el laboratorio de Ecología Molecular Microbiana se han realizado diversos trabajos orientados en la identificación de los factores homólogos putativos de UPF1, UPF2, UPF3 y RNPS1 en *M. maydis*. Dentro de estos, se han diseñado oligonucleótidos para la identificación de los genes putativos umUpf1, umUpf2 Y umUpf3 en *M. maydis* por PCR en tiempo real donde se comprobó la presencia de estos en la cepa 521 de *M. maydis* (**Figura 14**) (Martínez-Montiel, 2016).



Se han realizado las construcciones necesarias para obtener proteínas recombinantes de los homólogos UPF1, UPF2 y UPF3. Para estos fines, se emplearon los vectores de expresión pProEXHTb y pProEXHTc, los cuales están diseñados específicamente para la producción de proteínas recombinantes en *Escherichia coli*. Estas herramientas ofrecen ventajas adicionales, como la presencia de un cassette de resistencia a ampicilina que facilita la selección de colonias tras la exposición al antibiótico, el gen *lacI* que permite inducir la expresión proteica con lactosa o análogos como el isopropil- β -D-1-tiogalactosido (IPTG), y una etiqueta de seis histidinas (6xHis) en el extremo N-terminal que posibilita tanto la detección por Western blot como la purificación de las proteínas recombinantes por cromatografía de afinidad. Ambos vectores presentan un mismo tamaño de 4779 pb y únicamente difieren en el marco de lectura. Asimismo, los insertos empleados en la construcción de estos vectores fueron seleccionados a partir del genoma de *M. maydis*. Para el ensamblaje de Upf1, se eligieron los primeros 873 pb, dado que dichos segmentos codifican el dominio CH, caracterizado por su alto contenido de cisteínas e histidina, lo cual favorece la interacción con UPF2. Como resultado, se obtuvo la construcción Upf1-CH/pProEXHTb con un peso molecular de 5652 pb, localizándose el inserto en la posición 363-1235. En el caso de Upf2, se amplificó el

gen completo, el cual presenta una longitud de 3708 pb. De este modo, se obtuvo la construcción Upf2/pProEXHTb con un peso total de 8487 pb, ubicando el inserto en las posiciones 363- 4070 pb. Para obtener Upf3/pProEXHTc se amplificó el gen completo, que tiene un tamaño de 1608 pb. El fragmento está ubicado entre las posiciones 750-2358 (**Figura 15**) (Burgos-Gómez, 2014; Martínez-Montiel, 2016).

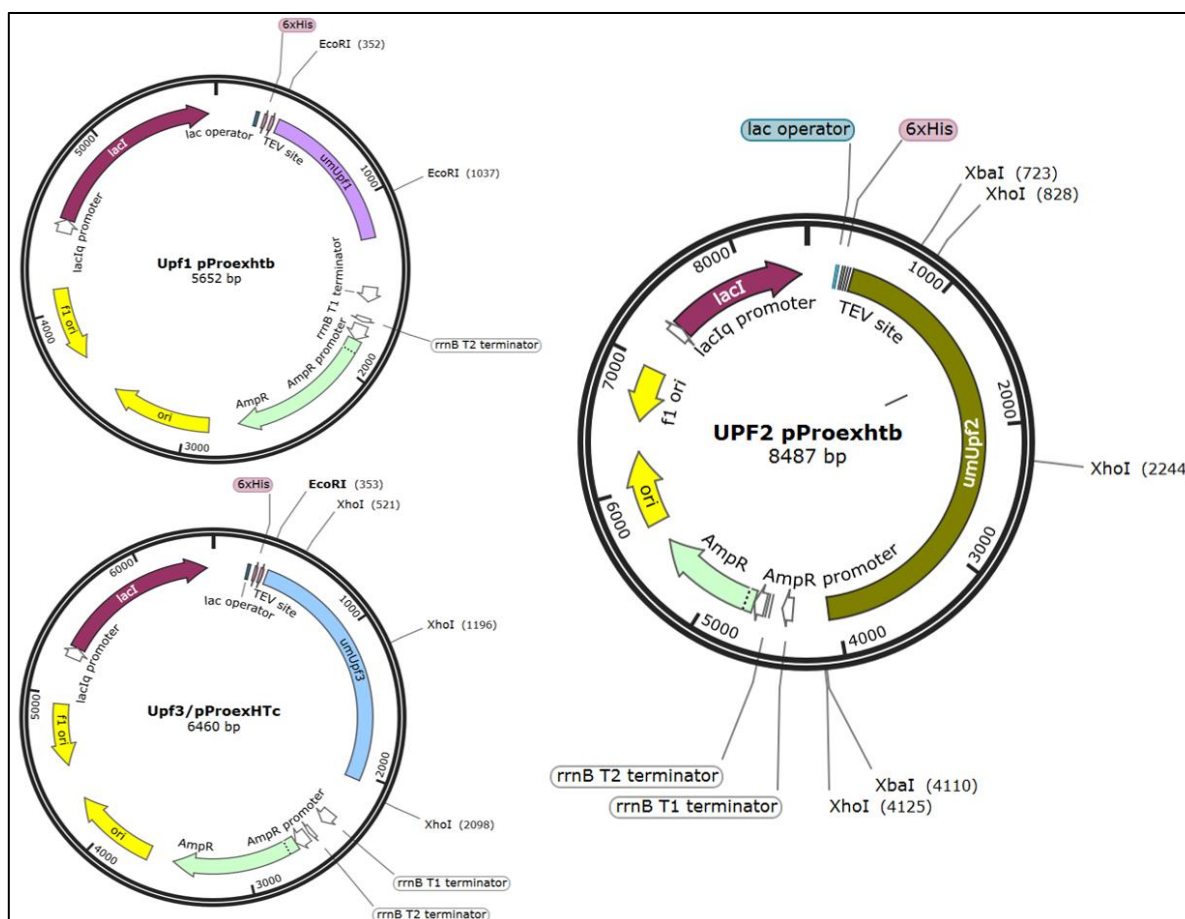


Figura 15. Construcción de los vectores para las proteínas recombinantes umUpf1-CH, umUpf2 y umUpf3.

La figura muestra los mapas de cada una de las construcciones de los plásmidos, indicando su tamaño (pb) y las principales características del vector, incluyendo el cassette de resistencia a ampicilina (amp), el operón lactosa (*lac operator*), represor *lacI*, el promotor *trc*, el sitio de inducción con IPTG y la etiqueta de histidinas (6xHis). Asimismo, se señala la inserción y orientación de cada uno de los genes clonados y los distintos sitios de corte con enzimas de restricción. Esta figura fue realizada en el programa SnapGene.

También, se han llevado a cabo ensayos de inhibición de la vía utilizando fármacos como la emetina, observándose que la adición de 100 ug/ml de este compuesto lograba suprimir dicha vía. Posteriormente, mediante técnicas de biología molecular como RT-PCR, se evaluó la expresión de 17 transcritos y se detectó un aumento en los niveles de Fraxatina, Magoh y Cyh2, por lo que la acumulación de estos refiere a que son blancos de la vía. Mientras que la

transcripción de otros factores activadores de la vía como Upf3, Hbs1, Mushashi, Rnps1 y U1-70K disminuyen considerablemente, lo cual tiene sentido debido a la inhibición de esta ruta (**Figura 16**) (Martínez-Montiel, 2016).

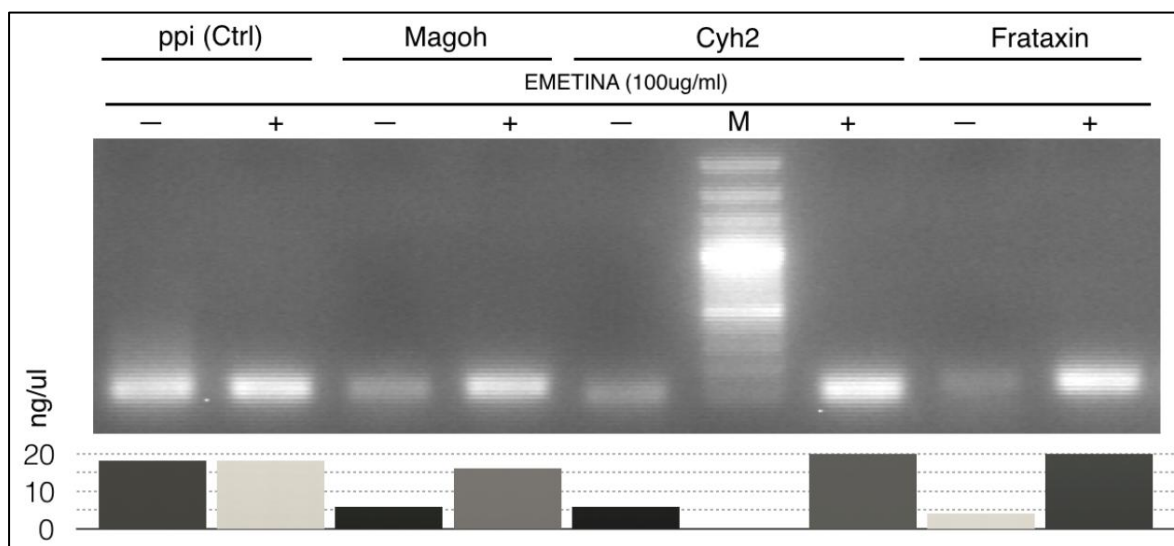


Figura 16. Transcritos regulados por NMD en *M. maydis* FB1.

Electroforesis de un gel de agarosa al 1.5% donde se observan los amplificadores de PCR a partir de cDNA para ppi, Magoh, Cyh2, Frataxina. El ARN proviene de cultivos de *M. maydis* en presencia (+) y en ausencia (-) de emetina. En la gráfica se observa la cuantificación de la concentración para los productos de PCR (Martínez-Montiel, 2016) .

Por último, se ha demostrado que la alteración del gen *Upf1* por ensayos de mutagénesis como la interrupción del gen con *cassette* de resistencia a Higromicina tiene un efecto significativo en la supervivencia del microorganismo, pues es subletal para *M. maydis* (**Figura 17**) (Martínez-Montiel, 2016).

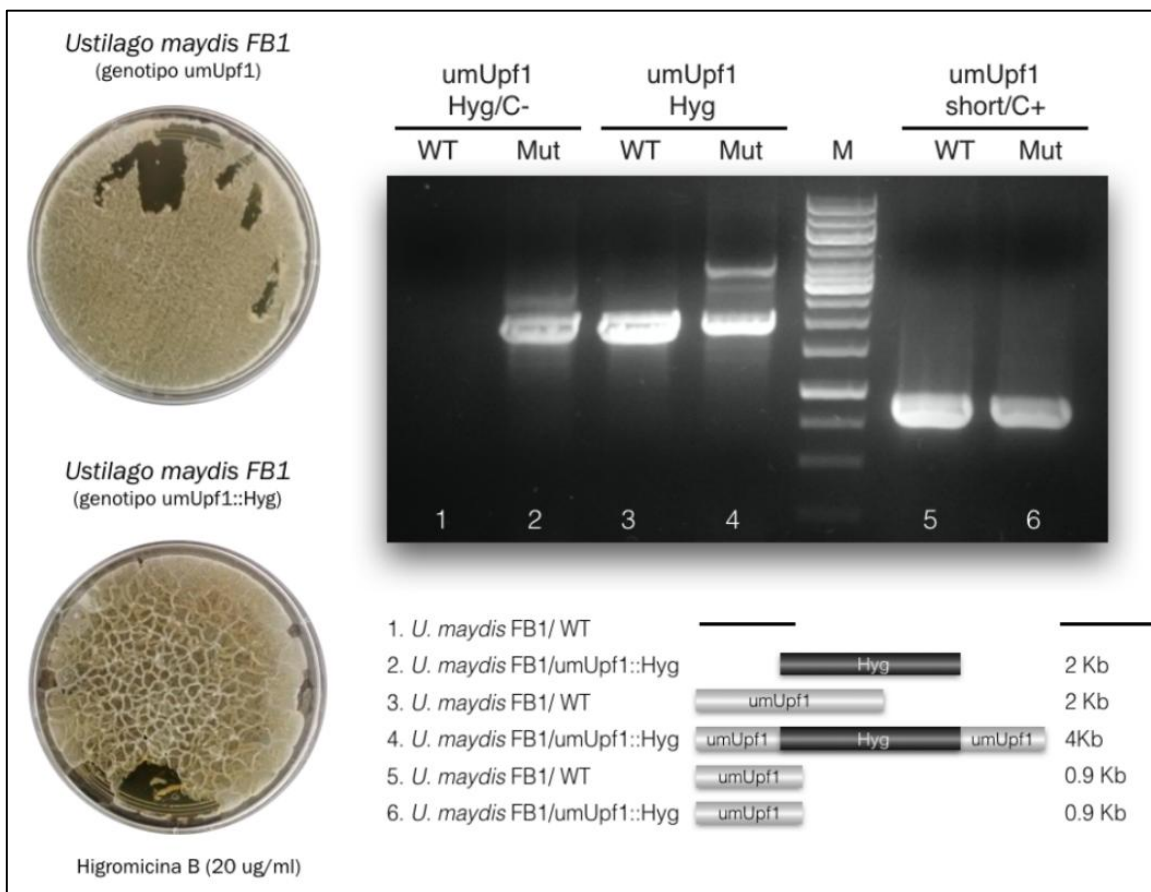


Figura 17. Interrupción de Upf1 con cassette de resistencia a Higromicina en la cepa FB1 de *M. maydis*.

A la izquierda se muestran las cepas en medio sólido, tanto la cepa silvestre de *M. maydis* FB1 (WT, arriba), como la cepa obtenida después de la electroporación y posterior crecimiento en medio de selección (20 ug/ml de Higromicina, Mut, abajo). A la derecha se presenta la imagen de un gel de agarosa al 1% donde podemos observar los productos de PCR amplificados a partir de ambas cepas WT y Mut. En el carril 1 y 2 el amplicon corresponde al cassette de Hyg (únicamente encontrado en la Mutante), en el carril 3 y 4 el amplicon se obtiene con los oligonucleótidos FwdUpf1 y RevinttronUpf1. En este caso en la WT únicamente se amplifica la región correspondiente al gen y para el caso de la mutante se amplifica además de dicha banda, una adicional correspondiente al generado a partir de la inclusión del gen de Higromicina. En los carriles 5 y 6 se muestra el amplicon para la región CH de umUPF1 contenido en ambos fondos génicos. Abajo del gel se muestra la representación esquemática para describir el origen de las muestras, los tamaños esperados y las regiones que comprenden los amplificados (Martínez-Montiel, 2016).

4. JUSTIFICACIÓN

El decaimiento del ARNm sin sentido (NMD, por sus siglas en inglés: Nonsense Mediated mRNA Decay) es un mecanismo postranscripcional, que regula la expresión génica de eucariotas, facilitando la eliminación de transcritos anómalos. Se ha descrito su importancia y función en células eucariotas. Sin embargo, existen dificultades técnicas para estudiarlo, por lo que se propone al basidiomiceto *Mycosarcoma maydis* como modelo experimental.

El estudio de los factores de NMD, así como su asociación con el *splicing* nos permitirá comprender su función y regulación en la degradación de transcritos aberrantes bajo condiciones celulares normales y de inhibición. Una vez definidos, eventualmente, extrapolarlo en humano para entender los procesos anormales en el desarrollo de enfermedades como el cáncer, así como proponer nuevos métodos de detección y/o terapias alternas.

5. HIPOTESIS

Mycosarcoma maydis posee las proteínas responsables de la activación de la vía de decaimiento del ARN mensajero sin sentido (NMD).

6. OBJETIVOS

6.1 Objetivo General

Estudiar los factores de *splicing* y de decaimiento del ARNm sin sentido (NMD) en *M. maydis*.

6.2 Objetivos Específicos

- Realizar un análisis comparativo de la maquinaria de NMD en hongos.
- Verificar la presencia de los factores de NMD putativos en *M. maydis*.
- Analizar la posible interacción de UPF1 con el factor de *splicing* RNPS1 en *M. maydis*.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Análisis bioinformático

Se estudiaron las proteínas involucradas en la activación de la vía NMD en 187 especies de hongos, incluido *M. maydis*. Para la búsqueda de la información, se utilizaron diferentes bases de datos, entre ellas la Enciclopedia de Genes y Genomas de Kyoto (KEGG, por sus siglas en inglés Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) y el Centro Nacional para la información Biotecnológica (NCBI, por sus siglas en inglés National Center for Biotechnology Information), así como sus derivados: KEGG pathway, NCBI Protein y NCBI Orthologs.

7.2 Material Biológico y metodología experimental

7.2.1 Cepas de *Escherichia coli* y plásmidos utilizados

Cepas para clonación			
Cepas	Genotipos o características		Referencia
<i>Escherichia coli</i> DH5α	<i>LacZ Delta M15, endA1, recA1</i>		Taylor, 1993
Cepas para expresión			
Cepas	Genotipos o características	tRNA genes	Referencia
<i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3)	<i>F-ompT gal dcm lon hsdSB(r_B⁻ m_B⁻) λ(DE3)</i>	-	Agilent technologies
<i>Escherichia coli</i> BL21- Codon Plus (DE3)	<i>E. coli B F- ompT hsdS(r_B⁻ m_B⁻) dcm+ Tetr gal λ(DE3) endA Hte [argU ileY leuW Camr</i>	argU, ileY, proL, leuW	Agilent technologies
<i>Escherichia coli</i> Solu BL21 (DE3)	<i>F- ompT hsdS_B (r_B⁻ m_B⁻) gal dcm (DE3)[†]</i>	-	Amsbio Biosite

Tabla 2. Cepas utilizadas para clonación y expresión de proteínas recombinantes

Cepas fúngicas		
Cepa	Descripción	Referencia
<i>Ustilago maydis</i> 521 ó <i>Mycosarcoma maydis</i> 521	Cepa de referencia	Broad Institute, USA

Tabla 3. Cepas fúngicas utilizadas

Plásmidos				
Vectores	Uso	Características	Cassette de Resistencia	Referencia
pProEx-HTb	Vector de clonación	Rep (pBR322), His (6) N-terminal, <i>bla</i> (Ap), <i>lacI</i> , promotor <i>Trc</i> , Sitio múltiple de clonación (SMC)	Ampicilina	ThermoFisher
pProEx-HTc	Vector de clonación	Rep (pBR322), His (6) N-terminal, <i>bla</i> (Ap), <i>lacI</i> , promotor <i>Trc</i> , Sitio múltiple de clonación (SMC)	Ampicilina	ThermoFisher

Tabla 4. Vectores utilizados para la producción de proteínas recombinantes

7.2.2 Medios de cultivo

Se utilizaron diferentes medios de cultivo tanto líquidos como sólidos. A continuación, se detalla su preparación:

Luria Bertani (LB): Medio de cultivo utilizado para el crecimiento de *E. coli DH5-α*.

Luria Bertani (LB)	
Componente	Cantidad para 1L
Extracto de Levadura	5 gr
NaCl	10 gr
Peptona de Caseína	10 gr

Tabla 5. Medio de cultivo Luria Bertani

(SOB): Medio de cultivo utilizado para el crecimiento de *E. coli DH5-α*. Una vez esterilizado el medio, se suplementó con 10 ml de $MgSO_4$, el cual se preparó con 24.6 gr de $MgSO_4$ anhidro (1M) hasta llevar a un volumen final de 100 ml y se esterilizó.

(SOB)	
Componente	Cantidad para 1L
Extracto de Levadura	5 gr
Triptona	20 gr
NaCl	0.5 gr
KCl	0.186 gr

Agua desionizada	950 ml
Sales	
Sulfato de Magnesio (MgSO ₄)(1M)	10 ml
Glucosa 20%	20 ml

Tabla 6. Medio de cultivo SOB

Terrific Broth (TB): Medio de cultivo utilizado para el crecimiento de *E. coli*. Para este medio, se preparó 100ml de buffer de fosfatos, el cual fue preparado, esterilizado y agregado al medio al final.

Terrific Broth (TB)	
Componente	Cantidad para 1L
Extracto de Levadura	24 gr
Triptona	20 gr
Glicerol	4 ml
Agua desionizada	900 ml
Buffer de fosfatos	
Fosfato monopotásico (KH ₂ PO ₄) (0.17 M)	2.31 gr
Fosfato dipotásico (K ₂ HPO ₄) (0.72 M)	12.5 gr
Agua desionizada	100 ml

Tabla 7. Medio de cultivo Terrific Broth

Yeast Extract, Peptone, Sugar (YEPS): Medio de cultivo utilizado para el crecimiento de *M. maydis*.

Yeast Extract, Peptone, Sugar (YEPS)	
Componentes	Cantidad para 1L
Dextrosa	20 gr
Extracto de Levadura	10 gr
Peptona de Caseína	20 gr

Tabla 8. Medio de cultivo YEPS

Para medios sólidos, se agregó 15 g/L de agar

En caso de ser necesario, los medios de cultivo fueron suplementados con antibióticos, los cuales se añadieron al medio estéril a partir de una solución concentrada. La preparación se realizó de la siguiente manera:

- Ampicilina (Amp) (sal sódica, Roche): se preparó una solución concentrada a 100 mg/ml en agua inyectable (PISA) para obtener en el medio una concentración de 100 µg/ml.

7.2.3 Técnicas de transferencia génica

7.2.3.1 Transformación de células de *E. coli* DH5-α con Cloruro de Calcio (0.1 M)

7.2.3.1.1 Preparación de células quimiocompetentes

Para obtener células quimiocompetentes se realizó el siguiente protocolo: se tomó una UFC de la cepa *E. coli* DH5α de una placa fresca y se inoculó en 5 ml de medio LB sin antibiótico el cual se incubó 16 horas a 37 °C en agitación constante. Después, se transfirió dicho inóculo en 200 ml de medio LB sin antibiótico y se incubó a 37 °C en agitación constante a 200 rpm y se revisó aproximadamente después de dos horas, hasta obtener una D.O_{600nm} de aproximadamente 0.5, sino se encontró a la densidad esperada, se debe revisar cada 20 minutos hasta alcanzarla. Posteriormente, se transfirió las células a tubos de polipropileno previamente enfriados y se colocaron en hielo por 10 minutos. Todos los pasos siguientes se realizaron en condiciones de esterilidad: se recuperaron las células por centrifugación a 3000 rpm por 10 minutos a 4 °C, se decantó el medio. Se resuspendió la pastilla en 50 ml de CaCl₂ 0.1 M y se colocó en hielo durante 10 minutos. Se recuperaron las células por centrifugación y se decantó el sobrenadante. Se resuspendió la pastilla en 2-4 ml de CaCl₂ 0.1 M/Glicerol al 15 %. Se realizaron alícuotas de 300 µl y se separaron en microtubos de 1.5 ml, se marcaron y enfriaron en hielo durante 10 min, finalmente se almacenaron a -80°C.

7.2.3.1.2 Transformación de células competentes *E. coli* DH5α por choque térmico

Se realizó la transformación de células competentes de la cepa *E. coli* DH5-α bajo el siguiente procedimiento: se tomaron 100 µl de células competentes y se colocaron en un microtubo de 1.5 ml. Se agregó 10 µl de plásmido (10 ng/ µl). Posteriormente se incubó el tubo 40 minutos en hielo, se realizó un choque térmico a 42 °C durante 90 segundos y se colocó el tubo en hielo para incubar durante 90

segundos. Después se agregó 750 µl de LB sin antibiótico y se incubó a 37 °C por 40 minutos en agitación. Finalmente se centrifugo a 3000 rpm por 5 minutos para obtener la pastilla, se decantó el exceso de LB, dejando aproximadamente 100 µl para resuspender la pastilla y se plaqueo en LB + Amp (100 µg/ml). Las placas se incubaron a 37 °C por 18 horas.

7.2.3.2 Transformación de células *E. coli* BL21 y variantes con Cloruro de Rubidio (50 mM)

7.2.3.2.1 Preparación de células competentes

Para la preparación de células competentes, se cultivó *E. coli* BL21 en 5 ml de SOB suplementado con MgSO₄ (10 mM) a 37°C en agitación constante a 200 rpm durante toda la noche. Se tomó 500 µl de precultivo de una noche anterior, se inoculó en 50 ml de medio SOB suplementado con MgSO₄ (10 mM) y se incubó a 37°C hasta alcanzar una D.O._{550nm} de 0.5. Una vez alcanzada la D.O, se pasó el cultivo a un tubo falcón, se incubó en hielo por 10 minutos, se centrifugó a 4000 rpm por 10 minutos, se eliminó el sobrenadante. Posteriormente, se resuspendió la pastilla en 4 ml de tampón tfb1 (30 mM acetato de potasio pH 5.8, 100mM RbCl anhidro, 10mM CaCl₂, 50mM MnCl₂, 15% (v/v) glicerol) e incubó 20 minutos en hielo. Se centrifugó en las mismas condiciones que anteriormente, se resuspendió en 2 ml de tampón tfb2 (100mM MOPS, 75mM CaCl₂, 50mM RbCl anhidro, 15% glicerol, KOH pH 6.8) y se incubó en hielo por 15 minutos. Se traspasaron las células y se realizaron alícuotas de 200µl en tubos eppendorf de 1.5 ml y se conservaron a -80°C.

7.2.3.2.2 Transformación de células competentes por choque térmico

La transformación de células competentes se realizó mediante el método de choque térmico. Para ello, se mezclaron 95 µl de células competentes con 5 µl ADN plasmídico (10 ng/ µl) en un tubo eppendorf. La muestra se incubó en hielo por 30 minutos y posteriormente se aplicó un choque térmico a 42°C por 1 minuto y 20 segundos. Después, las células se incubaron en hielo durante 1 minuto. Posteriormente, se adiciono 1 ml de medio SOB y se incubó durante 1 hora 30 minutos a 37°C en agitación constante con el fin de permitir la recuperación celular y la expresión del gen de resistencia al antibiótico. Una vez transcurrido el tiempo

de incubación, se tomaron 100 µl de células transformadas y se sembraron en placas de medio LB sólido suplementado con ampicilina (100 µg/ml). Por último, las placas se incubaron a 37°C durante toda la noche para favorecer el crecimiento de las colonias transformantes.

7.2.4 Técnicas Generales de Biología Molecular

7.2.5 Técnicas Experimentales con ácidos nucleicos

7.2.5.1 Extracción de ADN plasmídico de *E. coli* DH5-α mediante lisis alcalina

Para el aislamiento del ADN plasmídico, se cultivó *E. coli* DH5-α en 5 ml de medio LB+ Ampicilina (100 µg/ml) e incubó a 37°C en agitación constante durante toda la noche. Una vez obtenido el crecimiento, se centrifugó el cultivo a 4000 rpm por 10 minutos y se decantó el sobrenadante. Se resuspendió en 1 ml de PBS 1X y se pasó a un tubo eppendorf de 1.5 ml. Se centrifugó a 13 000 rpm por 3 minutos y se decantó el sobrenadante. Se resuspendió la pastilla en 200 µl de solución I (50 mM de glucosa, 25 mM de Tris-HCl pH 8 y 10 mM de EDTA pH 8), se añadió 200 µl de solución II (0.2N NaOH y 1%SDS), se mezcló por inversión y se agregó 200 µl de solución III (Acetato de potasio 3M). Los lisados se centrifugaron a 13 000 rpm por 10 minutos. Se traspasó el sobrenadante a un microtubo eppendorf de 1.5 ml, se adicionó 1 ml de etanol absoluto frío y se incubó a -20°C por 1 hora. Se centrifugó, se decantó el sobrenadante y se agregó 1 ml de etanol al 70% frío para lavar la pastilla. Se centrifugó, decantó y eliminó el etanol con mucho cuidado no llevarse la pastilla. Se secó y se resuspendió la pastilla en 30 µl de agua inyectable (PISA) con 0.01% de ARNasa.

7.2.5.2 Extracción de ADN plasmídico de *E. coli* DH5-α mediante CTAB

Para el aislamiento de ADN plasmídico, se colocó un precultivo de *E. coli* DH5-α en 5 ml de medio SOB+Amp (100 µg/ml) e incubó a 37°C durante toda la noche. Se tomó 1.5 ml del cultivo y se traspasó a un microtubo de 1.5 ml estéril. Se centrifugó 1 minuto a 15 000 rpm y se aspiró el sobrenadante. Se agregó 300 µl de STET (sacarosa 8% (p/v), Tritón X-100 al 0.1% (v/v), EDTA 0.5 M, Tris-HCl 50mM, pH 8) y se resuspendió la pastilla cuidadosamente sin generar burbujas. Se agregó 10 µl

de lisozima (50 mg/ml), se resuspendió nuevamente y se incubó a 37°C por 10 minutos. Se hirvieron las muestras a 95°C por 1 minuto 20 segundos, se centrifugaron y se retiró la pastilla de restos celulares con un palillo. Se agregó 10 µl de CTAB 5% (p/v)+ NaCl (0.5 M) al sobrenadante, se vortexeo, se centrifugó y agregó 300 µl de NaCl (1.2 M). Se precipitó con 750 µl de etanol absoluto frío, se vortexeo, se centrifugó y se decantó el sobrenadante. Se añadió 750 µl de etanol al 70%, se centrifugó a 13 000 rpm por 5 minutos y se decantó el sobrenadante. Se dejó secar la pastilla y se agregó 33 µl de agua miliQ con 0.01% de ARNasa.

7.2.5.3 Extracción de ARN de *M. maydis* con trizol

Para la extracción de ARN se tomaron 5 ml de la suspensión celular de un cultivo de toda la noche con una D.O_{600nm} de 1.0 (ajustando la densidad adecuada) de *M. maydis*, se centrifugo durante 10 minutos a 4000 rpm a 10°C decantando el sobrenadante; a continuación las células se lavaron con 5 ml de PBS 1X, se centrifugó y decantó. La pastilla de extractos celulares fue colocada en un mortero estéril, se agregó nitrógeno líquido y se maceró hasta obtener un polvo blanquecino o lisado celular. Se colocó en un tubo eppendorf de 1.5 ml. Se resuspendió con cuidado (sin formar burbujas durante el pipeteo) en 1 ml de trizol (Invitrogen). La muestra homogenizada se incubó a temperatura ambiente por 5 minutos. Se centrifugó a 13,000 rpm por 15 minutos a 4°C. Se traspasó el sobrenadante a un tubo estéril. Se agregó 250 µl de cloroformo, se agitó vigorosamente con la mano por 30 segundos, se incubó por 5 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó a 13 000 rpm por 15 minutos a 4°C. Posteriormente, se tomó la fase acuosa (evitando tocar la pared sucia del tubo) y se traspasó a un tubo estéril. Se agregó 500 µl de isopropanol y se mezcló cuidadosamente. Se incubó 1 hora a -20°C. Se centrifugó a 13 000 rpm por 10 minutos y se retiró el sobrenadante con mucho cuidado. Se agregó 350 µl de etanol al 75%, deslizándolo por la pared del tubo, se mezcló por inmersión, se centrifugó por 13 000 rpm por 10 minutos y se retiró el sobrenadante con cuidado sin retirar la pastilla. Se dejó secar la pastilla por 10 minutos, se resuspendió en 30 µl de agua libre de ARNasas (previamente incubada 10 minutos a 55°C) y se almacenó a -20°C.

7.2.5.4 Electroforesis de ADN y ARN de *M. maydis* en geles de agarosa

En las distintas electroforesis se usaron geles de agarosa al 1% (p/v) para ADN plasmídico, corroborar las restricciones y 1.5% (p/v) para ARN total, ambos en tampón TAE 1X(40mM de Tris-acetato pH 8 y 1mM de EDTA). Este mismo tampón fue utilizado para el corrimiento de las muestras. Las muestras de ADN y ARN fueron mezcladas con 3 µl de tampón de carga (30% glicerol, 0,25% de azul de bromofenol (p/v), 0,25% xilencianol (p/v) en agua inyectable estéril (Pisa), pH 8), se depositaron en los pocillos de los geles solidificados y se corrieron a 100V, 400mA por 30 minutos. Como patrón de referencia se utilizaron 5 µl de marcador de peso molecular de 1 kb (Invitrogen).

7.2.5.5 Retrotranscripción a partir de ARN de *M. maydis*

Para la obtención de fragmentos de ADNc a partir de ARN total de *M. maydis* se utilizó y siguió el protocolo del kit Thermo Scientific RevertAid First Strand cDNA Synthesis #K1621. En un tubo eppendorf de 1.5 ml, se agregó lo siguiente: 2 µl ARN (50 ng/µl), 1 µl Oligo dT y 9 µl de agua libre de ARNasas, se mezcló por inmersión, se centrifugo brevemente e incubó a 65°C por 5 minutos. Se mantuvo el tubo en hielo y se agregaron los componentes en el siguiente orden: 4 µl de Buffer 5X, 1 µl de Inhibidor de ARNasa (20 U/µl) RiboLock, 2 µl de Mix dNTP (10 mM) y 1µl de enzima RevertAid M-MuLV RT (200 U/µl). Se mezcló por inmersión, se centrifugó brevemente, se incubó a 42°C por 1 hora y se detuvo la reacción con calor a 70°C por 5 minutos.

7.2.5.6 Amplificación de Fragmentos de ADN mediante PCR

Para amplificar los genes *Rnps1*, *Upf1*, *Upf2*, *Upf3*, *Magoh* y *Hbs1*, las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un volumen final de 25 µl, el cual contenía: 2.5 µl de Buffer de PCR (10X), 1.5 µl de MgCl₂ (25 mM), 1 µl de dNTP's (10 mM), 1 µl de oligonucleótido *Forward*, 1 µl de oligonucleótido *Reverse*, 0.5 µl de Taq ADN polimerasa, 1 µl de ADN o ADNc (obtenido a partir de la retrotranscripción) como templado y 16.5 µl de agua (PISA). Se utilizó un programa general de amplificación, con excepción de la temperatura de alineación y el tiempo de extensión, que se

ajustaron según el tamaño del gen a amplificar. El protocolo general incluyó una etapa de predesnaturalización a 95°C por 5 minutos, seguida de 25 a 30 ciclos de las siguientes condiciones: Desnaturalización a 94°C de 30 a 45 segundos, Alineación por 30 a 45 segundos con la temperatura de fusión necesaria y extensión a 72°C por el tiempo necesario para amplificar el fragmento esperado, tomando 1 minuto por cada mil pares de bases a amplificar. Al finalizar los ciclos se programó una extensión final de 72°C por 7 minutos. La temperatura de alineamiento se calculó a partir de la media de las T_m (temperatura de fusión) del par de oligonucleótidos usados en cada reacción.

Oligonucleótidos y condiciones de PCR					
Nombre del oligonucleótido	Secuencia	Tm	Tiempo de extensión	Tamaño del amplificado	Referencia
PCR para comprobación de clonación					
Upf1 Fwd	ATG TCC GAG CTC TAC CAG TTT	62°C	1 min	873 pb	Este trabajo
Upf1 RevCH	CGG CTT GTC GAG ATC GTC AA	62°C			Este trabajo
Upf2 Fwd	ATG GCA GCT TCC GCT AGC T	60°C	4 min	3819 pb	Este trabajo
Upf2 Rev	TTA GAA GCC GGG ACT GTT CC	62°C			Este trabajo
Upf3 Fwd	ATG TCG CAG TCA CAA AGA GG	60°C	2 min	1413 pb	Este trabajo
Upf3 Rev	CTA GAG GAT GTG CAG CTT GG	62°C			Este trabajo
PCR para amplificación de gen empleando como molde ADNc					
Rnps1 FwdRT	CAC AAT CAA GAC GTG CCA AAC	62°C	30 seg	148 pb	Este trabajo
Rnps1 Rev	TCA TCG TGT GTG TTG GCG G	62°C			Este trabajo
Upf1 Fwd	ATG TCC GAG CTC TAC CAG TTT	62°C	30 seg	136 pb	Este trabajo
Upf1 RevRT	GGC GTG CTT GGA GTG TTT CT	62°C			Este trabajo

Upf2 Fwd	ATG GCA GCT TCC GCT AGC T	63°C	30 seg	132 pb	Este trabajo
Upf2 RevRT	GCG CTC TTT GTA AAT TGC CTG	63°C			Este trabajo
Upf3	ATG TCG CAG TCA CAA AGA GG	62°C	30 seg	105 pb	Este trabajo
Upf3 RevRT	CGC CCT GTC GGT TTG TTG C	62°C			Este trabajo
Magoh Fwd	ATG TCT GAC TTT TAC GTC CGA	64°C	30 seg	148 pb	Este trabajo
Magoh RevRT	TCC ACA TCT CTT TGC GGA TTA G	64°C			Este trabajo
Hbs1 Fwd	ATG TCA CGA CAT CGC GCC G	62°C	30 seg	268 pb	Este trabajo
Hbs1 RevRT	TTG CTT CTC TTC GGC TCT TT	62°C			Este trabajo

Tabla 9. Oligonucleótidos y condiciones de PCR

7.2.5.7 Uso de enzimas de restricción para el análisis del ADN plasmídico

Los ensayos con enzimas de restricción permitieron realizar cortes al ADN plasmídico para la comprobación de las construcciones. Estas enzimas fueron suministradas por los laboratorios Roche, Fermentas y New England Biolabs. La reacción se llevó a cabo en un volumen de 20 µl, colocando 2 µl de Buffer, 0.5 µl de enzima como se indica en la tabla, 3 µl de ADN plasmídico y 14.5 µl de agua (PISA). Posteriormente, las reacciones se incubaron a 37°C por 2 horas. A continuación se muestra una tabla de las enzimas utilizadas para estos ensayos:

Tabla de enzimas de restricción				
Nombre de la enzima	Corte		Temperatura	Tiempo de incubación
	5' → 3'	3' → 5'		
<i>EcoRI</i>	G AATTC	CTTAA G	37°C	2hrs
<i>BamHI</i>	G GATCC	CCTAG G	37°C	2hrs
<i>XbaI</i>	T CTAGA	AGATC T	37°C	2hrs

Tabla 10. Condiciones de uso de las enzimas de restricción

La eficiencia de la restricción se comprobó mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1% (p/v).

7.2.5.8 Purificación y concentración de ADN plasmídico

Para la purificación de los plásmidos Upf1 pProEX-HTb y Upf2 pProEX-HTb se utilizó y siguió el protocolo del Kit Qiagen, Núm. 12963.

7.2.5.9 Secuenciación de las construcciones Upf1 pProEX-HTb y Upf2 pProEX-HTb

El ADN destinado a la secuenciación fue purificado aplicando el protocolo establecido por el Kit Qiagen, Núm. 12963. Los oligonucleótidos utilizados en la secuenciación fueron diseñados de la siguiente manera:

Tabla de oligonucleótidos para secuenciación				
Nombre del oligonucleótido	Secuencia	Longitud	Localización	Referencia
M13/pUC Reverse	AGC GGA TAA CAA TTT CAC ACA GG	23 pb	235-257	Invitrogen

Tabla 11. Características de los oligonucleótidos utilizados para secuenciación

Posteriormente, las muestras y los oligonucleótidos fueron enviadas a la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM.

7.2.6 Técnicas para la síntesis de proteínas recombinantes

7.2.6.1 Inducción de las proteínas recombinantes RNPS1 y UPF1-CH

Para la inducción de las proteínas recombinantes RNPS1 y UPF1-CH, se inoculó 1ml de medio TB+Amp (100 µg/ml) con una UFC de la cepa transformada de RNPS1 o UPF1-CH según correspondiera, y se incubó a 37°C en agitación constante a 200 rpm toda la noche. Al día siguiente, se tomaron 100 µl del precultivo y se inocularon en 2 ml de TB+Amp (100 µg/ml). Se incubó a 37°C en agitación constante a 200 rpm por 2 horas o hasta alcanzar una D.O_{590nm} de 0.5 -1.0. Se removió 1 ml de cultivo (muestra sin inducir). Al cultivo restante, se le adicionó 5µl, 10µl, 15µl, 20µl y 25µl de un stock de (100mM) para alcanzar concentraciones finales de 0.5 mM, 1.0 mM, 1.5 mM, 2.0 mM y 2.5 mM, respectivamente. Todas las muestras se incubaron a 37°C en agitación constante a 200 rpm por 3 horas. Una vez transcurrido el tiempo, se tomaron 200 µl de ambos cultivos; inducido y no inducido,

estos se pasaron a un microtubo. Se centrifugo a 15 000 rpm durante 1 minuto y se decantó el sobrenadante cuidadosamente. Se agregó 60 µl de agua miliQ y se resuspendió la pastilla. Posteriormente, se agregó 20 µl de Buffer Laemli 4X (1M Tris-HCl pH 6.8, 10% SDS, glicerol, 1% azul de bromofenol, β-mercaptoetanol a un volumen final de 10 ml) y 60 µl de agua miliQ, se mezcló por inversión, se hirvieron muestras a 95°C durante 5 minutos y se centrifugaron a 6 000 rpm durante 10 segundos para recuperar la mayor parte de las proteínas. Las proteínas inducidas y no inducidas se resuspendieron con ayuda de una jeringa de insulina hasta que el buffer Laemli 4x lo permitiera para reducir la viscosidad. Se centrifugaron a 6 000 rpm durante 10 segundos y se almacenaron para su posterior corrimiento en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 10%.

7.2.6.2 Electroforesis de las proteínas recombinantes RNPS1 y UPF1-CH

Para verificar la integridad e identificar la proteína de interés, se realizó un gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) bifásico donde se realizó el gel separador al 10% (2.5 ml de Acrilamida 30%, 1.9 ml de Buffer Tris-HCl 1.5M pH 8.8 0.4% SDS, 22 µl de APS 10%, 15 µl de TEMED y 3.12 ml de agua) y para el gel concentrador al 10% (650 µl de Acrilamida al 30%, 1.25 ml de Buffer Tris-HCl 0.5M pH 6.8 0.4%SDS, 20 µl de APS al 10%, 15 µl de TEMED y 3.0 ml de agua). Se cargaron 20 µl de cada muestra en los pocillos y 10 µl de marcador de proteínas con un rango de 10-250 kDa (Page Ruler, BioRad). La electroforesis se realizó en buffer Tris-Glicina (500mM Tris, 500mM Glicina) a 140V por 1 hora y 45 minutos.

7.2.6.3 Tinción de geles de poliacrilamida con Azul de Coomassie

Para visualizar las proteínas, el gel de poliacrilamida se tiño con Azul de Coomassie (0.1% brillante de Coomassie, 45% metanol, 10% ácido acético) durante 20 minutos en agitación constante. Posteriormente, se retiró el exceso de colorante, se agregó solución para desteñir (20% Metanol, 20% ácido acético, 60% agua bidestilada) y se dejó en agitación constante por 30 minutos. Se realizaron dos lavados con solución para desteñir o hasta eliminar por completo el colorante.

7.2.7 Purificación de las proteínas recombinantes RNPS1 y UPF1-CH

Para la purificación de las proteínas recombinantes UPF1-CH y RNPS1, se seleccionó una colonia de la cepa transformada, se inoculó en 1ml de medio SOB suplementado con ampicilina (100 µg/ml) y se incubó durante 16 horas a 37°C en agitación constante. Debido a que el sonicador requiere de volúmenes mayores a 20 ml, se adicionaron 300µl de precultivo a un matraz con un volumen de 50ml de medio TB con ampicilina (100 µg/ml) y se incubó a 37°C en agitación constante a 200 rpm durante 2-3 horas, o hasta alcanzar una D.O_{560nm} de 0.6-0.8. Posteriormente, se adiciono IPTG a una concentración de 0.5 mM, 1.0 mM, 1.5 mM, 2.0 mM y 2.5 mM (véase el apartado de resultados) y se dejó incubar por 3 horas adicionales bajo las mismas condiciones. Al finalizar la inducción, el cultivo se centrifugó a 4000 rpm por 10 minutos, se decantó el sobrenadante y se resuspendió el pellet celular en 20 ml de tampón de lisis (NaH₂PO₄ 50mM, NaCl 300 mM, imidazol 10 mM, PMSF 10 mM a pH 8.0). La disrupción celular, se realizó por sonicación, aplicando ciclos de 10 segundos de pulsación seguidos de 30 segundos de descanso a una amplitud del 40%. El lisado se centrifugo a 13 000 rpm durante 30min a 4°C, y el sobrenadante resultante se conservó a 4°C para su posterior purificación por cromatografía de afinidad.

La fracción soluble se purificó por cromatografía de afinidad utilizando columnas de níquel- ácido nitrilo acético- agarosa (Ni-NTA) (Qiagen, Cat #30230). La muestra se preparó siguiendo el protocolo del proveedor, donde se prepararon 4ml (8mg/mL) del lisado sonificado con 1 ml de perlas de níquel- ácido nitrilo acético- agarosa (Ni-NTA), y se incubó a 4°C por 2 horas en constante agitación. La mezcla se transfirió a la columna previamente equilibrada con 5ml de amortiguador de lisis. El primer volumen recolectado correspondió a la fracción no retenida. Después, se realizaron de dos a tres lavados con 2 ml de buffer de lavado (NaH₂PO₄ 50 mM, NaCl 300 mM, imidazol 20 mM, PMSF 10 mM a pH 8.0), recolectándose cada una de las fracciones. Por último, la proteína unida se recuperó aplicando tres veces 2ml de buffer de elución (NaH₂PO₄ 50 mM, NaCl 300 mM, imidazol 250 mM, PMSF 10 mM a pH 8.0), recolectando cada una de las eluciones por separado. Finalmente, se

analizaron las muestras en un gel de poliacrilamida al 10% en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE).

7.2.8 Técnicas para la solubilización de proteínas

7.2.8.1 Solubilización de proteínas con Sarkosyl

Para la solubilización de proteínas se utilizaron concentraciones crecientes de Sarkosyl, en un rango de 0.3% a 1%. Tras la lisis celular por sonicación, se tomó una alícuota de 1 ml a la que se añadieron 200 µl de Sarkosyl. La muestra se incubó a 4°C durante 3 horas en agitación constante. Posteriormente, se centrifugó a 13 000 rpm, obteniéndose las fracciones soluble y celular, las cuales fueron recolectadas para su posterior análisis mediante electroforesis en gel de poliacrilamida al 10% en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE).

7.2.8.2 Desnaturalización de la proteína recombinante RNPS1 con urea

Para la desnaturalización de proteínas, se prepararon cultivos de 50 ml, los cuales fueron inducidos y sometidos a sonicación bajo las mismas condiciones descritas en la sección 7.2.7. Tras la sonicación, las muestras se fraccionaron en sobrenadante y sedimento celular por centrifugación. El sedimento celular se resuspendió en 10 ml de PBS 1X, posteriormente, se tomó una alícuota de 1 ml y se transfirió a un microtubo. Esta muestra se centrifugó a 12 000 rpm durante 15 minutos a 4°C. El sobrenadante fue decantado. Se realizaron lavados consecutivos con distintas soluciones. Para ello, se añadió 1 ml de solución A (Tris-HCl 20mM, NaCl 500mM, urea 2M, Tritón X-100 pH 9) al sedimento celular. La suspensión se homogenizó utilizando un homogenizador hasta lograr la completa disolución del sedimento. Se centrifugó a máxima velocidad por 1 minuto y se decantó el sobrenadante. Se agregó 1 ml de solución B (Tris-HCl 20 mM, Cloruro de guanidina 2M, Ditiotretitol 1M (DTT) pH 9), se homogenizó, se centrifugó y se decantó el sobrenadante. Se añadió 1ml de solución C (HCl 20mM, Tritón X-100, DTT 1M pH 9) y se repitió el mismo procedimiento. Por último, se colocó 1 ml de solución D (Tris-HCl 20mM pH 9) y se repitió el procedimiento. Tras completar los 4 lavados, se resuspendió el sedimento en 1 ml de tampón de desnaturalización para cuerpos de inclusión (Tris-HCl 20 mM, NaCl 500 mM, urea 8M y DTT 1 mM), a una

temperatura de 4°C en constante agitación durante 16 horas. Para evaluar el procedimiento, se realizó y se visualizó en un gel de poliacrilamida al 10% en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE).

8. RESULTADOS

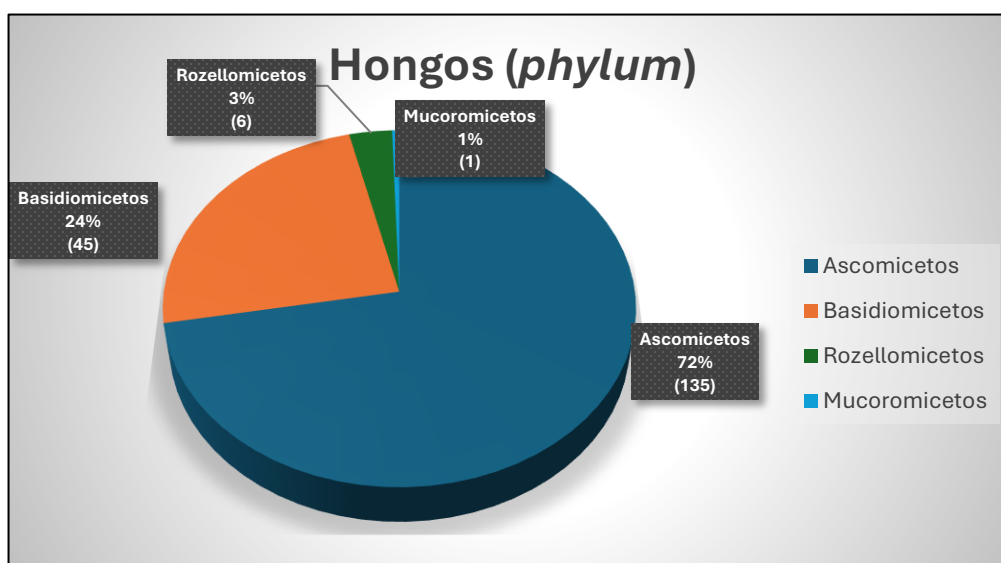
8.1 Análisis comparativo de la maquinaria de NMD en hongos

En el siguiente trabajo, se logró la identificación de 64 factores que pertenecen a la vía de supervivencia del ARNm (**Anexo 2**), de los cuales 32 factores están involucrados en la activación de la vía de decaimiento del ARNm sin sentido (NMD, por sus siglas en inglés; Non sense Mediated mRNA Decay). Cada uno de estos fueron clasificados, descritos y definidos con base en su función (**Tabla 13**).

Clasificación de factores en NMD	Tipos de factores	Factores	Características	Función
Factores centrales de NMD	Factores NMD	1 Upf1	Es una ARN helicasa, fosfoproteína y ATPasa, que forma parte del sustrato de SMG1.	Facilita el transporte nucleocitoplasmático. Forma parte de los factores del procesamiento del ARNm. Activa la vía NMD y promueve la traducción.
		2 Upf2	Es un regulador de la vía NMD, que une a UPF1 y UPF3	Participa en la exportación nuclear y supervivencia del ARNm, específicamente NMD. Promueve la traducción.
		3 Upf3	Es una proteína, que forma parte del EJC e interactúa directamente con UPF2 y en algunos casos con Y14	Favorece el transporte nuclear. También, participa en la vía NMD y la traducción.
Factores asociados de NMD	Fosfatasa y cinasas	4 SMG1	Es un miembro de la familia de proteínas relacionadas a la fosfoinositido-3-cinasa.	Implicada en la vía NMD al fosforilar a UPF1.
		5 SMG5	Es una proteína codificada por el gen SMG5	Participa en la degradación del ARNm mediada sin sentido al desfosforilar a UPF1. También, funge como un adaptador de UPF1 a la proteína fosfatasa 2A (PP2A).
		6 SMG6	Es una proteína codificada por el gen SMG6	Presenta una actividad de endonucleasa. Promueve la desfosforilación de UPF1.
	Factores del complejo EJC	7 SMG7	Es una proteína codificada por el gen SMG7	Implicada en la vía NMD al interactuar con PP2A y desfosforilar a UPF1. Si está sobreexpresa, facilita el reclutamiento de UPF1 a los cuerpos P.
		8 Y14	Es una proteína de unión al ARN 8A, que forma parte del componente central del EJC al formar un heterodímero estable con MAGOH	Promueve la exportación nuclear y la traducción. Participa en la activación de NMD.
		9 MAGOH	Es un componente central del EJC, que forma un heterodímero con Y14 y se une a TAP	Facilita el transporte nucleocitoplasmático y la vía NMD. Promueve la traducción.
		10 MLN51	Es un factor central del EJC, que se une a EIF4A3	Ayuda en el exporte nuclear, NMD y traducción.
		11 EIF4A3	Es una ARN helicasa dependiente de ATP y proteína central del EJC.	Participa en el transporte nucleocitoplasmático, la vía NMD y la traducción.
		12 SAP18	Es un componente de la familia de las histonas desacetilasas. Este factor se une a RNPS1	Facilita el transporte nucleocitoplasmático. Forma parte de los factores del procesamiento del ARNm. Activa la vía NMD y promueve la traducción.
		13 Pinin	Proteína que forma parte del complejo EJC y se asocia a RNPS1	Permite el exporte del ARNm y se une al EJC. Interviene en NMD.
		14 ACIN1	Es un componente del EJC, que forma un heterodímero con RNPS1	Induce la apoptosis. Participa en la traducción, NMD y traducción.
		15 RNPS1	Es una proteína de unión al ARN rico en dominios de serina.	Facilita el exporte del ARNm, la vía NMD y la traducción.
		16 REF/ALY	Es un componente del EJC, que recluta a TAP/p15 e interactúa con UAP56 y Y14	Participa en el exporte nuclear.
		17 SRM160	Es una proteína rica en serina/arginina, coactivadora del splicing. Forma parte del complejo EJC	Ayuda en el exporte del ARNm, splicing y la traducción.
	Factores asociados a EJC	18 UAP56	Es una ARN helicasa dependiente de ATP.	Promueve el splicing. Ayuda en el transporte nucleocitoplasmático. Forma parte del EJC, que recluta a REF/ALY.
		19 P15	Proteína asociada a REF/ALY y componentes del poro nuclear para interactuar con el EJC	Importante para el exporte nuclear, la vía de supervivencia del ARNm y la traducción.
		20 TAP (NXF)	Proteína asociada con el EJC, ya que interactúa con REF/ALY y algunos componentes del complejo del poro nuclear	Implicada en el transporte nucleocitoplasmático, la vía de vigilancia del ARNm y la biogénesis de ribosomas en eucariotas.
	Subunidades de Fosfatasa	24 PPP2C	Subunidad catalítica de la serina/treonina fosfatasa 2A (PP2A)	Al tratarse de una subunidad de la PP2A, está se une con las SMGs para desfosforilar a UPF1. Participa en el ciclo celular, la vía de supervivencia del ARNm y la traducción.
		25 PPP2R1	Subunidad reguladora A de serina/treonina fosfatasa 2A (PP2A)	Al tratarse de una subunidad de la PP2A, está se une con las SMGs para desfosforilar a UPF1. Presente en el ciclo celular, la vía de señalización PI3-Akt, la vía de supervivencia del ARNm y la traducción.
		26 PPP2R2	Subunidad reguladora B de serina/treonina fosfatasa 2A (PP2A)	Al tratarse de una subunidad de la PP2A, está se une con las SMGs para desfosforilar a UPF1. Implicada en el ciclo celular, la vía de señalización AMPK, la vía de supervivencia del ARNm y la traducción.
		27 PPP2R3	Subunidad reguladora B de serina/treonina fosfatasa 2A (PP2A)	Al tratarse de una subunidad de la PP2A, está se une con las SMGs para desfosforilar a UPF1. Presente en el ciclo celular, la transducción de señales, la vía de supervivencia del ARNm y la traducción.
		28 PPP2R5	Subunidad reguladora B de serina/treonina fosfatasa 2A (PP2A)	Al tratarse de una subunidad de la PP2A, está se une con las SMGs para desfosforilar a UPF1. Participa en el ciclo celular, la transducción de señales, la vía de supervivencia del ARNm y la traducción.
	Factores asociados al complejo de unión a CAP	29 CBP20	Subunidad de la proteína de unión al CAP	Participa en el exporte nuclear, la unión del CAP, el procesamiento de siRNA, la vía de supervivencia del ARNm y la traducción. Forma parte del espliceosoma durante el paso pre-catalítico.
		30 CBP80	Subunidad de la proteína de unión al CAP. Ortólogo de NCBP1 en humano.	Participa en el exporte nuclear, la unión del CAP, el procesamiento de siRNA, la vía de supervivencia del ARNm y la traducción. Forma parte del espliceosoma durante el paso pre-catalítico.
	Proteínas de disociación del ribosoma	31 HBS1	Es una proteína que se localiza en el citosol y forma complejos con Dom34	Interactúa con el ribosomas para promover la disociación de subunidades y la eliminación del peptidil ARNt.
		32 Dom34	Es una proteína que forma complejos con HBS1	Permite la disociación de la subunidad ribosómica y el inicio de la traducción.

Tabla 12. Características y funciones de los factores asociados a NMD

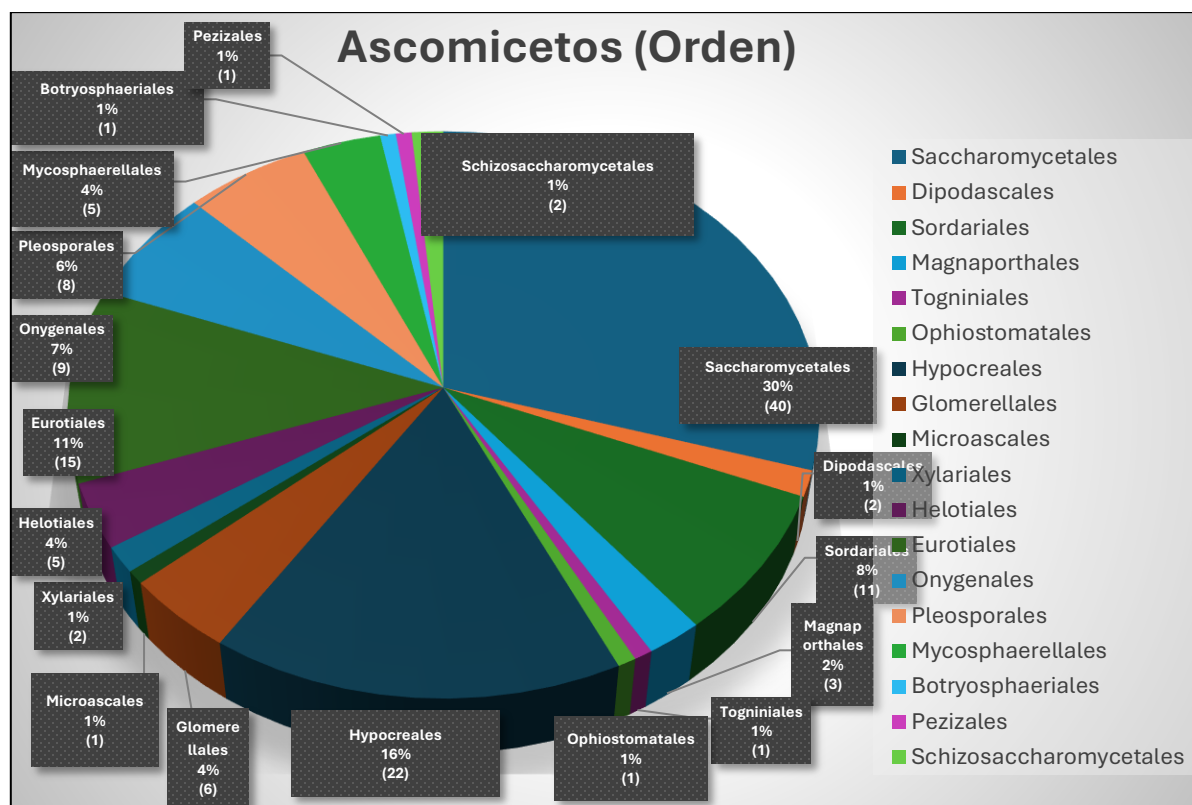
La distribución de los diferentes factores de NMD fue analizada y comparada en 187 hongos, que a su vez, fueron clasificados en diferentes grupos con base en su *phylum*, clase, orden, familia y género (**Anexo 2**). Debido a la gran información generada y con el fin de facilitar la interpretación, se realizó el análisis comparativo de los factores siguiendo la clasificación por *phylum* y orden. La clasificación por *phylum*, nos llevó a la agrupación de los 187 hongos en cuatro grupos con cierto número de especies que correspondían a 135 ascomicetos, 45 basidiomicetos, 6 rozellomicetos y 1 mucoromiceto (**Gráfica 1**).



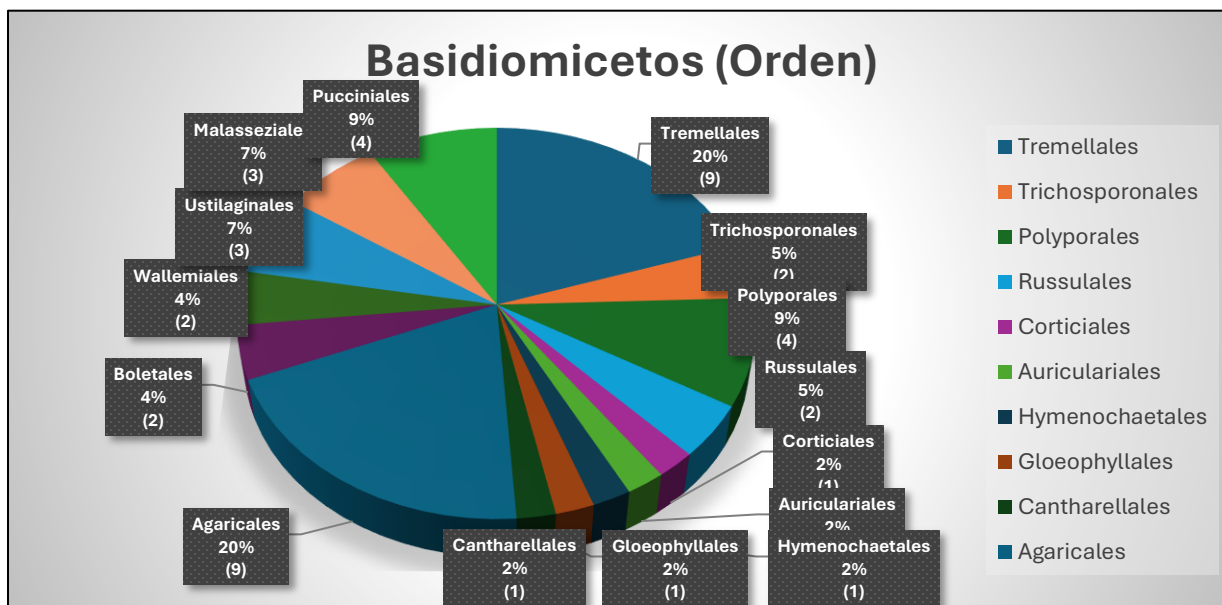
La subclasificación por orden nos permitió la agrupación de los 135 ascomicetos en: 40 *Saccharomycetales*, 2 *Dipodascales*, 11 *Sordariales*, 3 *Magnaporthales*, 1 *Togniniales*, 1 *Ophioostomatales*, 22 *Hypocreales*, 6 *Glomerelales*, 1 *Microascales*, 2 *Xylariales*, 5 *Helotiales*, 15 *Eurotiales*, 9 *Onygenales*, 8 *Pleosporales*, 5 *Mycosphaerellales*, 1 *Botryosphaeriales*, 1 *Pezizales* y 2 *Schizosaccharomycetales* (**Gráfica 2**).

Mientras que la subclasificación por orden de los 45 basidiomicetos se realizó de la siguiente manera: 9 *Tremellales*, 2 *Trichosporonales*, 4 *Polyporales*, 2 *Russulales*, 1 *Corticiales*, 1 *Corticiales*, 1 *Auriculariales*, 1 *Hymenochaetales*, 1 *Gloeophyllales*, 1 *Cantharellales*, 9 *Agaricales*, 2 *Boletales*, 2 *Wallemiales*, 3 *Ustilagnales*, 3 *Malasseziales* y 4 *Pucciniales* (**Gráfica 2**). La agrupación por orden de los 45 basidiomicetos incluyó los siguientes grupos y número de hongos: 9 *Tremellales*, 2

Trichosporonales, 4 *Polyporales*, 2 *Russulales*, 1 *Corticiales*, 1 *Auriculariales*, 1 *Hymenochaetales*, 1 *Gloeophyllales*, 1 *Cantharellales*, 9 *Agaricales*, 2 *Boletales*, 2 *Vallemiales*, 3 *Ustilaginales*, 3 *Malasseziales* y 4 *Pucciniales* (**Gráfica 3**). Por otra parte, no se logró la identificación de los rozellomicetos debido a la poca información de filogenia y clasificación que se tiene de estos hongos. Mientras que se logró la agrupación del único mucoromiceto en el orden de los *Glomerales*.



Gráfica 2. Número de ascomicetos analizados con base a su clasificación por orden



Gráfica 3. Número de basidiomicetos analizados con base a su clasificación por orden.

8.1.1 Factores centrales de la vía NMD

La activación del mecanismo NMD incluye el reclutamiento de diversos factores, que se han clasificado como factores centrales y factores asociados. Los factores centrales forman parte del núcleo de la maquinaria de NMD y se han descrito por lo menos tres de ellos, como es el caso de Upf1, Upf2 y Upf3. A continuación, se explica la expresión de cada uno de ellos en los diferentes grupos de hongos:

UPF1 es un factor clave en la vía NMD, pues se requiere de su actividad para la fosforilación de la reacción y el reclutamiento de proteínas accesorias, por lo que resultaría lógico su expresión en la mayoría de los hongos. Los datos obtenidos revelaron que de los 185 hongos analizados 144 presentan este factor, mientras que si lo analizamos detalladamente por grupos, de los 135 ascomicetos analizados, 113 reportan una sobreexpresión del factor central UPF1, 4 de ellos sustituyen su actividad con el ortólogo NAM7 y 18 continúan caracterizándose, pues aparentemente poseen los dominios que caracterizan a este factor. Además, 28 de los 45 basidiomicetos analizados reportan la presencia de UPF1, mientras que 17 aparentemente carecen de él. En los rozellomicetos, 4 de ellos no reportan la expresión de este factor, ni de algún otro ortólogo. Sin embargo, eso no significa que no lo expresen, pues se ha reportado que *Encephalitozoon romaleae* y

Vairimorpha ceranae expresan una proteína similar, que posee los mismos dominios de UPF1, por lo que podría tratarse de esta proteína.

UPF2 es la proteína de unión entre UPF1 y UPF3, por lo que se esperaría una relación de la expresión entre los tres factores centrales. Sorprendentemente, UPF2 es el factor central mayor caracterizado e identificado hasta el momento, ya que el 95% de los organismos analizados (177 hongos) lo expresan. La mayoría de los ascomicetos presentan este factor con excepción de *Saccharomyces ludwigii*, quien expresa el ortólogo NMD2p. Por otra parte, se observó que *Yamadazyma tenuis* y *Tuber melanosporum* no presentan ortólogos para UPF2. Así como se observó que los rozellomicetos no expresan, ni presentan algún ortólogo para UPF2, esto debido al tipo de relación parasitaria que tiene este grupo de hongos.

UPF3 es una proteína que al unirse a UPF2 y UPF1 forman el complejo de vigilancia y activan la vía NMD. A pesar de que UPF3 es el factor menor descrito, se ha encontrado que 124 ascomicetos y 35 basidiomicetos lo expresan. Aquellos que aún no han sido identificados pertenecen al orden de los *Saccharomycetales*, *Dipodascales* y *Pleosporales*. Dentro de los *Saccharomycetales*, solo se ha identificado la actividad del ortólogo Upf3p en *S. ludwigii*.

Adicional a ello, se ha observado que *Eremothecium cymbalariae* no presenta ortólogo para Upf3, por lo que podría no ser fundamental para él y compensar su actividad con el complejo Upf1-Upf2. Curiosamente, *Y. tenuis* y *Alternaria alternata* son hongos que no expresan los tres factores centrales, esto podría relacionarse a su naturaleza parasitaria y patógena, del tal forma que podrían utilizar mecanismos del hospedero que compensen su actividad.

8.1.2 Factores asociados al complejo CAP

CBP80 es una de las proteínas que mayor prevalece en ascomicetos, basidiomicetos y rozellomicetos, dado que está presente en 131 ascomicetos y 42 basidiomicetos y 1 mucoromiceto. De los 3 basidiomicetos no reportados, *Psilocybe cubensis* y *Moniliophthora perniciosa* no presentan ortólogos para CBP80, mientras que *Malassezia sympodialis* expresa una proteína similar a CBP80, llamada STO1,

que posee dominios funcionales similares, por lo que podría considerarse a STO1 como un ortólogo. En ascomicetos, ocurre algo similar con *Trichoderma asperellum* dado que presenta dominios funcionales similares a STO1, sin embargo, continúa caracterizándose. En los rozellomicetos no hay presencia de este factor.

Sorprendentemente, CBP20 es uno de los pocos factores que se encuentra presente en todos los rozellomicetos, esto resulta razonable al ser una proteína fundamental en el reconocimiento del ARNm en el agregado de la caperuza. También, se encontró que los 43 basidiomicetos analizados contienen a CBP20 con excepción de *Postia placenta* y *M. perniciosus*. Caso contrario del grupo de los ascomicetos a los que corresponde *Aspergillus oryzae*, *Uncinocarpus reesii*, *Trichophyton benhamiae*, *Trichophyton verrucosum*, *Zymoseptoria tritici* y *Candidozyma auris*.

8.1.3 Fosfatasas y cinasas

En mamíferos, las fosfatasas y cinasas juegan un papel importante en la activación de UPF1 al dar paso a una serie de reacciones de fosforilación y desfosforilación, sin embargo, la expresión de estas es distinta en eucariontes inferiores, pues se encontró que la fosfatasa SMG1 no está presente en hongos, lo que indicaría que la fosforilación está regulada por otras proteínas y/o mecanismos en estos organismos.

SMG5, SMG6 y SMG7 son cinasas que en conjunto participan en la desfosforilación de Upf1. La expresión de las SMGs es variable en hongos, pues SMG6 solo está presente en 18 basidiomicetos de los 187 hongos analizados. Algunos de estos basidiomicetos poseen el gen ortólogo est1a. SMG7 está presente en 6 basidiomicetos y diferentes grupos de los ascomicetos, dentro de los que se resalta al orden de los *Hypocreales* y *Glomerellales*. Mientras que SMG5 está ausente en casi todos los hongos, excepto en *S. cerevisiae*. Esta levadura presenta los ortólogos Eslp1, Est1a y Est1p.

La PP2A es una enzima que ayuda en diferentes procesos celulares, sobre todo, al asociarse con las SMG's para permitir la fosforilación de Upf1. PPP2R1, PPP2R2, PPP2R3 y PPP2R5 son subunidades que forman parte de esta fosfatasa.

Se encontró que PPP2R1 es la subunidad, que mayor prevalece en hongos, dado que las únicas especies que no expresan esta enzima son *P. placenta*, *M. perniciosa* y *Vairimorpha necatrix*. Lo mismo ocurrió con la subunidad PPP2R2 que se encuentra ausente en *Yarrowia lipolytica*, *Cutaneotrichosporon cavernícola* y *P. placenta*. Mientras que PPP2R5 prevalece en todos los ascomicetos y casi todos los basidiomicetos, pues se observó que no está presente en *P. placenta*, *P. cubensis* y *Puccinia tritricina*. Por otra parte, PPP2R3 demostró no estar presente en hongos. La ausencia de esta subunidad indicaría que su papel no interfiere con la actividad de la fosfatasa 2A y por lo tanto no es primordial en la activación de la vía NMD en estos organismos. Además que *P. placenta* no expresa ninguna de las subunidades de la fosfatasa 2A, esto debido a su naturaleza infectiva y degradativa de lignocelulosa en plantas.

8.1.4 Factores asociados al complejo EJC

Y14 y MAGOH son un heterodímero, que al unirse al regulador PYM1 promueve el desensamble del complejo EJC en el citoplasma y el reclutamiento de la subunidad ribosomal 48S para iniciar la traducción. Se identificó la ausencia de Y14 en *Sugiyamaella lignohabitans*, *Rhizoctonia solani*, *Laccaria bicolor*, *Psilocybe cubensis* y *Malassezia sympodialis*. Por su parte, MAGOH no se encontró en *Podospora bellae*, *Thermochaetoides thermophila*, *Pochonia chlamydosporia*, *Kwoniella newhampshirensis* y *Wallemia ichthyophaga*. Además, ambos factores están ausentes en Rozellomicetos y en determinados Ascomicetos, particularmente en Saccharomycetales, así como en *T. verrucosum* y *P. placenta*.

En mamíferos, MLN51, Pinin y ACIN1 son elementos periféricos de EJC, que protegen y transportan el ARN del núcleo hacia el citoplasma. En hongos no hay reportes de expresión de estos factores, ni de algún gen ortólogo, de manera que son factores característicos de especie.

SAP18, también, es un elemento periférico de EJC, que está presente en la mayoría de los ascomicetos y basidiomicetos. Sin embargo, no prevalece en ciertos grupos como los *Saccharomycetales*, *Dipodascales*, *Togniniales*, *Microascales*, *Botryosphaeriales*, *Cantharellales* y *Malasseziales*. En los rozellomicetos no está presente este factor.

RNPS1 es una de las proteínas, que recubre al complejo EJC y junto con ALY/REF, SAP18, PININ y ACIN1 forman la capa externa del complejo. La expresión de RNPS1 en hongos es variable, pues 74 ascomicetos, 17 basidiomicetos, 6 rozellomicetos y 1 mucoromiceto no lo presentan. Si lo analizamos por orden, esta proteína está ausente en *Saccharomycetales*, *Togniniales*, *Mycosphaerellales*, *Botryosphaeriales*, *Pezizales*, *Auriculariales*, *Hymenochaetales*, *Cantharellales* y *Glomeralles*. Además que no ha sido identificada en algunos *Eurotiales*, *Hypocreales*, *Eurotiales*, *Onygenales*, *Pleosporales*, *Trichosporonales*, *Polyporales*, *Russulales*, *Agaricales*, *Boletales*, *Ustilaginales* y *Malasseziales*.

ALY/REF es un transportador del ARNm y factor asociado a NMD, que no ha sido identificado en ciertos *Saccharomycetales* como *Saccharomyces eubayanus*, *Saccharomyces paradoxus*, *Eremothecium cymbalarie*, *Vanderwaltozyma polyspora*, *Torulaspora globosa*, *Meyerozyma guilliermondii* y *Clavispora lusitaniae*. Así como tampoco está presente en algunos Agaricales y Malasseziales como *Moniliophthora perniciosa* y *Malassezia sympodialis*. En los rozellomicetos está ausente este factor y no presenta algún gen ortólogo, por lo que probablemente este factor no es esencial para el recubrimiento de EJC.

EIF4A3 es uno de los factores asociados a EJC mayor identificado y caracterizado en hongos, dado que todos los ascomicetos, mucoromicetos y la mayoría de los basidiomicetos, lo poseen. *P. placenta* y *P. graminis* son basidiomicetos que presentan el ortólogo EIF-4A, lo que nos indicaría que la expresión de esta proteína es fundamental para la regulación de NMD en estos organismos. La expresión de está en los rozellomicetos aún se desconoce.

8.1.5 Proteínas transitorias y asociadas al complejo EJC

Además de las proteínas que participan en el reconocimiento del complejo EJC, se han descrito otras proteínas, que se unen de manera transitoria como SRM160, UAP56 y P15. Las cuales fueron incluidas para el análisis de este trabajo:

UAP56 es una de las proteínas transitorias mayormente expresada, pues prevalece en 176 de los 187 hongos analizados. *Naumovozyma castelli*, *Sordaria macrospora* y *Blastomyces gilchristii* son ascomicetos que no expresan dicho factor. De la misma manera *Trichosporon asahii*, *Postia placenta*, *Rhizoctonia solani* y *P. cubensis* son basidiomicetos que no lo expresan. Mientras tanto *Vairimorpha ceranae* y *Vairimorpha necatrix* son los únicos rozellomicetos que expresan UAP56.

SRM160 es otra de las proteínas que junto con UAP56 y P15 rodean al complejo EJC. Bajo esta afirmación, se esperaría el hallazgo de este factor en los mismos hongos que UAP56. Sin embargo, se ha visto que SRM160 tiene una menor presencia, pues este factor no prevalece en 54 ascomicetos, 12 basidiomicetos y 6 rozellomicetos. Los *Saccharomycetales*, *Hipocreales* y *Eurotiales* fueron los ascomicetos que mayor carecían de la expresión de este factor. Mientras que basidiomicetos fueron los Agaricales y Boletales. A pesar de que se realizó la búsqueda de genes ortólogos, no se encontró alguno, por lo que probablemente este factor no sea esencial para algunas actividades celulares en ciertas especies.

Se observó que 80 ascomicetos y 37 basidiomicetos usan a P15 como factor asociado a NMD, el cual se une a SAP18 para recubrir el complejo EJC. En ascomicetos, los *Saccharomycetales*, *Dipodascales*, *Hypocreales*, *Onygenales*, *Pleosporales*, *Mycosphaerellales* y *Pezizales* no poseen este factor. En basidiomicetos, ocurre lo mismo en los *Trichosporonales*, *Polyporales*, *Corticiales*, *Agaricales*, *Boletales* y *Pucciniales*. Asimismo, se ha observado la ausencia de P15 en rozellomicetos y mucoromicetos. Sin embargo, se ha observado que los *Saccharomycetales*, *Onygenales*, *Mycosphaerellales*, *Trichosporonales*, *Polyporales* y *Boletales* presentan al ortólogo NTF2, quien presenta dominios funcionales similares a P15, por lo que suple la actividad de esta misma.

TAP es un factor asociado que se une al complejo EJC. Se observó que este factor está presente en 176 de los 187 hongos analizados. *Penicillium digitatum* e *Histoplasma mississippiense* son ascomicetos que presentan los ortólogos NFX1 y NFX2. Además que los basidiomicetos *Psilocybe cubensis* y *Malassezia sympodialis* poseen el ortólogo FAP1. Mientras tanto rozellomicetos y mucoromicetos son grupos de hongos que no poseen este factor.

8.1.6 Factores que participan en la disociación del ribosoma

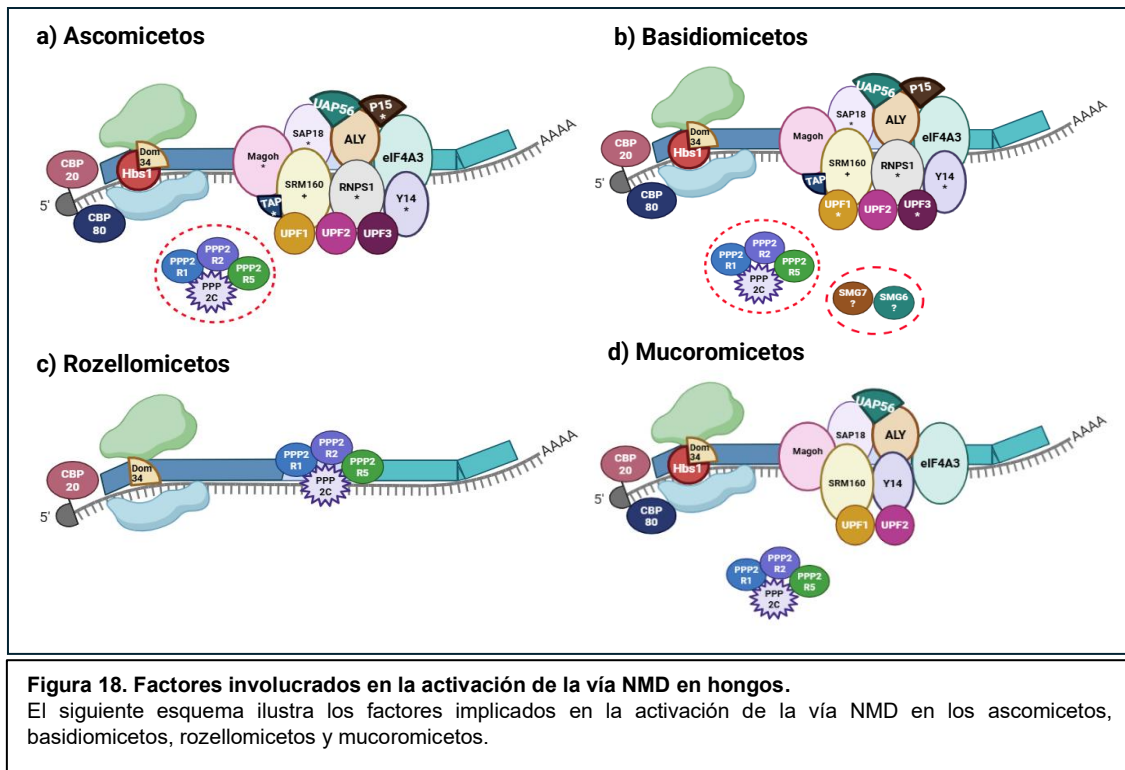
La presencia de HBS1 es fundamental para la interacción con DOM34, lo que permite la disociación de los ribosomas. HBS1 se identificó en la mayoría de los hongos analizados, mostrando una alta conservación evolutiva. No está presente en *Vanderwaltozyma polyspora*, *Torulaspora globosa*, *Lodderomyces elongisporus*, *Yamadazyma tenuis*, *Pichia pastoris*, *Yarrowia lipolytica*, *Schizosaccharomyces pombe* y *Schizosaccharomyces osmophilus*, todos ascomicetos. Tampoco se encuentra en algunos basidiomicetos como *Phanerochaete carnosa*, *Moniliophthora perniciosa*, *Marasmius oreades*, *Puccinia graminis*, *Puccinia triticina*, *Puccinia striiformis* y *Melampsora larici*, ni en rozellomicetos.

DOM34 se identificó como un factor altamente conservado entre los ascomicetos, ya que está presente en todos los miembros de este grupo. Sin embargo, se observó su ausencia únicamente en los basidiomicetos *Postia placenta*, *Stereum hirsutum* y *Moniliophthora roreri*. Sorpresivamente, DOM34 se encuentra presente en todas las especies analizadas de rozellomicetos y mucoromicetos.

8.1.7 Factores implicados en la degradación del ARNm

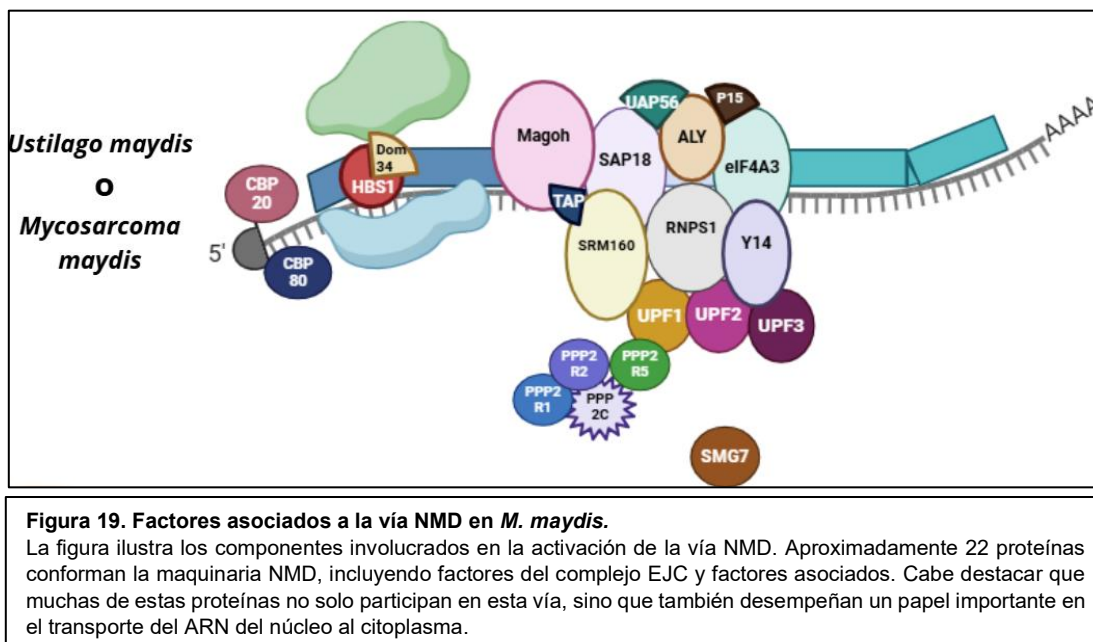
SKI7 es una proteína del exosoma responsable de degradar ciertas partículas de ARN. Esta solo se encuentra en los ascomicetos; *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces eubayanus*, *Saccharomyces paradoxus* y *Nakaseomyces glabatus*.

De manera que la composición proteica para activar a la vía es distinta en cada *phylum*. La **Figura 18** ilustra la maquinaria NMD de cada *phylum*.



8.1.8 Factores implicados en la activación de la vía NMD en *Mycosarcoma maydis*

Por último, en este análisis se determinó que *Mycosarcoma maydis* presenta una maquinaria compleja, pues posee alrededor de 22 factores, los cuales pueden clasificarse como centrales, periféricos y transitorios de EJC, entre ellos UPF1, UPF2, UPF3, MAGOH, eIF4A3, Y14, RNPS1, ALY, P15, UAP56, SRM160 y TAP. Además de aquellos implicados en la disociación del ribosoma y degradación del transcrito como CBP20, CBP80, HBS1 y DOM34, así como aquellos responsables de la hiperfosforilación de Upf1, como SMG7 y la fosfatasa 2A. Curiosamente, no se encontró la presencia de las fosfatasa SMG1, SMG5, SMG6 y SMG8, ni tampoco de MLN51, por lo que se propuso el siguiente esquema (**Figura 19**).



8.2 Expresión de los transcritos Rnps1, Upf1, Upf2, Upf3, Hbs1 y Magoh en *Mycosarcoma maydis*.

Para la identificación de los transcritos putativos de los factores de NMD Upf1, Upf2, Upf3, Hbs1 y Magoh se utilizó la cepa 521 de *Ustilago maydis* o *Mycosarcoma maydis*.

Primero, se realizó la búsqueda de la secuencia genómica y transcriptómica de cada uno de ellos. Una vez identificados, se diseñaron los oligonucleótidos específicos que más tarde se utilizaron para amplificar por PCR de punto final. Las secuencias y condiciones de PCR se describieron anteriormente (**Tabla 10**). Experimentalmente, se realizó una extracción de ARN total de *M. maydis* 521 y se comprobó su integridad por gel de agarosa al 1.5% donde logramos observar una buena concentración con bandas bien definidas, sin degradación (**Figura 20**), lo que ayuda en la obtención del ADNc. Posteriormente, se realizaron ensayos de RT-PCR dividiéndolo en retrotranscripción para la obtención de ADNc, seguida de una PCR de punto final utilizando como templado dicho molde. Los transcritos analizados de manera bioinformática corresponden con los amplificados obtenidos *in situ* (**Figura 21**).

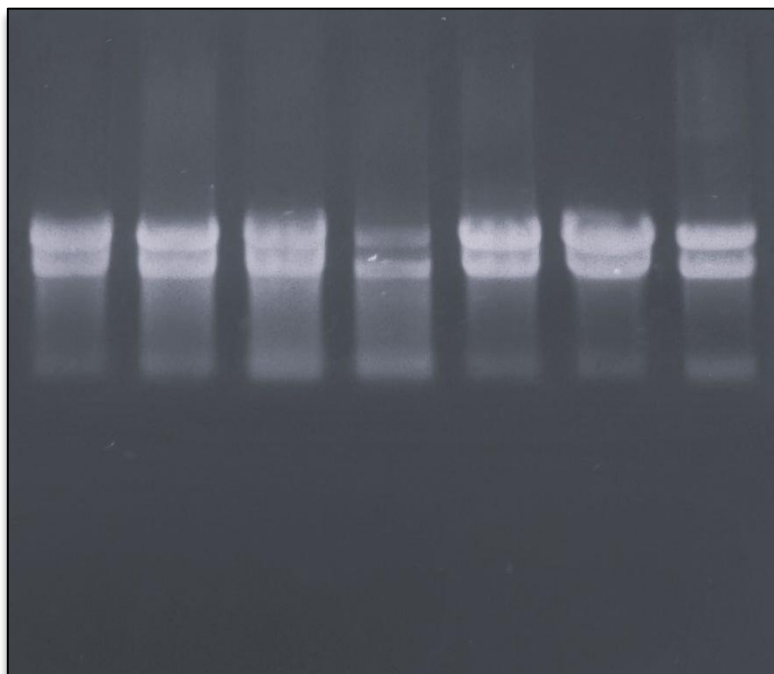


Figura 20. Verificación de la extracción de ARN total de *M. maydis* 521. En la imagen se muestra un gel de agarosa al 1.5% donde se observa la integridad del ARN total.

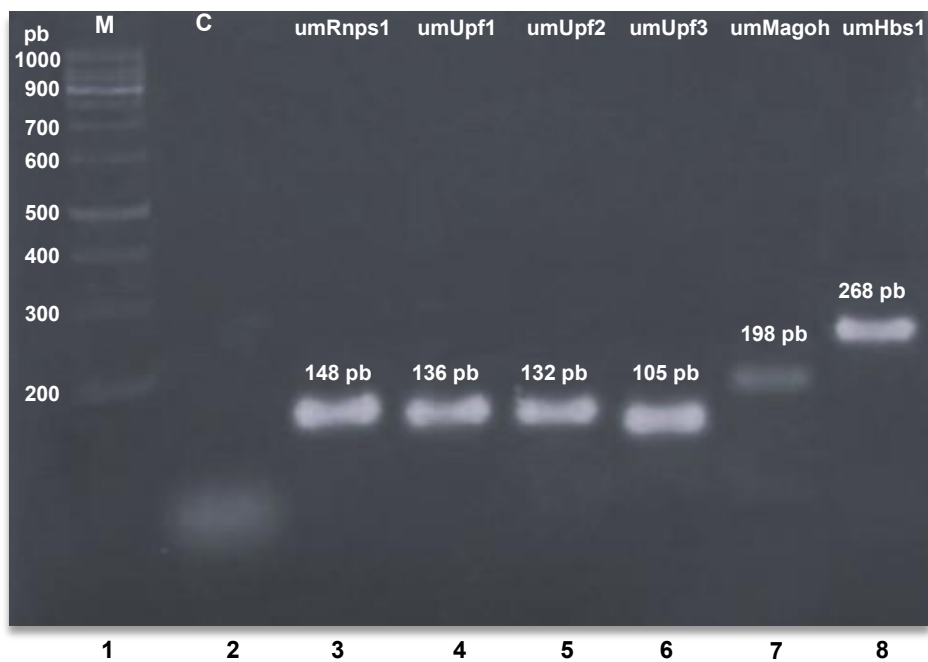


Figura 21. Expresión de los genes umRnps1, umUpf1, umUpf2, umUpf3, umMagoh y umHbs1.

Gel de agarosa al 1.5% que muestra los amplificadores obtenidos a partir de cDNA de umRnps1, umUpf1, umUpf2, umUpf3, umMagoh y umHbs1. Las muestras se cargaron en el siguiente orden: primer carril marcador de peso (M), segundo carril control, tercer carril umRnps1, cuarto carril umUpf1, quinto carril umUpf2, sexto carril umUpf3, séptimo carril umMagoh y octavo carril umHbs1. Los tamaños para las bandas obtenidas se indican en cada carril.

8.3 Comprobación por PCR de las construcciones umUpf1, umUpf2 y umUpf3.

Con el objetivo de verificar las construcciones previamente obtenidas en el laboratorio, se diseñaron oligonucleótidos específicos para la amplificación de los insertos umUpf1CH, umUPF2 y umUPF3, presentes en los vectores pProEX-HTb y pProEX-HTc. Específicamente, umUpf1CH es un inserto de 873 pb que se clonó en el vector pProEX-HTb, cuyo tamaño es de 4779 pb, dando como resultado una construcción de 5652 pb. Por su parte, umUpf2 tiene un tamaño de 3708 pb, y de igual manera fue insertado en pProEX-HTb, generando una construcción final de 8487 pb. Finalmente, umUPF3 posee un tamaño de 1608 pb, el cual se insertó en el vector pProEX-HTc, también de 4779 pb, obteniéndose una construcción de 6455 pb.

Tomando en consideración estos datos y las secuencias de los insertos, se diseñaron oligonucleótidos específicos para la amplificación de cada uno de los insertos por PCR de punto final (**Tabla 10**). Las condiciones de PCR se describieron previamente en el apartado 7.2.5.6. Lo que obtuvimos por resultado se encuentra en la figura 21 donde observamos amplificados cercanos a 873pb para umUpf1CH (carril 2), 3819 pb para umUpf2 (carril 3) y 1413 pb para umUpf3 (carril 4), que corresponden al tamaño esperado.

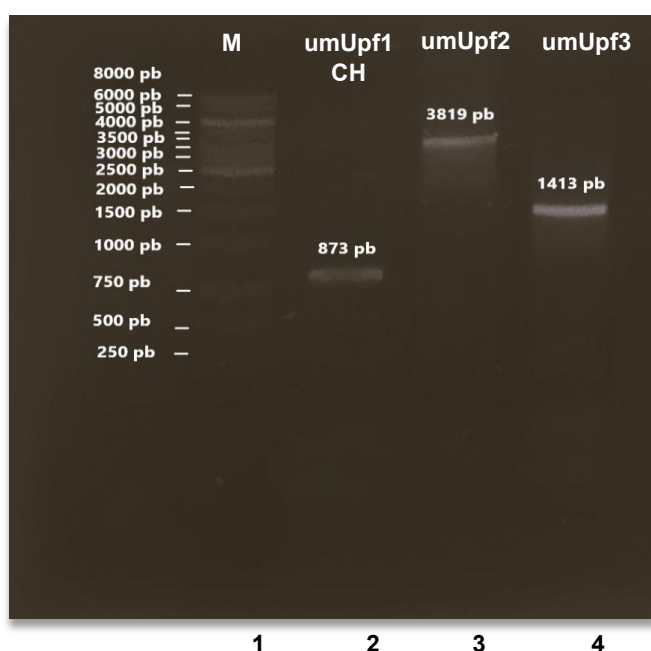


Figura 22. Identificación de la inserción de los genes umUpf1, umUpf2 y umUpf3 en vectores de expresión.

Gel de agarosa al 1% que muestra los productos de PCR esperados correspondientes a Upf1, Upf2 y Upf3. El primer carril corresponde al marcador de peso (M), segundo carril el amplicon de umUpf1CH, tercer carril el amplicon de umUpf2 y el cuarto carril el amplicon de umUpf3. Los tamaños para las bandas obtenidas se indican en cada carril.

8.4 Comprobación por digestión con enzimas de restricción de las construcciones umUpf1, umUpf2 y umUpf3.

Empleando ensayos con enzimas de restricción se comprobaron las construcciones correspondientes a los homólogos de UPF1, UPF2 y UPF3, previamente generadas en el laboratorio. Las enzimas empleadas fueron seleccionadas considerando la cantidad de sitios de corte que se generaban en el vector, así como su disponibilidad en el laboratorio.

La construcción Upf1CH/pProexhtb tiene un peso de 5652 pb. Al utilizar la enzima *EcoRI*, se obtuvo un doble corte en los sitios 352 y 1037, lo que origina dos fragmentos: uno de 685pb y otro de 4967 pb. Upf2/pProEX-HTb corresponde a una construcción de 8487pb. Se empleó la enzima *XbaI*, la cual realiza dos cortes en las posiciones 723 y 4110, generando así dos fragmentos de 3387pb y 5100 pb, respectivamente. Upf3/pProexhtc es una construcción de 6455 pb que se digirió con la enzima *EcoRI*, la cual corta en el sitio 752 y genera un fragmento del mismo tamaño.

Tras la realización de las digestiones con enzimas de restricción, los resultados fueron visualizados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%. En el carril 1, se depositó un marcador de peso molecular de 1kb (Thermo Scientific). En el carril 2, visualizamos una banda de 4967 pb, correspondiente al tamaño esperado. En el carril 3 observamos bandas de 5100 pb y 3387 pb, que corresponden con los esperados. Por último, en el carril 4 detectamos una banda de 6455 pb, que coincide con el tamaño previsto (**Figura 22**). De esta manera, podemos concluir que las construcciones son correctas, se encuentran en buenas condiciones para iniciar con la sobreexpresión de proteínas recombinantes.

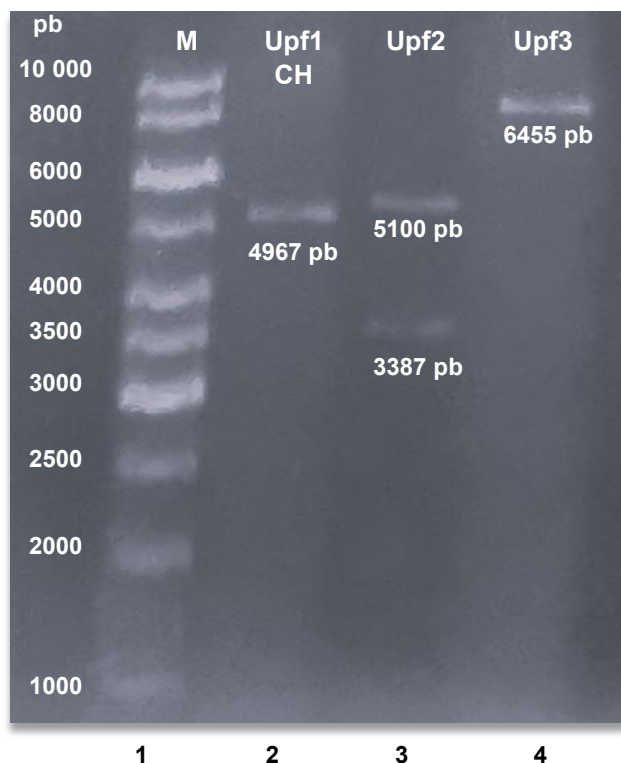


Figura 23. Identificación de los insertos por digestión con enzimas de restricción.

Gel de agarosa al 1% que muestra digestiones realizadas con las enzimas de restricción *EcoRI* y *XbaI*. Las muestras fueron cargadas de la siguiente manera: carril 1 marcador de peso (M), carril 2 Upf1CH, carril 3 Upf2 y carril 4 Upf3. Los tamaños para las bandas obtenidas se indican en cada carril.

8.5 Secuenciación de las proteínas recombinantes para los homólogos de UPF1 y UPF2 en *Mycosarcoma maydis*.

Las construcciones Upf1-CH/pProEX-HTb y Upf2/pProEX-HTb fueron enviadas a secuenciar con el propósito de reafirmar su identidad e integridad. Para este procedimiento, se realizó la extracción de plásmidos por CTAB y, posteriormente, se purificaron los plásmidos hasta obtener una concentración de 10 µg/ul. Asimismo, se diseñaron oligonucleótidos (Véase el apartado 7.2.5.9) con el fin de delimitar la región a secuenciar. Las muestras y oligonucleótidos fueron enviados a la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM.

En el caso de la construcción Upf1CH/pProEXHTb, el oligonucleótido M13/Puc Fwd se posicionó entre los nucleótidos 235 y 257, localizados río arriba del codón de inicio del gen y de la etiqueta de histidinas (6xHis) (**Figura 23a**). Esto permitió obtener una secuenciación de 1062 pb, correspondientes a la región comprendida entre las posiciones 278 y 1325, abarcando así la totalidad del gen. Con base en los resultados de la secuenciación, fue posible confirmar el marco de lectura, la inserción y la orientación correcta de umUpf1, la presencia de la etiqueta

de histidinas, el codón de inicio y los sitios de reconocimiento para la enzima *EcoRI* (Figura 24b). Estos hallazgos respaldan y confirman los resultados previamente obtenidos mediante los análisis de cortes con enzimas de restricción.

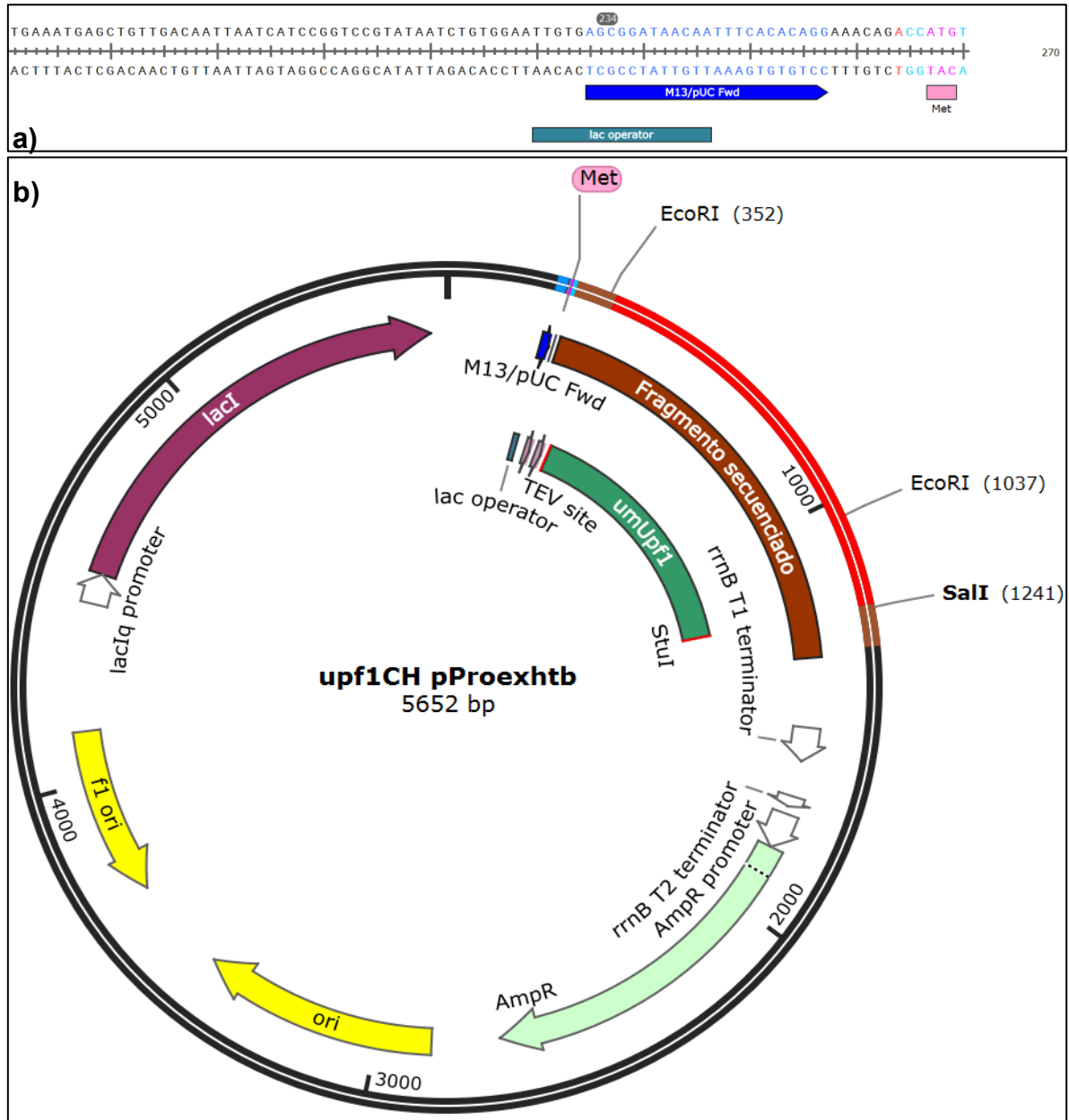


Figura 24. Secuenciación de la proteína recombinante Upf1CH pProExHTb.

En la siguiente imagen generada en el programa Snapgene se esquematizan los resultados de la secuenciación **a)** Sitio de reconocimiento del oligonucleótido M13/Puc Fwd, utilizado para la secuenciación de la construcción Upf1-CH pProEX-HTb. **b)** Representación de los sitios de inserción del gen umUPF1-CH, el codón de inicio, los sitios de reconocimiento de la enzima *EcoRI*, la etiqueta de histidinas (6xHis) y la región secuenciada. Además, de los sitios de reconocimiento de la enzima *StuI*, los cuales fueron utilizados para la apertura inicial del vector.

Para la construcción Upf2/pProEX-HTb se utilizó el mismo cebador M13/Puc Fwd, el cual se alineó en la posición 235-257 de la construcción, también, localizado río arriba del codón de inicio y de la etiqueta de histidinas (6XHis) (**Figura 24a**). Esta secuenciación generó una lectura a 1062 pb desde la posición 278-1339, lo que permitió una lectura parcial del gen insertado. Sin embargo, estos resultados nos confirman que el marco de lectura es correcto así como la inserción y orientación de umUpf2. Además, se constató la presencia del codón de inicio, de la etiqueta de histidinas (6XHis) y de los sitios de reconocimiento para la enzimas *EcoRI* y *XbaI*, previamente empleadas para la verificación por digestión con enzimas de restricción (**Figura 24b**).

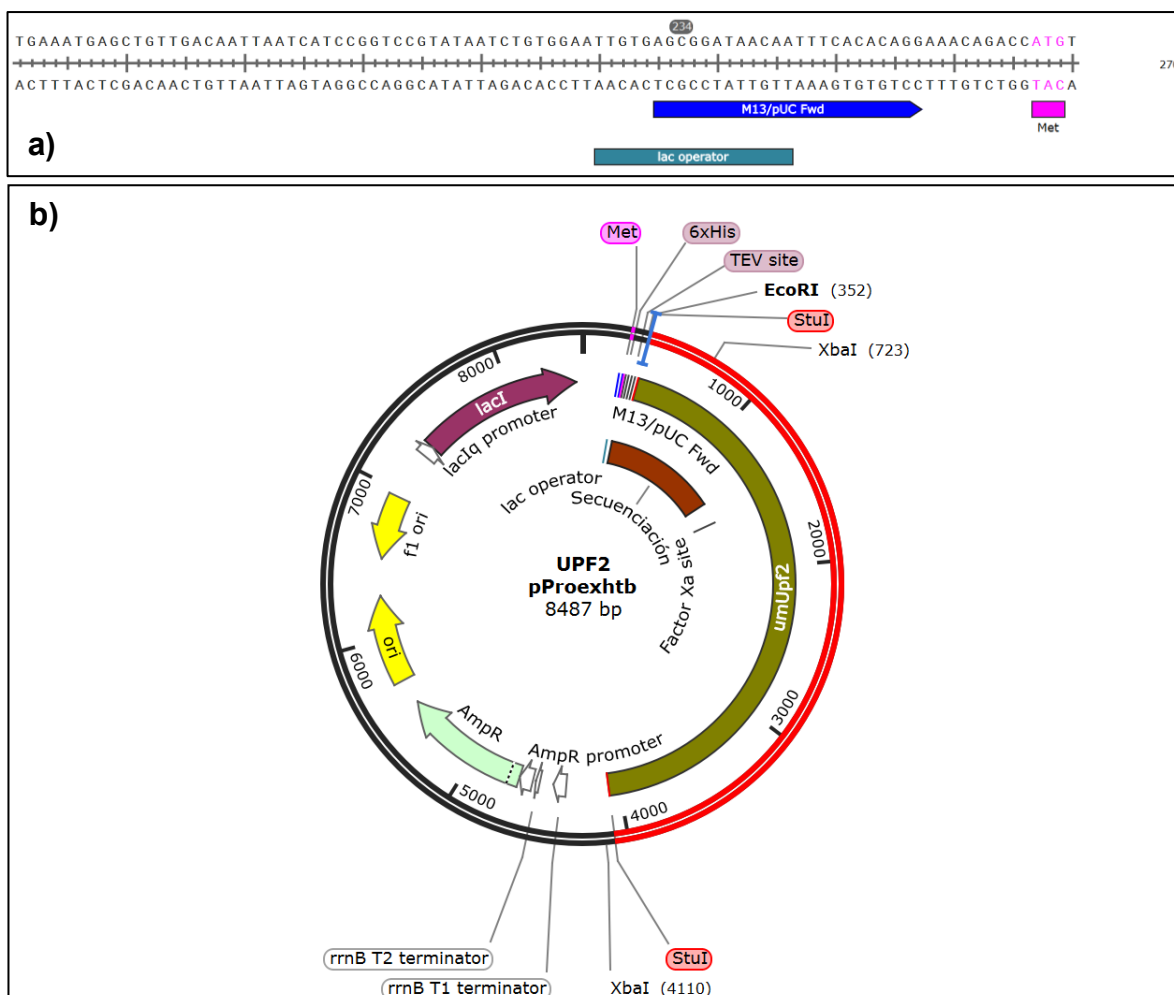
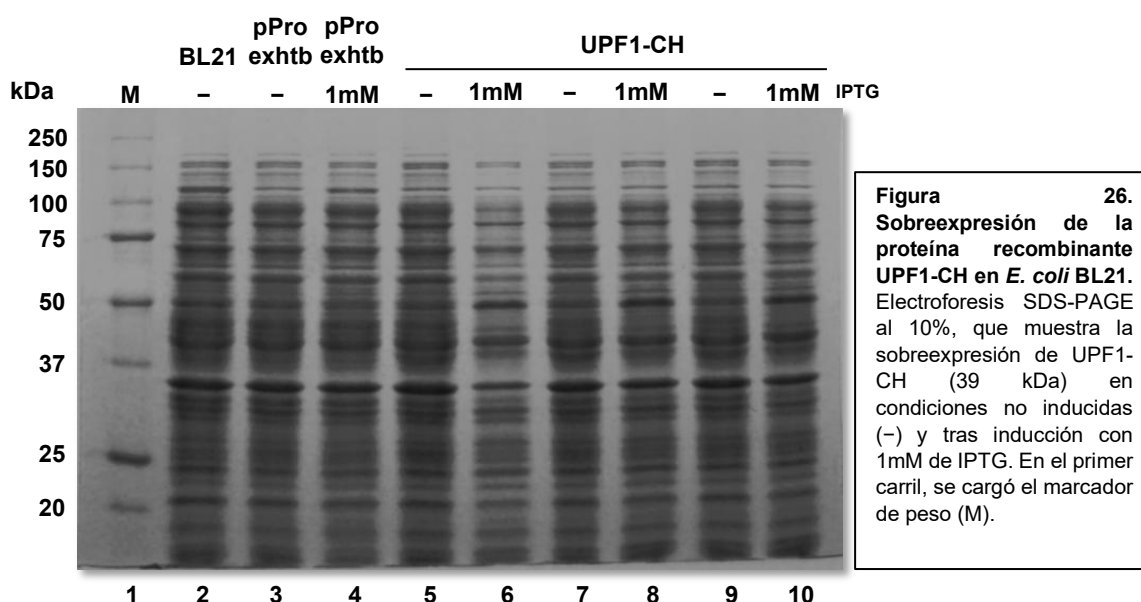


Figura 25. Secuenciación de la proteína recombinante Upf2 pProEx-HTb.

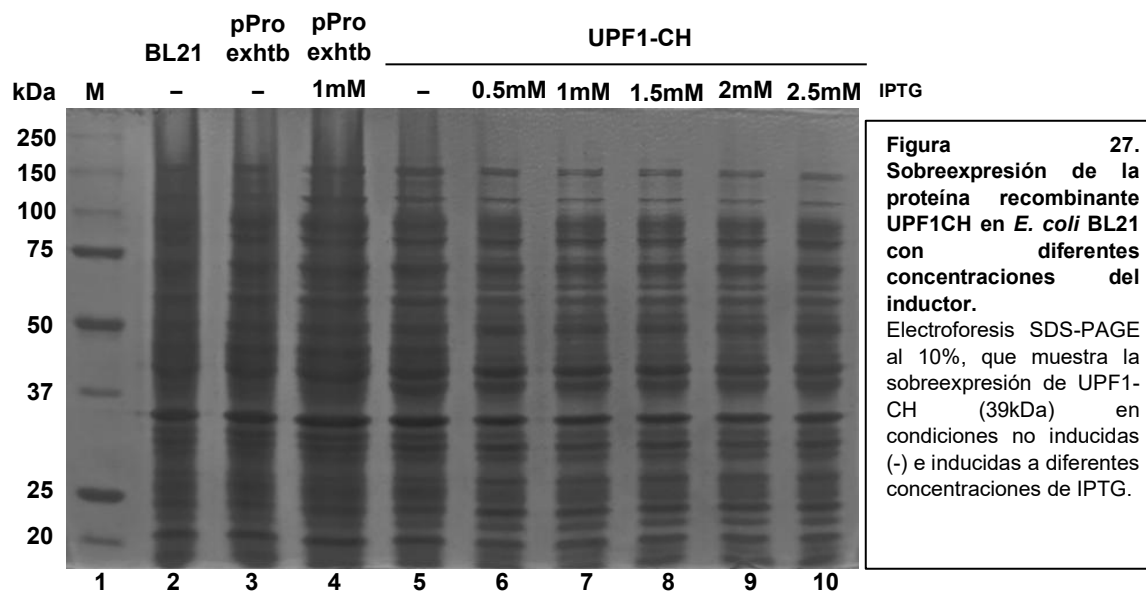
En la siguiente imagen generada en el programa Snapgene se esquematizan los resultados de la secuenciación **a)** Sitio de reconocimiento del oligonucleótido M13/Puc Fwd, utilizado para la secuenciación de la construcción Upf1-CH pProEX-HTb. **b)** Representación de los sitios de inserción del gen umUPF2, el codón de inicio, los sitios de reconocimiento de la enzima *EcoRI*, la etiqueta de histidinas (6xHis) y la región secuenciada dentro del vector pProEX-HTb. Además, de los sitios de reconocimiento de la enzima *StuI*, los cuales fueron utilizados para la apertura inicial del vector.

8.6 Sobreexpresión de la proteína recombinante homóloga UPF1-CH

Tras la verificación de las construcciones, se procedió a la sobreexpresión de las proteínas recombinantes. La proteína recombinante UPF1-CH tiene un peso molecular aproximado de 39kDa. Para comenzar los ensayos de recombinantes, se realizó extracción de plásmido mediante CTAB a partir de las transformantes en *E. coli* DH5- α y este mismo se utilizó para transformar en la cepa de sobreexpresión *E. coli* BL21. Se seleccionaron múltiples colonias que crecieron en presencia de ampicilina (resistentes a ampicilina) como posibles transformantes y se cultivaron; la mitad se indujo con 1mM de IPTG y la otra mitad se mantuvo sin inductor. Los cultivos se incubaron a 37°C durante 3hrs en agitación constante. La **figura 26** muestra un gel de poliacrilamida al 10% teñido con azul de Coomassie, en el cual se analizó el extracto proteico total de UPF1-CH. Como controles se incluyeron una colonia de BL21 sin transformar y sin inductor (carril 2), así como dos colonias de BL21 transformadas con el vector pProEx-HTb vacío sin y con inductor (carriles 3 y 4). Los carriles 5, 7 y 9 corresponden a cultivos no inducidos de UPF1-CH mientras que los carriles 6, 8 y 10 representan muestras de UPF1-CH inducidas con IPTG al 1mM. En este experimento, se observaron bandas cercanas a 37kDa que podrían indicar que se trata de nuestra proteína de interés. Sin embargo, la intensidad del bandeo fue similar entre las muestras inducidas y no inducidas. Ante la ausencia de un aumento evidente en la sobreexpresión tras la inducción, se optó por modificar la concentración de IPTG para los ensayos posteriores.

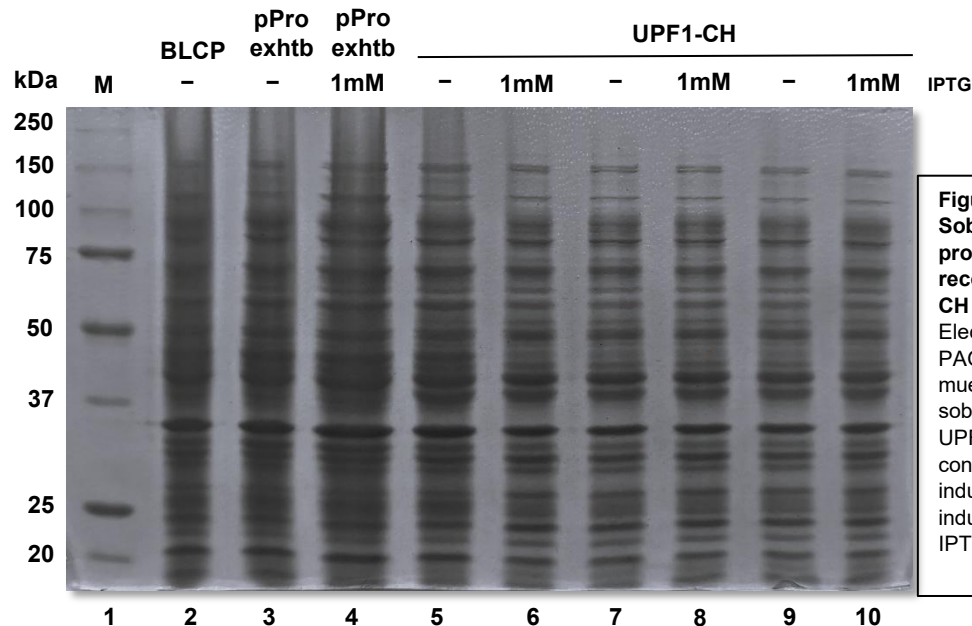
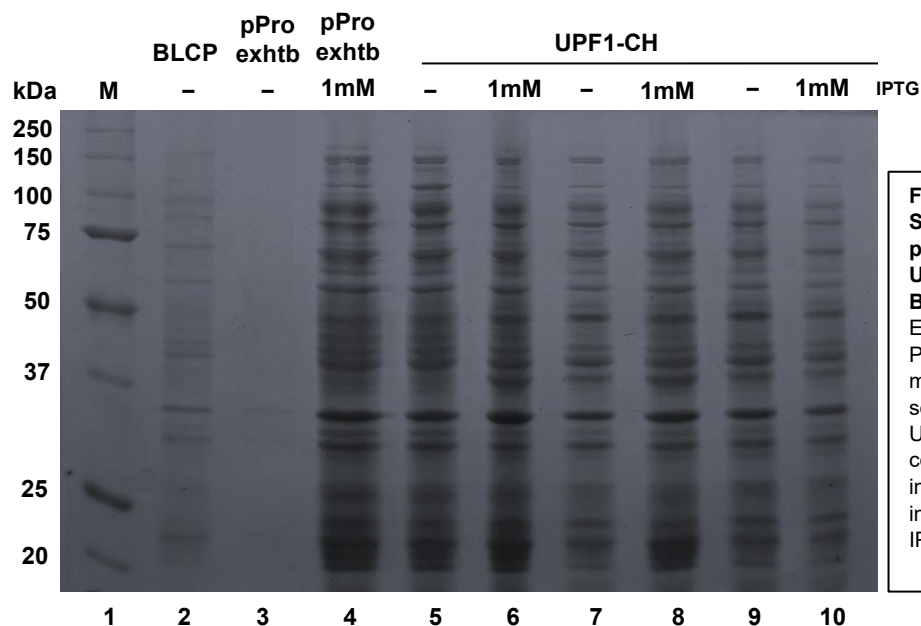


En la **figura 27**, se incluyen los mismos controles previamente descritos. Asimismo, se emplearon la misma temperatura y tiempo de incubación que en los ensayos anteriores. Los carriles 5,7 y 9 corresponden a muestras de UPF1-CH no inducidas, mientras que los carriles 6, 8 y 10 representan muestras inducidas con 0.5mM, 1mM 1.5mM, 2mM y 2.5mM de IPTG, respectivamente. En esta ocasión, se observó el mismo comportamiento, pues la adición de IPTG no produjo un aumento detectable en la expresión de la proteína. La intensidad de las bandas permaneció comparable entre las muestras UPF1-CH con y sin inductor, por lo que no hay un cambio diferencial significativo.



Se tomó la decisión de cambiar la cepa de expresión, eligiendo así a *E. coli* BL21-CodonPlus (BLCP), la cual contiene copias adicionales de genes que codifican para distintos ARNt, lo que favorece la traducción de codones poco frecuentes, por consiguiente mejora la expresión proteica en comparación con la cepa BL21 (Green y Sambrook, 2012; Greener y cols., 1997; Grodberg y Dunn, 1988). Tomando en cuenta lo anterior, se transformó en *E. coli* BLCP (D3) y se seleccionaron varias colonias para su crecimiento y evaluación. Durante la etapa de inducción, las muestras se trataron con IPTG al 1mM y se incubaron a 37°C durante 3 horas. Posteriormente, se realizó el corrimiento electroforético en el cual se cargó el marcador de peso molecular (M) (carril 1), los controles previamente descritos (carriles 2-4), muestras UPF1-CH no inducidas (carriles 5, 7 y 9) y muestras UPF1-CH inducidas (carriles 6, 8 y 10) (**Figura 28**). Nuevamente, se observa misma intensidad de bandeos sin cambios diferenciales significativos, por lo que se eligió

modificar la temperatura de incubación.



En la **figura 29**, se observan muestras tratadas con 1mM de IPTG (carriles 6, 8 y 10) a 24°C por 12 horas donde no apreciamos cambios en la sobreexpresión de UPF1-CH.

Por consiguiente, se optó nuevamente por cambiar de cepa de expresión, seleccionando a *E. coli* SoluBL21 debido a su capacidad para producir proteínas de mamíferos en forma soluble. Dado que previamente se había observado una

disminución en la expresión al agregar el inductor a las células, se decidió evaluar una concentración mayor de IPTG.

Para estos experimentos se consideró trabajar con una concentración de 2mM de IPTG. En la **figura 30**, se muestra un gel de poliacrilamida al 10% en el que se cargaron las muestras en el siguiente orden: marcador de peso molecular (primer carril), controles (carriles segundo al quinto), extractos totales sin inductor (sexto carril), extractos inducidos con 2mM de IPTG (séptimo carril); fracción celular o pastilla (octavo carril), y fracción soluble o sobrenadante (noveno carril). Los resultados muestran que la adición del inductor IPTG aumenta la expresión de UPF1-CH en comparación con la muestra no inducida. Asimismo, tras la lisis celular por sonicación, se detectó la presencia de proteína tanto en la fracción celular como en la fracción soluble, por este motivo se seleccionó la fracción soluble para su posterior purificación.

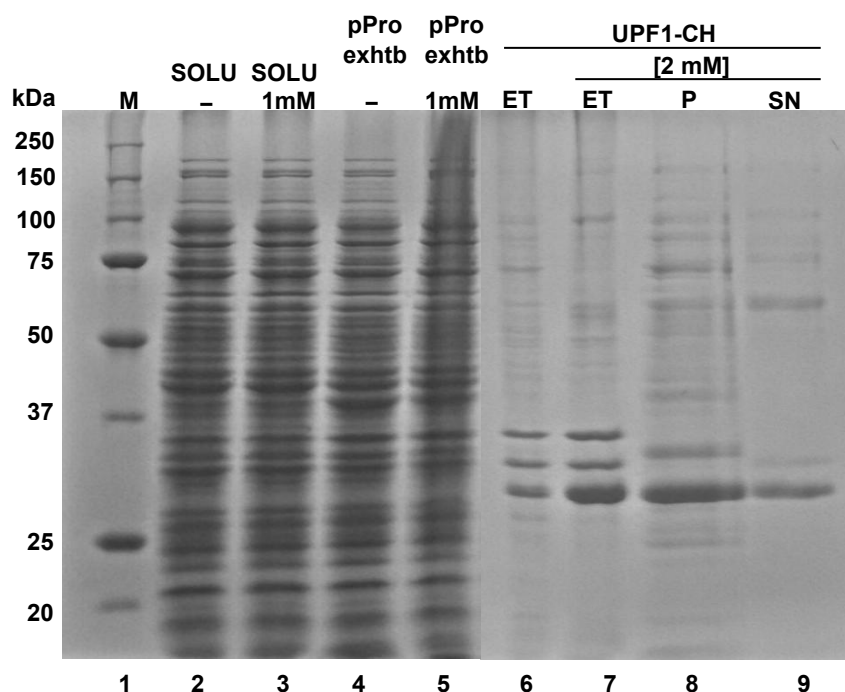


Figura 30. Sobreexpresión de la proteína recombinante UPF1-CH en *E. coli* SoluBL21. Electroforesis SDS-PAGE al 10%, que muestra la sobreexpresión de UPF1-CH (39 kDa) en condiciones no inducidas (-) e inducidas al 1 mM con IPTG a 24°C.

UPF1-CH es una proteína recombinante clonada en un vector de expresión, pProEX-HTb, que permite la expresión de la proteína recombinante con una etiqueta de seis histidinas (6xHis) para su purificación mediante cromatografía de afinidad. Por esta razón, se probó el sobrenadante previamente obtenido, el cual se hizo pasar a través de una columna de níquel- ácido nitrilo acético-agarosa (Ni-NTA). Inicialmente, la fracción soluble se incubó con las perlas de níquel- ácido nitrilo acético-agarosa para la interacción con los residuos de histidina, se cargó en la columna, se realizaron lavados para eliminar proteínas inespecíficas. Posteriormente, se realizó la elución de las proteínas con imidazol 250 mM. Finalmente, se tomó una alícuota de cada fracción obtenida para su posterior análisis mediante geles de poliacrilamida al 10% en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE). Las muestras fueron cargadas en el siguiente orden en un gel de poliacrilamida al 10%: Marcador de peso (M) (carril 1), Extractos totales (ET) (carril 2), Fracción celular (P) (carril 3), Sobrenadante (SN) (carril 4), Fracción no retenida (NR) (carril 5), Lavados (L) (carril 6-7), Eluciones (E) (carril 8-10). En este gel se aprecian bandeos de aproximadamente 39 kDa presentes en los extractos totales, la fracción celular y

el sobrenadante, sin embargo, no hay presencia en las fracciones de lavados ni eluciones, lo que indica que aunque la proteína UPF1-CH pudiera estar presente, no se logró la purificación (Figura 31).

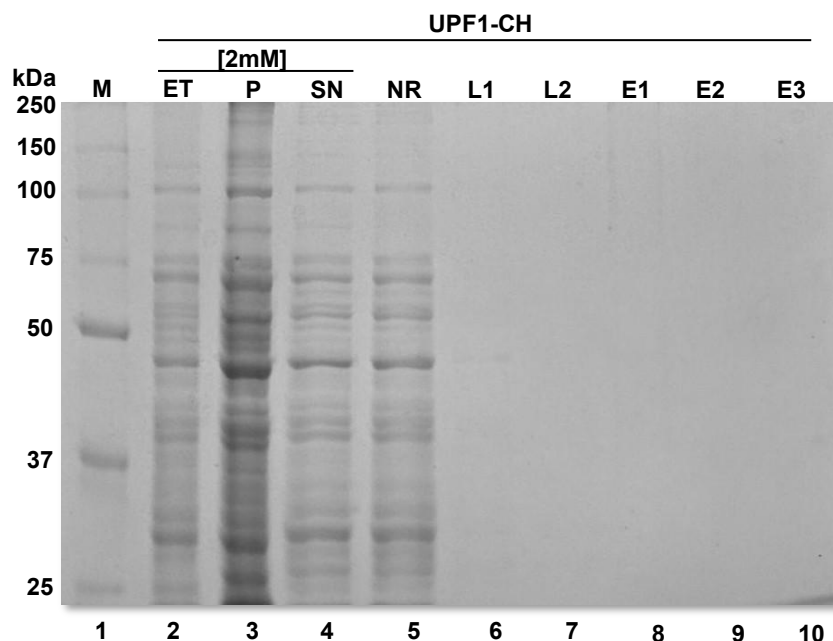
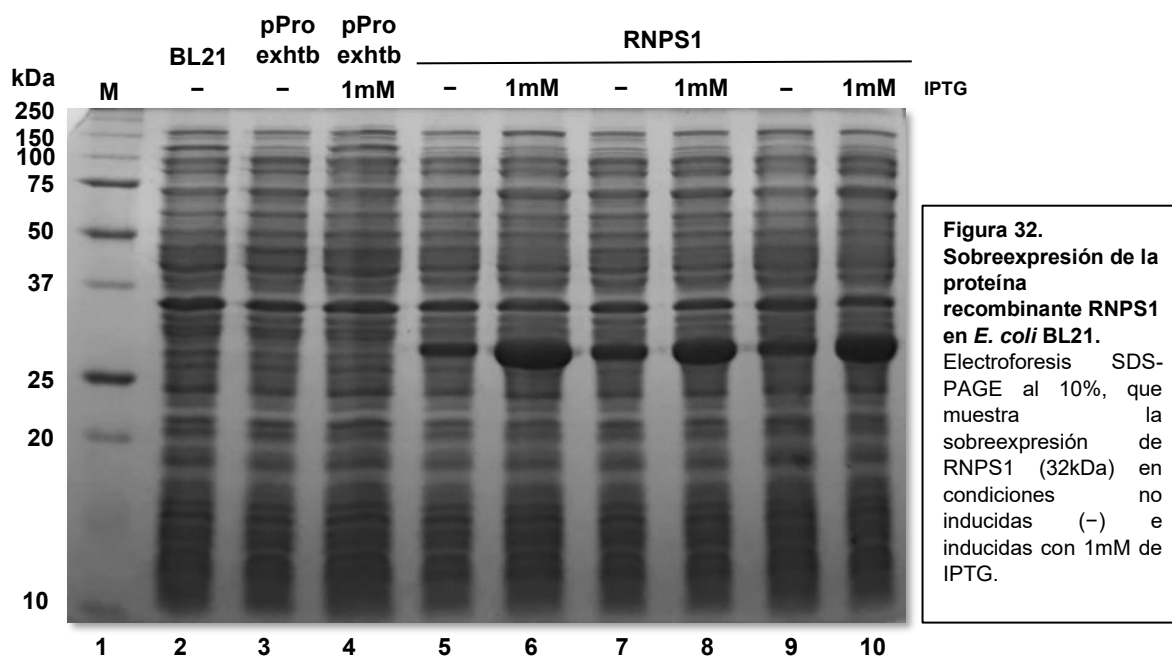


Figura 31. Purificación de la proteína recombinante UPF1-CH.
Electroforesis SDS-PAGE al 10%, que muestra la purificación por cromatografía de afinidad de UPF1-CH (39 kDa). Las muestras se cargaron en el siguiente orden: Marcador de peso (M) (Carril 1), Extractos totales (ET) (Carril 2), Pastilla (P) (Carril 3), Sobrenadante (SN) (Carril 4), Fracción no retenida (NR) (Carril 5), Lavados 1 y 2 (L1, L2) (Carriles 6 y 7), Eluciones 1, 2 y 3 (E1, E2, E3) (Carriles 8, 9 y 10).

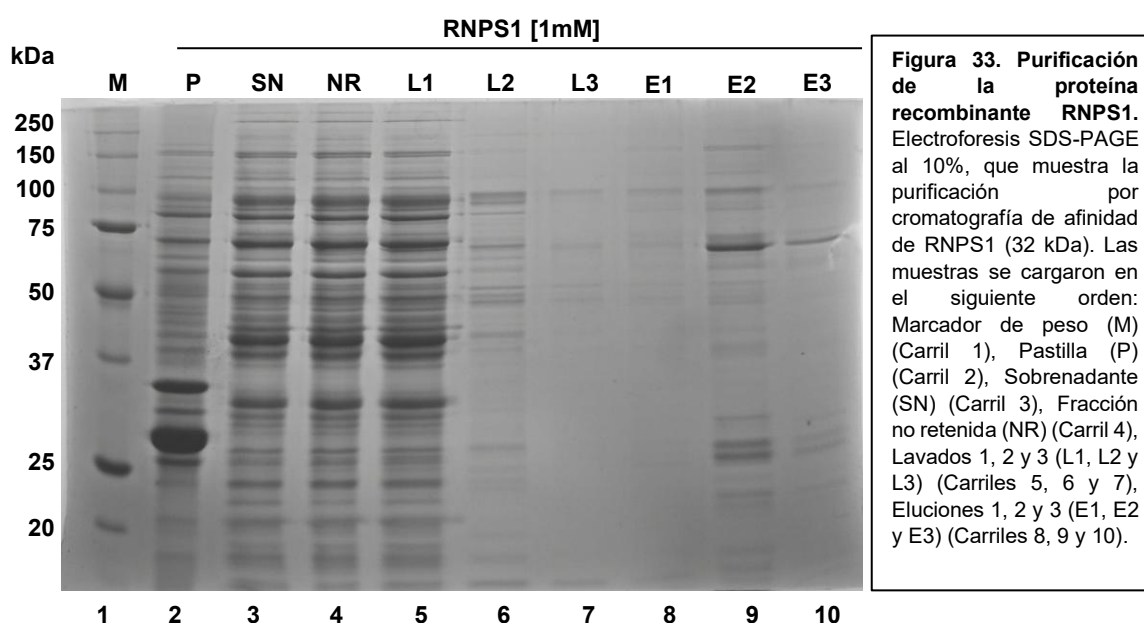
8.7 Sobreexpresión de la proteína recombinantes homóloga RNPS1

De manera análoga a lo realizado para la obtención de la proteína recombinante UPF1-CH, el plásmido RNPS1 se aisló a partir de las transformantes en *E. coli* DH5- α y posteriormente se empleó para transformar en la cepa de expresión *E. coli* BL21. Se seleccionaron aquellas colonias resistentes a ampicilina como posibles transformantes, las cuales fueron cultivadas, inducidas con IPTG al 1mM e incubadas a 37°C durante 3 horas para la obtención de los extractos proteicos totales. Considerando que RNPS1 presenta un peso molecular aproximado de 32kDa, se preparó un gel de poliacrilamida al 10% en el que se cargaron el Marcador de peso molecular (M) (carril 1), los controles (carriles 2-4), las muestras no inducidas (carriles 5, 7 y 9) y las muestras inducidas con 1mM de IPTG (carriles 6, 8 y 10) (**Figura 32**). En los carriles 6, 8 y 10 se observó una sobreexpresión evidente de RNPS1 en comparación con las muestras no inducidas, lo que podría atribuirse a la adición de IPTG.



Una vez confirmada la inducción, se procedió a cultivar e incubar volúmenes mayores de 50 ml, los cuales se indujeron bajo las mismas condiciones previamente establecidas. Posteriormente, se realizó la lisis celular para obtener la fracción soluble y continuar con el proceso de purificación por afinidad. La purificación se

llevó a cabo mediante cromatografía de afinidad utilizando perlas de Niquel- ácido nitrilo acético-agarosa (Ni-NTA). En la figura 33, se muestran las fracciones obtenidas durante el proceso de purificación, el primer carril corresponde al marcador de peso, el segundo carril a la fracción celular, el tercer carril contiene la fracción soluble y el cuarto carril corresponde a la fracción no retenida. Los carriles cinco al siete incluyen las fracciones de lavado con el buffer de lavado (NaH_2PO_4 50 mM, NaCl 300 mM, imidazol 20 mM, PMSF 10 mM a pH 8.0), mientras que los carriles ocho al diez contienen las eluciones realizadas con el buffer de elución con una concentración de 250 mM de Imidazol, en las cuales se esperaba recuperar la proteína de interés. Sin embargo, se observó una banda correspondiente al peso molecular estimado de RNPS1 en la pastilla celular, lo que sugiere que la proteína podría encontrarse en cuerpos de inclusión.



Debido a este resultado, se modificaron variables como la temperatura de incubación con el objetivo de reducir la formación de cuerpos de inclusión. Se llevo a cabo el mismo procedimiento previo, con excepción de la temperatura de incubación durante la inducción, que se disminuyó a 24°C. Se cargaron los mismos controles y el mismo marcador de peso molecular, muestras sin inducir e inducidas al 1mM donde observamos el mismo patrón e intensidad de bandeo de cuando se inducía a 37°C (Figura 34), lo que llevó a la decisión de modificar las concentraciones del inductor.

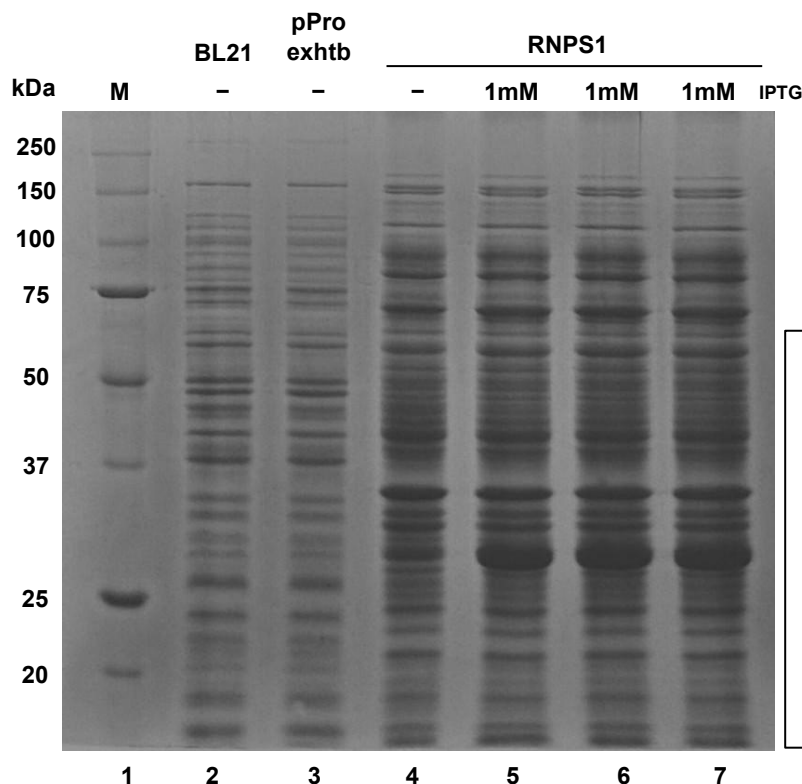
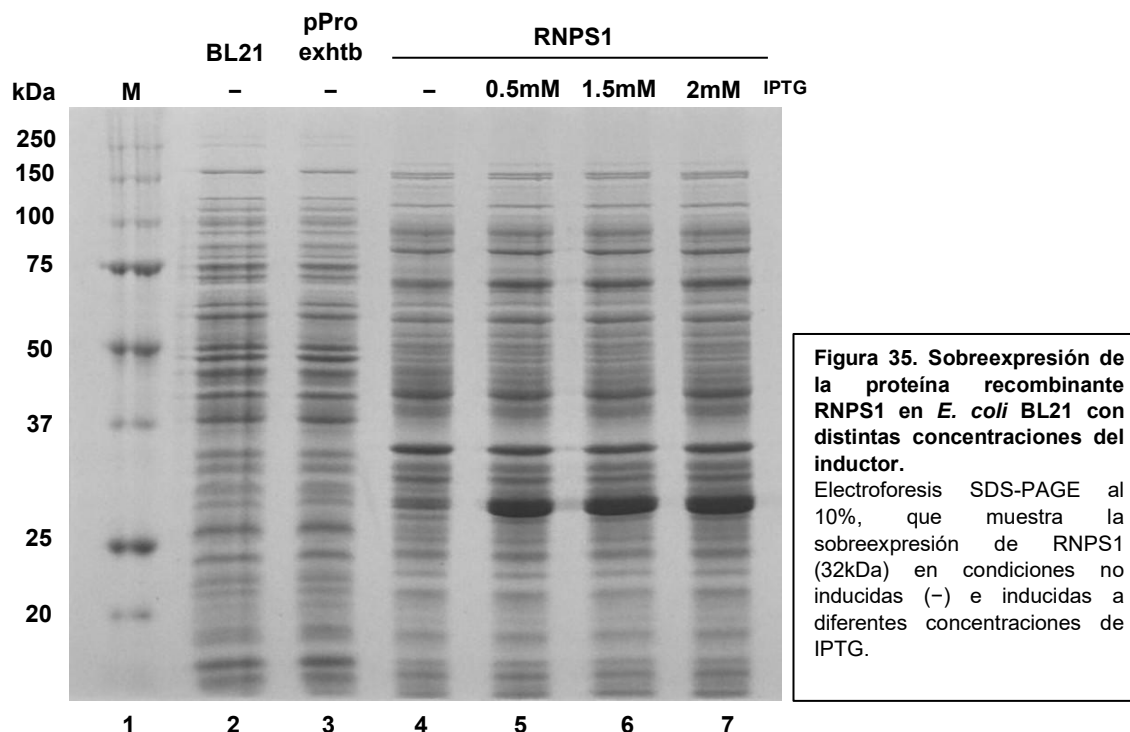


Figura 34. Sobreexpresión de la proteína recombinante RNPS1 en *E. coli* BL21 a baja temperatura de incubación. Electroforesis SDS-PAGE al 10%, que muestra la sobreexpresión de RNPS1 (32kDa) en condiciones no inducidas (-) e inducidas con 1mM de IPTG a 24°C.

Se evaluó la expresión de la proteína recombinante RNPS1 a diferentes concentraciones de IPTG (0.5 mM, 1.5 mM y 2mM) donde se observó que a concentraciones altas del inductor la expresión disminuye. Esto podría deberse a que el microorganismo lo percibe como un compuesto toxico y en respuesta a ello, reduce la síntesis de la proteína. En **la figura 35**, observamos un gel de poliacrilamida al 10% en el que se corrieron los mismos controles y las muestras sometidas a distintas concentraciones del inductor (carriles 5-7) donde no hubo cambio en la sobreexpresión de RNPS1. En este contexto, se evidenció que, aun manipulando variables durante el periodo de incubación de *E. coli* BL21, el patrón y la intensidad del bandeo seguía siendo el mismo. Por lo tanto, se continuó la búsqueda de alternativas que evitaran la formación de cuerpos de inclusión, así como metodologías para su solubilización.



Al no notarse diferencias en la sobreexpresión de la proteína recombinante RNPS1 inducida con diferentes concentraciones de IPTG, se buscaron alternativas menos agresivas para la solubilización de los cuerpos de inclusión. El N-lauril sarcosina o Sarkosyl es un detergente aniónico capaz de solubilizar agregados de cuerpos de inclusión. Este método de solubilización permite la disrupción de los cuerpos de inclusión sin requerir el replegamiento posterior de la proteína (Singh y cols., 2015). Por ello, las muestras de RNPS1 inducidas con 0.5 mM de IPTG se trataron con Sarkosyl al 0.3% durante 3 horas a 4°C y se purificaron mediante cromatografía de afinidad. En la **figura 36**, se muestran los resultados de las fracciones purificadas por este método donde el primer carril se cargó el marcador de peso (M), en el segundo carril; los extractos totales de RNPS1, en el tercer carril; la fracción celular o pastilla de RNPS1 (P) resuspendida en 200 µl de Sarkosyl al 0.3%, en el cuarto carril Fracción no retenida (NR), en los carriles quinto al séptimo; una serie de lavados, y en los carriles octavo al décimo, la serie de eluciones. Los resultados mostraron que el tratamiento no logró solubilizar los cuerpos de inclusión, por lo que fue necesario modificar las concentraciones del tensoactivo.

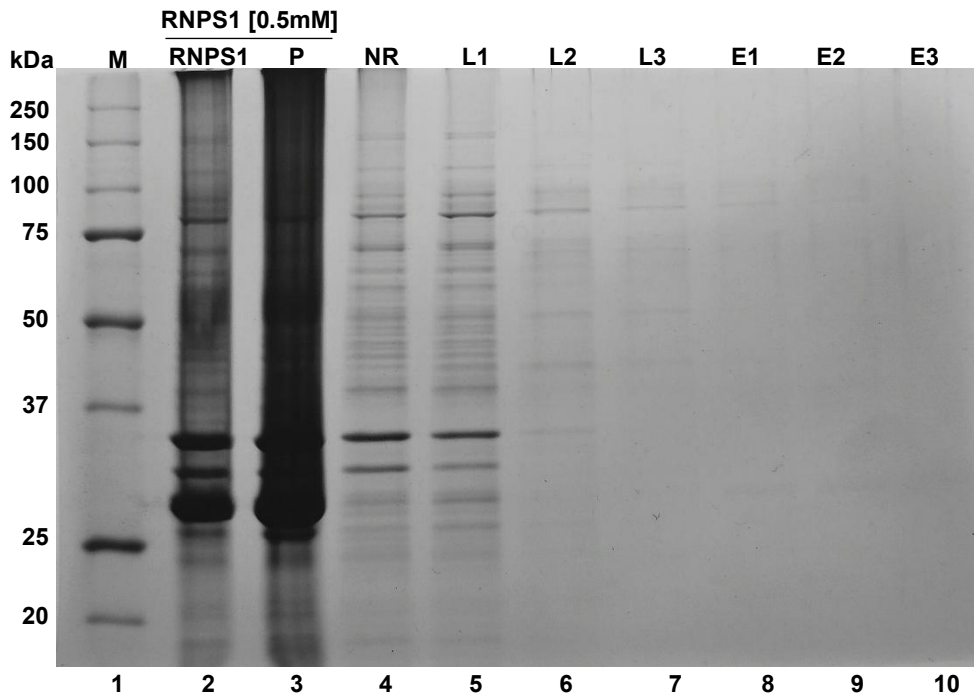


Figura 36. Purificación de la proteína recombinante RNPS1.

Electroforesis SDS-PAGE al 10%, que muestra la purificación por cromatografía de afinidad de RNPS1 (32 kDa). Las muestras se cargaron en el siguiente orden: Marcador de peso (M) (Carril 1), Pastilla (P) (Carril 2), Sobrenadante (SN) (Carril 3), Fracción no retenida (NR) (Carril 4), Lavados 1, 2 y 3 (L1, L2 y L3) (Carriles 5, 6 y 7), Eluciones 1, 2 y 3 (E1, E2 y E3) (Carriles 8, 9 y 10).

Para ello, se optó por evaluar concentraciones crecientes de Sarkosyl con la finalidad de identificar aquella que permitiera la solubilización de los cuerpos de inclusión. Las muestras fueron tratadas con Sarkosyl al 0.3%, 0.5% y 1% durante 3 horas a 4°C en constante agitación, posteriormente se centrifugaron y se obtuvo la fracción celular o pastilla (P), y soluble o sobrenadante (SN). Estas fueron analizadas en un gel de poliacrilamida al 10%. En la **imagen 36**, podemos observar que la proteína recombinante se concentra en la fracción celular, de modo que el tratamiento no produjo cambios en la solubilización.

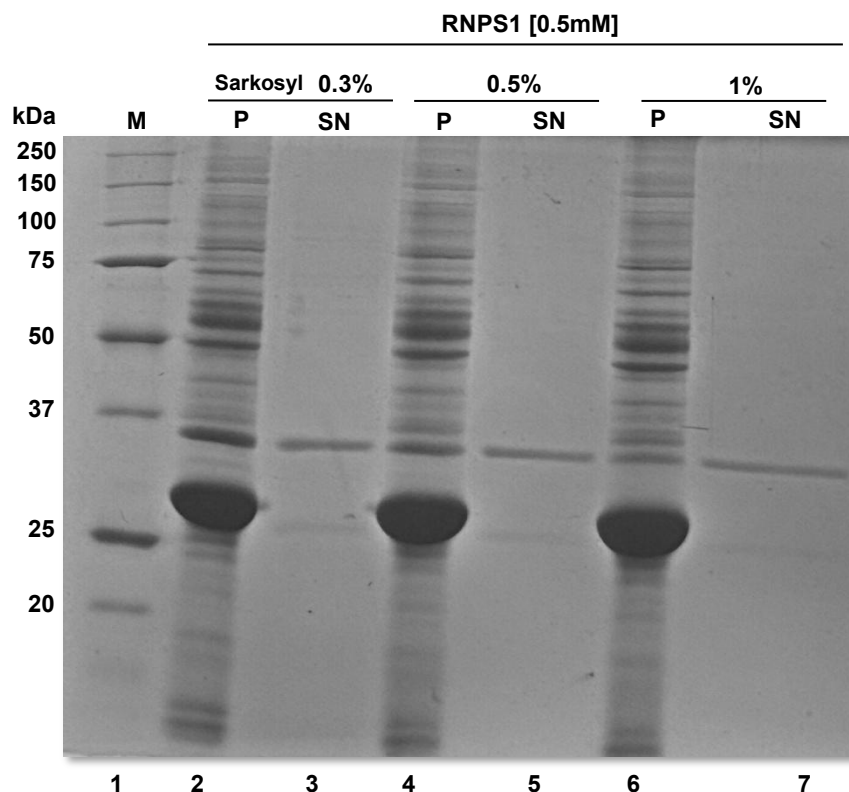


Figura 37. Proteína recombinante RNPS1 tratada con Sarkosyl al 0.3%, 0.5% y 1%. Electroforesis SDS-PAGE al 10%, que muestra el tratamiento con sarkosyl aplicado a RNPS1. Se observa bandeos intensos de aproximadamente 32 kDa en la fracción celular o pastilla, lo que indica que el tratamiento no fue efectivo. Las muestras fueron cargadas en el siguiente orden: Marcador de peso (M) (carril 1), Pastillas (P) (carriles 2, 4 y 6) y Sobrenadantes (SN) (carriles 3, 5 y 7). Antes de la separación de fases, las muestras fueron tratadas con 0.3%, 0.5% y 1% de Sarkosyl.

Los resultados anteriores sugirieron la necesidad de evaluar nuevas cepas de expresión de *E. coli*, que favorecieran la sobreexpresión de RNPS1 y evitaran la formación de cuerpos de inclusión, por lo que se optó utilizar la cepa *E. coli* SoluBL21. Esta cepa está diseñada para mejorar la expresión de proteínas solubles en mamíferos. En consecuencia, RNPS1 se transformó en *E. coli* SoluBL21 y se evaluaron concentraciones de 0.5mM y 1mM de IPTG. Las muestras fueron cargadas en un gel de poliacrilamida al 10% en el siguiente orden: Marcador de peso (carril 1), controles (carriles 2-5), RNPS1 sin inductor (carril 6), RNPS1 inducida con 0.5 mM de IPTG (carril 7) y RNPS1 inducida con 1mM de IPTG. Los resultados muestran que RNPS1 se sobreexpresa al 0.5 mM y 1mM de IPTG, sin embargo, es necesario aplicar lisis mecánica para identificar el estado de la proteína, es decir si está presente en fracción celular o sobrenadante (**Figura 38**).

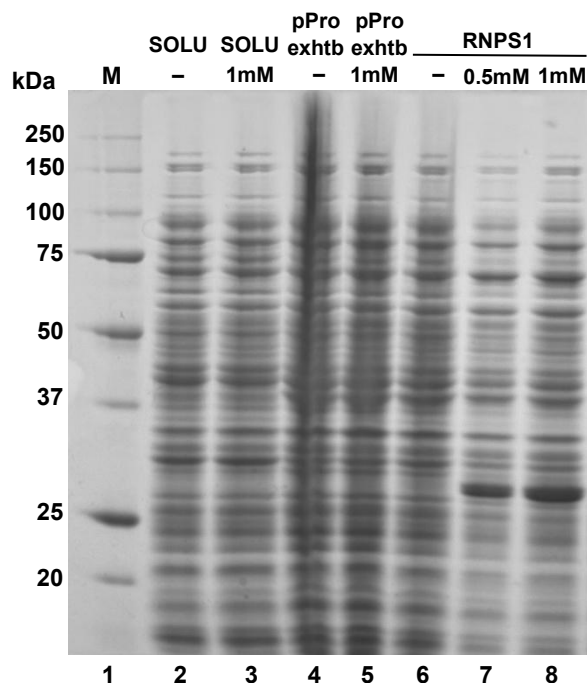


Figura 38. Sobreexpresión de la proteína recombinante RNPS1 en *E. coli* SoluBL21 con diferentes concentraciones del inductor.

Electroforesis SDS-PAGE al 10%, que muestra la sobreexpresión de RNPS1 (32kDa) en condiciones no inducidas (-) e inducidas con 0.5 mM y 1mM de IPTG. Las muestras fueron cargadas en el siguiente orden: Marcador de peso (M) (carril 1), controles (carriles 2-5), RNPS1 sin inductor (carril 6), RNPS1 inducida al 0.5 mM (carril 7), RNPS1 inducida al 1 mM (carril 8).

Nuevamente, se indujo RNPS1 al 1mM, se separó la fracción celular y el sobrenadante donde logramos observar que la proteína se localiza en la fracción celular (**Figura 39**).

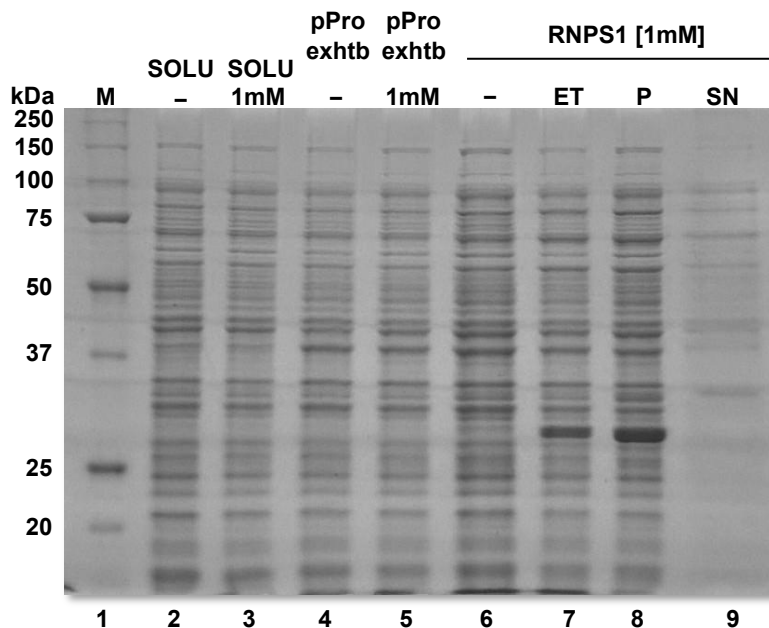


Figura 39. Sobreexpresión de la recombinante RNPS1 en *E. coli* SoluBL21.

Electroforesis SDS-PAGE al 10%, que muestra la sobreexpresión de RNPS1 (32kDa) en condiciones no inducidas (-) y tras inducción con 1mM de IPTG en extractos totales, fracción celular y fracción soluble. Las muestras fueron cargadas de la siguiente manera: Marcador de peso (M) (carril 1), Controles (carriles 2-5), RNPS1 sin inductor (carril 6), Extractos totales de RNPS1 (ET) (carril 7), Fracción celular (carril 8), Fracción soluble o sobrenadante (SN) (carril 9).

Previamente se habían aplicado diferentes métodos para evitar y solubilizar los cuerpos de inclusión, sin embargo no obtuvimos éxito. Por lo tanto, los resultados

anteriores sugieren la necesidad del uso de agentes desnaturalizantes como la urea. Para estos experimentos se emplearon los mismos controles y marcador de peso (carriles 1 al 5), anteriormente utilizados, así como RNPS1 sin inducir (carril 6), extractos totales de RNPS1 inducida con 1mM de IPTG (carril 7), pastilla (carril 8) y sobrenadante (carril 9). Cabe mencionar que RNPS1 fue tratada con urea 8M durante 16 horas a 4°C en constante agitación, tras lo cual se separaron las fracciones; celular y soluble. En los carriles 6 y 7 se aprecia un bandeo intenso cercano a los 32kDa, lo que indica que podría tratarse de RNPS1. En el carril 8 se observa una disminución de la intensidad del bandeo, mientras que el carril 9 se aprecia una única banda cercana a los 32 kDa, lo que sugiere la solubilización de los cuerpos de inclusión y liberación de la proteína al sobrenadante (**Figura 40**).

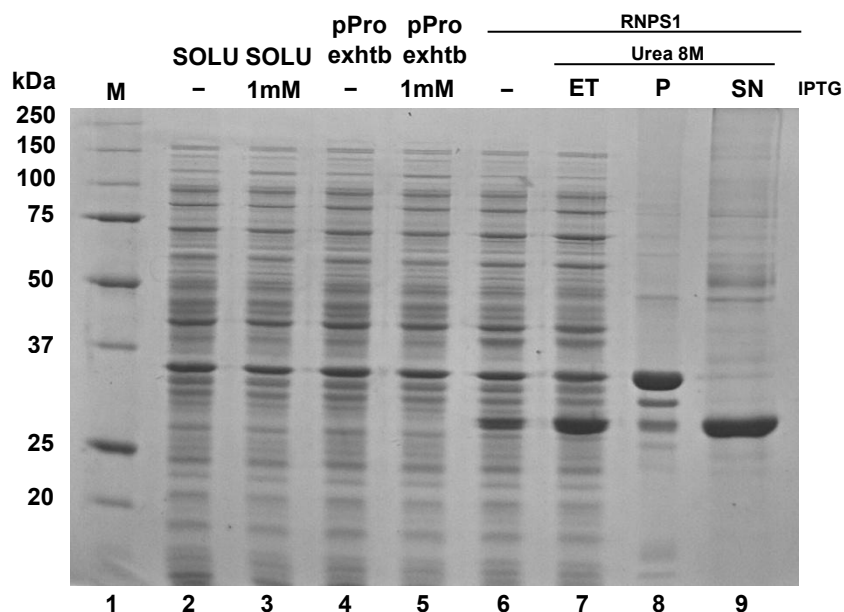


Figura 40. Proteína recombinante RNPS1 tratada con Urea al 8M.

Electroforesis SDS-PAGE al 10%, que muestra la sobreexpresión de RNPS1 (32kDa) en condiciones no inducidas (-) y tras inducción con 1mM de IPTG en extractos totales, fracción celular y fracción soluble. Adicional a ello, se aplicó tratamiento con Urea al 8M a las fracciones celular y soluble. Las muestras fueron cargadas de la siguiente manera: Marcador de peso (M) (carril 1), Controles (carriles 2-5), RNPS1 sin inductor (carril 6), Extractos totales de RNPS1 (ET) (carril 7), Fracción celular (carril 8), Fracción soluble o sobrenadante (SN) (carril 9).

9. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

9.1 Análisis comparativo de la maquinaria NMD en hongos

En este trabajo se logró la identificación de 32 factores que participan en la activación de la vía NMD, sin embargo, la expresión de estos factores es variable en los 187 hongos analizados. Se requirió la agrupación de estos hongos con base en su filogenia donde logramos observar que los ascomicetos y los basidiomicetos son los grupos que poseen la maquinaria NMD más compleja, pues se identificaron alrededor de 21 factores involucrados en la activación de la vía de cada uno de ellos (**Figura 18**).

Los resultados también indican que, en ascomicetos y basidiomicetos, la ausencia de determinados factores de la vía, como MLN51, SMG1, SMG5, SMG6 y SMG7, no implica necesariamente la pérdida de funcionalidad de este mecanismo. Estos hallazgos concuerdan con lo reportado por Lu y cols., (2025) quienes confirmaron la ausencia de los factores SMG5, SMG6, SMG7, SMG8 y SMG9 de por lo menos diez hongos fitopatógenos, entre ellos *M. maydis*. En estos organismos, la función de los factores ausentes podría ser compensada por proteínas homólogas que conservan dominios proteicos similares, lo que favorecería su interacción con el resto de los componentes de la vía y permitiría la activación de la vía NMD. Este tipo de compensación funcional ya ha sido descrita previamente en otros organismos como en el nematodo *C. elegans*, que posee las proteínas SMG2, SMG3 y SMG4, codificadas por los genes ortólogos de *Upf1*, *Upf2* y *Upf3*, respectivamente (Longman y cols., 2007). Asimismo, la ausencia de ciertos componentes podría estar relacionado con la capacidad infectiva de algunos microorganismos, los cuales pueden aprovechar mecanismos y proteínas del huésped para suplir funciones propias (Martínez-Montiel y cols., 2016).

También, se encontró que los rozellomicetos constituyen el grupo con el menor número de factores identificados. De los 32 factores identificados en la vía general de NMD, únicamente CBP20, Dom34, PPP2C, PPP2R1, PPP2R2 y PPP2R5 se encuentran presentes en estos organismos (**Figura 18**). Resulta interesante que hasta el momento no se han caracterizado factores esenciales como CBP80, lo que

refleja el limitado conocimiento sobre estos hongos. Sin embargo, no se descarta la posibilidad de que estos organismos posean una maquinaria funcional capaz de llevar a cabo la degradación del ARNm mediante la vía NMD.

En los mucoromicetos, se identificaron 17 factores involucrados en la activación de la vía NMD, incluyendo factores centrales, asociados y de transición (**Figura 18**). En particular, en el mucoromiceto *Rhizophagus irregularis* no se ha reportado la expresión del factor central UPF3, pero se ha identificado una proteína con similitud estructural que contiene un dominio smg4, la cual continúa caracterizándose (Lin y cols., 2014; Tisserant y cols., 2013). La expresión de esta proteína sugiere la existencia de proteínas homologas que compensan la funcionalidad de la vía en ausencia de UPF3B. Asimismo, ensayos de sobreexpresión génica y secuenciación en rozellomicetos y mucoromicetos permitiría esclarecer la expresión y funcionalidad de los factores implicados en la vía NMD, contribuyendo en la comprensión de los mecanismos de regulación de este proceso en estos grupos fúngicos.

RNPS1 es uno de los factores cuya presencia se detectó en al menos 98 especies de hongos. La ausencia de esta proteína en el resto de los organismos analizados podría ser compensada por la acción de proteínas homologas con funciones equivalentes. De acuerdo con Schlautmann y cols., (2022), la presencia de RNPS1 puede influir en la activación de la vía de degradación por NMD, sin embargo, no se considera un factor esencial a nivel global. De manera consistente, estudios realizados en líneas celulares afirman que aunque RNPS1 modula la actividad de la NMD, no es indispensable para la supervivencia celular. En este contexto, es posible que en eucariotas inferiores como las levaduras, RNPS1 ejerza un efecto modulador sin ser fundamental en la activación de la vía (Das y Panigrahi, 2024).

Sorpresivamente, UPF2 se identificó como uno de los factores más conservados entre hongos, ya que el 95% de los hongos presentan este factor, lo que sugiere que podría ser indispensable para la regulación de la vía de degradación del ARNm sin sentido. Esto concuerda con los datos reportados por Lu y cols., (2025) quienes

señalan que los factores centrales Upf1, Upf2 y Upf3 se sobreexpresan en hongos fitopatógenos, lo que refuerza la importancia funcional de estos componentes en la activación y regulación de la vía NMD.

9.2 Sobreexpresión de los transcritos *Rnps1*, *Upf1*, *Upf2*, *Upf3*, *Magoh* y *Hbs1* en *Mycosarcoma maydis*

En la fase experimental de este trabajo, se confirmó la presencia y expresión de los genes *Rnps1*, *Upf1*, *Upf2*, *Upf3*, *Magoh* y *Hbs1* en *M. maydis* mediante el uso de técnicas de biología molecular. La obtención de ADNc a partir de ARN total, seguida de la amplificación por PCR, permitió demostrar que estos genes se transcriben eficientemente en este organismo, lo cual concuerda con nuestros hallazgos e interpretaciones bioinformáticas.

En levaduras modelo como *S. cerevisiae* y algunos mamíferos, se ha reportado la expresión coordinada de estos genes como parte de un proceso de regulación y control de calidad de los transcritos, por lo que podrían estar conservados evolutivamente en organismos eucariotas (Barbarin-Bocahu y cols., 2024; Martínez-Montiel, 2016). En 2025, Lu y cols., reportaron la expresión de genes homólogos de factores involucrados en la activación de la vía NMD en hongos fitopatógenos. De manera consistente, señalaron que los factores más conservados dentro de este grupo corresponden a los componentes centrales de la vía, específicamente Upf1, Upf2 y Upf3, así como a proteínas que forman parte del complejo EJC, entre ellas eIF4A3, MAGOH, Y14 y MLN51. Estos datos reportados como de alto grado de conservación sugieren que la maquinaria central de NMD se mantiene conservada en hongos fitopatógenos, lo que confirma y respalda los resultados obtenidos en este trabajo respecto a la expresión de estos factores y refuerza la relevancia biológica de los mecanismos de control de calidad del ARN, específicamente de la vía NMD, en hongos.

9.3 Comprobación de la integridad de las construcciones UPF1-CH y UPF2

En esta sección del trabajo, se evaluó la integridad de las construcciones UPF1-CH y UPF2 mediante el uso de técnicas de biología molecular y secuenciación. Esto

debido al tiempo de resguardo del material biológico. Los análisis por digestión con enzimas de restricción y PCR brindaron una información aproximada del tamaño de las construcciones y de los insertos, los cuales coincidieron con los valores previstos a partir de los análisis bioinformáticos. Adicionalmente, la secuenciación proporcionó información detallada sobre la composición nucleotídica de cada construcción, lo que permitió identificar el codón de inicio, corroborar el marco de lectura, así como localizar los sitios de reconocimiento de enzimas de restricción como *EcoRI*, *StuI* y *XbaI*. Asimismo, se confirmó la correcta inserción y orientación del gen, así como la presencia de la etiqueta de histidinas (6xHis). En conjunto, estos resultados indican que las construcciones se encuentran integra y sugieren que el sistema de expresión es adecuado para la síntesis de las proteínas recombinantes correspondientes.

9.4 Análisis de la expresión de las proteínas recombinantes UPF1-CH y RNPS1

En este apartado del trabajo, se evaluaron la sobreexpresión y la purificación de UPF1-CH en *E. coli*. Inicialmente, la transformación del vector se realizó en *E. coli* BL21 donde no se observaron cambios significativos en la sobreexpresión de la proteína en presencia o ausencia del inductor Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG). Se esperaba que la adición del inductor incrementara la expresión de UPF1-CH, sin embargo, se observó todo lo contrario, ya que la inducción con IPTG no resultó en un aumento detectable de la sobreexpresión. Con el fin de evaluar si este fenómeno dependía de la concentración del inductor, se analizaron concentraciones crecientes de IPTG desde 0.5 mM hasta 2.5 mM en *E. coli* BL21, observándose el mismo efecto. Este comportamiento podría deberse a que *E. coli* reconoce la síntesis de UPF1-CH como un proceso no propio y potencialmente tóxico, lo que podría activar mecanismos de regulación celular destinados a reducir la síntesis de la proteína para mantener la integridad celular.

Por este motivo, se tomó la decisión de cambiar la cepa de expresión y se seleccionó a *E. coli* SoluBL21, pues es una variante de *E. coli* BL21 que presenta ARNt para codones pocos frecuentes en procariotas (Rosano y Ceccarellu, 2014).

El cambio de la cepa de expresión y el aumento de la concentración de IPTG al 2 mM mejoró la sobreexpresión de UPF1-CH.

Tras la sobreexpresión de UPF1-CH, se procedió a su purificación mediante cromatografía de afinidad utilizando columnas de níquel agarosa. Durante este proceso, la proteína se detectó principalmente en la Fracción no retenida, sin una recuperación significativa en las eluciones. Este resultado indicaría que UPF1-CH no se unió eficientemente a la columna, lo que podría atribuirse a una interacción deficiente entre la etiqueta de histidinas (6xHis) y la resina de agarosa. Esto podría deberse a que la etiqueta de histidinas se encuentre parcialmente oculta debido al plegamiento de la proteína. O bien las condiciones de purificación no fueron optimas como el pH o la concentración de imidazol en los buffers de carga y lavado, podrían haber afectado negativamente la unión de la proteína a la resina.

Adicionalmente, podría considerarse el uso de estrategias de purificación complementarias. En 1995, Czaplinski y cols., reportaron la sobreexpresión y purificación de la proteína recombinante UPF1 de *S. cerevisiae*. La purificación se realizó por cromatografía de intercambio iónico utilizando columnas dietilaminoetilocelulosa (DEAE-Sephacel), por la cual se logró obtener un grado de pureza superior al 95%. Mientras que en 2023 Xue y cols., purificaron a UPF1 por cromatografía de exclusión por tamaño utilizando columnas de Superdex 200. Tomando en consideración esto, los resultados ponen de manifiesto la necesidad de continuar optimizando las condiciones de purificación para obtener una proteína funcional y de alta pureza.

De la misma manera que la recombinante UPF1-CH, se evaluaron distintas estrategias para la sobreexpresión y solubilización de la proteína recombinante RNPS1 en *E. coli*. Para lograr esto, se evaluaron distintas concentraciones del inductor IPTG donde la sobreexpresión en *E. coli* BL21 se alcanzaba a una concentración de 0.5 mM y 1.0 mM de IPTG. Sin embargo, la proteína se concentraba en la fracción celular, lo que sugiere la formación de cuerpos de inclusión. Este comportamiento es característico de proteínas eucariotas en

sistemas procariotas, debido a diferencias en el plegamiento y la ausencia de la maquinaria celular especializada (Bhatwa y cols., 2021).

Asimismo, la evaluación de concentraciones crecientes de IPTG no resultó en un incremento en la fracción soluble de RNPS1, lo que indica que la modificación de la concentración del inductor no fue un factor determinante para evitar la agregación de esta proteína. Estos resultados concuerdan con lo establecido por Hon y cols., (2021) quienes señalan que la solubilidad proteica depende del ajuste de factores extrínsecos como las condiciones del cultivo y del sistema de expresión.

En este contexto, se optó por utilizar la cepa de expresión *E. coli* SoluBL21, diseñada específicamente para la solubilización de proteínas de mamíferos. Esta estrategia se planteó como una alternativa para minimizar la formación de cuerpos de inclusión y obtener a RNPS1 en condiciones cercanas a su estado funcional. No obstante, no se observó un efecto significativo en la solubilización de RNPS1.

Ante la formación persistente de cuerpos de inclusión, se evaluaron métodos de solubilización mediante detergentes y agentes desnaturizantes. El uso de sarkosyl no permitió la solubilización efectiva de RNPS1, mientras que la urea facilitó su solubilización. Desafortunadamente, su carácter desnaturizante representa un desafío, pues puede alterar la estructura y funcionalidad de la proteína. Esto implica la necesidad de procesos adicionales de renaturalización, los cuales pueden resultar en una pérdida parcial de la actividad biológica (Bhuyam, 2022).

En contraste Deka y Singh (2022) lograron la sobreexpresión y purificación de RNPS1 humano en forma soluble, utilizando el vector pHis-TEV y la cepa de expresión *E. coli* Rosetta (DE3). En dicho estudio, se obtuvo una concentración adecuada de proteína en forma soluble, lo que sugiere que esta cepa y vector de expresión podría favorecer el plegamiento correcto de RNPS1. Por lo que, la evaluación futura de esta cepa, así como la modificación del vector de expresión empleado en el anterior estudio, podrían resultar estrategias viables para mejorar la solubilidad y la obtención de RNPS1 en condiciones funcionales.

Los ensayos de tipo *pull down* para analizar la interacción entre RNPS1 y UPF1-CH no se realizaron debido a la baja solubilidad de RNPS1 y la escasa afinidad de UPF1-CH por la columna de cromatografía para su purificación. Al no obtener la purificación de UPF1-CH, la presencia de proteínas inespecíficas podría alterar los resultados y la captura de RNPS1. De igual forma, el plegamiento de RNPS1 podría dificultar su interacción, ya que al encontrarse en cuerpos de inclusión podría ocultar el sitio de unión y reconocimiento para UCF1-CH. Por otra parte, la desnaturalización de RNPS1 con urea podría favorecer la apertura conformacional de la proteína y promover la interacción, sin embargo como ya se había mencionado, este procedimiento podría alterar el estado de asociación entre ambas proteínas. Por lo que, estos posibles comportamientos deberán ser analizados a futuro.

10. CONCLUSIONES

- Los ascomicetos y basidiomicetos poseen una maquinaria compleja y altamente organizada para la activación de la vía NMD, la cual requiere la participación de aproximadamente 21 factores.
- La composición y organización de la maquinaria de activación de la vía NMD es similar entre ascomicetos y basidiomicetos, por lo que se sugiere la conservación de este mecanismo en hongos.
- Se confirmó la presencia y la expresión de los genes Upf1, Upf2, Upf3, Rnps1, Hbs1 y Magoh en *Mycosarcoma maydis*, lo que refuerza la idea de la conservación de la vía NMD en organismos eucariotas.
- Las construcciones Upf1 y Upf2 diseñadas para la producción de proteínas recombinantes mantienen su integridad estructural.
- La proteína recombinante UPF1-CH se sobreexpresa en *Escherichia coli* SoluBL21 cuando se emplean altas concentraciones del inductor, lo que evidencia la influencia de la cepa hospedera y de las condiciones de inducción en la expresión de proteínas eucariotas.
- La proteína recombinante RNPS1 se sobreexpresa en *Escherichia coli* SoluBL21 cuando se emplean bajas concentraciones del inductor, sin embargo, esta permanece asociada a cuerpos de inclusión, lo que limita su obtención en forma soluble.

11. PERSPECTIVAS

- Evaluar la sobreexpresión de la proteína recombinante RNPS1 en *Escherichia coli* Rossetta (DE3) para evitar la formación de cuerpos de inclusión.
- Evaluar la purificación de la proteína UPF1-CH y RNPS1 por cromatografía de afinidad.
- Demostrar la interacción entre las proteínas UPF1-RNPS1 empleando ensayos de tipo *pull down*.
- Identificar posibles mensajeros blanco de NMD en *Mycosarcoma maydis* empleando técnicas de microarreglos.

BIBLIOGRAFÍA

Arias-Palomo, E., Yamashita, A., Fernández, I. S., Núñez-Ramírez, R., Bamba, Y., Izumi, N., Ohno, S., & Llorca, O. (2011). The nonsense-mediated mRNA decay SMG-1 kinase is regulated by large-scale conformational changes controlled by SMG-8. *Genes & Development*, 25(2), 153. <https://doi.org/10.1101/GAD.606911>

Baralle, M., & Baralle, F. E. (2021). *Concise review Alternative splicing and liver disease*. <https://doi.org/10.1016/j.aohep.2021.100534>

Barbarin-Bocahu, I., Ulryck, N., Rigobert, A., Gutierrez, N. R., Decourty, L., Raji, M., Garkhal, B., Le Hir, H., Saveanu, C., & Graille, M. (2024a). Structure of the Nmd4-Upf1 complex supports conservation of the nonsense-mediated mRNA decay pathway between yeast and humans. *PLOS Biology*, 22(9), e3002821. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PBIO.3002821>

Behera, A., Panigrahi, G. K., & Sahoo, A. (2024). Nonsense-Mediated mRNA Decay in Human Health and Diseases: Current Understanding, Regulatory Mechanisms and Future Perspectives. *Molecular Biotechnology* 2024 67:9, 67(9), 3374–3390. <https://doi.org/10.1007/S12033-024-01267-7>

Bhatwa, A., Wang, W., Hassan, Y. I., Abraham, N., Li, X. Z., & Zhou, T. (2021). Challenges Associated With the Formation of Recombinant Protein Inclusion Bodies in *Escherichia coli* and Strategies to Address Them for Industrial Applications. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 9, 630551. <https://doi.org/10.3389/FBIOE.2021.630551/FULL>

Bhuyan, A. K. (2002). Protein Stabilization by Urea and Guanidine Hydrochloride†. *Biochemistry*, 41(45), 13386–13394. <https://doi.org/10.1021/BI020371N>

Burgos Gamez, X., & BURGOS GAMEZ, X. 704401. (2014). *Construcción de las proteínas recombinantes para los homólogos de los factores de NMD UPF1 y UPF2 de Ustilago maydis* [Tesis, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla]. <https://hdl.handle.net/20.500.12371/6923>

Carrard, J., & Lejeune, F. (2023). Nonsense-mediated mRNA decay, a simplified view of a complex mechanism. *BMB Reports*, 56(12), 625. <https://doi.org/10.5483/BMBREP.2023-0190>

Celik, A., Baker, R., He, F., & Jacobson, A. (2017). High-resolution profiling of NMD targets in yeast reveals translational fidelity as a basis for substrate selection. *RNA*, 23(5), 735–748. <https://doi.org/10.1261/RNA.060541.116/-/DC1>

Clerici, M., Deniaud, A., Boehm, V., Gehring, N. H., Schaffitzel, C., & Cusack, S. (2013). Structural and functional analysis of the three MIF4G domains of nonsense-mediated decay factor UPF2. *Nucleic Acids Research*, 42(4), 2673. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKT1197>

Cougot, N., Daguenet, É., Baguet, A., Cavalier, A., Thomas, D., Bellaud, P., Fautrel, A., Godey, F., Bertrand, É., Tomasetto, C., & Gillet, R. (2014). Overexpression of MLN51 triggers P-body disassembly and formation of a new type of RNA granules. *Journal of Cell Science*, 127(21), 4692–4701. <https://doi.org/10.1242/JCS.154500/VIDEO-1>

Das, R., & Panigrahi, G. K. (2024). Messenger RNA Surveillance: Current Understanding, Regulatory Mechanisms, and Future Implications. *Molecular Biotechnology* 2024 67:2, 67(2), 393–409. <https://doi.org/10.1007/S12033-024-01062-4>

Deka, B., & Singh, K. K. (2017). Multifaceted Regulation of Gene Expression by the Apoptosis- and Splicing-Associated Protein Complex and Its Components. *International Journal of Biological Sciences*, 13(5), 545. <https://doi.org/10.7150/IJBS.18649>

Deka, B., & Singh, K. K. (2022). Molecular cloning, expression and generation of a polyclonal antibody specific for RNPS1. *Molecular Biology Reports* 2022 49:9, 49(9), 9095–9100. <https://doi.org/10.1007/S11033-022-07676-8>

Embree, C. M., Abu-Alhasan, R., & Singh, G. (2022). *Features and factors that dictate if terminating ribosomes cause or counteract nonsense-mediated mRNA decay*. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2022.102592>

Fatscher, T., Boehm, V., & Gehring, N. H. (2015). Mechanism, factors, and physiological role of nonsense-mediated mRNA decay. *Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS*, 72(23), 4523–4544. <https://doi.org/10.1007/S00018-015-2017-9>

Fritz, S. E., Ranganathan, S., Wang, C. D., & Hogg, J. R. (2022). An alternative UPF1 isoform drives conditional remodeling of nonsense-mediated mRNA decay. *The EMBO Journal*, 41(10). <https://doi.org/10.15252/EMBJ.2021108898>

Gebhardt, A., Habjan, M., Benda, C., Meiler, A., Haas, D. A., Hein, M. Y., Mann, A., Mann, M., Habermann, B., & Pichlmair, A. (2015). mRNA export through an additional cap-binding complex consisting of NCBP1 and NCBP3. *Nature Communications*, 6, 8192. <https://doi.org/10.1038/NCOMMS9192>

Gerbracht, J. V., Boehm, V., Britto-Borges, T., Kallabis, S., Wiederstein, J. L., Ciriello, S., Aschemeier, D. U., Krüger, M., Frese, C. K., Altmüller, J., Dieterich, C., & Gehring, N. H. (2020). CASC3 promotes transcriptome-wide activation of nonsense-mediated decay by the exon junction complex. *Nucleic Acids Research*, 48(15), 8626. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKAA564>

Green, R. M., & Sambrook, J. (2012). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 4th edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 33(1), 75–78. <http://pub.chinasciencejournal.com/article/getArticleRedirect.action?doiCode=10.3724/SP.J.1141.2012.01075>

Greener, A., Callahan, M., & Jerpseth, B. (1997). An efficient random mutagenesis technique using an E. coli mutator strain. *Molecular Biotechnology*, 7(2), 189–195. <https://doi.org/10.1007/BF02761755>

Grodberg, J., & Dunn, J. J. (1988). ompT encodes the Escherichia coli outer membrane protease that cleaves T7 RNA polymerase during purification. *Journal of Bacteriology*, 170(3), 1245. <https://doi.org/10.1128/JB.170.3.1245-1253.1988>

Gutiérrez, K. A. R., Montiel, N. M., Ruiz, M. A., Cholula, M. P. G., & Contreras, R. D. M. (2021). Reprogramación del splicing alternativo de genes asociados a cáncer de mama. *EPISTEMUS*, 15(30), 75–82.

<https://doi.org/10.36790/EPISTEMUS.V15I30.186>

He, F., & Jacobson, A. (2022). Eukaryotic mRNA decapping factors: molecular mechanisms and activity. *The FEBS Journal*, 290(21), 5057. <https://doi.org/10.1111/FEBS.16626>

Hug, N., Longman, D., & Cáceres, J. F. (2016). Mechanism and regulation of the nonsense-mediated decay pathway. *Nucleic Acids Research*, 44(4), 1483. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKW010>

Iermak, I., Wilson Eisele, N. R., Kurscheidt, K., Loukeri, M. J., Basquin, J., Bonneau, F., Langer, L. M., Keidel, A., & Conti, E. (2025). Molecular mechanisms governing the formation of distinct Upf1-containing complexes in yeast. *Cell Reports*, 44(10), 116415. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2025.116415>

Karousis, E. D., & Mühlemann, O. (2019). *Nonsense-Mediated mRNA Decay Begins Where Translation Ends*. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a032862>

Karp, Gerald., & Araiza Martínez, M. E. (2019). *Biología celular y molecular. Conceptos y experimentos, 8e | AccessMedicina | McGraw Hill Medical* (8va. edición). Mc Graw Hill. <https://accessmedicina-mhmedical-com.proxydgb.buap.mx/book.aspx?bookid=2817>

Kim, H. K., Pham, M. H. C., Ko, K. S., Rhee, B. D., & Han, J. (2018). Alternative splicing isoforms in health and disease. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology* 2018 470:7, 470(7), 995–1016. <https://doi.org/10.1007/S00424-018-2136-X>

Larran, A. S., Ge, J., Martín, G., De la Concepción, J. C., Dagdas, Y., & Qüesta, J. I. (2024). Nucleo-cytoplasmic distribution of SAP18 reveals its dual function in splicing regulation and heat-stress response in Arabidopsis. *Plant Communications*, 6(1), 101180. <https://doi.org/10.1016/J.XPLC.2024.101180>

Lejeune, F. (2022). *Nonsense-Mediated mRNA Decay, a Finely Regulated Mechanism*. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10010141>

Lin, K., Limpens, E., Zhang, Z., Ivanov, S., Saunders, D. G. O., Mu, D., Pang, E., Cao, H., Cha, H., Lin, T., Zhou, Q., Shang, Y., Li, Y., Sharma, T., van Velzen, R., de Ruijter, N., Aanen, D. K., Win, J., Kamoun, S., ... Huang, S. (2014). Single Nucleus Genome Sequencing Reveals High Similarity among Nuclei of an Endomycorrhizal Fungus. *PLOS Genetics*, 10(1), e1004078. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PGEN.1004078>

Longman, D., Plasterk, R. H. A., Johnstone, I. L., & Cáceres, J. F. (2007). Mechanistic insights and identification of two novel factors in the C. elegans NMD pathway. *Genes & Development*, 21(9), 1075. <https://doi.org/10.1101/GAD.417707>

Lu, P., Wang, J., Wang, X., Wang, D., & Shi, H. (2025). Up-Frameshift Factors from Phytopathogenic Fungi Play a Crucial Role in Nonsense-Mediated mRNA Decay. *Journal of Fungi*, 11(6), 404. <https://doi.org/10.3390/JOF11060404/S1>

Lu, Y. Y., & Krebber, H. (2021). Nuclear mRNA Quality Control and Cytoplasmic NMD Are Linked by the Guard Proteins Gbp2 and Hrb1. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(20), 11275. <https://doi.org/10.3390/IJMS222011275>

Martínez Montiel, N., & MARTINEZ MONTIEL, N. 264278. (2016). *Identificación y caracterización de los factores involucrados en decaimiento de ARN mensajero sin sentido (NMD) en Ustilago maydis*. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. <https://hdl.handle.net/20.500.12371/1068>

Martínez-Montiel, N., Morales-Lara, L., Hernández-Pérez, J. M., & Martínez-Contreras, R. D. (2016). *In Silico Analysis of the Structural and Biochemical Features of the NMD Factor UPF1 in Ustilago maydis*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0148191>

Martínez-Montiel, N., Rosas-Murrieta, N. H., Ruiz, M. A., Monjaraz-Guzman, E., & Martinez-Contreras, R. (2018). Alternative Splicing as a Target for Cancer

Treatment. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(2).
<https://doi.org/10.3390/IJMS19020545>

Meaux, S., van Hoof, A., & Baker, K. E. (2008). Nonsense-mediated mRNA decay in yeast does not require PAB1 or a poly(A) tail. *Molecular Cell*, 29(1), 134.
<https://doi.org/10.1016/J.MOLCEL.2007.10.031>

Mitra, R., Rehman, A., Singh, K. K., & Jaganathan, B. G. (2022). Multifaceted roles of MAGOH Proteins. *Molecular Biology Reports* 2022 50:2, 50(2), 1931–1941.
<https://doi.org/10.1007/S11033-022-07904-1>

Muir, V. S., Gasch, A. P., & Anderson, P. (2018). The substrates of nonsense-mediated mRNA decay in *Caenorhabditis elegans*. *G3: Genes, Genomes, Genetics*, 8(1), 195–205. <https://doi.org/10.1534/G3.117.300254/-/DC1>

Münsterkötter, M., & Steinberg, G. (2007). *The fungus Ustilago maydis and humans share disease-related proteins that are not found in Saccharomyces cerevisiae*.
<https://doi.org/10.1186/1471-2164-8-473>

Nagar, P., Islam, M. R., & Rahman, M. A. (2023a). Nonsense-Mediated mRNA Decay as a Mediator of Tumorigenesis. *Genes*, 14(2), 357.
<https://doi.org/10.3390/GENES14020357>

Nogueira, G., Fernandes, R., García-Moreno, J. F., & Romão, L. (2021). Nonsense-mediated RNA decay and its bipolar function in cancer. *Molecular Cancer* 2021 20:1, 20(1), 72-. <https://doi.org/10.1186/S12943-021-01364-0>

Pérez-Rodríguez, F., Valdés-Santiago, L., García-Chávez, J. N., Castro-Guillén, J. L., & Ruiz-Herrera, J. (2023). Analysis of gene expression related to polyamine concentration and dimorphism induced in ornithine decarboxylase (odc) and spermidine synthase (spd) *Ustilago maydis* mutants. *Fungal Genetics and Biology*, 166. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2023.103792>

Rosano, G. L., & Ceccarelli, E. A. (2014). Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. *Frontiers in Microbiology*, 5(APR), 172.
<https://doi.org/10.3389/FMICB.2014.00172>

- Ryu, I., Won, Y. S., Ha, H., Kim, E., Park, Y., Kim, M. K., Kwon, D. H., Choe, J., Song, H. K., Jung, H., & Kim, Y. K. (2019). eIF4A3 Phosphorylation by CDKs Affects NMD during the Cell Cycle. *Cell Reports*, 26(8), 2126-2139.e9. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.01.101>
- Schlautmann, L. P., Lackmann, J. W., Altmüller, J., Dieterich, C., Boehm, V., & Gehring, N. H. (2022). Exon junction complex-associated multi-adaptor RNPS1 nucleates splicing regulatory complexes to maintain transcriptome surveillance. *Nucleic Acids Research*, 50(10), 5899. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKAC428>
- Sciarrillo, R., Wojtuszkiewicz, A., Assaraf, Y. G., Jansen, G., Kaspers, G. J. L., Giovannetti, E., & Cloos, J. (2020). The role of alternative splicing in cancer: From oncogenesis to drug resistance. *Drug Resistance Updates*, 53, 100728. <https://doi.org/10.1016/j.drug.2020.100728>
- Singh, A., Upadhyay, V., Upadhyay, A. K., Singh, S. M., & Panda, A. K. (2015). Protein recovery from inclusion bodies of Escherichia coli using mild solubilization process. *Microbial Cell Factories*, 14(1), 41-. <https://doi.org/10.1186/S12934-015-0222-8/TABLES/3>
- Singh, K. K., Wachsmuth, L., Kulozik, A. E., & Gehring, N. H. (2013). Two mammalian MAGOH genes contribute to exon junction complex composition and nonsense-mediated decay. *RNA Biology*, 10(8), 1291. <https://doi.org/10.4161/RNA.25827>
- Staszewski, J., Lazarewicz, N., Konczak, J., Migdal, I., & Maciaszczyk-Dziubinska, E. (2023). UPF1—From mRNA Degradation to Human Disorders. *Cells*, 12(3). <https://doi.org/10.3390/CELLS12030419>
- Steinberg, G., & Perez-Martin, J. (2008). Ustilago maydis, a new fungal model system for cell biology. *Trends in Cell Biology*, 18(2), 61–67. <https://doi.org/10.1016/J.TCB.2007.11.008>

Stubbs, S. H., & Conrad, N. K. (2014). Depletion of REF/Aly alters gene expression and reduces RNA polymerase II occupancy. *Nucleic Acids Research*, 43(1), 504. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKU1278>

Tisserant, E., Malbreil, M., Kuo, A., Kohler, A., Symeonidi, A., Balestrini, R., Charron, P., Duensing, N., Frei Dit Frey, N., Gianinazzi-Pearson, V., Gilbert, L. B., Handa, Y., Herr, J. R., Hijri, M., Koul, R., Kawaguchi, M., Krajinski, F., Lammers, P. J., Masclaux, F. G., ... Martin, F. (2013). Genome of an arbuscular mycorrhizal fungus provides insight into the oldest plant symbiosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(50), 20117–20122. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1313452110;WGROU:STRING:PUBLICATION>

Yi, Z., Arvola, R. M., Myers, S., Dilsavor, C. N., Alhasan, R. A., Carter, B. N., Patton, R. D., Bundschuh, R., & Singh, G. (2022). Mammalian UPF3A and UPF3B can activate nonsense-mediated mRNA decay independently of their exon junction complex binding. *The EMBO Journal*, 41(10), e109202. <https://doi.org/10.15252/EMBJ.2021109202>

	pb	aa	kDa	+PolyHis (kDa)
RNPS1	197	594	22	32
UPF1/CH	873	290	32	39
umUPF1	3285	1094	121	–
umUPF2	3708	1235	137	144
umUPF3	1680	559	59	66
hUPF1	3390	1129	124	–
hUPF2	3819	1272	148	–
hUPF3b	1413	470	56	–
Anexo 2. Tamaño de los factores centrales y asociados a NMD en <i>M. maydis</i> y <i>H. sapiens</i>				

Estudio de los factores de splicing y decaimiento del ARNm sin sentido (NMD) en *Mycosarcoma maydis*

Anexo 3. Tabla de distribución de los diferentes factores relacionados en la activación de NMD en hongos.

						Factores NMD			Factores asociados al complejo de unión CAP		Fosfatasa y cinasas				Factores del complejo EJC										Factores asociados a EJC		Subunidades de la fosfatasa 2A					Factores de disociación		Factores de degradación						
		División (Phylum)	Clase	Orden	Familia	Género	Código de organismo	UPF1	UPF2	UPF3	CBP80 (NCRP1)	CBP20 (NCRP2)	SMG1	SMG5	SMG6	SMG7	Y14	MAO1H	MLN51	EIF4A3	SAP18	Pinin (PIN)	ACIN1	RNP51	ALY (THOC4)	SRM160 (SRM1)	UAP56 (DRI158)	P15(NOT1_2)	KIF (TAP)	PPP2C	PPP2R1	PPP2R2	PPP2R3	PPP2R5	HBS1	DOM3A	SKI7			
1	Alf					Staphylococcus aureus	8327	FAH060C	FAH072C	YH0672N	3N6142W	YH123W								FAH071W					FAH061W		FAH06W		FAH06C		FAH06W	FAH06W	FAH06W	FAH06W	FAH06W	FAH06W	FAH06W	FAH06W	FAH06W	FAH06W
2	Alf					Staphylococcus aureus	8327	FAH060C	FAH072C	YH0672N	3N6142W	YH123W								FAH071W					FAH061W		FAH06W		FAH06C		FAH06W	FAH06W	FAH06W	FAH06W	FAH06W	FAH06W	FAH06W	FAH06W	FAH06W	FAH06W
3	Alf					Staphylococcus aureus	8327	FAH060C	FAH072C	YH0672N	3N6142W	YH123W								FAH071W					FAH061W		FAH06W		FAH06C		FAH06W	FAH06W	FAH06W	FAH06W	FAH06W	FAH06W	FAH06W	FAH06W	FAH06W	FAH06W
4	Alf					Staphylococcus aureus	8327	FAH060C	FAH072C	YH0672N	3N6142W	YH123W								FAH071W					FAH061W		FAH06W		FAH06C		FAH06W	FAH06W	FAH06W	FAH06W	FAH06W	FAH06W	FAH06W	FAH06W	FAH06W	FAH06W
5	Alf					Staphylococcus aureus	8327	FAH060C	FAH072C	YH0672N	3N6142W	YH123W								FAH071W					FAH061W		FAH06W		FAH06C		FAH06W	FAH06W	FAH06W	FAH06W	FAH06W	FAH06W	FAH06W	FAH06W	FAH06W	FAH06W
6	Alf					Staphylococcus aureus	8327	FAH060C	FAH072C	YH0672N	3N6142W	YH123W								FAH071W					FAH061W		FAH06W		FAH06C		FAH06W	FAH06W	FAH06W	FAH06W	FAH06W	FAH06W	FAH06W	FAH06W	FAH06W	FAH06W
7	Alf					Staphylococcus aureus	8327	FAH060C	FAH072C	YH0672N	3N6142W	YH123W								FAH071W					FAH061W		FAH06W		FAH06C		FAH06W	FAH06W	FAH06W	FAH06W	FAH06W	FAH06W	FAH06W	FAH06W	FAH06W	FAH06W
8	Alf					Staphylococcus aureus	8327	FAH060C	FAH072C	YH0672N	3N6142W	YH123W								FAH071W					FAH061W		FAH06W		FAH06C		FAH06W	FAH06W	FAH06W	FAH06W	FAH06W	FAH06W	FAH06W	FAH06W	FAH06W	FAH06W
9	Alf					Staphylococcus aureus	8327	FAH060C	FAH072C	YH0672N	3N6142W	YH123W								FAH071W					FAH061W		FAH06W		FAH06C		FAH06W	FAH06W	FAH06W	FAH06W	FAH06W	FAH06W	FAH06W	FAH06W	FAH06W	FAH06W
10	Alf					Staphylococcus aureus	8327	FAH060C	FAH072C	YH0672N	3N6142W	YH123W								FAH071W					FAH061W		FAH06W		FAH06C		FAH06W	FAH06W	FAH06W	FAH06W	FAH06W	FAH06W	FAH06W	FAH06W	FAH06W	FAH06W
11	Alf					Staphylococcus aureus	8327	FAH060C	FAH072C	YH0672N	3N6142W	YH123W								FAH071W					FAH061W		FAH06W		FAH06C		FAH06W	FAH06W	FAH06W	FAH06W	FAH06W	FAH06W	FAH06W	FAH06W	FAH06W	FAH06W
12	Alf					Staphylococcus aureus	8327	FAH060C	FAH072C	YH0672N	3N6142W	YH123W								FAH071W					FAH061W		FAH06W		FAH06C		FAH06W	FAH06W	FAH06W	FAH06W	FAH06W	FAH06W	FAH06W	FAH06W	FAH06W	FAH06W
13	Alf					Staphylococcus aureus	8327	FAH060C	FAH072C	YH0672N	3N6142W	YH123W								FAH071W					FAH061W		FAH06W		FAH06C		FAH06W	FAH06W	FAH06W	FAH06W	FAH06W	FAH06W	FAH06W	FAH06W	FAH06W	FAH06W
14	Alf					Staphylococcus aureus	8327	FAH060C	FAH072C	YH0672N	3N6142W	YH123W								FAH071W					FAH061W		FAH06W		FAH06C		FAH06W	FAH06W	FAH06W	FAH06W	FAH06W	FAH06W	FAH06W	FAH06W	FAH06W	FAH06W
15	Alf					Staphylococcus aureus	8327	FAH060C	FAH072C	YH0672N	3N6142W	YH123W								FAH071W					FAH061W		FAH06W		FAH06C		FAH06W	FAH06W	FAH06W	FAH06W	FAH06W	FAH06W	FAH06W	FAH06W	FAH06W	FAH06W
16	Alf					Staphylococcus aureus	8327	FAH060C	FAH072C	YH0672N	3N6142W	YH123W								FAH071W					FAH061W		FAH06W		FAH06C		FAH06W	FAH06W	FAH06W	FAH06W	FAH06W	FAH06W	FAH06W	FAH06W	FAH06W	FAH06W
17	Alf					Staphylococcus aureus	8327	FAH060C	FAH072C	YH0672N	3N6142W	YH123W								FAH071W					FAH061W		FAH06W		FAH06C		FAH06W	FAH06W	FAH06W	FAH06W	FAH06W	FAH06W	FAH06W	FAH06W	FAH06W	FAH06W
18	Alf					Staphylococcus aureus	8327	FAH060C	FAH072C	YH0672N	3N6142W	YH123W								FAH071W					FAH061W		FAH06W		FAH06C		FAH06W	FAH06W	FAH06W	FAH06W	FAH06W	FAH06W	FAH06W	FAH06W	FAH06W	FAH06W
19	Alf					Staphylococcus aureus	8327	FAH060C	FAH072C	YH0672N	3N6142W	YH123W								FAH071W					FAH061W		FAH06W		FAH06C		FAH06W	FAH06W	FAH06W	FAH06W	FAH06W	FAH06W	FAH06W	FAH06W	FAH06W	FAH06W
20	Alf					Staphylococcus aureus	8327	FAH060C	FAH072C	YH0672N	3N6142W	YH123W								FAH071W					FAH061W		FAH06W		FAH06C		FAH06W	FAH06W	FAH06W	FAH06W	FAH06W	FAH06W	FAH06W	FAH06W	FAH06W	FAH06W
21	Alf					Staphylococcus aureus	8327	FAH060C	FAH072C	YH0672N	3N6142W	YH123W								FAH071W					FAH061W		FAH06W		FAH06C		FAH06W	FAH06W	FAH06W	FAH06W	FAH06W	FAH06W	FAH06W	FAH06W	FAH06W	FAH06W
22	Alf					Staphylococcus aureus	8327	FAH060C	FAH072C	YH0672N	3N6142W	YH123W								FAH071W					FAH061W		FAH06W		FAH06C		FAH06W	FAH06W	FAH06W	FAH06W	FAH06W	FAH06W	FAH06W	FAH06W	FAH06W	FAH06W
23	Alf					Staphylococcus aureus	8327	FAH060C	FAH072C	YH0672N	3N6142W	YH123W								FAH071W					FAH061W		FAH06W		FAH06C		FAH06W	FAH06W	FAH06W	FAH06W	FAH06W	FAH06W	FAH06W	FAH06W	FAH06W	FAH06W
24	Alf					Staphylococcus aureus	8327	FAH060C	FAH072C	YH0672N	3N6142W	YH123W								FAH071W					FAH061W		FAH06W		FAH06C		FAH06W	FAH06W	FAH06W	FAH06W	FAH06W	FAH06W	FAH06W	FAH06W	FAH06W	FAH06W
25	Alf					Staphylococcus aureus	8327	FAH060C	FAH072C	YH0672N	3N6142W	YH123W								FAH071W					FAH061W		FAH06W		FAH06C		FAH06W	FAH06W	FAH06W	FAH06W	FAH06W	FAH06W	FAH06W	FAH06W	FAH06W	FAH06W

Estudio de los factores de splicing y decaimiento del ARNm sin sentido (NMD) en Mycosarcoma maydis

[illegible]

