



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

CENTRO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS MICROBIOLÓGICAS

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA

Construcción de las proteínas recombinantes para los homólogos de los factores de NMD UPF1 y UPF2 de *Ustilago maydis*

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
LICENCIADO EN QUÍMICO FARMACOBIOLOGO

PRESENTA

XADENI BURGOS GAMEZ

ASESORES

DIRECTOR DE TESIS

D. C. Rebeca D. Martínez Contreras

ASESOR DE TESIS

M. C. Nancy Martínez Montiel

ASESOR INTERNO

MSP. Claudy Lorena Villagrán Padilla



PUEBLA, PUE.

DICIEMBRE 2014

Cuanto más se eleva un hombre, más pequeño les parece a los que
no saben volar.

Friedrich Nietzsche

AGRADECIMIENTOS

Familiares

A mis padres por siempre darme todo el apoyo que necesitaba. Estoy consciente de que no soy como ustedes quisieran, pero a pesar de eso he alcanzado la primera meta que ustedes quieren para nosotros. Sin ustedes no lo habría logrado.

A mis hermanos Itzayana y Luis Ángel, porque aunque vivan molestándome, sé que siempre estarán conmigo y que sin ustedes yo no sería quien soy.

Amigos

A Mony y Naye, para mi ustedes más que amigas son hermanas, gracias por todo el apoyo y consejos que siempre me dieron. Han estado conmigo en las buenas y en las malas, saben que las quiero mucho.

A Zuly por ser una excelente amiga, gracias por hacer tantas cosas por mí, algunas de las cuales no siempre fueron las correctas. Siempre creíste en mí y eso no lo olvidare. Agradeceré al destino que nos haya hecho querernos sin pensarlo.

A Oliva por ser una gran amiga y consejera, no olvides que te apoyo y a donde te vayas te visitare.

A Enrique, porque además de ser un amigo, siempre estuviste dispuesto a escuchar todos mis dramas escolares y compartirme los tuyos. Me regañas cuando es necesario, me animas cuando lo necesito y eso no lo olvidaré.

A Clau y Luz por compartirme su alegría que siempre hizo que los momentos juntas se convirtieran en excelentes momentos. Gracias por su tiempo y consejos.

A Lili por ser mi amiga y estar conmigo, tengo excelentes recuerdos del primer año que compartiste con nosotros.

A Carlos y Cyntia por ser buenos amigos y excelentes compañeros de equipo en muchas ocasiones.

A Héctor, porque al final decidimos hablarnos, gracias por tus consejos y el apoyo que me das aunque sea a tu manera.

A Omar, la mitad de mi vida has estado conmigo, escuchándome, aconsejándome y regañándome cuando fue necesario, amigos como tú no se encuentran tan fácilmente.

A Chava por ser de esos amigos que no tienes que tener siempre cerca, porque has comprobado que cuando te necesito siempre estás conmigo.

A Héctor Oswaldo, porque siempre has creído en mí, me apoyaste desde los inicios de esta etapa. Gracias por ser mi amigo, escucharme y aconsejarme.

A Sonia por compartir conmigo horas de laboratorio y Raúl por ayudarme cuando te lo pedía, aunque dentro de ti no quisieras y lo tuvieras prohibido. Las maldades entre nosotros hicieron muy ameno los días en laboratorio.

A Aldo, Fego, Joel, Angy, Paty y Armando por ser mis amigos y aunque ahora no estemos tan cerca como antes, ustedes siempre influenciaron en mí de la mejor manera posible.

Académicos

A la Doctora Rebeca D. Martínez Contreras por haberme dado la oportunidad de realizar este trabajo en su laboratorio.

A Nancy por haberme asesorado y apoyado durante todo el tiempo que me tomo la realización de este trabajo.

A la Doctora Nora Hilda Rosas Murrieta por darme la oportunidad de trabajar en su laboratorio. Gracias por todas sus enseñanzas, confianza, dedicación, tiempo y críticas, procuraré siempre tenerlo en cuenta.

Al Doctor Julio Manuel Hernández Pérez, a ti debo agradecerte primero la oportunidad que me das de tener un amigo como tú, sé que siempre me darás los consejos adecuados. Gracias por dedicar parte de tu tiempo en hacerme ver que las matemáticas y la fisicoquímica son cosas fáciles, contigo así parece. Finalmente, gracias por aceptar darme la oportunidad de trabajar contigo y creer en mí, descubrí que tal vez en el fondo llevé un químico teórico.

Al Químico José Ángel, por enseñarme que cuando se quiere algo se puede lograr, que un poco de exigencia en la vida no es malo. Gracias por compartirme su conocimiento, alegría y curiosidad. Sin olvidar agradecer los traumas generados durante sus horas de clase, hasta de esas situaciones nos hacías aprender.

A la profesora Marta Lobo, en usted siempre encontré una motivación y apoyo.

A la MSP Claudy, por aceptar ser mi asesora interna y apoyarme en los trámites necesarios.

A los profesores: Alejandro Cesar Ruiz Tagle, Patricia Guadalupe Suarez Albores y María de la Cruz Meneses Sánchez por formar mi comité revisor y mostrar disposición de ayudarme.

ÍNDICE

Contenido

1. RESUMEN.....	1
2. MARCO TEÓRICO.....	2
2.1 Expresión genética.....	2
2.2 Degradación del ARN mensajero sin sentido (Nonsense mediated mRNA decay)	6
2.3 Mecanismo de NMD en mamíferos	7
2.4 Mecanismo de NMD en levaduras	9
2.5 Factores de NMD: proteínas UPF	11
2.6 Importancia clínica de NMD	13
2.7 <i>Ustilago maydis</i> como modelo biológico de estudio	14
3. MARCO DE REFERENCIA	16
4. PLANTEAMIENTO DE PROBLEMA	20
5. JUSTIFICACIÓN.....	21
6. OBJETIVOS	22
6.1 Objetivo general.....	22
6.2 Objetivos específicos	22
7. MATERIALES Y MÉTODOS	23
7.1 Microorganismo de estudio	23
7.2 Medios de cultivo	23
7.3 Técnicas generales de biología molecular.....	24
7.3.1 Extracción de ADN genómico (Kit Wizard Genomic DNA Purification)	24
7.3.2 Extracción de ADN plásmidico mediante Lisis Alcalina	24
7.3.3 Amplificación de fragmentos de ADN mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	25
7.3.4 Restricción de ADN	25
7.3.5 Reparación de fragmentos de ADN.....	25
7.3.6 Ligación de moléculas de ADN	26
7.3.7 Purificación de ADN	26
7.3.8 Electroforesis de ácidos nucleicos.....	26
7.3.9 Clonación en pPROEX HT	27

7.4	Técnicas de transferencia genética.....	27
7.4.1	Preparación de células quimiocompetentes de <i>E. coli</i> DH5α.....	27
7.4.2	Transformación	27
7.5	Técnicas de proteínas recombinantes	28
7.5.1	Inducción de proteínas recombinantes	28
7.5.2	Electroforesis de proteínas	28
8.	DIAGRAMA DE TRABAJO	30
9.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	31
9.1	Amplificación por PCR de los marcos de lectura abiertos para los homólogos de UPF1 y UPF2 en la cepa FB1 de <i>Ustilago maydis</i>	31
9.2	Clonación de los fragmentos de PCR amplificados para los genes homólogos de UPF1 y UPF2 de <i>U. maydis</i> en el vector de expresión pPROEX HTb	34
9.2.1	Clonación del fragmento de PCR amplificado para el homólogo de UPF1CH... ..	35
9.2.2	Clonación del fragmento de PCR amplificado para el homólogo de UPF2.....	36
9.3	Sobreexpresión de las proteínas recombinantes homólogas a UPF1 y UPF2 de <i>U. maydis</i> en <i>E. coli</i> DH5α	38
9.3.1	Sobreexpresión de la proteína recombinante homóloga a UPF1.....	38
9.3.2	Sobreexpresión de la proteína recombinante homóloga a UPF2.....	39
10.	CONCLUSIONES.....	41
11.	PERSPECTIVAS	42
12.	BIBLIOGRAFÍA	43

ABREVIATURAS

ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
ARN Pol	ARN polimerasa
ATP	Adenosín trifosfato
BP	Branch point (Sitio de empalme)
Cap	Metilación del extremo 5´
CBC	Complejo de unión al <i>cap</i>
CBP	Proteínas de unión al <i>cap</i>
CPI	Complejo de pre-iniciación
EJC	Complejo de unión exón-exón
eRFs	Factores de liberación
GTP	Guanosín trifosfato
NMD	Degradación del ARNm sin sentido
Pabp1	Proteína de unión a la cola de poli A
Py	Segmento de polipirimidinas
Pre-ARNm	ARN mensajero prematuro
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PTC	Codón de término prematuro
SnRNPs	Partículas ribonucleicas nucleares pequeñas
SS-3	Sitio de splicing 3´
SS-5	Sitio de splicing 5´
TC	Codón de término
UPF	Proteínas up – frameshift
3´UTR	Región 3´ no traducida

1. RESUMEN

El ARNm sirve de molde para la síntesis de proteínas, por tanto es razonable pensar que la célula cuente con mecanismos de control de calidad del ARNm, uno de estos, el mecanismo de NMD (nonsense mediated mRNA decay) reconoce el ARNm que tienen codones de terminación prematuros para el proceso de traducción, evitando de esta manera la síntesis de proteínas truncas. En mamíferos existen al menos tres características principales que dirigen un ARNm a degradación por NMD: la presencia del *cap* unido a CBP20 y CBP80 en el extremo 5', la proteína de unión a la cola de poli A (PABPC1) en el extremo 3' y el EJC; estas características están asociadas a los ARN mensajeros recién sintetizados y procesados, por lo que NMD en mamíferos probablemente se produce como resultado del reconocimiento de codones de terminación prematuros durante una primera "pionera" ronda de traducción. El mecanismo de NMD está presente en todas las eucariotas estudiadas hasta la fecha, el núcleo del NMD está compuesto por tres proteínas Up-frameshift: Upf1, Upf2 y Upf3.

Después de la publicación del genoma del basidiomiceto *Ustilago maydis* y de la comparación de su proteoma con el de humano, se hizo notorio que estos organismos tienen en común un mayor número de proteínas, que al comparar al humano con el modelo fúngico más utilizado *Saccharomyces cerevisiae*. Este hecho nos hace pensar que las proteínas involucradas en el mecanismo de NMD en humanos podrían ser las mismas que las involucradas en *Ustilago maydis*. Por análisis bioinformático se han encontrado genes putativos homólogos para las proteínas del núcleo del mecanismo de NMD. En este trabajo se obtendrán las proteínas recombinantes homólogas a Upf1CH y Upf2 de *Ustilago maydis*, las cuales serán de utilidad para realizar estudios de su función y participación en el mecanismo de NMD en este hongo para ver si podría ser propuesto como modelo biológico de estudio.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Expresión genética

La expresión genética es el proceso por medio del cual todos los organismos procariotas y eucariotas transforman la información codificada por el ácido desoxirribonucleico (ADN) en las proteínas necesarias para su desarrollo y funcionamiento. El dogma central de la biología molecular que se muestra en figura 1, describe el proceso de la expresión genética (Crick, 1958; Brenner y cols, 1961).

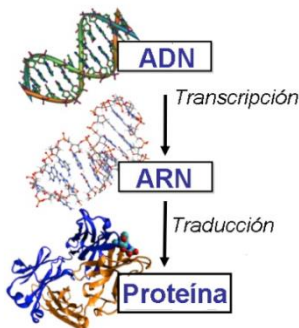


Figura 1. Dogma central de la biología molecular. Es un concepto que describe el flujo de la información genética, el cual inicia con la molécula del ADN la cual servirá de molde para obtener el ARNm por el proceso de transcripción, el cual será finalmente traducido para generar una proteína.

En todos los organismos el contenido de ADN de todas sus células es idéntico; esto quiere decir que contienen toda la información necesaria para la síntesis de todas las proteínas, pero no todos los genes se expresan al mismo tiempo ni en todas las células. Inicialmente se pensó, que la complejidad de un organismo estaba relacionada con el número de genes, pero la comparación de los genomas de distintos organismos reveló que el aumento en el número de genes no se correlaciona con la complejidad del organismo analizada en términos morfológicos y comportamentales. Por ejemplo, el gusano *Caenorhabditis elegans* posee cerca de 20.000 genes (Ruvkun y Hobert, 1998) pero carece de muchos de los tipos celulares y tejidos presentes en la mosca *Drosophila melanogaster*, la cual posee menos de 14.000 genes (Adams, 2000). La revelación de que el genoma humano contiene aproximadamente 20.000/25.000 genes, precipitó el desconcierto sobre las bases moleculares de la complejidad de los organismos (Baltimore, 2001; Lander y cols, 2001; Harrison y cols, 2002); quedó claro entonces que la clave para explicar la complejidad de un organismo no era el número total de genes sino más bien cuál era la información contenida en estos, cómo y cuándo se manifestaba o era expresada y cómo era amplificada, es decir la clave para determinar la complejidad de un organismo está en su proceso de expresión genética (Muñoz, 2009); por lo que su regulación constituye un aspecto fundamental en la regulación global del metabolismo y función celular. Debido al

alto coste energético de la síntesis proteica, la regulación de la expresión genética es esencial para que la célula pueda hacer un uso óptimo de la energía disponible. Regular la concentración de una proteína celular implica mantener un equilibrio entre muchos procesos, existen al menos seis puntos potenciales en los que la cantidad de proteína puede ser regulada (Figura 2): síntesis del pre-ARNm, procesamiento postranscripcional o maduración del ARNm, degradación del ARNm, síntesis proteica, modificación postraducciona y degradación proteica (Orphanides y Reinberg, 2002; Reed, 2003); la concentración de una determinada proteína se controla mediante mecanismos reguladores en algunos o en todos estos puntos (Muñoz 2009; Montes, 2012).

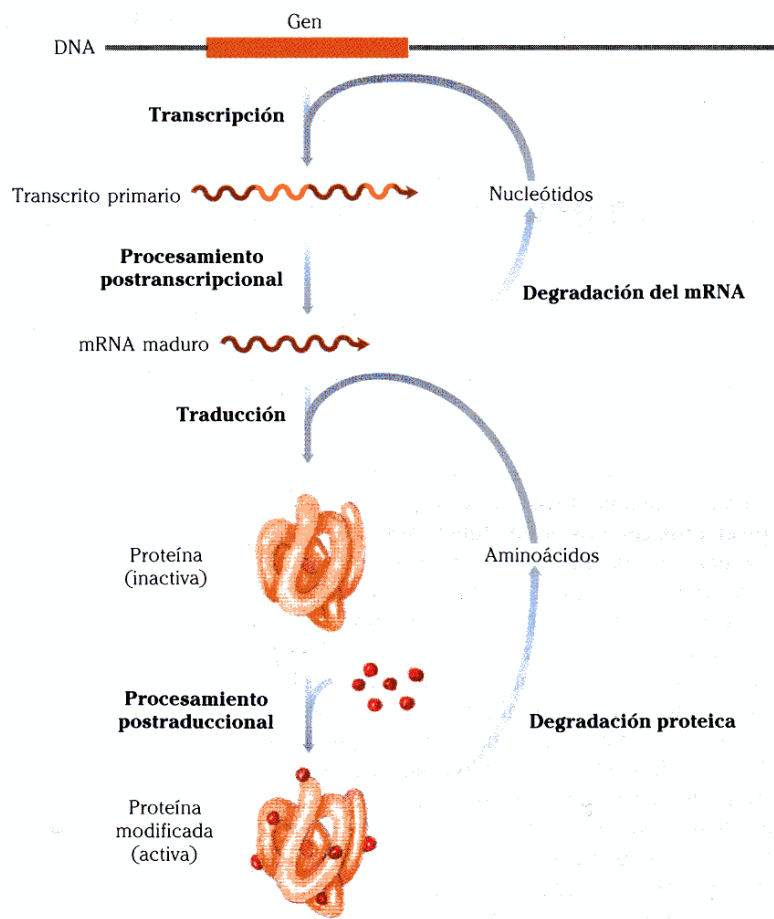


Figura 2. Regulación de la expresión genética. La expresión de genes eucariontes comprende una serie de pasos interconectados que incluye la transcripción, el procesamiento postranscripcional, la degradación del ARNm, la síntesis proteica, la modificación postraducciona y la degradación de proteínas, estos pasos están interconectados para asegurar su eficiencia y fidelidad (Lehninger. Principios de bioquímica).

La síntesis del pre-ARNm se lleva a cabo por el proceso de transcripción, el cual consta de tres etapas: iniciación, elongación y terminación, cada una de ellas está altamente regulada por numerosos factores así como por la secuencia de ADN y la estructura de la cromatina. En células eucariotas, la transcripción comienza con la formación del denominado complejo de pre-iniciación (CPI), que consiste en el reclutamiento de los factores de transcripción generales y la ARN polimerasa dependiente de ADN II (ARN Pol II) a la región promotora basal, posteriormente la ARN Pol II abandona el promotor y comienza la etapa de elongación, la transcripción de los genes continúa mucho más allá de la secuencia codificante necesaria para producir el ARNm, por lo que la finalización de la transcripción ocurre varios nucleótidos después de superar la señal de corte (Proudfoot 1989; Alló, 2010; Jackson y cols, 2010). El proceso de transcripción da origen a un pre-ARNm que debe ser modificado o madurado en tres reacciones que son:

a) Metilación del extremo 5'

Consiste en la adición del grupo trifosfatado 7-metilguanosina, denominado *cap*, que es necesario para la unión al ribosoma al momento de la traducción. La estructura del *cap* es reconocida por un complejo nuclear (CBC) formado por un heterodímero de proteínas de unión al *cap* (CBP): CBP 80 y CBP 20 (Cowli, 2010).

b) Poliadenilación en el extremo 3'

Consiste en la adición de adeninas en todos los ARN mensajeros excepto en los de las histonas. Esta secuencia denominada cola de poli A está formada por una secuencia de aproximadamente 50 a 250 nucleótidos, que evita la degradación del ARNm (Max y cols, 1985).

c) *Splicing*

Es un proceso que consiste de dos reacciones de transesterificación dependientes de ATP por medio de las cuales se eliminan las regiones no codificantes o intrones (escindiéndolos del pre-ARNm) y se unen o empalman las regiones codificantes o exones para generar el ARNm maduro (figura 3) (Jiménez y cols, 2007). El reconocimiento del intrón está regido por los sitios 5' y 3' de *splicing*. El sitio de *splicing* 5' (SS-5') marca la unión exón/intrón, este sitio contiene el dinucleótido GU en el extremo 5' del intrón. El otro extremo del intrón, la región del sitio 3' de *splicing* (SS-3'), que delimita la unión intrón/exón, posee tres secuencias conservadas: el sitio de empalme o branch-point (BP), un segmento de polipirimidinas (Py) y el dinucleótido AG en el extremo 3' del intrón (Zhang, 1998; Reed R, 2000; Hastings M L y Krainer A R, 2001). La eliminación de intrones y ligación de los exones es llevada a cabo por un complejo denominado *spliceosoma*, que consta de cinco partículas ribonucleoproteicas (U1, U2, U4, U6 y U5 snRNPs) y más de 200 proteínas auxiliares, entre las cuales se encuentran

proteínas involucradas no sólo en la reacción de *splicing* sino también en otros pasos de la expresión genética (Kramer, 1996; Wahl y cols, 2009). Numerosos estudios realizados tanto *in vitro* como *in vivo*, avalan la idea de un ensamblaje secuencial y ordenado de los distintos factores que forman el *spliceosoma* (Will y Luhrmann, 2001; Matlin y Moore, 2007; Hoskins y cols, 2011). Al final del proceso de *splicing*, un complejo proteico de aproximadamente 350 kDa, denominado complejo de unión exón-exón (EJC) se deposita de 20 a 24 nucleótidos río arriba de la unión. El EJC está compuesto de un complejo núcleo que incluye la helicasa eIF4AIII, la proteína MLN51 y el heterodímero de MAGOH y Y14, además de otras proteínas accesorias (Tabla 1). El EJC tiene múltiples papeles en varios procesos celulares además del *splicing* del pre-ARNm como: la exportación, traducción y estabilidad del ARNm (Hwang y Ki Kim, 2012).

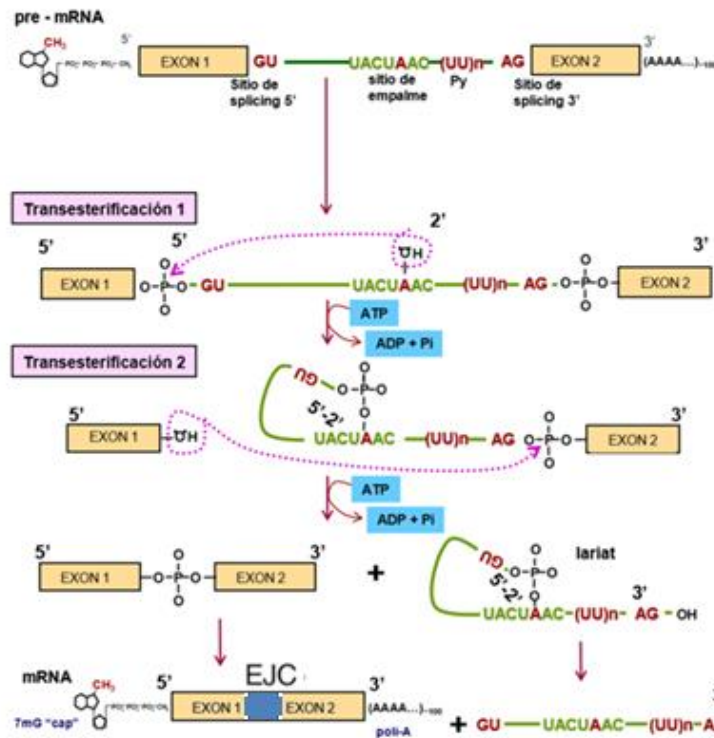


Figura 3. Mecanismo de *splicing*. El *splicing* se lleva a cabo por dos reacciones de transesterificación dependientes de ATP por medio de las cuales se eliminan los intrones y se empalman los exones (Modificada de Jiménez y cols, 2007).

Todos estos procesos ocurren en el núcleo y se influyen unos a otros, permitiendo, entre otras cosas, regular la estabilidad del mensajero, la amplificación de la información genética, la traducción de proteínas y la localización del producto proteico (Orphanides y Reinberg, 2002).

Tabla 1. Proteínas de NMD y EJC.

Proteína	Localización celular	Características y Funciones
UPF1	Principalmente citoplasmática.	Participa en el NMD, la degradación del ARNm de histonas y la degradación del ARNm mediada por Stau-1. Promueve la traducción, es sustrato de fosforilación de SMG-1, es reclutada por eRFs. Tiene dominios ATPasa y helicasa.
UPF2	Citoplasmática, pero hay evidencias de localización nuclear.	Participa en el NMD como una proteína adaptadora que une a las proteínas UPF1 y UPF3. Promueve la traducción.
UPF3	Nuclear	Participa en el NMD interactuando directamente con UPF2. Puede también interactuar directamente con Y14. Promueve la traducción.
SMG-1	Citoplasmática	Participa en el NMD fosforilando a UPF1
SMG-5	Citoplasmática	NMD: interactúa con la fosfatasa 2A y promueve la desfosforilación de UPF1.
SMG-6	Citoplasmática	NMD: interactúa con la fosfatasa 2A y promueve la desfosforilación de UPF1.
SMG-7	Citoplasmática	NMD: interactúa con la fosfatasa 2A y promueve la desfosforilación de UPF1.
Y14	Nuclear y citoplasmática	Participa en el NMD. Promueve la traducción. Es una proteína del núcleo del EJC, forma un heterodímero estable con MAGOH.
MAGOH	Nuclear y citoplasmática	Participa en el NMD. Promueve la traducción. Es una proteína del núcleo del EJC, forma un heterodímero estable con Y14.
eIF4AIII	Nuclear y citoplasmática	Participa en el NMD. Es una helicasa de ARN. Es una proteína del núcleo del EJC, que probablemente ancla las otras proteínas del EJC al ARNm.
MLN51	Nuclear y citoplasmática	Es una proteína del núcleo del EJC que interactúa directamente con eIF4AIII. Se une a ARN <i>in vitro</i>

Modificada de Chang y cols, 2007

Después de completar todo el procesamiento nuclear, el ARNm es exportado del núcleo al citoplasma por medio de un poro nuclear (Schell y cols, 2002, Hwang y Ki Kim, 2012), ya en el citoplasma sirve como molde para la síntesis de proteínas, proceso que se conoce como traducción. Para evitar errores en la síntesis o función del ARNm, las células eucariotas tienen varios mecanismos de control de calidad que preferentemente degradan ARN mensajeros aberrantes o no funcionales para asegurar su función y por lo tanto la calidad de la expresión genética.

2.2 Degradación del ARN mensajero sin sentido (Nonsense mediated mRNA decay)

Debido a que la función primaria del ARNm es como template para la síntesis de proteínas, es razonable pensar que la célula cuente con mecanismos de control de calidad dependientes de la traducción, que degraden ARN mensajeros que codifiquen para proteínas truncas. El mecanismo de NMD (Nonsense mediated mRNA decay), el cual está presente en todas las eucariotas estudiadas hasta la fecha (Culbertson, 1999), es un mecanismo que reduce errores en la expresión

genética debido a que selectivamente reconoce y degrada ARN mensajeros que tienen codones de terminación prematuros (PTC) para el proceso de traducción, como una medida para disminuir los efectos negativos de proteínas truncas que son comúnmente generadas durante la expresión genética (Maquat y cols, 2010; Hwang y Ki Kim, 2012). Los PTC pueden surgir por mutaciones sin sentido, deleciones o inserciones, reordenamiento del ADN, desplazamientos del marco de lectura o errores en el *splicing* del pre-ARNm (Lejeune y Maquat, 2005; Stalder y Mühlemann, 2008).

A pesar de los estudios realizados durante los últimos años, los mecanismos moleculares de NMD no están completamente entendidos; por lo que se han propuesto diferentes modelos para explicar el reconocimiento del PTC por la maquinaria de NMD que han surgido de estudios en diferentes organismos como *Saccharomyces cerevisiae*, *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans*, plantas y mamíferos (Kertesz y cols, 2006; Behm-Ansmant y cols, 2007; Longman y cols, 2007; Ivanov y cols, 2008; Silva y cols, 2008).

En los últimos años se ha comprobado que NMD no sólo degrada transcritos con PTC's, sino que además regula el nivel de muchos ARNm involucrados en una variedad de procesos celulares, como la reparación del ADN, el ciclo celular y el metabolismo; por lo que NMD no sólo es importante para la degradación de transcritos sino igualmente para regular la expresión de genes (Mendell y cols, 2004).

2.3 Mecanismo de NMD en mamíferos

Se sabe que en mamíferos existen tres características determinantes para enviar un ARNm a degradación por NMD: la presencia del *cap* unido a CBP20 y CBP80 en el extremo 5', la proteína de unión a la cola de poli A (PABPC1) en el extremo 3' y el EJC; estas características están asociadas a los ARN mensajeros recién sintetizados y procesados, por lo que NMD en mamíferos probablemente se produce como resultado del reconocimiento de codones de terminación prematuros durante una primera "pionera" ronda de traducción (Sato y cols, 2008; Wang y cols, 2011). El mecanismo de NMD es activado específicamente cuando la proteína UPF1 interactúa con UPF2 que se une a su vez a UPF3. El término del proceso de traducción involucra a un complejo proteico denominado SURF, el cual consiste de UPF1, SMG-1 y los factores de liberación eucarióticos eRF1 y eRF3 (Wang y cols, 2001). Cuando se presenta un proceso de traducción aberrante, existe por lo menos un EJC río abajo del codón de termino prematuro, permitiendo

la interacción de las proteínas UPF, lo que da como resultado la fosforilación de UPF1 y NMD, probablemente por la activación de mecanismos de degradación del ARNm (Maquat y Carmichael, 2001; Kashima y cols, 2006 Hwang y Ki Kim, 2012). Por el contrario, en un proceso de traducción normal se evita el mecanismo de NMD porque todos los EJC están río arriba del codón de término y por tanto son desplazados por el ribosoma antes de que la proteína UPF1 sea reclutada al ARNm (Maquat, 2005; Behm-Ansmant y cols, 2007; Chang y cols, 2007). Después de la *pionera* ronda de traducción, el ARNm es sometido a cambios que incluyen el reemplazamiento de CBP80:CBP20 por eIF4E en el extremo 5' y se procede a la traducción en masa, por lo que en mamíferos la *pionera* ronda de traducción es utilizada para el control de calidad del ARNm (Figura 4) (Ishigaki y cols, 2001; Isken y Maquat, 2007).

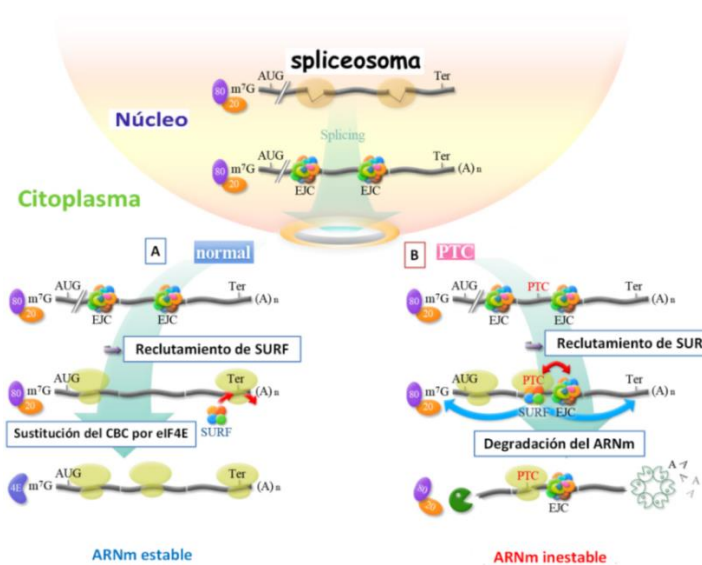


Figura 4. Mecanismo de NMD en mamíferos. Después de que el ARNm ha completado su procesamiento nuclear es exportado al citoplasma con el cap unido en su extremo 5', los EJC y la cola de poli A en el extremo 3', donde servirá de molde para la síntesis de proteínas por el proceso de traducción. A) Durante el proceso de traducción todos los EJC presentes en el ARNm son desplazados por el ribosoma, cuando el ribosoma se posiciona en un codón de término, el complejo SURF es reclutado para generar la liberación de la proteína, el CBP80:CBP20 es reemplazado por eIF4E y se procede a la traducción en masa. B) Cuando un ARNm contiene un PTC, no todos los EJC son desplazados por el ribosoma; cuando el ribosoma reconoce al PTC es reclutado el complejo SURF y hay una interacción entre la proteína UPF1 en SURF y las proteínas UPF2 y UPF3 en EJC que etiquetan al ARNm como aberrante e inducen su degradación (Modificada de Hwang y Ki Kim, 2012).

Los mecanismos de degradación del ARNm por NMD en mamíferos generalmente involucran: 1) La remoción del *cap* por el complejo Dcp1:Dcp2 seguido de la degradación 5' a 3' por las exonucleasas Xrn1 o Rat1 y 2) la deadenilación por Pan2, PARN o Ccr4 seguido de la degradación 3' a 5' por el exosoma (Figura 5). No se ha establecido cuál de las dos vías de degradación contribuye mayoritariamente al NMD (Yamashita y cols, 2005).

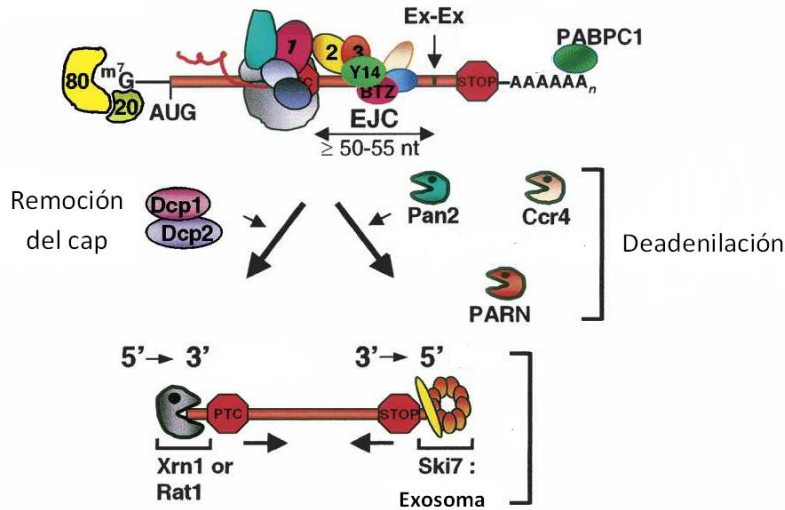


Figura 5. Vías de degradación del ARNm por NMD en mamíferos. Después de que un PTC es reconocido en un ARNm, se induce su degradación por dos vías: la remoción del *cap* seguido de la degradación 5' a 3' y la deadenilación seguido por la degradación 3' a 5'. No se ha establecido cuál de las dos vías de degradación ocurre principalmente (Modificada de Isken y Maquat, 2007).

2.4 Mecanismo de NMD en levaduras

El mecanismo de NMD ha sido estudiado en la levadura *S. cerevisiae*, donde se ha observado que participan las proteínas UPF1, UPF2 y UPF3 (Leeds y cols, 1992). A diferencia del mecanismo propuesto en mamíferos, el NMD en esta levadura puede degradar ARNm recién sintetizados, es decir que tienen en el extremo 5' el complejo Cbc1:Cbc2 (ortólogo al complejo CBP80:CBP20 en mamíferos) y ARNm con eIF4E unido en ese extremo (Gao y cols, 2005). El mecanismo propone que el reconocimiento del PTC se genera por una distancia anormal entre el codón de terminó y la proteína de unión a la cola de poli A (Pab1), que ha sido denominada 3'UTR faux (Amrani y cols, 2004), que origina una terminación de la traducción ineficiente que permite el reclutamiento no sólo de los factores de liberación eucarióticos eRF1 y eRF3, sino también de los

factores UPF de NMD por un mecanismo que no ha sido completamente determinado. Por el contrario, cuando la traducción ocurre eficientemente existe una interacción entre Pab1 y eRF3 que estimula la actividad de eRF1 para liberar la proteína recién sintetizada y el ARNm no es etiquetado para su degradación (Figura 6) (Maquat, 2004; Conti e Izaurralde, 2005).

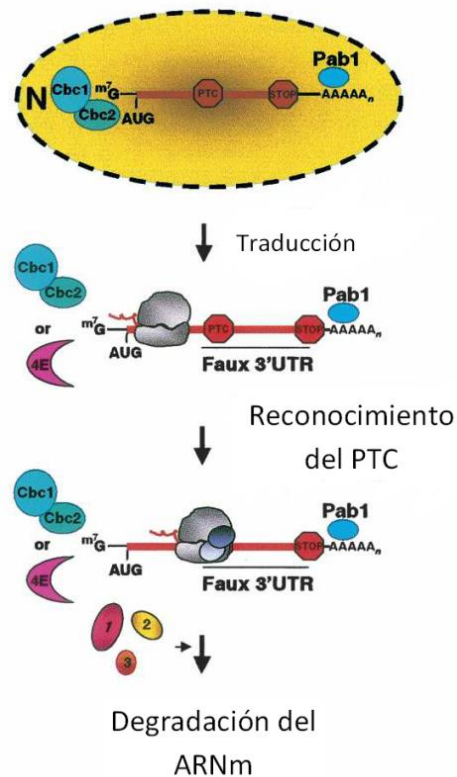


Figura 6. Mecanismo de NMD en *Saccharomyces cerevisiae*. El NMD en esta levadura degrada transcritos que tienen en su extremo 5' el complejo Cbc1:Cbc2 o eIF4E; el PTC es reconocido por la presencia de 3'UTR faux que resulta en una terminación ineficiente del proceso de traducción y la degradación del ARNm (Modificada de Isken y Maquat, 2007).

El mecanismo de degradación principal del ARNm por NMD en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* involucra la remoción del *cap* por el complejo Dcp1:Dcp2 seguido de la degradación 5' a 3' por la exonucleasa Xrn1 (Muhlrad y Parker 1994; He y Jacobson 2001; Cao y Parker 2003; He y cols, 2003). En menor contribución, se lleva a cabo la deadenilación por Pan 2 o Ccr4 seguida de la degradación 3' a 5' por el exosoma (Figura 7) (Cao y Parker 2003; Mitchell y Tollervey, 2003).

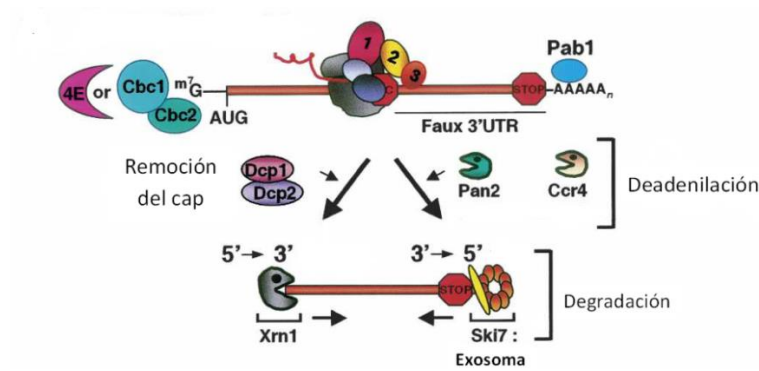


Figura 7. Vías de degradación del ARNm por NMD en *S. cerevisiae*. El NMD degrada ARNm principalmente por la remoción del cap mediada por el complejo Dcp1:Dcp2 y la degradación 5' a 3' por la exonucleasa Xrn1. En menor contribución se lleva a cabo la deadenilación y degradación 3' a 5' por el exosoma (Modificada de Isken y Maquat, 2007).

2.5 Factores de NMD: proteínas UPF

El centro de la maquinaria de NMD comprende tres factores en trans llamados proteínas UPF (up – frameshift). Las proteínas UPF1, UPF2 y UPF3 fueron inicialmente identificadas en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* y posteriormente en eucariotas superiores (Leeds y cols, 1992; Cui y cols, 1995).

La proteína UPF1 es el factor de NMD más conservado entre los organismos estudiados y por tanto la más conocida por su papel central en NMD. Es un complejo fosfoproteico que contiene múltiples dominios (Figura 8), los más relevantes para NMD son: un dominio con actividad helicasa 5' - 3' dependiente de ATP, un dominio con actividad ATPasa dependiente de ARN, un dominio de unión a ARN y un dominio CH (Weng y cols, 1996; Bhattacharya y cols, 2000). Los extremos N y C terminal de la proteína tienen varios residuos de serina que son de importancia central en NMD porque están sujetos a un ciclo de fosforilación y desfosforilación por proteínas SMG (Yamashita y cols, 2001; Ohnishi y cols, 2003). La proteína SMG-1 es una quinasa que fosforila residuos de serina y treonina (Yamashita y cols, 2001), promueve el estado fosforilado de UPF1 (Wilkinson, 2003); en contraste, las proteínas SMG-5, SMG-6 y SMG-7 promueven la desfosforilación de UPF1 por medio del reclutamiento de la fosfatasa 2A (Anders y cols, 2003). El descubrimiento de que NMD requiere a las proteínas SMG para fosforilar y desfosforilar a UPF1, sugiere que este ciclo dirige al NMD en mamíferos y *Caenorhabditis elegans* (Wilkinson, 2003). La proteína UPF1 se localiza en el citoplasma y es reclutada al ARNm en la última etapa de la traducción, interactúa con los factores de liberación eucarióticos eRF1 y eRF3,

formando parte del complejo SURF (Wang y cols, 2001; Chang y cols, 2007; Ivanov y cols, 2008; Gleghorn y Maquat, 2011).

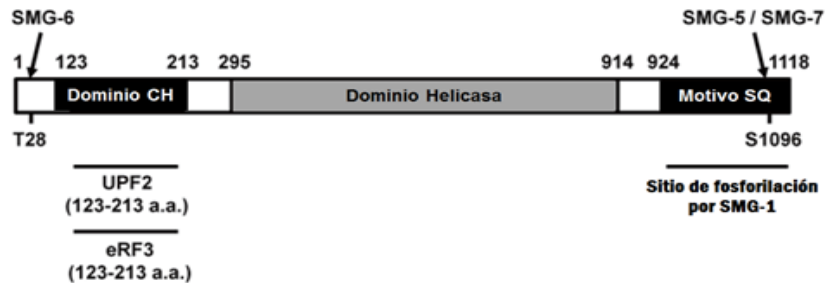


Figura 8. Estructura de la proteína UPF1. El diagrama muestra los dominios identificados en la proteína UPF1: el dominio rico en cisteína/histidina (CH) presente en el extremo N-terminal, el dominio helicasa en gris y el motivo rico en serina/glutamina (SQ), presente en el extremo C-terminal. Sobre el esquema, los números en la parte superior indican el número de aminoácido que delimita cada dominio y se indican dos sitios de fosforilación en la parte inferior. También se muestran los sitios de interacción con otros factores de NMD.

La proteína UPF2 es una molécula adaptadora, tiene distintos sitios de unión a UPF1 y UPF3 (Lykke-Andersen y cols, 2000; Serin y cols, 2001). El dominio de unión a UPF1 está presente en ambos extremos, N y C terminal y se ha demostrado que ambos dominios son necesarios para NMD. El dominio de unión a UPF3 (Figura 9) tiene una secuencia idéntica al motivo de interacción proteína-proteína MIF4G inicialmente descubierto en el factor de inicio de la traducción eIF4G (Kadlec y cols, 2004). Esta proteína se localiza principalmente en el citoplasma, sin embargo, al formar parte del EJC es probable que sea reclutada al ARNm durante el proceso de *splicing* en el núcleo (Mendell y cols, 2000).



Figura 9. Dominios MIF4-G de la proteína UPF2. La proteína UPF2 presenta tres dominios MIF4-G, siendo el tercero el más importante por ser el sitio de unión de UPF3 (Clerici y cols, 2013).

La proteína UPF3, a diferencia de UPF1 y UPF2, no tiene actividad bioquímica; sin embargo probablemente participa en NMD en mamíferos, porque forma parte del EJC. La proteína UPF3 es la menos conservada de las tres proteínas UPF. El genoma humano tiene dos diferentes genes que codifican para la proteína UPF3. La proteína UPF3a (también llamada UPF3) está en el cromosoma 13 y la proteína UPF3b (también llamada UPF3X) está en el cromosoma X. Las proteínas UPF3a y UPF3b tienen algunas características comunes.

- Ambas interactúan directamente con UPF2 a través de un dominio en el extremo N- terminal (Kadlec y cols, 2004).
- Son predominantemente proteínas nucleares que son lanzadas al citoplasma (Lykke-Andersen y cols, 2000).
- Son reclutadas al ARNm durante el *splicing* del pre – ARNm y después son transportadas con éste al citoplasma (Chang y cols, 2007)

2.6 Importancia clínica de NMD

Ha sido estimado, que aproximadamente el 30% de las enfermedades genéticas asociadas a mutaciones son generadas por ARN mensajeros que tienen PTC's y que en muchos de los casos, el mecanismo de NMD influye en las manifestaciones clínicas como en el gen de la β -globina (Forget y cols, 1974), el gen de la Rodopsina (Rosenfeld y cols, 1992) y el gen del receptor de la Tirosin-quinasa (Patton y cols, 2002). El NMD es benéfico si previene la producción de proteínas truncas que tengan un efecto negativo en la célula; por el contrario, es perjudicial si evita la producción de proteínas truncas que tienen una función residual, como por ejemplo, mutaciones que causan fibrosis quística (Holbrook y cols, 2004).

Los datos sugieren que el total de enfermedades genéticas relacionadas con el mecanismo de NMD han sido subestimadas y que se requieren mayores estudios para entender completamente el mecanismo y su importancia clínica. Por esta razón, el establecimiento de nuevos modelos de estudio que permitan extrapolar los datos a humanos son necesarios.

2.7 *Ustilago maydis* como modelo biológico de estudio

Los hongos son un grupo de microorganismos eucariotas que tienen un papel esencial en los ecosistemas, pero al mismo tiempo son microorganismos patógenos de plantas y animales. Algunos hongos se utilizan como modelos para estudiar procesos celulares básicos, el modelo fúngico de estudio más utilizado es *S. cerevisiae*, a pesar de que carece de algunos procesos celulares básicos presentes en células animales. Por otro lado, el reciente acceso al genoma completo de *Ustilago maydis* lo perfila como un importante modelo de estudio para diferentes procesos en células eucariotas (Münsterkötter y Steinberg, 2007).

Ustilago maydis es un hongo basidiomiceto que pertenece a la clase de los Ustilaginales. Este hongo infecta al maíz dulce (*Zea mays*) y su progenitor el Teozinte (*Zea mexicana* subesp. *parviglumis*), ocasionando el carbón común del maíz o huitlacoche (Figura 10), una enfermedad de distribución mundial que ocasiona graves pérdidas económicas (Agrios, 2005). *U. maydis* es un hongo biotrófico dimórfico que en su fase haploide crece en forma de levaduras unicelulares saprófitas que se dividen por gemación. La fase diploide o sexual se inicia con la fusión de dos células haploides sexualmente compatibles (Klosterman, 2007).



Figura 10. Carbón común del maíz. *U. maydis* parasita al maíz generando tumores, en la imagen se muestra una mazorca que fue infectada por el hongo.

U. maydis ha sido considerado como modelo biológico desde mediados de la década de los 40's para el estudio de los aspectos básicos de la patogénesis fúngica en plantas, la especificidad en el apareamiento, la recombinación genética, los genes que participan y controlan el proceso de dimorfismo, entre otros. Este particular interés lo ha convertido en el miembro del orden Ustilaginales más estudiado en la actualidad (Martínez-Espinoza y cols, 2002).

El genoma de *U. maydis* ha sido secuenciado y anotado (Kämper y cols, 2006), revelando que posee un genoma relativamente pequeño (20.5 Mb) que codifica aproximadamente 6,500 genes. Recientemente se volvió evidente que *U. maydis* y los seres humanos tienen en común proteínas y procesos celulares que no se encuentran en el modelo fúngico *S. cerevisiae* (Figura 11).

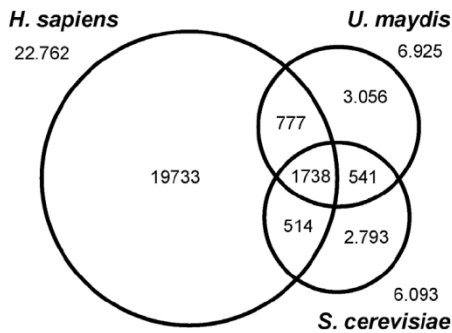


Figura 11. Comparación del proteoma de *S. cerevisiae*, *U. maydis* y *H. Sapiens*. El proteoma de *U. maydis* es más semejante al humano, que el de *S. cerevisiae*, ya que comparte con el humano 777 proteínas.

El hecho de que *U. maydis* tenga en común un mayor número de proteínas con el humano, genera la siguiente pregunta: ¿Estás proteínas tienen la misma función en ambos organismos? Un estudio realizado por Münsterkötter y Steinberg clasificó las proteínas que comparten estos dos organismos de acuerdo a su función, encontrando que ambos presentan las mismas proteínas involucradas en procesos como la degradación de aminoácidos, la oxidación de ácidos grasos, *splicing* y modificación del ARNm y modificación y degradación de proteínas (Tabla 2). Este hecho nos hace pensar que las proteínas involucradas en el mecanismo de NMD en humanos podrían ser las mismas que las involucradas en *U. maydis*, por lo que se estudiará el mecanismo de NMD en este hongo para ver si podría ser utilizado como modelo biológico.

Tabla 2. Clasificación funcional de las proteínas de *U. maydis* y humanos

Función	Número de proteínas
<i>Splicing</i> del ARNm	38
Modificación y degradación de proteínas	29
Señalización mediada por proteínas G	17
Degradación de aminoácidos	14
Oxidación de ácidos grasos	10
Función desconocida	222

Modificada de Münsterkötter y Steinberg. 2007

3. MARCO DE REFERENCIA

Ustilago maydis contiene un gran número de genes que están relacionados cercanamente a genes humanos. Un análisis de todo el genoma demuestra que *U. maydis* está más estrechamente relacionado con los humanos que a la levadura *S. cerevisiae* (Figura 12B) y numerosas proteínas son compartidas sólo por *U. maydis* y *Homo sapiens*. Los recientes avances en nuestra comprensión de los procesos biológicos celulares básicos en *U. maydis* han indicado que este hongo es, en muchos aspectos, más relacionado con los metazoos que a sus primos ascomicetos y por lo tanto, podría ser una herramienta eficaz para la investigación de algunos procesos celulares complejos como el mecanismo de NMD.

Los componentes centrales de la ruta de NMD son tres proteínas *Up-frameshift*: UPF1, UPF2 y UPF3 (también conocidas como SMG-2, SMG-3 y SMG-4 respectivamente), las cuáles fueron inicialmente identificadas en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* y posteriormente en eucariotas superiores (Leeds y cols, 1992; Cui y cols, 1995). UPF1 es el factor de NMD más ampliamente conservado entre los organismos (Stalder, 2008); presenta varios dominios funcionales y estructurales, entre los que se encuentra el dominio CH, que es de importancia por ser el sitio unión de UPF2. El genoma de *U. maydis* ha sido secuenciado, lo que ha permitido realizar la búsqueda y comparación de los genes putativos de las proteínas UPF1, UPF2 y UPF3. La comparación de los productos proteicos de estos genes con sus respectivos homólogos en Humano muestran que tienen un porcentaje de identidad del 65% para UPF1 y 33% para UPF2. A partir de estos datos se ha obtenido el modelo del dominio CH de la proteína UPF1 (Figura 12A) y se han realizado alineamientos de la secuencia aminoácidica de este dominio, encontrando que existe un alto grado de homología entre *U. maydis* y *Homo sapiens* (Figura 12C).

El análisis de la estructura cristalográfica de rayos X reportada para UPF1, reveló que el dominio CH de UPF1 presenta 2 interfaces distintas de interacción con UPF2 (Figura 13) (Kadlec, 2006; Clerici, 2009), siendo UPF2 más que un adaptador entre UPF1 y UPF3, un activador de UPF1, tras la unión de UPF2 al dominio regulador CH, UPF1 sufre un cambio conformacional importante, provocando que el dominio helicasa catalítico se una a ARN menos extensamente y active su helicasa. Por lo tanto, la formación del complejo de vigilancia modifica las propiedades de unión a ARN y la actividad catalítica de UPF1 (Chakrabarti, 2011).

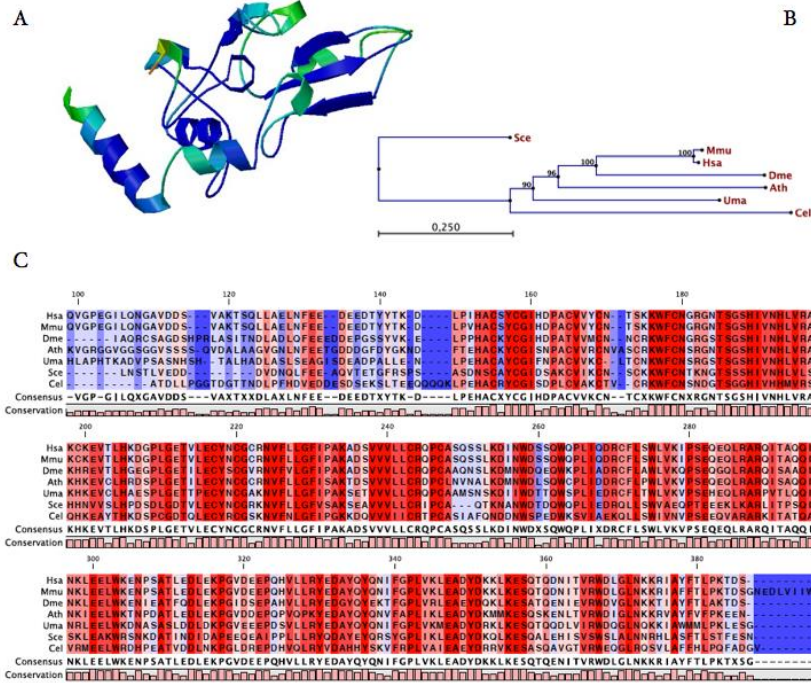


Figura 12. Análisis del dominio CH de UPF1. **A.** Modelo de UPF1CH de *U. maydis*. Muestra la posible conformación secundaria y terciaria del dominio CH de UPF1 obtenido con el programa Swiis Model. **B.** Diagrama que muestra la relación filogenética entre *U. maydis* y *Homo sapiens*. Se observa que *U. maydis* y *Homo sapiens* están más relacionados entre sí que a levadura *S. cerevisiae*, que es el modelo fúngico más utilizado. **C.** Alineamiento de la secuencia aminoácida del dominio CH. En color rojo se representan las regiones que presentar mayor homología y en azul las que presentan menor homología. El dominio CH está tiene un alto grado de conservación entre los organismos.

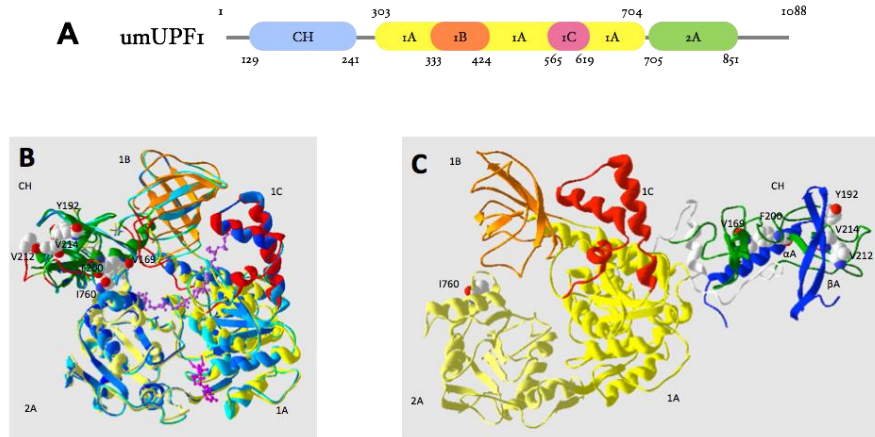


Figura 13. Estructura de la proteína putativa UPF1 de *U. maydis*. **A.** Esquema de la proteína UPF1. Se indican los dominios funcionales y estructurales de la proteína, en color azul está indicado el dominio CH. Los números de la parte inferior indican la posición de los diferentes dominios. **B.** Estructura cerrada de UPF1. **C.** Estructura abierta de UPF1. Después de la unión de UPF2, mostrada en color azul, se induce un cambio conformacional en la proteína.

La proteína UPF2 presenta su sitio de unión a UPF1 en el extremo N-terminal de la proteína. Se ha observado que existen aminoácidos que están altamente conservados en los sitios de unión a otras proteínas UPF (Figura 14 y 15) y que mutaciones en éstos aminoácidos generan cambios en las interacciones de las proteínas.

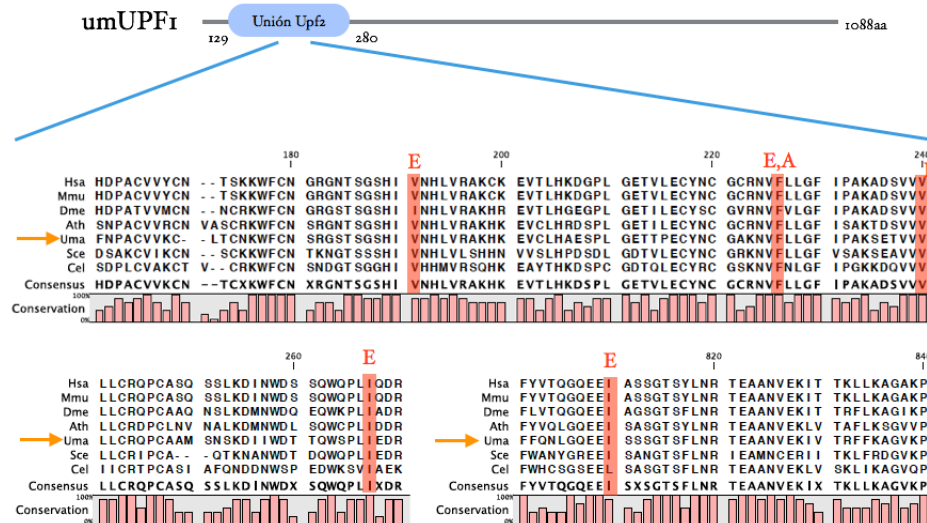


Figura 14. Alineamiento de la secuencia de la proteína UPF1. Se muestra el alineamiento de la secuencia aminoácídica de la proteína UPF1 de varios organismos. Se indican los aminoácidos que están altamente conservados, los cuáles son sitios posibles de mutaciones.

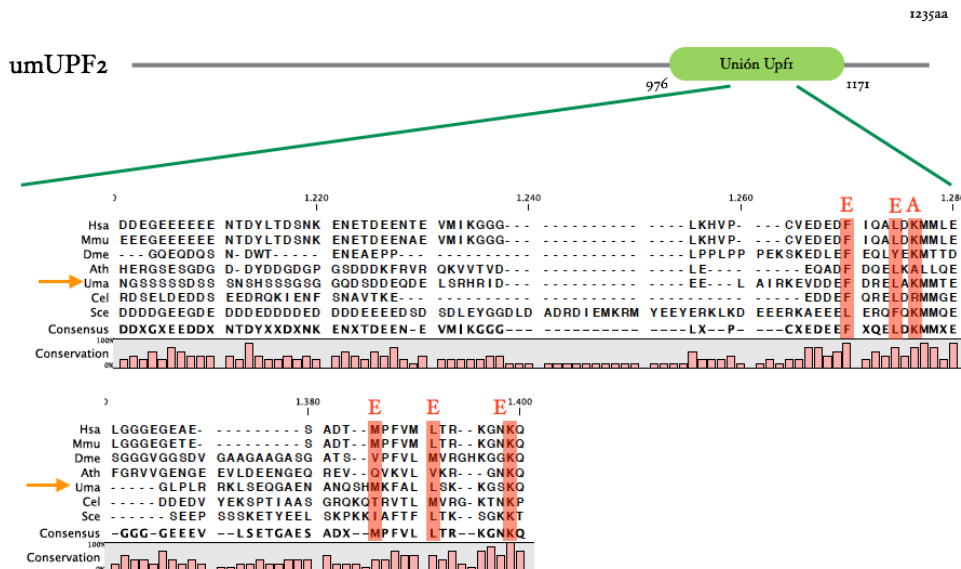


Figura 15. Alineamiento de la secuencia de la proteína UPF2. Se muestra el alineamiento de la secuencia aminoácídica de la proteína UPF2 de varios organismos. Se indican los aminoácidos que están altamente conservados, los cuáles son sitios posibles de mutaciones.

El dominio CH de la proteína UPF1 interacciona con el dominio 2A generando un pocket hidrofóbico, estas interacciones igualmente se ven afectadas por mutaciones en los aminoácidos más conservados (Figura 16).

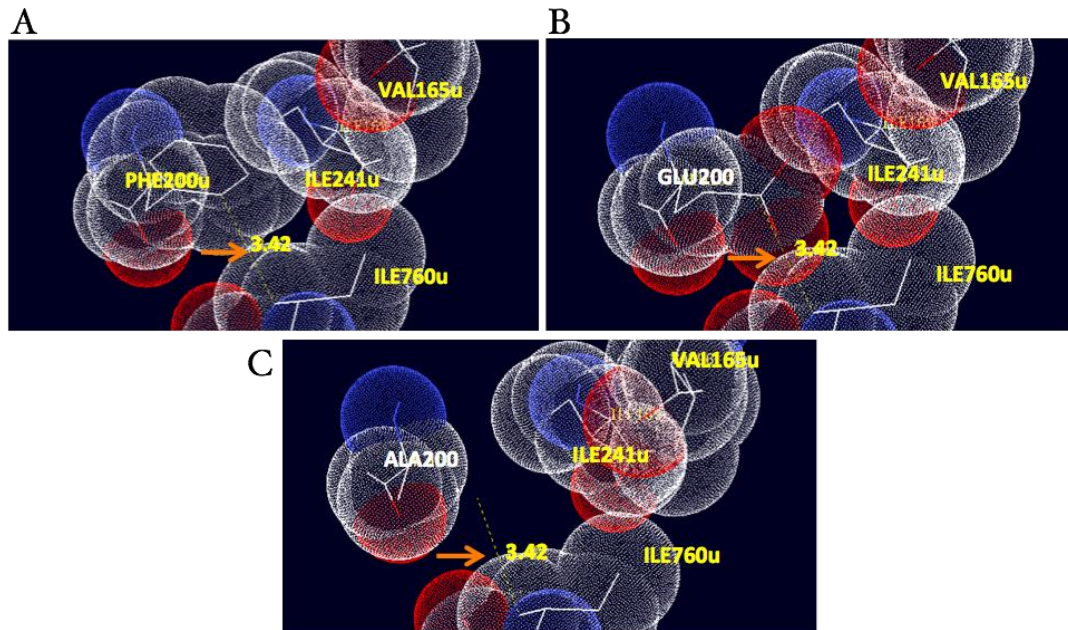


Figura 16. Interacciones en el pocket del dominio CH. **A.** Se muestran las interacciones entre el dominio CH y el dominio 2A, se observa una distancia de 3.42 Å. **B.** Cuando se realiza una mutación de la fenilalanina en la posición 200 por ácido glutámico se observa que hay una separación de las fuerzas electrostáticas que permiten la interacción entre ambas regiones de la proteína. **C.** Cuando se realiza una mutación de la fenilalanina por alanina, es clara la pérdida de la interacción electrostática, lo que genera un cambio conformacional en la proteína.

Las proteínas UPF1 y UPF2 son clave en el mecanismo de NMD, por lo que elucidar su estructura, interacciones y función, es la clave para entender el mecanismo de NMD en el modelo de estudio.

4. PLANTEAMIENTO DE PROBLEMA

La expresión de la información genética es fundamental para llevar a cabo todos los procesos bioquímicos celulares. Los sistemas de vigilancia desarrollados por los organismos contribuyen a la correcta y regulada expresión de esta información; así, se ha identificado que los sistemas de vigilancia del ARNm son importantes para mantener las funciones celulares y tienen un papel regulador crítico en la expresión normal de los genes, siendo el mecanismo de NMD uno de los mecanismos de vigilancia del ARNm más relevante.

NMD es un mecanismo importante en el reconocimiento y degradación del ARNm potencialmente dañado que degrada selectivamente transcritos aberrantes que contienen codones de terminación prematuros (PTC), los cuales tienen el potencial de producir proteínas truncas con efectos dañinos, por lo que constituye un mecanismo de control de calidad importante. Mediante análisis informático realizado en diferentes eucariontes, hasta la fecha se ha determinado que es un proceso conservado, involucrado en la regulación de la expresión de 1-10% de los ARN mensajeros fisiológicos normales; sin embargo, se ha identificado que varios organismos han evolucionado para desarrollar mecanismos diferentes para discriminar ARN mensajeros que tienen PTC de codones de paro naturales y degradar ARNm blancos. En este sentido, la vía de NMD contribuye a la supresión o exacerbación de manifestaciones clínicas de desórdenes genéticos humanos específicos, estos hallazgos se han identificado gracias a estudios realizados en organismos modelo en donde se ha identificado a los efectores del camino NMD y el desarrollo de estos mecanismos (Behm-Asnmant, 2007).

Los componentes centrales de la vía de NMD son tres proteínas up-frameshift: UPF1, UPF2 y UPF3 y se han descrito ortólogos en varios eucariontes. UPF1 es el factor de NMD más ampliamente conservado y elucidar su estructura y función será clave en el entendimiento del mecanismo de NMD.

5. JUSTIFICACIÓN

Las proteínas centrales del proceso de NMD (UPF1, UPF2 y UPF3), son ampliamente estudiadas en la actualidad, al conocerse que pueden funcionar para compensar o evitar errores durante la traducción de proteínas; específicamente, degradando o eliminando proteínas truncas con codones prematuros de terminación que tendrían consecuencias perjudiciales para la célula. Se ha observado que estos errores pueden ocasionar enfermedades en el ser humano tales como ciertos tipos de cáncer o enfermedades neurodegenerativas.

El modelo de estudio a emplear para dicha investigación será el hongo dimórfico *Ustilago maydis*, en el que se ha identificado a las proteínas centrales de NMD. El material biológico generado con este trabajo podrá contribuir al estudio de esta vía en *Ustilago maydis* con las posibles implicaciones y correlaciones para el mismo mecanismo en mamíferos.

6. OBJETIVOS

6.1 Objetivo general

- ❖ Generar las proteínas recombinantes homólogas para UPF1 y UPF2 de la cepa FB1 de *Ustilago maydis*

6.2 Objetivos específicos

- ❖ Amplificar por PCR los marcos de lectura abiertos para los homólogos de UPF1 y UPF2 en la cepa FB1 de *Ustilago maydis*.
- ❖ Clonar los fragmentos de PCR amplificados para los genes homólogos de UPF1 y UPF2 de *U. maydis* en el vector de expresión pPROEX HTb.
- ❖ Sobreexpresar las proteínas recombinantes homólogas a UPF1 y UPF2 de *U. maydis* en *E. coli* DH5a

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Microorganismo de estudio

Tabla 3. Cepas empleadas

Cepa	Descripción	Referencia
<i>Ustilago maydis</i> FB1	Cepa de referencia	Broad Institute
<i>Escherichia coli</i> DH5 α	LacZ Delta M15, endA1, recA1.	Taylor, 1993

Tabla 4. Plásmidos utilizados

Plásmido	Genotipo relevante	Referencia
pPROEX HT	Promotor Tcr, gen <i>LacI</i> , ori C, un gen β -lactamasa.	Addgene

7.2 Medios de cultivo

Se utilizaron diferentes medios de cultivo líquidos y sólidos, cuya composición y preparación se detallan a continuación:

YEPS: es el medio de cultivo utilizado para la propagación de *U. maydis*.

Componente	Cantidad para 1 L
Dextrosa	20 g
Extracto de levadura	10 g
Peptona de caseína	20 g

LB (Luria-Bertani): medio de cultivo utilizado de forma habitual para el crecimiento bacteriano. Se utilizó para el crecimiento de *E. coli*.

Componente	Cantidad para 1 L
Extracto de levadura	5 g
NaCl	10 g
Peptona de caseína	10 g

Para preparar medio sólido se agrega 15 g/L de agar.

Cuando fue necesario, el medio LB fue suplementado con antibiótico. El antibiótico y la concentración empleada fue: Ampicilina (Amp) (sal sódica, Roche), se preparó una solución concentrada a 100 mg/mL en agua bidestilada estéril. La concentración final en el medio de cultivo fue de 100 µg/mL.

7.3 Técnicas generales de biología molecular

7.3.1 Extracción de ADN genómico (Kit Wizard Genomic DNA Purification)

Para la extracción de ADN genómico con el Kit Wizard Genomic DNA Purification, la cepa FB1 de *U. maydis* se cultivó en 5 mL de medio YEPS durante toda la noche a 30 °C en agitación constante. Se centrifugó por 2 min a 13000 rpm decantando el sobrenadante, se resuspendió la pastilla en 293 µL de EDTA 50 mM. Para la lisis celular se añadieron 7.5 µL de lítica 50 mg/mL mezclando suavemente con una punta, se incubó 60 min a 37 °C y posteriormente se adicionó 300 µL de *Nuclei lysis solution*. Para la precipitación de proteínas se añadieron 100 µL de *Protein Precipitation Solution*, se mezcló con vortex e incubó en hielo por 5 min. Tras centrifugar a 13000 rpm durante 3 min se llevó a cabo la precipitación y rehidratación de ADN; para esto, se transfirió el sobrenadante a un microtubo de 1.5 mL nuevo y se añadieron 300 µL de isopropanol frío, se mezcló suavemente y se centrifugó a 13000 rpm durante 2 min, desechando el sobrenadante; luego se añadieron 300 µL de etanol al 70 % frío y se mezcló, en seguida se centrifugó a 13000 rpm por 2 min aspirando el etanol, se secó la pastilla al aire durante 15 min. Finalmente, para la rehidratación se añadió a la pastilla de ADN 50 µL de *Rehydration Solution* incubando a 4°C durante toda la noche.

7.3.2 Extracción de ADN plásmidico mediante Lisis Alcalina

Para el aislamiento de ADN plásmidico se cultivaron las células de *E. coli* DH5α en 5 mL de medio LB + Amp100, incubando durante toda la noche a 37 °C en agitación constante. Se centrifugó el cultivo a 5000 rpm durante 10 min, se desechó el sobrenadante y 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) mezclando con una punta de micropipeta. A continuación se añadió 200 µL de solución II (0.2 N NaOH y 1 % SDS) y se mezcló por inversión. Posteriormente se agregó 200 µL de solución III (Acetato de potasio 3 M) y se mezcló en vortex durante 10 min, se incubó a -20 °C por 10 min. Los lisados se centrifugaron durante 10 min a 13000 rpm. Se recuperó el sobrenadante en un microtubo de 1.5 mL limpio, se adicionó 1 mL de etanol absoluto frío y se incubó a -20 °C por 10 min, se centrifugó nuevamente, se decantó el sobrenadante y a continuación se añadió 1 mL de

etanol al 70% frío para lavar la pastilla. Finalmente, se eliminaron los residuos de etanol, dejando secar en una campana de extracción y se resuspendieron las pastillas en 50 µL de agua PISA con 0.01 % de RNasa.

7.3.3 Amplificación de fragmentos de ADN mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La amplificación de los genes se realizó en un volumen de 25 µL que contenía 1 µL del ADN templado (20 ng/ µL), 2.5 µL de ThermoPol® Reaction Buffer (1X), 0.5 µL de dNTPs (10 mM), 1 µL de cada oligonucleótido (10 mM), 0.5 µL de ADN polimerasa (Taq ADN polimerasa o Vent ADN polimerasa, 5 U) y 19.5 µL de agua PISA. Las reacciones se realizaron en un termociclador *MultiGene OptiMax*. Los programas utilizados para cada gen se indican a continuación:

UPF1

La predesnaturalización fue a 94 °C durante 5 min; la desnaturalización a 94 °C por 30 seg; el alineamiento de los primers al templado fue de 60 °C durante 30 seg y la polimerización fue a 72 °C por 1 min; a partir de la desnaturalización se repitió el programa por 35 ciclos con una etapa final de polimerización a 72 °C por 10 min.

UPF2

La predesnaturalización fue a 94 °C durante 5 min; la desnaturalización a 94 °C por 30 seg; el alineamiento de los primers al templado fue de 62 °C durante 30 seg y la polimerización fue a 72 °C por 4 min; a partir de la desnaturalización se repitió el programa por 35 ciclos con una etapa final de polimerización a 72 °C por 10 min.

7.3.4 Restricción de ADN

Los ensayos con enzimas de restricción permiten cortar al ADN en sitios específicos, las enzimas utilizadas en este trabajo fueron suministradas por la casa comercial Roche o Fermentas y se utilizaron siguiendo las instrucciones del fabricante. Generalmente las reacciones se incubaron a 37 °C durante 2 horas. La reacción se llevó a cabo en un volumen de 15 µL colocando 1.5 µL de buffer, 0.5 µL de enzima (10 u/ µL), 8 µL de agua PISA y 5 µL de la muestra (50 ng/µL). La eficiencia de la restricción se comprobó mediante electroforesis en gel de agarosa.

7.3.5 Reparación de fragmentos de ADN

Para reparar extremos cohesivos en los productos de amplificación con Taq ADN polimerasa se utilizó el fragmento Klenow (Fermentas), el cual corresponde al fragmento largo de la polimerasa I de *E. coli* y se usó en un 2 % en una reacción

final de 20 μL que contenía 2 μL de buffer 10X, 1 μL de dNTPs (10 mM), 0.1 a 4 μg de ADN y el resto de agua PISA; la mezcla se incubó a 37 °C por 1 hora.

7.3.6 Ligación de moléculas de ADN

Para ligar moléculas de ADN se empleó la ligasa del fago T4, la reacción se realizó en un volumen final de 10 μL adicionando lo siguiente: 1 μL de buffer 10X, 1 μL de ligasa del fago T4 (1 U/ μL), de 25 a 50 ng de ADN lineal en una concentración de 3:1 inserto: vector, el resto de agua Pisa. La mezcla se incubó durante toda la noche a temperatura ambiente.

7.3.7 Purificación de ADN

Para purificar muestras de ADN se realizó el siguiente protocolo: el volumen de la muestra debe ser de 100 μL , de no ser así se ajustó con agua PISA. Por cada 100 μL se añadió: 400 μL de Binding Buffer, se mezcló la muestra en vortex por 4 segundos y se centrifugó. Posteriormente, se insertó una columna dentro de un tubo colector y usando una micropipeta se transfirió la muestra a la columna, se centrifugó de 30 – 60 segundos a 8000 xg a una temperatura entre 15 a 25 °C. Se desconectó la columna del tubo colector y se desechó la solución del tubo colector. Después de reconectar la columna al tubo colector y añadir 400 μL de Wash Buffer, se centrifugó de 30 – 60 segundos a 8000 xg. Se desechó la solución del tubo colector. Se volvió a reconectar la columna al tubo colector y se añadió 300 μL de Wash Buffer, se centrifugó de 30 – 60 segundos a 8000 xg. Se desechó la solución del tubo colector. Se reconectó la columna al mismo tubo colector y se centrifugó 1 minuto a máxima velocidad. Se desechó la solución del tubo colector. Finalmente, se conectó la columna a un microtubo de 1.5 mL limpio y se añadió de 10 – 20 μL de Buffer de elución y se centrifugó 1 minuto a 8000 xg. De la muestra obtenida se debe correr una alícuota en una electroforesis en gel de agarosa para determinar la concentración de la muestra.

7.3.8 Electroforesis de ácidos nucleicos

Para las distintas electroforesis de producto de PCR, para verificar la extracción de ADN genómico y plásmidico o para corroborar las restricciones enzimáticas se usaron geles de agarosa al 1 % (p/v) en tampón TAE (40 mM de Tris-acetato pH 8 y 1 mM de EDTA) añadiendo Bromuro de etidio (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Para correr la electroforesis se utilizó el mismo tampón TAE. Las muestras de ADN mezcladas con 2 μL del tampón de carga (0.25 % de azul de bromofenol (p/v), 0.25 % xilencianol (p/v) y 15 % de Tris-Ficoll (p/v) en agua Pisa, pH 8), se depositaron en los pocillos de los geles solidificados y se corrieron a 100 V por 30 minutos. Como patrón de referencia se utilizó el marcador de peso molecular GeneRuler (1 Kb Fermentas). Después de la electroforesis, los geles se visualizaron con un transiluminador de luz ultravioleta (300 nm de longitud de onda).

7.3.9 Clonación en pPROEX HT

El sistema de expresión procariota pProEX HT está diseñado para la expresión de proteínas en *E. coli*, el vector consta de tres series: pPROEX HTa, pPROEX HTb y pPROEX HTc que difieren en su marco de lectura. Para clonar productos de PCR, primero se debe seleccionar el vector apropiado y este debe ser digerido con una enzima de restricción adecuada (sección 5.3.4) para no desplazar el marco de lectura del inserto. En el tubo de reacción se adicionaron los siguientes componentes para un volumen final de 10 μ L: 1 μ L de Buffer T4 DNA ligasa, 1 μ L de enzima T4 DNA ligasa (1 U/ μ L), de 25 a 50 ng de ADN linear en una concentración de 3:1 inserto – vector y el resto de agua PISA. Se mezcló en vortex suavemente y se centrifugó por 3 – 5 segundos. La mezcla de ligación se incubó a temperatura ambiente durante toda la noche. Finalmente se utilizó la mezcla de ligación directamente para transformar.

7.4 Técnicas de transferencia genética

7.4.1 Preparación de células quimiocompetentes de *E. coli* DH5 α

Para obtener células quimiocompetentes se realizó el siguiente protocolo: se tomó una UFC de la cepa DH5 α de *E. coli* de una placa fresca y se utilizó para inocular 5 mL de medio LB sin antibiótico el cual se incubó 16 h a 37 °C. Después, se transfirió dicho inóculo a 200 mL de medio LB sin antibiótico y se incubó el cultivo a 37 °C con agitación vigorosa y se revisó aproximadamente después de dos horas, hasta obtener una DO_{600nm} de aproximadamente 0.5, sino se encontró a la densidad esperada, se debe revisar cada 20 min hasta alcanzarla. Posteriormente, se transfirió las células a tubos de polipropileno previamente enfriados y se colocaron en hielo por 10 min. Todos los pasos siguientes se realizaron en condiciones de esterilidad: se recuperaron las células por centrifugación a 3000 rpm por 10 min 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 min. 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 μ L y se separaron en microtubos de 1.5 mL, se marcaron y enfriaron en hielo durante 10 min, finalmente se almacenaron a -70°C.

7.4.2 Transformación

Se realizó la transformación de células competentes de la cepa DH5 α de *E. coli* bajo el siguiente procedimiento: se tomaron 100 μ L de células competentes y se colocaron en un microtubo de 1,5 mL. Se agregó 10 μ L de la ligación inserto - vector (sección 7.3.9). 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 + Amp100. Las placas se incubaron a 37 °C por 18 horas.

7.5 Técnicas de proteínas recombinantes

7.5.1 Inducción de proteínas recombinantes

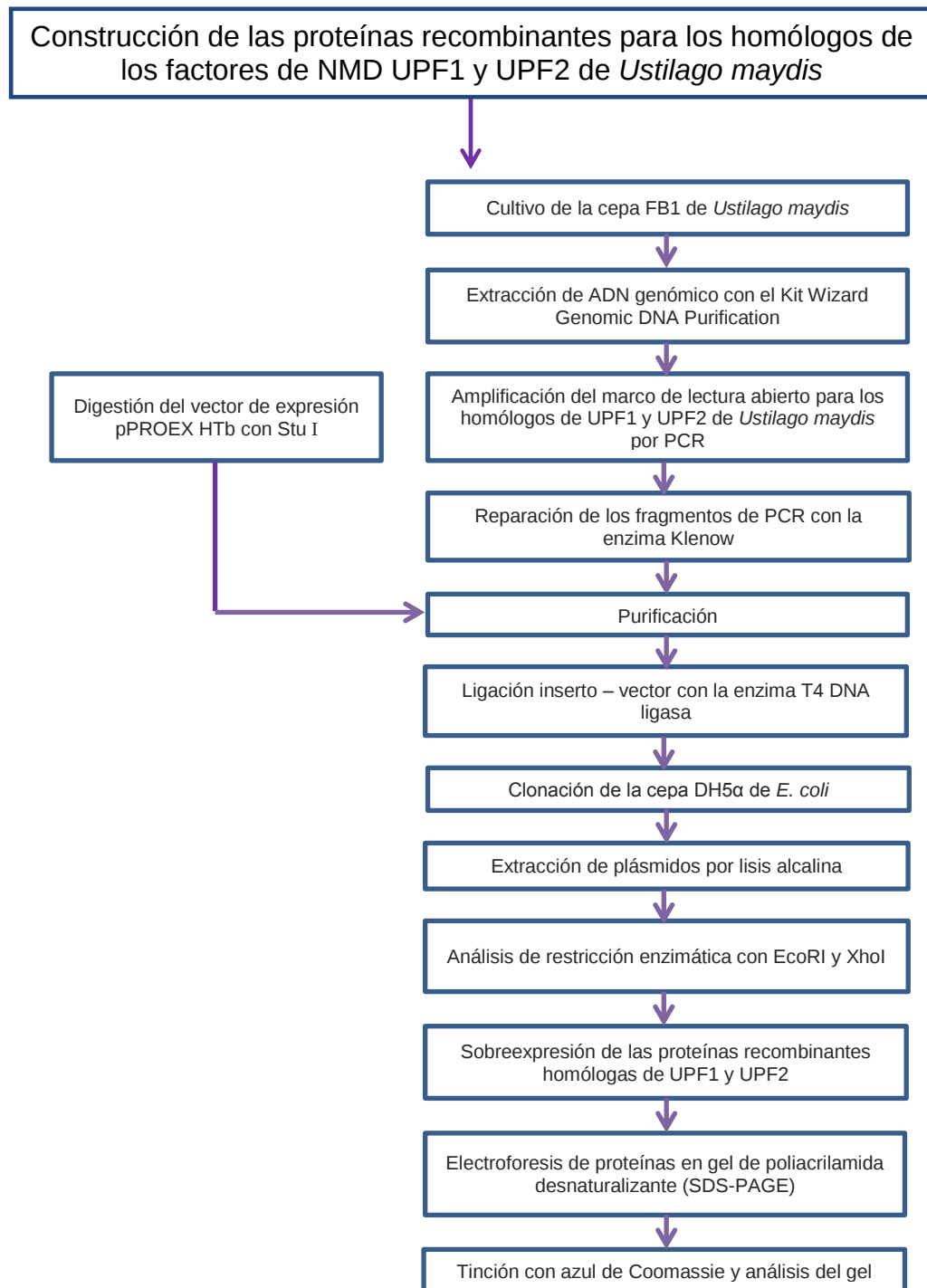
Para la inducción de proteínas recombinantes se realizó el siguiente procedimiento: se inoculó 2 mL de medio LB + Amp100 con una UFC de la cepa transformada y se incubó el cultivo toda la noche a 37 °C con agitación constante. Al día siguiente, se inoculó 10 mL de medio LB + Amp100 con 0.1 mL del cultivo anterior y se incubó a 37°C con agitación. Cuando el cultivo alcanzó una DO_{590nm} entre 0.5 – 1, se removi6 1 mL del cultivo, se colocó en un microtubo de 1.5 mL, se centrifugó por 1 min, se desechó el sobrenadante y se lavó las células con 100 µL de PBS 1X, está muestra fue etiquetada como no inducida. Al cultivo restante, se adicionó IPTG a una concentración final de 0.6 mM, se continuó con la incubación a 37°C y se removi6 1 mL de cultivo a las horas 1, 2, 3 y 5 de inducción, el cual fue colocado en un microtubo de 1.5 mL, se centrifugó por 1 min, se desechó el sobrenadante y se lavó las células con 100 µL de PBS 1X, estas muestras fueron etiquetadas como inducidas. Posteriormente se adicionó a cada muestra 60 µL de buffer Laemli (0.5 M Tris-HCl pH 6.8, 10 % SDS, 1 % Azul de bromofenol, glicerol, 50 µL de β-mercapto etanol a un volumen final de 1 mL), la muestras fueron sonicadas a una amplitud de 3 durante 10 seg, repitiendo esta operación 3 veces con intervalos de 10 seg. Finalmente las muestras se hirvieron a 95 °C por 10 min, para verificar la integridad del extracto proteico se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida.

7.5.2 Electroforesis de proteínas

Para verificar la integridad del extracto proteico e identificar la proteína de interés se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS - PAGE), para mejorar la nitidez de las bandas se utilizan dos geles el Resolving Gel y el Stacking gel, la concentración del gel fue diferente para cada proteína: para UPF1 se preparó un gel de poliacrilamida al 12 % (para un volumen final de 10 mL se debe agregar 3.4 mL Agua DDI, 4.0 mL de Acrilamida 30 %, 2.5 mL Buffer: 1.5 M Tris-HCl pH 8.8 para Resolving gel y 0.5 M Tris-HCl pH 6.8 para Stacking gel, 0.1 mL de SDS 10 %, 100 µL APS y 5 µL TEMED) y para UPF2 se preparó un gel de poliacrilamida al 8 % (para un volumen final de 10 mL se debe agregar 4.7 mL Agua DDI, 2.7 mL

de Acrilamida 30 %, 2.5 mL Buffer: 1.5 M Tris-HCl pH 8.8 para Resolving gel y 0.5 M Tris-HCl pH 6.8 para Stacking gel, 0.1 mL de SDS 10 %, 100 μ L APS y 5 μ L TEMED). Se cargaron 30 μ L de la muestra en los pocillos, como patrón de referencia se utilizó un marcador de proteínas con un rango de 15 – 170 KDa (Page Ruler Fermentas). La electroforesis se corrió en Buffer Tris – Glicina (500 mM Tris, 500 mM Glicina) a 80 mV por un tiempo de 2 – 3 horas. Después de la electroforesis, los geles se colocaron en un recipiente y se tiñeron con Azul de Coomassie (0.1 % Azul brillante de Coomassie, 45 % metanol, 10 % ácido acético) durante 15 min en agitación. Posteriormente se retiró el exceso de colorante y el gel se lavó con agua de la llave. Finalmente el gel se colocó en un volumen de solución para desteñir (10 % metanol, 5 % de ácido acético), dejando en agitación por 18 horas, después de este tiempo el gel se visualizó sobre un fondo blanco.

8. DIAGRAMA DE TRABAJO



9. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

9.1 Amplificación por PCR de los marcos de lectura abiertos para los homólogos de UPF1 y UPF2 en la cepa FB1 de *Ustilago maydis*

Inicialmente se realizó el cultivo de la cepa FB1 de *Ustilago maydis* en medio sólido YEPS (Figura 17A), posteriormente se realizó un cultivo en medio líquido a partir del cual se realizó la extracción de ADN genómico con el Kit Wizard Genomic DNA Purification (sección 7.3.1), se verificó la calidad del ADN extraído en una electroforesis en gel de agarosa teñido con bromuro de etidio y fotografiado bajo luz UV (Figura 17B) (sección 7.3.8), a partir de la cual se determinó la concentración del ADN genómico comparando la banda obtenida con las bandas del marcador, determinando una concentración de 20 ng/μL, que es la concentración requerida para la amplificación por PCR.

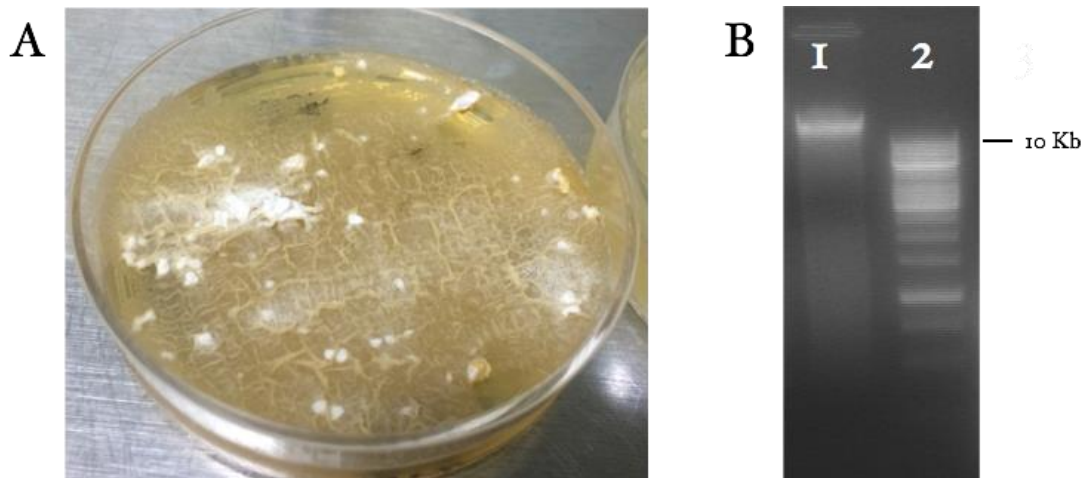


Figura 17. A. Placa de la cepa FB1 de *Ustilago maydis*. La cepa FB1 presenta un crecimiento algodonoso, de color blanco sin originar pigmentación al medio. **B. ADN genómico de la cepa FB1 de *U. maydis*.** Gel de agarosa. Carril 1. ADN genómico. Carril 2. Marcador de peso molecular (Gene Ruler 1 Kb Fermentas).

El siguiente paso fue la amplificación por PCR de las regiones de interés. La amplificación del dominio CH de UPF1 se llevó a cabo a partir de ADN genómico de la cepa FB1 de *Ustilago maydis*. Para el ensayo de PCR se utilizaron los oligonucleótidos UPF1 Fwd y UPF1 Rev que presentan la siguiente secuencia: UPF1 Fwd ATGTCCGAGCTCTACCAGTT y UPF1 Rev TTGACGATCTCGACAAGCCG, con la técnica descrita en la sección 7.3.3. El producto fue visualizado en un gel de agarosa teñido con bromuro de etidio y fotografiado bajo luz UV como se describe en el apartado 7.3.8 (Figura 18).

El dominio CH de UPF1 es el sitio de unión de la proteína UPF2 (Kervestin y Jacobson, 2006), este dominio se localiza en el extremo N-terminal de la proteína (Imamachi y cols, 2012). En *Ustilago maydis* el dominio CH tiene un tamaño de 112 aminoácidos y está ubicado en la posición 129-241 aa; los oligonucleótidos utilizados para amplificar este dominio son específicos para *U. maydis* y amplificaron los primeros 873 pb del gen iniciando en el ATG, región que abarca el dominio CH.



Figura 18. Homólogo de UPF1 en *U. maydis*. **A.** Esquema del homólogo de UPF1 en *U. maydis*. Se muestra el dominio estructural CH, que es el sitio de unión a UPF2. El tamaño total del gen es de 3267 pb que codifican para 1088 aa. Las flechas en negro indican la ubicación de los oligonucleótidos usados, que delimitan el dominio CH de la proteína y los números en la parte inferior indican la posición del dominio CH. **B.** Gel de agarosa. Carril 1. Marcador de peso molecular (Gene Ruler 1 Kb Fermentas). Carril 2. Producto de PCR de UPF1 que presenta un tamaño de 873 pb.

La amplificación del marco de lectura abierto completo (ORF) de UPF2 se llevó a cabo a partir de ADN genómico de la cepa FB1 de *Ustilago maydis*. Para el ensayo de PCR se utilizaron los oligonucleótidos UPF2 Fwd y UPF2 Rev que presentan la siguiente secuencia: UPF2 Fwd ATGGCAGCTTCCGCTAGCTG y UPF2 Rev TTAGAAGCCGGGACTGTTCC, con la técnica descrita en la sección 7.3.3. El producto fue visualizado en un gel de agarosa teñido con bromuro de etidio y fotografiado bajo luz UV como se describe en el apartado 7.3.8 (Figura 19).

Los oligos que se utilizaron son específicos para *Ustilago maydis* y amplificaron el marco de lectura abierto completo para el homólogo de UPF2 que presenta un tamaño de 3708 pb iniciando en el ATG. La proteína UPF2 funciona como una molécula adaptadora en el mecanismo de NMD, ya que presenta sitios de unión a UPF1 y UPF3 (Mendel y cols, 2000), por esta razón fue necesario la amplificación del marco de lectura abierto completo para estudios posteriores.

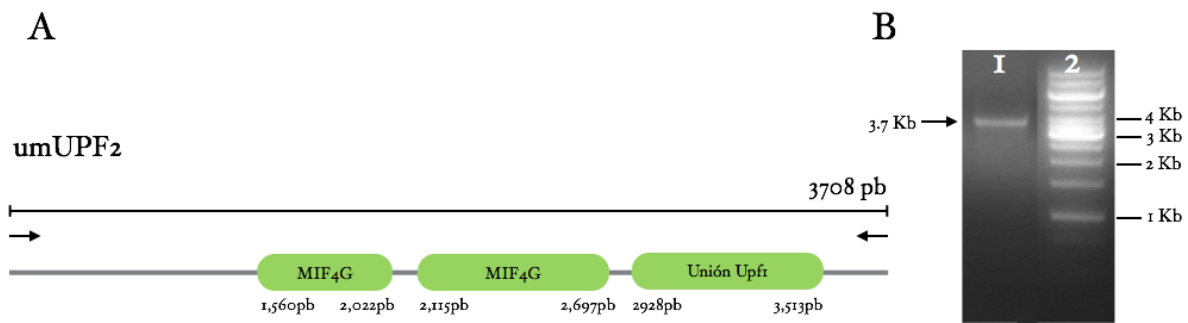


Figura 19. Homólogo de UPF2 en *U. maydis*. **A.** Esquema del homólogo de UPF2 en *U. maydis*. Se muestran los tres dominios MIF4G, el tercero de estos dominios es el sitio de unión de la proteína UPF3. El tamaño total del gen es de 3708 pb. Las flechas negras indican la posición de los oligonucleótidos utilizados. Los números en la parte inferior indican la posición de los dominios MIF4G. **B.** Gel de agarosa. Carril 1. Producto de PCR de UPF2 que presenta un tamaño de 3708 pb. Carril 2. Marcador de peso molecular (Gene Ruler 1 KB Fermentas).

Ambos productos de amplificación se obtuvieron con la enzima Taq DNA polimerasa (BioLabs) la cual genera extremos cohesivos que tuvieron que ser reparados (sección 7.3.5) antes de realizar la clonación, para no modificar el marco de lectura debido a que ambos productos de PCR inician con el ATG. Después de ser reparados, los productos de PCR fueron purificados (sección 7.3.7).

Después de obtener los productos de PCR, fue necesario buscar un sistema de expresión para generar las proteínas recombinantes. En general, un sistema de expresión consiste en un conjunto de elementos genéticos configurados de manera óptima para el control de la transcripción y traducción de las secuencias a expresar. El sistema de expresión en *Escherichia coli* está constituido por dos componentes: una bacteria huésped y un vector de expresión que posee los elementos génicos necesarios para realizar los procesos de transcripción y traducción en dicha bacteria. *E. coli* es ampliamente utilizada como sistema de expresión debido a su fácil manipulación, el elevado número de mutantes y vectores de expresión disponibles, el amplio conocimiento de la fisiología de la célula y el conocimiento del efecto de la sobreexpresión de proteínas sobre la bacteria. La cepa de *E. coli* que se utilizó fue DH5α que presenta el genotipo indicado en la tabla 3 y el vector de expresión fue pPROEX HT cuyas características se indican en la tabla 4.

9.2 Clonación de los fragmentos de PCR amplificados para los genes homólogos de UPF1 y UPF2 de *U. maydis* en el vector de expresión pPROEX HTb

El sistema de expresión procariota pPROEX HT está diseñado para la expresión de proteínas recombinantes en *E. coli*. La proteína expresada presenta una secuencia de 6 histidinas en el extremo N-terminal que favorece su purificación. El sistema de expresión pPROEX HT consta de tres series: pPROEX HTa, pPROEX HTb y pPROEX HTc; los tres vectores presentan un tamaño de 4779 pb, un origen de replicación específico para *E. coli*, un promotor Trc, un gen de resistencia a Ampicilina y un gen *lacI* y únicamente difieren en su marco de lectura. Para la selección de un vector, primero se seleccionó una enzima de restricción que estuviera disponible en el laboratorio, que presentará su sitio de reconocimiento en el sitio múltiple de restricción del vector y que generará extremos romos, los cuáles son requeridos para no desplazar el marco de lectura debido a que los fragmentos de PCR fueron reparados para obtener de igual manera extremos romos; este tipo de extremos vuelve no específica la ligación inserto-vector, por lo que se tuvieron dos posibilidades: obtener una versión correcta de la clona, en la que el inserto se encuentra en la dirección 5' a 3' y obtener una versión incorrecta, en la que el inserto se encuentra en la dirección 3' a 5'.

La enzima que se utilizó fue *StuI*, cuya secuencia de reconocimiento es AGGCCT y el vector que se eligió fue pPROEX HTb, el cual presenta en su sitio múltiple de restricción el sitio de reconocimiento de la enzima elegida, la cual generará extremos romos después del corte (Figura 20).

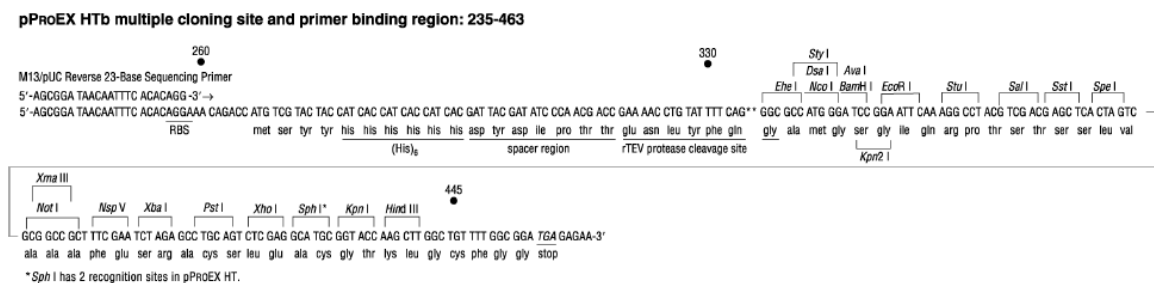


Figura 20. Sitio múltiple de restricción del vector pPROEX HTb. Esquema que representa el sitio múltiple de restricción del vector, donde se observa el sitio de reconocimiento de la enzima *StuI* en la posición 362 indicado con una línea azul, el corte de esta enzima generará extremos romos.

Después de ser linearizado, el vector pPROEX HTb fue purificado como se indica en la sección 7.3.7.

9.2.1 Clonación del fragmento de PCR amplificado para el homólogo de UPF1CH

El producto de amplificación obtenido del dominio CH de UPF1 tiene un tamaño de 873 pb y el vector un tamaño de 4779 pb, por lo que el tamaño de la construcción pPROb-UPF1CH es de 5652 pb, el inserto se localiza en la posición 363-1235 (Figura 21A). Después de la transformación de la cepa DH5 α de *E. coli* (sección 7.4.2), las clonas se cultivaron en medio LB + AMP, debido a que el vector genera resistencia a este antibiótico porque presenta un gen de resistencia a ampicilina. De las colonias obtenidas se eligieron 20 de cada placa, a partir de las cuales se realizó la extracción de plásmidos (Sección 7.3.2) y análisis de restricción enzimática para verificar las clonas seleccionadas.

Con el programa NEBCutter (<http://tools.neb.com/NEBcutter2/>) se analizó la secuencia de la construcción pPROb-UPF1CH para elegir una enzima de restricción disponible en el laboratorio, que generará un bandeo diferente para la versión correcta e incorrecta. La enzima que se utilizó fue EcoRI que reconoce la siguiente secuencia palindrómica: GAATTC y presenta los sitios de reconocimiento mostrados en la figura 21A, las bandas generadas después de la restricción enzimática para la versión correcta son: 685 pb y 4967 pb y para la versión incorrecta: 208 pb y 5444 pb.

Después de realizar el análisis de restricción enzimática a las 20 clonas seleccionadas, solo una de ellas presentó el bandeo correspondiente, la clona del carril 2 de la figura 21B presenta bandas con un tamaño de 685 pb y 4967 pb que corresponde a la versión correcta de la clona, es decir el producto de amplificación fue insertado en el vector en la dirección correcta (5' a 3'). Las otras muestras presentaron únicamente el vector linearizado, es decir no hubo una ligación inserto-vector y al momento de transformar únicamente se incorporó el vector.

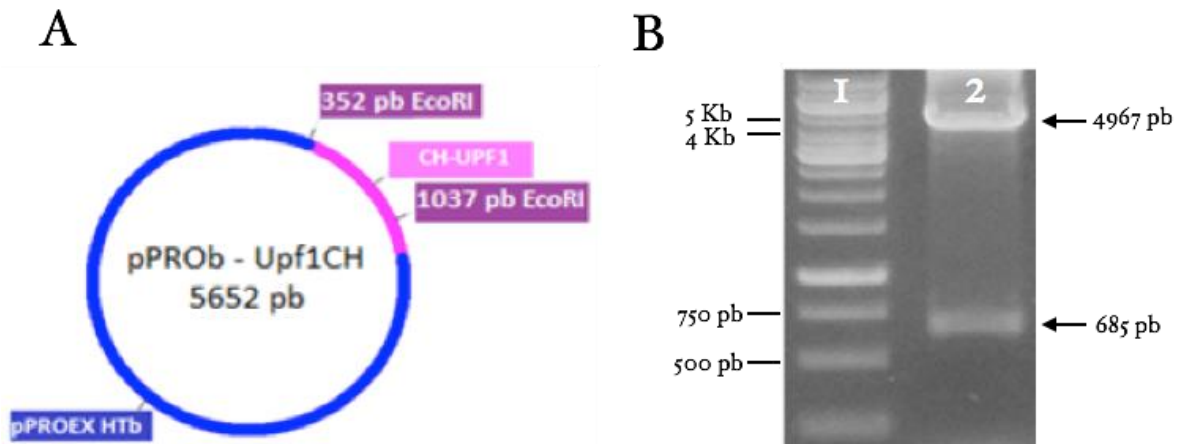


Figura 21. Construcción y restricción enzimática del plásmido pPROb – UPF1CH. **A.** Representación de la construcción pPROb-UPF1CH, en color rosa se muestra el producto de amplificación de UPF1CH y en color azul el vector. Además se indican los sitios de reconocimiento de la enzima EcoRI en las etiquetas de color morado. **B.** Gel de agarosa que muestra la restricción enzimática de las clonas de pPROb-UPF1CH con EcoRI. Carril 1. Marcador de peso molecular (Gene Ruler 1 KB Fermentas). Carril 2. Plásmido de pPROb-UPF1CH cortado con la enzima EcoRI la cual presenta las bandas que corresponden a la versión correcta de la clona.

9.2.2 Clonación del fragmento de PCR amplificado para el homólogo de UPF2

El producto de amplificación obtenido del homólogo de UPF2 tiene un tamaño de 3708 pb y el vector un tamaño de 4779 pb, por lo que el tamaño de la construcción pPROb-UPF2 es de 8487 pb, el inserto se localiza en la posición 363-4070 pb (Figura 22A). Al igual que para UPF1CH, después de la transformación de la cepa DH5 α de *E. coli* (sección 7.4.2), las clonas se cultivaron en medio LB + AMP y de las colonias obtenidas se eligieron 20 de cada placa, a partir de las cuales se realizó la extracción de plásmidos (Sección 7.3.2) y análisis de restricción enzimática para verificar las clonas seleccionadas.

Con el programa NEBCutter se analizó la secuencia de la construcción pPROb-UPF2 para elegir una enzima de restricción disponible en el laboratorio, que generará un bandeo diferente para la versión correcta e incorrecta. La enzima seleccionada fue XhoI, que reconoce la siguiente secuencia palindrómica: CTCGAG y sus sitios de reconocimiento se muestran en la figura 22B. Las bandas generadas después de la restricción enzimática con la enzima XhoI para la

versión correcta son: 1416 pb, 1881 pb y 5190 pb y para la versión incorrecta: 521 pb, 1416 pb y 6550 pb.

Después de realizar el análisis de restricción enzimática a las 20 clonas seleccionadas, sólo se obtuvo una clona correcta. La clona del carril 2, presenta bandas con un tamaño de 1416 pb, 1881 pb y 5190 pb con la enzima XhoI (Figura 22B), que corresponden a la versión correcta de la clona, es decir el producto de amplificación fue insertado en el vector en la dirección correcta (5' a 3').

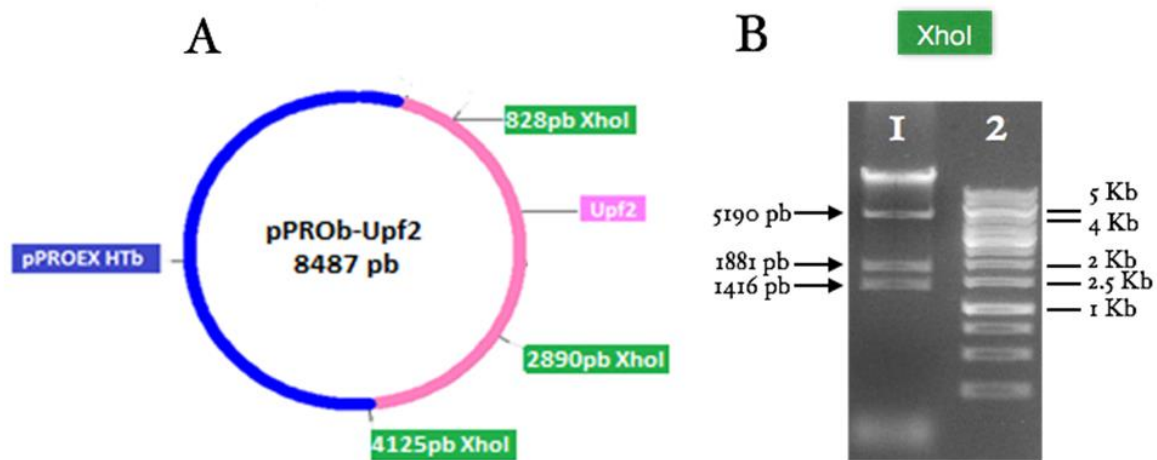


Figura 22. Construcción y restricción enzimática del plásmido pPROb-UPF2. **A.** Representación de la construcción pPROb-UPF2, en color rosa se muestra el producto de amplificación de UPF2 y en color azul el vector. Además se muestran los sitios de reconocimiento de la enzima XhoI en color verde. **B.** Gel de agarosa que muestra la restricción enzimática de las clonas pPROb-UPF2 con XhoI. Carril 1. Plásmido pPROb-UPF2 cortado con la enzima XhoI que presenta las bandas correspondientes a la versión correcta de la clona. Carril 2. Marcador de peso molecular (Gene Ruler 1 KB Fermentas).

Las dos clonas que se seleccionaron después del análisis de restricción enzimática, fueron mandadas a secuenciar lo que corroboró que correspondían a la versión correcta de la clona, es decir presentan la dirección correcta 5' a 3'. Se trabajó con estas muestras para realizar la sobreexpresión de las proteínas recombinantes, sin embargo no se garantizaba su obtención porque la expresión de proteínas recombinantes depende de varios factores genéticos y fisiológicos.

9.3 Sobreexpresión de las proteínas recombinantes homólogas a UPF1 y UPF2 de *U. maydis* en *E. coli* DH5α

El sistema de expresión utilizado: *E. coli* DH5α y el vector pPROEX HTb, permitirán la obtención de las proteínas recombinantes; como se mencionó anteriormente, el vector pPROEX HTb presenta un gen *LacI* el cual favorece la traducción en presencia de lactosa, en el laboratorio se utilizó el isopropil tiogalactósido (IPTG) que es un análogo no hidrolizable de la lactosa para mantener la concentración constante durante todo el experimento.

La inducción de proteínas recombinantes se realizó a partir de cultivos de las clonas seleccionadas; cuando los cultivos alcanzaron una DO_{590nm} entre 0.5 -1, se tomó una muestra que correspondió a la muestra sin inducir, posteriormente se agregó IPTG a una concentración final de 0.6 mM y se tomaron muestras correspondientes a 1, 2, 3 y 5 horas de inducción. Después de tener todas las muestras, sin inducir y con diferentes tiempos de inducción, se realizó un lavado con PBS 1X para eliminar completamente el medio de cultivo y las muestras fueron sonicadas y calentadas para lisar las células y liberar el extracto proteico, este paso fue necesario porque una de las desventajas de *E. coli* como sistema de expresión es el hecho de que no secreta las proteínas recombinantes al medio. Después de esto, se realizó un análisis del extracto proteico obtenido en geles de poliacrilamida teñidos con Azul de Coomassie.

9.3.1 Sobreexpresión de la proteína recombinante homóloga a UPF1

La proteína recombinante de UPF1CH presenta un tamaño aproximado de 37 KDa el cual fue calculado con el programa ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/>). El inicio de la traducción será en el codón AUG del vector; el producto de amplificación de UPF1CH no presentará un codón de término, por tanto el proceso de traducción finalizará en el codón de término del vector.

En la figura 23 se presentará una imagen del gel de poliacrilamida teñido con Azul de Coomassie que se utilizó para correr el extracto proteico de la clona pPROb-UPF1CH. El carril 2 presenta la muestra sin inducir y por esa razón la banda correspondiente a la proteína recombinante no se observa, en el carril 3 se presenta la muestra inducida por 5 horas, en la que se observa una banda con un tamaño correspondiente al esperado para la proteína recombinante.

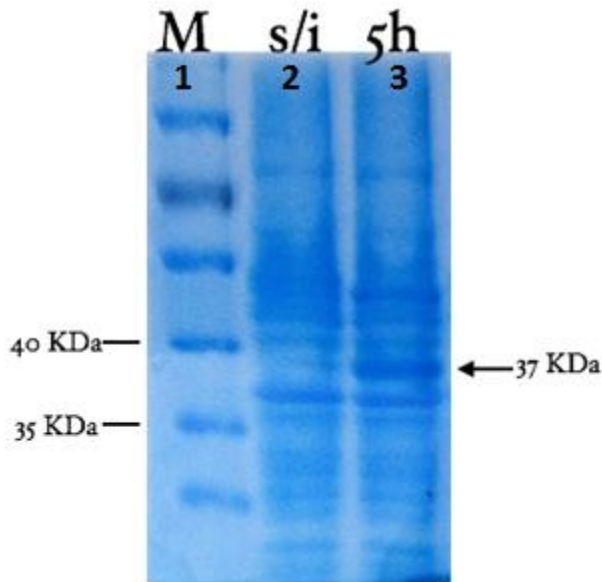


Figura 23. Inducción de la proteína recombinante UPF1CH. Gel de poliacrilamida teñido con Azul de Coomassie que muestra el corrimiento de los extractos proteicos de pPROb-UPF1CH. Carril 1. Marcador de peso molecular (Page Ruler Fermentas). Carril 2. pPROb-UPF1CH sin inducir. Carril 3. pPROb-UPF1CH con un tiempo de inducción de 5 horas.

9.3.2 Sobreexpresión de la proteína recombinante homóloga a UPF2

La proteína recombinante homóloga a UPF2 presenta un tamaño aproximado de 141 KDa el cual fue calculado con el programa ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/>). El inicio de la traducción será en el codón AUG del vector; el producto de amplificación de UPF2 corresponde al marco de lectura abierto completo, por tanto el proceso de traducción finalizará en el codón de término del inserto.

En la figura 24 se presentó una imagen del gel de poliacrilamida que se utilizó para correr el extracto proteico de la clona pPROb-UPF2. El carril 2 presentó la muestra sin inducir y por esa razón la banda correspondiente a la proteína recombinante no se observa, en el carril 3 se presentó la muestra inducida por 5 horas, en la que se observa una banda con un tamaño correspondiente al esperado para la proteína recombinante. En contraste con la proteína recombinante UPF1CH, la proteína recombinante UPF2 presenta una menor concentración, debido a que el experimento se realizó en las mismas condiciones que para la proteína recombinante UPF1CH, es probable que la baja concentración de la proteína recombinante UPF2 se deba a las características del mensajero, incluyendo el tamaño de UPF2 que es mucho mayor al de UPF1CH. Se debe destacar que la concentración de las proteínas no fue determinada por métodos cuantitativos, solo cualitativos y por esa razón no se indican valores que indiquen la concentración de las proteínas recombinantes.

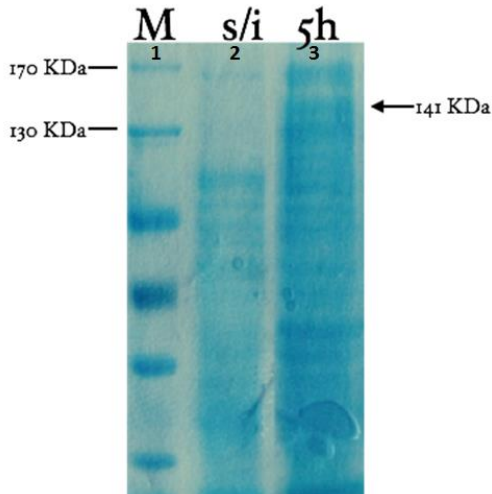


Figura 24. Inducción de la proteína recombinante UPF2. Gel de poliacrilamida teñido con Azul de Coomassie que muestra el corrimiento de los extractos proteicos de pPROb-UPF2. Carril 1. Marcador de peso molecular (Page Ruler Fermentas). Carril 2. pPROb-UPF2 sin inducir. Carril 3. pPROb-UPF2 con un tiempo de inducción de 5 horas.

Las bandas correspondientes a las proteínas recombinantes homólogas a UPF1CH y UPF2 se observan en los geles de poliacrilamida, en ambos casos la banda correspondiente a la proteína no se observa en la muestra sin inducir. La obtención de las proteínas recombinantes se corroboró por comparación de su tamaño con un marcador de peso molecular, por tanto se deben realizar otros experimentos para verificar las proteínas recombinantes obtenidas. Además de la banda correspondiente a la proteína se observan otras que corresponden a diversas proteínas celulares de *E. coli*.

La obtención de las proteínas recombinantes homólogas a UPF1CH y UPF2 es solo una parte de los experimentos que se necesitan realizar para determinar y analizar el mecanismo de NMD en el modelo de estudio. Las proteínas recombinantes obtenidas nos permitirán realizar estudios para analizar su secuencia y homología con otros homólogos determinados, analizar su función y finalmente el hecho de si son participes en el mecanismo de NMD en *U. maydis* y otros mecanismos.

10. CONCLUSIONES

- Se comprobó que *U. maydis* presenta los genes para amplificar los homólogos de las proteínas putativas Upf1CH y Upf2.
- Se obtuvo la ligación inserto-vector de las construcciones de pPROb-Upf1CH y pPROb-Upf2
- Se obtuvo la sobreexpresión de las proteínas recombinantes putativas homólogas a UPF1CH y UPF2 de *U. maydis*

11. PERSPECTIVAS

- Realizar la amplificación del marco de lectura abierto completo para el homólogo de UPF1 de *Ustilago maydis*.
- Verificar por ensayos de Western Blot las proteínas recombinantes homólogas a UPF1 y UPF2 de *Ustilago maydis* obtenidas.
- Realizar experimentos que permitan comprobar la interacción de las proteínas recombinantes obtenidas.

12. BIBLIOGRAFÍA

1. Adams, M. 2000. The Genome Sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science*. 287: 2185 – 2195
2. Agrios, G., N. 2005. *Plant Pathology*. Elsevier Academic Press, 922
3. Alló, M. 2010. Regulación epigenética del splicing alternativo mediante RNAs pequeños y argonauta 1. Editorial de la Universidad de Buenos Aires. 1-17
4. Amrani, N; Ganesan, R; Kervestin, S; Mangus, A., D; Ghosh, S. y Jacobson, A. 2004. A faux 3-UTR promotes aberrant termination and triggers nonsense-mediated mRNA decay. *Nature*. 432: 112–118
5. Anders, K., R; Grimson, A. y Anderson, P. 2003. SMG-5, required for *C. elegans* nonsense-mediated mRNA decay, associates with SMG-2 and protein phosphatase 2A. *EMBO Journal*. 22: 641–650
6. Baltimore, D. 2001. Our genome unveiled. *Nature*. 409: 814 - 820
7. Behm-Ansmant, I; Kashima, I; Rehwinkel, J; Sauliere, J; Wittkopp, N. y Izaurralde, E. 2007. mRNA quality control: an ancient machinery recognizes and degrades mRNAs with nonsense codons. *FEBS Letters*. 581: 2845-2853.
8. Behm-Ansmant, I; Gatfield, D. y Izaurralde, E. 2007. A conserved role for cytoplasmic poly (A)-binding protein 1 (PABPC1) in nonsense-mediated mRNA decay. *EMBO Journal*. 26: 1591–1601
9. Bhattacharya, A; Czapinski, K; Trifillis, P; He, F; Jacobson, A. y Peltz, S., W. 2000. Characterization of the biochemical properties of the human Upf1 gene product that is involved in nonsense-mediated mRNA decay. *RNA*. 6: 1226–1235
10. Brenner, S; Jacob, F. y Meselson, M. 1961. An unstable intermediate carrying information from genes to ribosomes for protein synthesis. *Nature*. 190. 576–581
11. Cao, D. y Parker, R. 2003. Computational modeling and experimental analysis of nonsense-mediated decay in yeast. *Cell* 113: 533–545
12. Chang, Y., F; Imam, J., S. y Wilkinson, M., F. 2007. The nonsense-mediated decay RNA surveillance pathway. *Rev. Biochemistry*. 76: 51-74
13. Clerici, M; Deniaud, A; Boehm, V; Gehring, N., H; Schaffitzel, C. y Cusack, S. 2013. Structural and functional analysis of the three MIF4G domains of nonsense-mediated decay factor UPF2. *Nucleic Acids Research*. 1-14
14. Crick, F. 1958. On protein synthesis. Biological replication of macromolecules. *Symp. Soc. Exp. Biol.* 12: 138–163
15. Conti, E. e Izaurralde, E. 2005. Nonsense-mediated mRNA decay: molecular insights and mechanistic variations across species. *Current Opinion in Cell Biology*. 17: 316-325
16. Cowli, H., V. 2010. Regulation of mRNA cap methylation. *Biochemistry*. 425: 295 - 302

17. Cui, Y; Hagan, K., W; Zhang, S. y Peltz, S., W. 1995. Identification and characterization of genes that are required for the accelerated degradation of mRNAs containing a premature translational termination codon. *Genes*. 9: 423-36
18. Culbertson, M., R. 1999. Nonsense-mediated mRNA decay and development: shoot the messenger to survive? *Trends in Genetics*. 15: 74–80
19. Culbertson, M., R. 1999. RNA surveillance. Unforeseen consequences for gene expression, inherited genetic disorders and cancer. *Trends in Genetics*. 15: 74-80
20. Gao, Q; Das, B; Sherman, F. y Maquat, L., E. 2005. Cap-binding protein 1-mediated and eukaryotic translation initiation factor 4E-mediated pioneer rounds of translation in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 102: 4258–4263.
21. Gleghorn, M., L. y Maquat, L., E. 2011. UPF1 Learns to Relax and Unwind. *Molecular Cell*. 41: 621 – 623
22. Hastings, M., L. y Krainer, A., R. 2001. Pre-mRNA splicing in the new millennium. *Current Opinion in Cell Biology*. 13: 302-309
23. Harrison, P., M; Kumar, A; Lang, N; Snyder, M. y Gerstein, M. 2002. A question of size: the eukaryotic proteome and the problems in defining it. *Nucleic Acids Research*. 30: 1083–1090
24. He, F. y Jacobson, A. 2001. Upf1p, Nmd2p, and Upf3p regulate the decapping and exonucleolytic degradation of both nonsense-containing mRNAs and wild-type mRNAs. *Mol. Cell. Biol*. 21: 1515–1530
25. He, F; Li, X; Spatrick, P; Casillo, R; Dong, S. y Jacobson, A. 2003. Genome-wide analysis of mRNAs regulated by the nonsense-mediated and 5 to 3 mRNA decay pathways in yeast. *Mol. Cell* 12: 1439–1452
26. Holbrook, J., A; Neu-Yilik, G; Hentze, W., M. y Kulozik, E., A. 2004. Nonsense-mediated decay approaches the clinic. *Nature Genetics*. 36: 801–808
27. Hoskins. y cols. 2011. Ordered and dynamic assembly of single spliceosomes. *Science*. 331: 1289-1295
28. Hwang, J. y Ki Kim, Y. 2012. When a ribosome encounters a premature termination codon. *Biochemistry and Molecular Biology*: 9-16
29. Imamachi, N; Tani, H. y Akimitsu, N. 2012. Up-frameshift protein 1 (UPF1): Multitalented entertainer in RNA decay. *Drug Discoveries & Therapeutics*. 6: 55-61
30. Isken, O. y Maquat, L., E. 2007. Quality control of eukaryotic mRNA: safeguarding cells from abnormal mRNA function. *Genes & Development*. 21: 1833 – 1856
31. Ishigaki, Y; Li, X; Serin, G. y Maquat, L. 2001. Evidence for a Pioneer Round of mRNA Translation: mRNAs Subject to Nonsense-Mediated Decay in Mammalian Cells Are Bound by CBP80 and CBP20. *Cell*. 106: 607-617
32. Ivanov, P., V; Gehring, H., N; Kunz, B., J; Hentze, W., M. y Kulozik, E., A. 2008. Interactions between UPF1, eRFs, PABP and the exon junction complex suggest an integrated model for mammalian NMD pathways. *EMBO Journal*. 27: 736–747

33. Jackson, R., J; Hellen, U., T. y Pestova, V. 2010. The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 11: 113-127
34. Jiménez, G., L. y cols. 2007. Biología celular del splicing. *Mensaje bioquímico*. 31: 141-156
35. Kadlec, J; Izaurralde, E. y Cusack, S. 2004. The structural basis for the interaction between nonsense-mediated mRNA decay factors UPF2 and UPF3. *Nature Structural & Molecular Biology*. 11: 330–37
36. Kämper. y cols, 2006. Genetics of Morphogenesis and Pathogenic Development of *Ustilago maydis*. *Advances in Genetics*. 57: 1-24
37. Kashima, I; Yamashita, A; Izumi, N; Kataoka, N; Morishita, R; Hoshino, S; Ohno, M; Dreyfuss, G. y Ohno, S. 2006. Binding of a novel SMG-1-Upf1-eRF1-eRF3 complex (SURF) to the exon junction complex triggers Upf1 phosphorylation and nonsense-mediated mRNA decay. *Genes*. 20: 355–336
38. Kertesz, S; Kerényi, Z. y Silhavy, D. 2006. Both introns and long 3-UTRs operate as cis acting elements to trigger nonsense-mediated decay in plants. *Nucleic Acids Research*. 34: 6147–6157
39. Khajavi, M; Inoue, K. y Lupski, R., J. 2006. Nonsense-mediated mRNA decay modulates clinical outcome of genetic disease. *European Journal of Human Genetics*. 14: 1074–1081
40. Klosterman, S., J. 2007. Genetics of Morphogenesis and Pathogenic Development of *Ustilago maydis*. *Advances in Genetics*. 57: 1-24
41. Kramer, A. 1996. The structure and function of proteins involved in mammalian pre-RNA splicing. *Rev Biochemistry*. 65: 367-409
42. Lander y cols. 2001. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*. 409: 860-921
43. Leeds, P; Wood, J., M; Lee, B., S. y Culbertson, M., R. 1992. Identification of an additional gene required for eukaryotic nonsense mRNA turnover. *Cell Biology*, Vol. 12: 2165–77
44. Lejeune, F. y Maquat, L., E. 2005. Mechanistic links between nonsense-mediated mRNA decay and pre-mRNA splicing in mammalian cells. *Cell Biology*. 17: 309–15
45. Longman, D; Plasterk, H., A. y Cáceres, F., J. 2007. Mechanistic insights and identification of two novel factors in the *C. elegans* NMD pathway. *Genes Development*. 21: 1075 – 1085
46. Lykke-Andersen, J; Shu, M., D. y Steitz, J., A. 2000. Human Upf proteins target an mRNA for nonsense – mediated decay when bound downstream of a termination codon. *Cell*. 103: 1121 – 1131
47. Maquat, L., .E. 2004. Nonsense-mediated mRNA decay: Splicing, translation and mRNP dynamics. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol*. 5: 89–99.
48. Maquat, L., E. 2005. Nonsense-mediated mRNA decay in mammals. *Cell*, Vol. 118: 1773-1776

49. Maquat, L., E. y Carmichael, G., G. 2001. Quality control of mRNA function. *Cell*. 104: 173–176
50. Maquat, L., E; Tarn, W., Y. e Isken, O. 2010. The pioneer round of translation: features and functions. *Cell*. 142: 368-374
51. Martínez-Espinoza, A., D; García-Pedrejas M., D. y Gold, S., E. 2002. The Ustilaginales as Plant pests and Model Systems. *Fungal Genetics and Biology*. 35: 1-20
52. Matlin, A., J. y Moore, M., J. 2007. Spliceosome assembly and composition. *Biology*, Vol. 623: 14-35
53. Max, L., A; Birnstiel, Meinrad, B. y Katharina, S. 1985. Transcription termination and 3' processing: the end is in site. *Cell*. 41: 349 - 359
54. Mendell, J., T; Sharifi, N., A; Meyers, J., L; Martinez-Murillo, F. y Dietz, H., C. 2004 Nonsense surveillance regulates expression of diverse classes of mammalian transcripts and mutes genomic noise. *Natural Genetics*. 36: 1073–1078
55. Mitchell, P. y Tollervey, D. 2003. An NMD pathway in yeast involving accelerated deadenylation and exosome-mediated 3 → 5 degradation. *Mol. Cell* 11: 1405–1413
56. Montes, R., M. 2012. Mecanismo molecular del acoplamiento de la transcripción y el splicing alternativo de los pre-mRNAs por TCERG1. Editorial de la Universidad de Granada. 3-18
57. Muhlrads, D. y Parker, R. 1994. Premature translational termination triggers mRNA decapping. *Nature* 370: 578–581.
58. Muñoz, M., J. 2009. Respuesta al daño al ADN: un ejemplo de acoplamiento entre transcripción y splicing alternativo. Biblioteca Digital de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales - Universidad de Buenos Aires. 1-34
59. Münsterkötter, M. y Steinberg, G. 2007. The fungus *Ustilago maydis* and humans share disease-related proteins that are not found in *Saccharomyces cerevisiae*. *BMC Genomics*. 8: 1471 – 216
60. Ohnishi, T; Yamashita, A; Kashima, I; Schell, T; Anders, KR; Grimson, A; Hachiya, T; Hentze, W., M; Anderson, P. y Ohno, S. 2003. Phosphorylation of hUPF1 Induces Formation of mRNA Surveillance Complexes Containing hSMG-5 and hSMG-7. *Molecular Cell*. 12: 1187–1120
61. Orphanides, G. y Reinberg, D. 2002. A Unified Theory of Gene Expression. *Cell*. 108: 439-451
62. Proudfoot, N., J. 1989. How RNA polymerase II terminates transcription in higher eukaryotes. *Trends Biochem Sci*. 14: 05-110
63. Reed R. 2000. Mechanisms of fidelity in pre-mRNA splicing. *Current Opinion in Cell Biology*. 12: 340-345
64. Reed, R. 2003. Coupling transcription, splicing and mRNA export. *Current Opinion in Cell Biology*. 15: 326–31

65. Ruvkun, G. y Hobert, O. 1998. The taxonomy of developmental control in *Caenorhabditis elegans*. *Science*. 282: 2033 – 2041
66. Sato, H; Hosoda, N. y Maquat, L., E. 2008. Efficiency of the pioneer round of translation affects the cellular site of nonsense-mediated mRNA decay. *Cell*. 29: 255–262
67. Schell, T; Kulozik, E., A. y Hentze, W., M. 2002. Integration of splicing, transport and translation to achieve mRNA quality control by the nonsense-mediated decay pathway. *Genome biology*. 3: 1006.1-1006.6
68. Serin, G; Gersappe, A; Black, J., D; Aronoff, R. y Maquat, LE. 2001. Identification and characterization of human orthologues to *Saccharomyces cerevisiae* Upf2 protein and Upf3 protein (*Caenorhabditis elegans* SMG-4). *Cell Biology*. 21: 209–23
69. Silva, A., L; Ribeiro, P. y Romão, L. 2008. Proximity of the poly(A)-binding protein to a premature termination codon inhibits mammalian nonsense-mediated mRNA decay. *RNA*. 14: 563–576
70. Stalder, L. y Mühlemann, O. 2008. The meaning of nonsense. *Cell Biology*. 18: 315-321
71. Wahl, M., C; Will, C., L. y Luhrmann, R. 2009. The spliceosome: design principles of a dynamic RNP machine. *Cell*. 136: 701-718
72. Wang, D; Wengrod, J. y Gardner, LB. 2011. Overexpression of the c-myc oncogene inhibits nonsensemediated RNA decay in B lymphocytes. *Biological Chemistry*. 286: 4038–4043
73. Wang, W; Czaplinski, K; Rao, Y. y Peltz, SW. 2001. The role of Upf proteins in modulating the translation read-through of nonsense-containing transcripts. *EMBO*. 20: 880–890
74. Weng, Y; Czaplinski, K. y Peltz, SW. 1996. Identification and Characterization of Mutations in the UPF1 Gene That Affect Nonsense Suppression and the Formation of the Upf Protein Complex but Not mRNA Turnover. *Molecular and Cellular Biology*. 16: 5477–90
75. Wilkinson, MF. 2003. The cycle of nonsense. *Molecular Cell*. 12: 1059–1061
76. Will, CL. y Luhrmann, R. 2001. Spliceosomal UsnRNP biogenesis, structure and function. *Cell*. 13: 290-301
77. Yamashita, A; Ohnishi, T; Kashima, I; Taya, Y. y Ohno, S. 2001. Human SMG-1, a novel phosphatidylinositol 3-kinase-related protein kinase, associates with components of the mRNA surveillance complex and is involved in the regulation of nonsense-mediated mRNA decay. *Genes*. 15: 2215–2228
78. Yamashita, A; Kashima, I. y Ohno, S. 2005. The role of SMG-1 in nonsense-mediated mRNA decay. *Biochemistry*. 1754: 305–315.
79. Zhang, J; Sun, X; Qian, Y. y Maquat, L. 1998. Intron function in the nonsense-mediated decay of b-globin mRNA: Indications that pre-mRNA splicing in the nucleus can influence mRNA translation in the cytoplasm. *RNA*. 4: 801-815