



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

CENTRO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS MICROBIOLOGICAS

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y GENÉTICA
MICROBIANA

"Búsqueda del Papel en *CIS* de los Elementos Moderadamente Repetidos de la Región Telomérica de *Ustilago maydis*"

TESIS

Que para obtener el grado de Maestro en Ciencias Microbiológicas
con opción Bioquímica y Genética Microbiana

Presenta:

Q.F.B. Estela Anastacio Marcelino

Directora de tesis:

D. en C. Patricia Georgina Sánchez Alonso



H. Puebla de Zaragoza

Noviembre 2004

El siguiente trabajo se realizó en el Instituto de Ciencias de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla en el Centro de Investigaciones Microbiológicas en los laboratorios de Bioquímica y Genética Microbiana contando con el apoyo del proyecto No.31741N y de la beca Número0165316 del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología

INDICE

Contenido	Página
Resumen-----	7
Introducción-----	10
♦ Secuencias Asociadas a Telómero-----	12
♦ Función de las Secuencias Asociadas a Telómero-----	13
♦ Protosilenciadores.-----	19
♦ Antecedentes-----	22
Hipótesis-----	28
Objetivos-----	28
Esquema de Trabajo-----	29
Material y Métodos-----	30
♦ Material Biológico-----	30
♦ Medios de cultivo-----	30
♦ Transformación de <i>Ustilago maydis</i> .-----	30
♦ Extracción de DNA genómico.-----	31
♦ Electroforesis en gel de campos pulsados.-----	32
♦ Hibridación Radiactiva.-----	32
♦ Determinación de estabilidad mitótica.-----	33
♦ Extracción de plásmidos, transformación en <i>E. coli</i> y	

purificación de plásmidos.-----	33
♦ Construcción de vectores que portan las secuencias <i>UTASb</i> de la región subtelomérica de <i>U. maydis</i> en vectores replicativos y no replicativos.-----	33
Resultados-----	37
♦ Subclonación del elemento <i>UTASb</i> + <i>RT</i> (repetido telomérico) en vectores de <i>U. maydis</i> , tanto replicativos como carentes de capacidad de replicación.-----	37
♦ El elemento <i>UTASb</i> en plásmidos replicativos para <i>U. maydis</i> permanece en estado episomal.-----	40
♦ El elemento <i>UTASb</i> en plásmidos no replicativos forma rearrreglos en el genoma de <i>U. maydis</i> . -----	47
Discusión-----	54
Conclusiones-----	59
Perspectivas-----	59
Bibliografía-----	60

INDICE DE FIGURAS

Fig.	Títulos	Pág.
1	Representación esquemática del extremo cromosomal-----	11
2	Representación esquemática del extremo cromosomal de <i>S. cerevisiae</i> -----	13
3	<i>Loci</i> de apareamiento sobre el cromosoma III de <i>S. cerevisiae</i> -----	16
4	Ensamblaje de las proteínas Sir en el locus <i>HMR</i> (Cromosoma III), telómeros, repetidos del rDNA y a DNA DSB.-----	17
5	Modelo para la iniciación y extensión de la heterocromatina telomérica.-----	19
6	Modelo para explicar la interacción funcional entre elementos silenciadores.-----	20
7	Mecanismos de silenciamiento por silenciadores, protosilenciadores y aisladores.	21
8	Representación esquemática del extremo cromosomal de <i>U. maydis</i> -----	22
9	Efecto de las secuencias teloméricas sobre la frecuencia de transformación.-----	24
10	Efecto de las secuencias teloméricas sobre la frecuencia de transformación (continuación).-----	25
11	Construcción del plásmido pCUT8-----	34
12	Construcción del plásmido pCUT8-A-----	35
13	Construcción del plásmido pCUT7-----	35
14	Construcción del plásmido pCUT7-A-----	36
15	Análisis del patrón de restricción de las construcciones pCUT8, pCUT8-A, pCUT7 y pCUT7-A.-----	36
16	Gráfico de los resultados obtenidos en frecuencia de transformación y estabilidad mitótica de la secuencia <i>UTASb</i> de <i>U. maydis</i> .-----	39
17	Análisis de southern blot de las transformantes obtenidas con la construcción pCUT8-----	44
18	Análisis de southern blot de las transformantes obtenidas con la construcción pCUT7-----	45
19	Hibridación tipo southern blot de los cariotipos electroforéticos de las transformantes obtenidas con los plásmidos pCUT8 y pCUT7. -----	46
20	Análisis de southern blot de las transformantes obtenidas con la construcción pCUT8-A-----	45

21	Análisis de southern blot de las transformantes obtenidas con la construcción pCUT7-A-----	52
22	Hibridación tipo southern blot de los cariotipos electroforéticos de las transformantes obtenidas con los plásmidos pCUT8-A y pCUT7-A.-----	53
23	Modelo propuesto para explicar los posibles mecanismos que se llevaron a cabo para la formación de rearrreglos en las transformantes de <i>U. maydis</i> -----	57

INDICE DE TABLAS

Tabla	Descripción	Página
1	Descripción de los vectores pCUT8, pCUT8-A, pCUT7 y pCUT7-A y de los controles pCM201 y pCM201-A-----	30
2	Características de las construcciones pCUT8, pCUT8-A, pCUT7 y pCUT7-A y de los controles pCM201 y pCM201-A-----	37
3	Frecuencia de Transformación y Estabilidad Mitótica de los plásmidos pCUT8, pCUT8-A, pCUT7 y pCUT7-A.-----	38

RESUMEN

Los telómeros se localizan en los extremos físicos de los cromosomas eucariotes y son estructuras nucleoproteicas necesarias para mantener la estabilidad de los cromosomas durante cada ronda de replicación, además de proteger los extremos de los cromosomas y ser sustratos para la replicación del telómero por la enzima telomerasa. El DNA telomérico está ensamblado en una estructura cromatínica no nucleosomal denominada telosoma. En *S. cerevisiae*, las principales proteínas en el telosoma son las proteínas Rap1p, Tel2p de unión específica a DNA de cadena doble y Cdc13p, proteína de unión a cadena sencilla del telómero. Rap1p además de interactuar con las proteínas Rif1p y Rif2p también interactúa con las proteínas Sir (proteínas reguladoras de la información silenciosa). En levaduras las proteínas Sir interactúan con la proteína Ku para regular la localización de los telómeros en la periferia nuclear al unirse con las proteínas del poro nuclear. El que el complejo telomérico se encuentre organizado en esta estructura telosomal, se favorece un estado de represión transcripcional que afecta la transcripción de genes adyacentes, fenómeno conocido como Efecto por Posición del Telómero (TPE). TPE afecta el tiempo de replicación del DNA o elimina la activación de las Secuencias de Replicación Autónoma (ARS) y afecta el índice de recombinación mitótica, así como también afecta a las secuencias asociadas a telómero.

Las Secuencias Asociadas a Telómero (TAS) son un mosaico de secuencias moderadamente repetidas, altamente polimórficas y poco conservadas incluso entre grupos taxonómicos relacionados. Los genes en estas regiones muestran represión transcripcional en función de su distancia con el telómero. A la fecha la región subtelomérica mejor caracterizada posiblemente sea la de *Sacharomyces cerevisiae* aunque también se han descrito con bastante precisión las de *Plasmodium falciparum*, *Tripanosoma brucei* y en humanos. Las TAS en *S. cerevisiae* se encuentra formado por dos elementos: el elemento Yö y el elemento X, el elemento Yö es una secuencia conservada localizada adyacente a los repetidos teloméricos y puede estar presente hasta cuatro veces o no estar presente. El elemento X es una secuencia menos conservada que el elemento Yö, se encuentra una secuencia aproximadamente de 470pb conservada a la que se le ha dado el nombre de centro X y adyacente al centro X se encuentran pequeñas secuencias llamadas STRs en número variable. Las secuencias asociadas a telómero no tienen una función bien dilucidada pero se ha determinado que pueden jugar papeles activos en

fenómenos que ocurren frecuentemente en esa región teniendo varias funciones particulares en diferentes organismos. Estas funciones se pueden agrupar en dos: 1) son sitios donde se alcanza una gran riqueza de eventos recombinogénicos y de plasticidad genómica que llevan a la homogenización y dispersión de secuencias y 2) por su cercanía al telómero y en algunos casos por la existencia de repetido telomérico entre las secuencias asociadas a telómero pueden sufrir silenciamiento transcripcional. El silenciamiento puede estar dado a través de la unión a poros de la membrana interna nuclear y a través de la extensión de la cromatina telomérica. Se ha observado que el centro X de la región subtelomérica de *S. cerevisiae* actúa como un elemento que propaga el silenciamiento hacia regiones internas del cromosoma en forma discontinua, a esta función se le ha dado el nombre de Protosilenciadores.

Los protosilenciadores son un bloque estructural de elementos o secuencias elaboradas que permiten el silenciamiento de secuencias vecinas del genoma únicamente cuando existe un ambiente silencioso. Un autentico silenciador o un silenciador maestro puede mantener el silenciamiento autónomamente durante todo el ciclo celular, mientras el protosilenciador requiere de un silenciador para poder favorecer la extensión de la cromatina silenciosa. Por otra parte, recientemente se descubrió la existencia de secuencias *Cis*-actuantes fuera del centro X pero formando parte del elemento X de *S. cerevisiae*. Estas secuencias denominadas X-STAR consisten de uno o varios elementos pequeños nombrados STR-D, -C, -B, -A, y se les ha atribuido propiedades anti-silenciadoras porque parecen actuar como una barrera para extender la cromatina silenciada. Se piensa que los aisladores definen el límite de los dominios cromosomales independientes, así un gen interpuesto entre un aislador y un protosilenciador puede ser expresado mientras este protegido por un aislador o viceversa.

Ustilago maydis un basidiomicete dimórfico, es un organismo adecuado para realizar estudios de biología celular y molecular de organismos eucariotes, su extremo cromosomal está formado de 37-39 unidades de repetido telomérico del tipo TTAGGG. En el borde del repetido telomérico se encuentra una secuencia de 376 pb conservado en todos los extremos cromosomales del hongo a la que se le ha dado el nombre de *rumT* (repetido de *Ustilago maydis* en Telómero). Hacia la región centrómero proximal se encuentran dos tipos de elementos estructurales asociados a telómero denominados: *UTASa* y *UTASb* (*Ustilago* Telomere Associated Sequence), los cuales son estructuralmente similares a los elementos Yöy X de *S. cerevisiae*. En nuestro equipo de trabajo se realizaron ensayos para determinar la capacidad de las secuencias

del elemento *UTASa* y *UTASb*, para modificar la frecuencia de transformación y estabilidad mitótica. Partiendo de la hipótesis de que la similitud de *UTASb* con el elemento X de *S. cerevisiae* pudiera ser también funcional, se decidió determinar el papel de estas secuencias para mejorar la segregación de plásmidos o mantener el efecto de silenciamiento de *RumT+RT*, aspectos en los que subyace la capacidad de unión de *rumT* a proteínas específicas del extremo cromosomal en el efecto del silenciamiento transcripcional. Este estudio nos permitió por un lado redondear los datos sobre el estudio funcional en *Cis* de la región subtelomérica de *U. maydis* y por otro lado hacer un análisis general de ambos elementos subteloméricos.

INTRODUCCION

Los Telómeros son complejos específicos de DNA-Proteínas que proveen una capa protectora al final de los cromosomas eucariotes lineares. Su principal función es mantener la estabilidad de los cromosomas durante cada ronda de replicación y ser substratos para la replicación del telómero por la enzima telomerasa (Bryan and Cech 1999; Zakian 1996). Los telómeros también participan en la organización nucleolar de los cromosomas.

El DNA telomérico está compuesto de secuencias, ricas en guanina y timina, generalmente cortas y arregladas en tándem; en organismos como protozoarios, ciliados y mamíferos estos arreglos forman repetidos con escasas o nulas variaciones, mientras en organismos como *Saccharomyces cerevisiae* y *Paramecium* forman repetidos irregulares en donde las variaciones de un patrón se encuentran interdispersas a lo largo de la secuencia (Zakian, 1989). La cadena rica en guanina de los telómeros tiene una orientación 5' a 3' hacia el extremo de los cromosomas, esta cadena rica en guanina se extiende en dirección 3' formando una saliente de cadena sencilla (Fig. 1) (Zakian, 1996).

Los telómeros de *Drosophila melanogaster*, *Chironomus pallidictatus* y *Bombix mori* poseen diferentes tipos de repetidos teloméricos pero exhiben algunas similitudes (revisado en Pryde *et al* 1997). En *Drosophila* se presentan los retroelementos HeT-A y TART arreglados en tandem (Biessman and Mason 1997) cumpliendo la función de telómero mientras *Bombix* tiene los retrotransposones (TRAS Y SART) cumpliendo la misma función (Takahashi *et al* 1997; Okazaki *et al* 1995). En *Chironomus* la región telomérica está formado por las secuencias repetitivas TA (Kamnert *et al*, 1998; Zhang *et al*, 1994; Cohn and Edström 1992).

El DNA telomérico esta ensamblado en una estructura cromatínica no nucleosomal denominada telosoma. En *S. cerevisiae*, las proteínas principales en el telosoma son las proteínas Rap1p (proteína activadora represora) y las proteínas Tel2p de unión específica a repetidos teloméricos de doble cadena, así como Cdc13p, proteína de unión a repetidos teloméricos de cadena sencilla. Rap1p, a su vez, puede interactuar con otras proteínas como son Rif1p y Rif2p (factor de interacción con Rap1p 1 y 2), cuya función es regular la longitud del telómero formando un asa y evitando así la incorporación de la telomerasa sobre el telómero (Berman *et al.* 1986; Shore and Nasmyth 1987; Nugent *et al.* 1996; Virta-Pearlman *et al.* 1996). En *Schizosaccharomyces pombe* a los repetidos teloméricos se unen las proteínas Taz1p y Pot1p (Cooper *et al.* 1997), a los telómeros de *Kluyveromyces lactis* Rap1p (Larson *et al.* 1994), a los

telómeros de *Oxytricha nova* TBP (proteínas de unión a telómero) (Froelich-Ammon *et al.* 1998) y a los telómeros de mamíferos las proteínas TRF1 Y TRF2 (factor 1 de unión al repetido TTAGGG) (Broccoli *et al.* 1997; Billaud *et al.* 1996; Chong *et al.* 1995). Rap1p además de interactuar con las proteínas Rif1p y Rif2p también interactúa con las proteínas Sir3p, Sir4p y Sir2p (proteínas reguladoras de la información silenciosa). Sin embargo, a diferencia de Rap1p de levaduras, en ensayos *in vitro* Rap1p de humanos interactúa con TRF2 propiciando su unión al DNA telomérico. Otras dos proteínas teloméricas humanas, TIN2p y la proteína reparadora de DNA Ku, interactúan con los telómeros por la vía de unión a TRF1p. En levaduras las proteínas Sir interactúa con la proteína Ku para regular la localización de los telómeros en la periferia nuclear al interactuar con las proteínas de poro nuclear Mlp2 (Blackburn, 2001).

Toda la estructura del complejo telomérico antes mencionada, favorece un estado de represión transcripcional que afecta la transcripción de genes adyacentes, este es un fenómeno conocido como Efecto por Posición del Telómero (TPE, *Telomere Position Effect*) (Gottschling *et al.* 1990). Prácticamente, cualquier gen colocado en una región adyacente al telómero es apagado o afectado en su replicación. En *Drosophila* la represión transcripcional de genes cercanos al telómero lleva al apagado de la expresión de un gen en alguna de las células de una clona de manera heredable, este es un efecto conocido como Variegación por Efecto de Posición (PEV). La variegación por efecto de posición se caracteriza por estados heterocromáticos epigenéticos semiestables por varias divisiones celulares. Un gen es controlado entre un estado silenciado o no silenciado cuando esta bajo la influencia de PEV (Aparicio *et al.* 1991; Pardue *et al.* 1995). TPE también afecta el tiempo de replicación del DNA o elimina la activación de las Secuencias de Replicación Autónoma (ARS) (Ferguson and Fangman 1992) y afecta el índice de recombinación mitótica (Sthavenhage and Zakian 1998). Otras secuencias también son afectadas por TPE, estas son en general las secuencias asociadas a telómero.

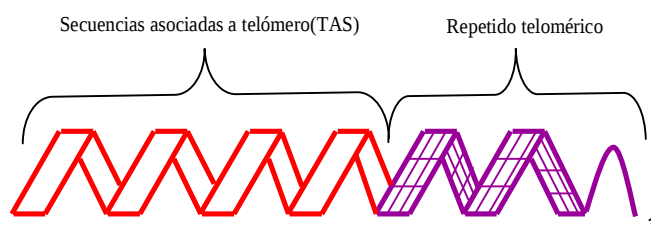


Figura 1: Representación esquemática del extremo cromosomal. Los rectángulos rojos representa la región subteloamérica y los rectángulos morados con rejillas al repetido telomérico en tandem de doble cadena, la línea morada representa a la cadena sencilla con orientación 3' hacia el extremo de los cromosomas.

SECUENCIAS ASOCIADAS A TELÓMERO

Las Secuencias Asociadas a Telómero (TAS) son un mosaico de secuencias moderadamente repetidas, altamente polimórficas y poco conservadas incluso entre grupos taxonómicos relacionados. Se encuentran formando un dominio estructural y funcionalmente distinto al resto del genoma, compuesto de arreglos de secuencias interdispuestas sobre el extremo de los cromosomas (Zakian, 1996). En ellas vamos a encontrar un número bajo de marcos de lectura abiertas, ya sea de genes o de elementos genéticos móviles e incluso sus reminiscencias (Pryde *et al* 1997). Los genes en estas regiones muestran represión transcripcional en función de su distancia con el telómero.

En los cromosomas humanos las regiones subteloméricas se componen de un mosaico de secuencias arregladas en forma de minisatélites ricas en G y C con una región conservada de 350 pb (Rouyer *et al.* 1990). Las TAS en humanos están organizadas por bloques cortos de secuencias de 1 a 1.5 kb localizados hacia el extremo distal de los cromosomas; hacia la región centrómero proximal estos son bloques grandes de secuencias de 3.0-15 kb. Estos dos dominios subteloméricos están separados por un sistema de repetidos TTAGGG. Estos dos dominios fueron encontrados en los cromosomas 16p, 4p, 22q y 4q y muy probablemente existan en todos los cromosomas (Rouyer *et al.* 1990).

En *Plasmodium falciparum* las TAS están localizadas adyacentes al repetido telomérico y se componen de seis Elementos Repetitivos Asociados a Telómero (TAREs 1-6) que muestran una organización conservada (Figueiredo *et al* 2000). Estos elementos están flanqueados por miembros de la familia de genes que codifican para factores de virulencia de este microorganismo, incluyendo los genes de la familia *var* (genes codificantes para determinantes antigénicos variables PfEMP1) (Hernández-Rivas *et al* 1997; Rubio *et al* 1996) responsables de la variación antigénica y citoadherencia. En las TAS de *Trypanosoma brucei* se encuentran los genes VSG (variantes de glicoproteínas de superficie) (100 a 1000 repetidos) intercalados con las secuencias B-ES (sitios de expresión en sangre). Los genes VSG son regulados por el promotor de las secuencias ESAGs (genes de expresión sitio asociados) localizado a una distancia de 45 a 60 kb y separado del resto del cromosoma por una región de 10 a 40 kb formado por repetidos de 50 pb. (Barry *et al* 1998). En *Leishmania* las TAS se van a formar por las secuencias LCTAS de 100 pb y MINITAS de 1.6 kb (Fu and Barker 1998).

En plantas las TAS generalmente presentan tramos largos de secuencias repetidas en tandem, frecuentemente separadas de los repetidos teloméricos por secuencias espaciadoras (revisado en Pryde 1997). En tabaco las TAS están formadas por las secuencias NP3R de 165 pb y NP4R de 180 pb (Chen *et al* 1997).

En *S. cerevisiae* las TAS incluyen a los elementos Y ϕ y los elementos X. Los elementos Y ϕ se localizan adyacentes al repetido telomérico, se encuentran altamente conservados y puede haber de 0 a 4 copias en cada extremo cromosomal. El elemento X es una secuencia menos conservada que el elemento Y ϕ . Este elemento se encuentra en todos los extremos cromosomales de la levadura y se localiza yuxtapuesto al repetido telomérico o a los elementos Y ϕ . Todos los elementos X tienen una secuencia central de aproximadamente 470 nucleótidos a la que se le ha dado el nombre de centro X. Adyacente al centro X se encuentran secuencias pequeñas nombradas STRs (subtelomeric repet), entre el elemento X y el elemento Y ϕ se puede encontrar tramos cortos de repetidos teloméricos (Fourel *et al* 1999; Louis 1995; Louis *et al.* 1994).

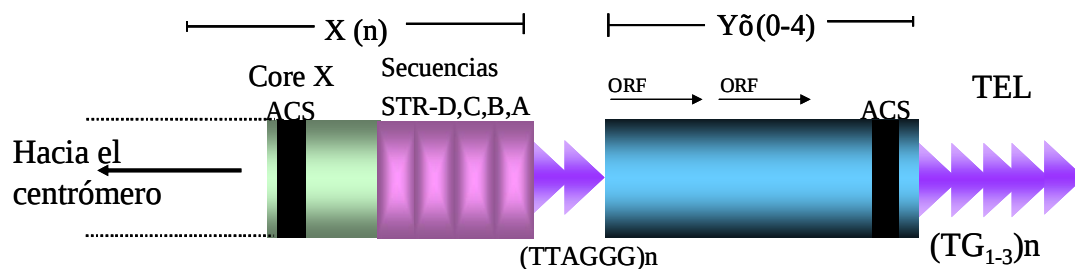


Figura 2: Representación esquemática del extremo cromosomal de *S. cerevisiae*. En el dibujo, el extremo final del cromosoma se encuentra hacia la derecha y el centrómero hacia la izquierda. Los triángulos morados representan al repetido telomérico, el rectángulo azul al elemento Y ϕ , el rectángulo verde al centro X y los rectángulos rosas a las secuencias STR-D, -C, -B, -A y los rectángulos negros a las secuencias ACS.

FUNCIÓN DE LAS SECUENCIAS ASOCIADAS A TELÓMERO

Las secuencias asociadas a telómero no tienen una función bien dilucidada pero se ha determinado que pueden jugar papeles activos en fenómenos que ocurren frecuentemente en esa región teniendo varias funciones particulares en diferentes organismos. Estas funciones se pueden agrupar en 2:

1.- Son sitios donde se alcanza una gran riqueza de eventos recombinogénicos y de plasticidad genómica.

Muchas de las secuencias en los genomas son relativamente estables, únicamente acumulan cambios que suceden esporádicamente a través del tiempo. Otras regiones, sin embargo, sufren cambios frecuentes que llevan a la homogenización y dispersión de secuencias repetidas (Pryde *et al.* 1997), tal es el caso de la región subtelomérica.

La región subtelomérica es en general dinámica, es un sitio donde se lleva a cabo cambios frecuentes por recombinación e intercambio de estas secuencias que llevan a la homogenización y dispersión de secuencias repetidas. Estos cambios se han observado en levaduras, humanos, *Tripanosomas* y *Plasmodium*. La recombinación en esta región está implicada en la variación de antígenos de superficie de parásitos patógenos a través del rearreglo y la expresión de genes en TAS, donde se tiene una especie de plasticidad claramente adaptativa (Hernández Rivas *et al* 1997; Freitas-Junior *et al* 2000). En organismos no patógenos la naturaleza dinámica de la región también puede ser adaptativa, por ejemplo en levaduras la región subtelomérica es usada para amplificar genes involucrados en la utilización de fuentes de carbono: SUC (invertasa), MAL (un operón de tres genes: maltosa, permeasa, maltasa y un factor trans-activante) y MEL (Ügalactosidasa). También se han descrito interacciones ectópicas frecuentes por conversión de gen o cambios recíprocos entre el locus silvestre MAL y homólogos de otros extremos cromosomales (revisado en Pryde and Louis 1997).

Los altos niveles de cambios vistos en la región subtelomérica no son los observados en el resto del genoma, a excepción de regiones específicas en el mismo organismo que sufren una rápida diversificación evolucionaria, tal como el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de vertebrados (Stephens *et al* 1999).

2.- Silenciamiento Transcripcional de las Secuencias Asociadas a Telómero por su cercanía al Telómero.

El silenciamiento se define como la inactivación de genes cercanos a una estructura represiva que propicia una conformación de cromatina silenciada (semejante a la heterocromatina), la cual persiste a través del ciclo celular y es dirigida por una cooperación interactiva entre secuencias de DNA requeridas para el silenciamiento (silenciadores), las proteínas de unión a los silenciadores y proteínas silenciadoras, las cuales de manera global

interactúan con proteínas de unión a DNA y nucleosomas (Gasser and Cockell 2001; Moazed, 2001). La cromatina silenciosa se forma únicamente sobre ciertas regiones, bloqueando el acceso de proteínas requeridas para la transcripción de genes cercanos a esta zona.

El silenciamiento transcripcional se ha observado en *S. cerevisiae* (Lusting 1998), *Schizosacharomyces pombe* (Grewal 2000) y en eucariontes superiores (Joseph *et al*, 2001). Un ejemplo clásico de silenciamiento es el estudiado en *Drosophila* (Stephane *et al*, 2001; Henikoff 2000, 1995) y ratón (Henikoff 2000); en donde la heterocromatina se encuentra concentrada en regiones centroméricas y teloméricas, desde donde se reprime la expresión de genes cercanos. A este fenómeno se le ha dado el nombre de variegación por efecto de posición por la naturaleza variable del silenciamiento (Henikoff 2000; Heard *et al* 1997). Un segundo ejemplo es el mecanismo utilizado en la regulación de la expresión de los genes Hox (genes requeridos para que lleve a cabo la última etapa de desarrollo de *D. melanogaster*), por los genes del grupo *polycomb*, los cuales codifican para proteínas que modulan la estructura de la cromatina desencadenando un efecto represivo sobre los genes Hox (Thomas *et al* 1996). Otro ejemplo clásico es la inactivación del cromosoma X en mamíferos, un proceso que involucra la compensación de genes X conectados a través del silenciamiento transcripcional de uno de los cromosomas X de células femeninas (Henning 1999). En eucariotes inferiores como *S. cerevisiae* y *S. pombe*, la cromatina silenciosa o heterocromatina-like es responsable del silenciamiento en: (1) locus de apareamiento (*HM*), (2) repetidos del rDNA y (3) telómeros, además de los centrómeros en *S. pombe* (revisado en Ying, 2002). Algunos de estos eventos se describen a continuación.

1. Silenciamiento transcripcional en los loci de apareamiento (HM). En levaduras los dos loci silenciosos de apareamiento, *HMR* y *HML* son donadores de información para el locus *MAT* y son responsables del control de apareamiento en levaduras (Haber, 1998). Los loci HM están flanqueados por los silenciadores E e I los cuales reprimen la transcripción de los genes *HML* y *HMR* (figura 3). En estas secuencias se encuentran sitios de unión para el complejo del origen de replicación (ORC), para la proteína represora y activadora 1 (Rap1p), y para el factor de unión a *ARS* (Abf1p) (Lusting 1998; Loo *et al* 1995). La función de E e I es iniciar el ensamblaje del complejo de los reguladores de la información silenciosa (complejo Sir). Los silenciadores también pueden servir como elementos aisladores como es el caso del silenciador I el cual separa la cromatina activa de la inactiva del locus *HML* (Bi *et al* 1999).

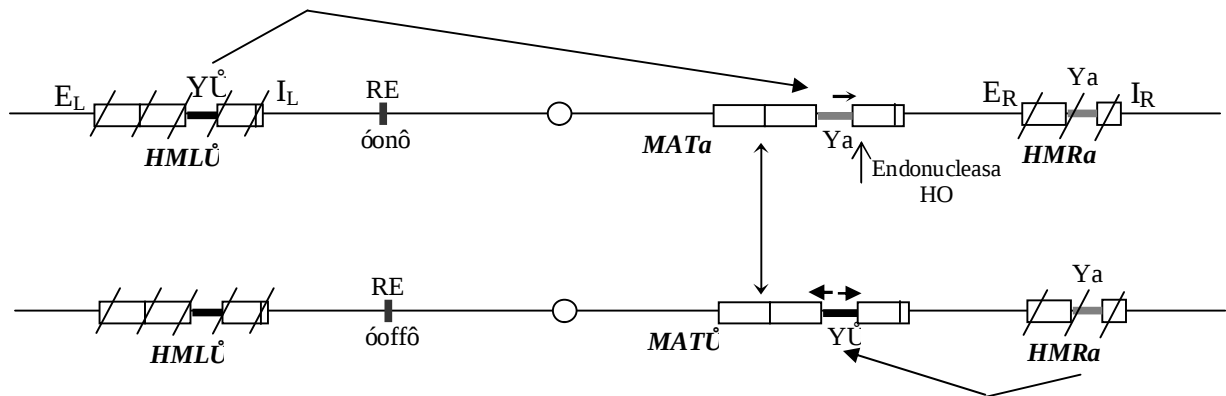


Figura 3: Loci de apareamiento sobre el cromosoma III. Además del locus MAT, El cromosoma III presenta otros dos loci donadores HML y HMR. Estos donadores son mantenidos en la estructura heterocromática (líneas diagonales) forzado por dos secuencias silenciadores adyacentes HML-E (E_L), HML-I (I_L), y HMR-E (E_R) y HMR-I (I_R). Cuando la endonucleasa HO es expresada, los alelos MAT pueden ser controlados por una conversión de genes (Haber 1998).

El silenciamiento en los loci HM requiere del complejo proteico Sir, el cual incluye a las proteínas Sir1p, Sir2p, Sir3p, y Sir4p (Moazed *et al* 1997). El complejo Sir es reclutado sobre secuencias que actúan como silenciadores en presencia de las proteínas asociadas (Rap1p, Abf1p y del complejo ORC), (ver Fig. 4) (Moretti *et al* 1994). Sir4p es reclutado por la proteína Sir1p cuando está unido a ORC (Triolo and Sternglanz 1996). Una vez ensamblado el complejo Sir se extiende sobre los nucleosomas por la interacción entre Sir3p y Sir4p con las colas aminoterminales hipoacetiladas de las histonas H3 y H4 (Hecht *et al* 1995; Braunstein *et al* 1993). Sir2p es requerido en pasos posteriores a la interacción inicial (Hoppe *et al* 2002). El papel de Sir1p, así como Sir2p, Sir3p y Sir4p, no debe ser limitado al ensamblaje de la cromatina silenciada de los loci HM; también parece tener un papel en el mantenimiento del silenciamiento a través del ciclo celular (Bi and Broach 1997; Cheng and Gartenberg 2000).

2. Silenciamiento transcripcional en repetidos de rDNA. En muchos organismos eucarióticos, los genes para rRNA (rDNA) están agrupados en largos repetidos en tándem sobre uno o pocos cromosomas. En *S. cerevisiae* el locus del DNA ribosomal tiene de 100 a 200 copias de unidades repetidas en tándem separados por espacios intergénicos (IGS) sobre el cromosoma XII (Petes, 1977). Cada repetido de rDNA tiene una longitud de aproximadamente 9 kb y posee una secuencia de replicación autónoma (ARS), aunque solo de 1 a 3 repetidos son utilizados como orígenes en la fase S (Brewer and Fangman, 1988; Liskens and Huberman, 1988). Aproximadamente la mitad de los repetidos rDNA son transcripcionalmente activos en algún

momento (Dammann *et al* 1993), el resto de los repetidos son mantenidos en un estado silencioso, en parte, por la acción de la proteína Sir2p (Bryk *et al* 1997; Fritze *et al* 1997; Smith and Boeke 1997). A diferencia del silenciamiento del loci HM y telómeros, el silenciamiento en el rDNA se requiere del complejo proteínico RENT (regulador del silenciamiento nucleolar y salida de la telofase). Este complejo está formado por tres componentes: Sir2p, Net1p (factor de establecimiento de silenciamiento nucleolar y regulador de la telofase 1) y Cdc14p (Straight *et al* 1999; Shou *et al* 1999). El silenciamiento de estas secuencias no requiere de las proteínas Sir1, 3 y 4, las cuales no forman parte del complejo RENT (Smith and Boeke 1997; Straight *et al* 1999), sin embargo, Sir2p si es requerida para el silenciamiento del rDNA y para la hipoacetilación de la histona H4 asociada con rDNA (Georg, J. H., *et al.*, 2002); Sir4p es requerido para regular la eficiencia del silenciamiento de rDNA modulando la distribución de una cantidad limitada de Sir2p entre los telómeros y los repetidos del rDNA. El complejo RENT se ensambla sobre la cromatina y Sir2p requiere de Net1p para ensamblarse al rDNA. Probablemente otras proteínas desconocidas, intervienen en la unión de RENT con el rDNA, los cuales podrían estar jugando un papel análogo al de los silenciadores y al de las proteínas de unión a telómero. (Fig.4)

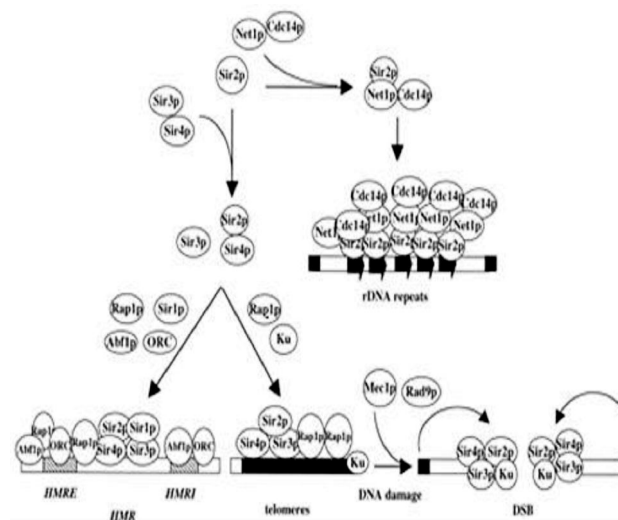


Fig.4. Ensamblaje de las proteínas Sir en el locus HMR (cromosoma III), telómeros, repetidos de rDNA (cromosoma III) y a DNA DSB. Sir3p está estrechamente asociado con Sir2p y Sir4p. Las proteínas Sir son reclutadas por Rap1p, Abf1p y ORC en HMR, mientras que en telómeros las proteínas Sir son reclutadas por Ku y Rap1p. Sir2p es reclutado en repetidos de rDNA por Net1p. Las cajas rellenas representan el extremo de los cromosomas, las cajas ralladas representan a los silenciadores y las flechas representan a los repetidos de rDNA. (Ying 2002).

3. Silenciamiento transcripcional en Región Subtelomérica. Por su cercanía al telómero y en algunos casos por la existencia de repetido telomérico entre estas secuencias el silenciamiento puede estar dado: a través de la unión a poros de la membrana interna nuclear y b) a través de la extensión de la cromatina telomérica.

a) A través de la unión a poros de la membrana interna nuclear. Dos tipos de silenciamiento pueden ocurrir en la periferia nuclear: 1) En donde los genes de la región subtelomérica, la proteína y Ku y el complejo de las proteínas Sir están involucrados. Es decir, si un gen de la región subtelomérica esta cerca de un silenciador y esté a su vez junto a un telómero en la periferia nuclear, la represión de ese gen va a ser por la estructura compacta que se forme. 2) Donde están involucradas las proteínas de la periferia nuclear Nup60, Mlp1 y Mlp2 y no hay represión natural en telómeros o en los locus de apareamiento. La proteína yKu70 y el telómero se unen a la periferia nuclear a través del complejo del poro nuclear (NPCs) formado por Mlp1p y Mlp2p y a su vez estas Mlps se unen a la nucleoporina Nup145p y Nup60p. Por otro lado, mutaciones en Nup60 y Nup145 dejaron ver la formación de telómeros agrupados en la envoltura nuclear en puntos diferentes al poro nuclear, lo que sugiere que existe otro mecanismo de unión de los telómeros (y sus proteínas y Ku y Sirp) a la envoltura nuclear (Vicent, G. *et al.*, 2000; Hediger and Gasser, 2002; Feuerbach, F. *et al.*, 2002). Independientemente de cuál sea el mecanismo de anclaje de los telómeros a la envoltura nuclear existe una alta preferencia por agruparse en la periferia del núcleo y reprimir genes localizados en la región subtelomérica.

b) A través de la extensión de tipo de cromatina telomérica. En *S. cerevisiae* la extensión del silenciamiento se inicia cuando Sir4p es reclutado por Rap1p y este a su vez se encuentra unido en sitios específicos sobre el telómero; esta interacción ayuda a determinar la asociación posterior de las proteínas en la heterocromatina. Una vez dada esta interacción, Sir4p recluta a Sir2p en una interacción que requiere de la histona H4 del nucleosoma adyacente a los sitios de unión de Rap1p en el DNA, para realizar una unión estable. Sir2p deacetila a la histona H3 Y H4 y permite el ensamblado de Sir3p al complejo, así como la unión de Sir4p con las colas N-terminales de las histonas. La presencia de Sir2p y Sir3p permite iniciar el proceso de elongación de la heterocromatina de manera cíclica y de esta manera Sir3p recluta a otra Sir4p, iniciándose de nuevo la unión de Sir2p y ensamblando a más Sir3p y Sir4p en la cromatina (Figura 5). La heterocromatina telomérica adicionalmente es estabilizada por dos eventos altamente ordenados que incluyen 1) el plegamiento del telómero, el cual a su vez permite

interacciones adicionales de las proteínas de unión al telómero Rap1p/Sir2p, Sir3p y Sir4p con proteínas de unión al centro X de la región subtelomérica. Este evento lleva a la formación de una cromatina altamente represiva y a la asociación de un telómero rico en proteínas Sir con la periferia nuclear; 2) Extensión de la cromatina represiva a través de secuencias que relevan la función de silenciamiento. Se ha observado que algunos elementos de la región subtelomérica de *S. cerevisiae* (Centro X) actúan como elementos que propagan (aunque en general no establecen) el silenciamiento hacia regiones internas del cromosoma en forma discontinua, a esta función se le ha dado el nombre de Protosilenciador (Lebrun. *et al.*, 2001).

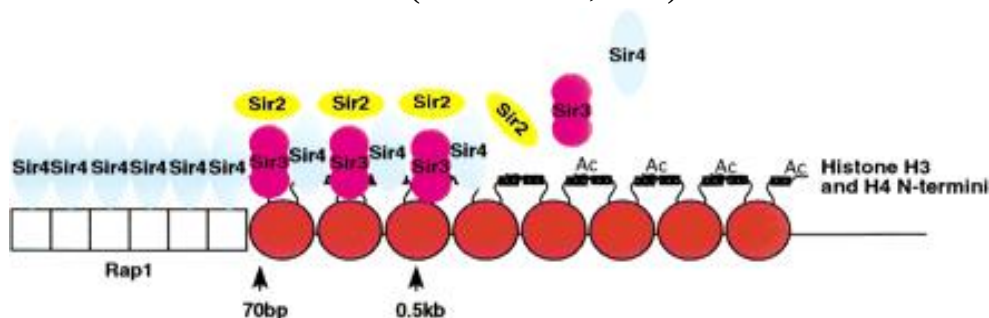


Figura 5: Modelo para la iniciación y extensión de la heterocromatina telomérica. Sir es la primera proteína reclutada para unir a Rap1p e iniciar la formación del complejo de silenciamiento. Sir4p recluta a Sir2p y Sir3p. Sir2p deacetila la cola de las histonas para permitir la unión de Sir3p a los nucleosomas adyacentes a los sitios Rap1. Sir3p recluta a mas Sir4p en los nucleosomas (Luo *et al* 2002).

PROTOSILENCIADORES

El establecimiento y mantenimiento del silenciamiento depende de elementos *cis* actuantes conocidos como silenciadores, estos elementos promueven el ensamblaje del complejo Sir. Sin embargo, existen otras secuencias que son reconocidas por las proteínas de unión a silenciadores las cuales una vez aislados se ha observado que son incapaces de iniciar el silenciamiento por ellas mismas, pero que *in situ* lo pueden propagar. Estas secuencias tienen la función de extender el silenciamiento de manera colineal a través de una interacción cooperativa con silenciadores fuertes cercanos que lleva a su vez a reforzar el silenciamiento (Boscheron *et al* 1996). La denominación de protosilenciadores se ha hecho por analogía con los protoenhancers. Los protosilenciadores abarcan a varios tipos de secuencias que llevan a cabo la represión de genes. Dentro de estas secuencias se encuentran algunas secuencias halladas en la región subtelomérica de *S. cerevisiae*. Específicamente el centro X, del cual se ha reportado como un elemento que tiene la función de protosilenciador (Fourel *et al.* 1999; Lebrun *et al.* 2001); los

casetes silenciosos de tipo de apareamiento de la levadura HMR-E y HMR-I también mantienen el silenciamiento en células arrestadas en la fase G1 (Cheng and Gartenberg 2000). Actualmente un protosilenciador se define como un bloque estructural de elementos o secuencias elaboradas que permiten el silenciamiento a secuencias vecinas del genoma únicamente cuando existe un ambiente silencioso (Fourel *et al.* 2002b).

Un autentico silenciador o silenciador maestro puede mantener el silenciamiento autónomamente durante todo el ciclo celular, mientras el protosilenciador requiere de un silenciador para poder favorecer la extensión de la cromatina silenciosa (Fourel *et al.* 2002b).

Curiosamente la concatamerización de protosilenciadores puede formar un auténtico silenciador; esto se ha demostrado mediante la creación de un silenciador sintético cuando se utiliza un ORC, sitios de unión a Abf1p y a Rap1p. Actualmente Se está explorando la posibilidad de que puedan cooperar varios protosilenciadores para inducir un silenciamiento fuerte en ausencia de silenciadores cercanos. (Fig.6) (Fourel *et al.* 2002b).

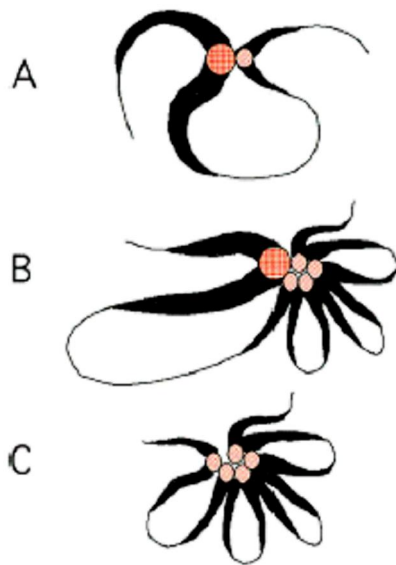
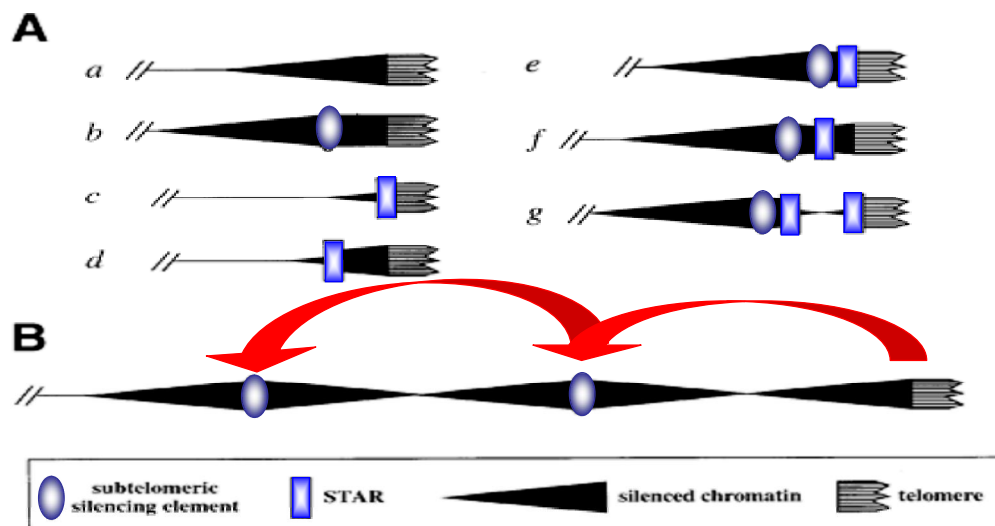


Figura 6: Modelo para explicar la interacción funcional entre elementos silenciadores. **(A)** Cooperación funcional entre un silenciador y un protosilenciador. **(B)** Arreglo de protosilenciadores, se ha pensado que se implica la unión de diferentes elementos silenciadores en una sola estructura. **(C)** Distintos protosilenciadores pueden estar agrupados para aliviar la necesidad de un silenciador genuino, creando una estructura de silenciamiento autónomo, como lo observado en el reclutamiento de componentes de la heterocromatina. Las líneas gruesas representan la cromatina silenciada, las esferas grandes a los silenciadores maestros y las esferas pequeñas a los elementos protosilenciadores (Fourel G., *et al.* 2002).

Por otra parte, recientemente se descubrió la existencia de secuencias *cis*-actuante fuera del centro X pero formando parte del elemento X de *S. cerevisiae*. Estas secuencias denominadas X-STAR (por subtelomeric anti-silencing región) consisten de uno o varios elementos pequeños nombrados STR-D, -C, -B, -A. Los elementos X-STAR son a los que se les ha atribuido propiedades anti-silenciadores porque parecen actuar como una barrera para extender la

cromatina silenciada. Se piensa que los aisladores definen el límite de los dominios cromosomales independientes, así un gen interpuesto entre un aislador y un protosilenciador puede ser expresado mientras este protegido por un aislador, ya que la función propia de un silenciador o un protosilenciador no es afectado por el aislador o viceversa (Lebrun *et al.* 2001).

Debido a la organización de los elementos X, que incluyen a los protosilenciadores y aisladores sobre regiones silenciosas del telómero de *S. cerevisiae*, se habla de una discontinuidad en el estado de silenciamiento, descartándose el modelo de extensión lineal del complejo Sir hacia regiones lejanas. Esta hipótesis parece explicar el fenómeno de silenciamiento sobre regiones distantes mediante un modelo de silenciamiento que incluye silenciadores y protosilenciadores que actúan mediante una interacción de complejos que permite la extensión de la cromatina silenciosa (Fourel *et al.* 1999, 2002b) (Fig. 7)



(Fourel *et al.* 1999)

Fig. 7 Mecanismos de silenciamiento por silenciadores, protosilenciadores y aisladores. A) inicialmente se determina el efecto por posición del telómero (a) la cromatina silenciada no se extiende del telómero a no más pocos kb hacia la región del centrómero (representado por un triángulo negro). El silenciamiento específico de elementos subteloméricos (p/e. el centro X de *S. cerevisiae*, óvalos morados) puede actuar como relevos prolongando la propagación del silenciamiento (b). Las secuencias STAR (caja azul) por el contrario, puede limitar la extensión de la cromatina silenciosa cuando es colocado cerca de los repetidos teloméricos (c) o a alguna distancia (d). El efecto de las secuencia STAR puede ser recuperado por la presencia de elementos silenciadores subteloméricos (e y f) no importando la distancia de STAR. Sin embargo dos secuencias STAR separadas definen un dominio que es aislado de la influencia de elementos silenciadores que los rodean (g). B) Un arreglo de elementos subteloméricos puede propagar el silenciamiento de una manera discontinua a través de múltiples relevos aún de largas distancias.

ANTECEDENTES

U. maydis, un basidiomicete dimórfico causante del carbón de maíz conocido comúnmente como huitlacoche, es adecuado como organismo modelo para realizar estudios de biología celular y molecular de organismos eucariotes (Holliday, 1961; 1974; Banuett 1992; Banuett and Herskowitz, 1994;).

En *U. maydis* se han descrito sistemas eficientes de transformación y disrupción génica, se ha secuenciado su genoma y sus secuencias ya han sido liberadas (<http://www.genome.wi.mit.edu/seq/fgi/>). *U. maydis* posee un genoma de 2.2×10^7 pb con un complemento haploide de 23 cromosomas que varían en el rango de 300 a 2000 kb, esto hace inminentemente útil el uso de electroforesis en campos pulsados, para el análisis genético y molecular de sus cromosomas. Además existe una variedad importante de mutantes y transformantes con diferentes marcadores de selección (Banks and Taylor, 1988; Keon *et al*, 1991; Gold *et al*, 1994).

En *U. maydis* el extremo cromosomal está constituido por repetidos de la secuencia TTAGGG, arreglados en tándem formando tramos largos de 37 a 39 repetidos teloméricos en promedio. (Sánchez Alonso, 1996).

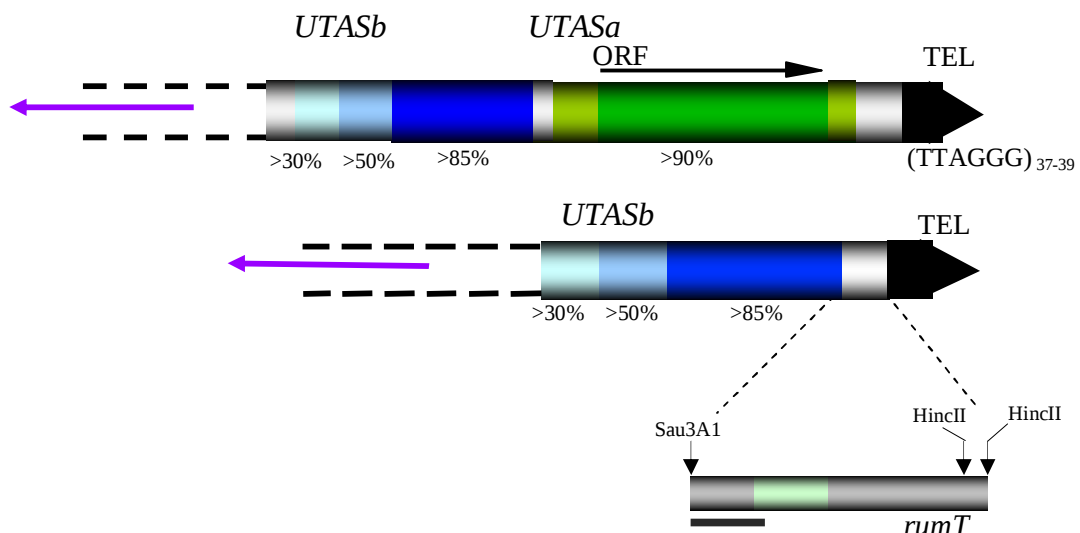


Fig. 8: Representación esquemática del extremo cromosomal de *U. maydis*. De color negro se representa al repetido telomérico, de color verde al elemento *UTASa* y de color azul al elemento *UTASb*, el elemento *rumT* se muestra de color gris.

En el borde del repetido telomérico se encuentra un segmento de 376 pb conservado en todos los extremos cromosomales del hongo. A esta secuencia se le denominó *rumT* (repetido de *Ustilago maydis* en Telómero). *RumT* muestra un tramo de aproximadamente 89 pb rico en A+T, el cual se especula que podría tener algún papel funcional (Guzmán and Sánchez, 1994) (Fig. 8). Estudios posteriores (Sánchez-Alonso, 1997) los autores mostraron que esta secuencia también se encuentra interdispersa sobre regiones internas del extremo cromosomal, y fue aislada como un fragmento *PstI* de 200 pb; a este tipo de secuencia se le denominó *rumS*.

Sánchez Alonso (1997) analizó el efecto de las secuencias del extremo cromosomal (*rumT*+RT) sobre vectores autoreplicativos y no autorreplicativos. En su estudio mostró que los plásmidos autorreplicativos portadores de 39 unidades del repetido telomérico (RT)₃₉, o portadores del borde *rumT*+ (RT)₃₉, sufrían un decremento drástico en su capacidad para transformar *U. maydis*, esto, reflejado en la obtención de una frecuencia de transformación menor a 10 transformantes por microgramo de DNA cuando se tiene únicamente al repetido telomérico. (Fig. 9)

En estudios posteriores, se mostró que la frecuencia de transformación de los mismo vectores aumentaba al disminuir el número de unidades de repetido telomérico, y adicionalmente, la subclonación de 29 unidades de repetido telomérico (TTTGGGG) de *Arabidopsis thaliana*, mostraba un efecto similar al del telómero (RT)₃₉ de *U. maydis*. En todos los casos, la estabilidad mitótica de las construcciones fue más baja que la del vector sin secuencias de la región telomérica, y su índice de pérdida por ciclo de replicación mucho más alta, lo cual indicaba un efecto de la región subtelomérica sobre la capacidad autorreplicativa. (Sánchez-Alonso *et al*, 2002)

El fenómeno de silenciamiento sobre secuencias de replicación autónoma ha sido reportado en *Saccharomyces cerevisiae* tanto para las secuencias localizadas en su genoma (Raghuraman *et al*, 1997; Stevenson and Gottschling 1999), como para secuencias de replicación autónoma localizadas sobre vectores plasmídicos (Kimmerly *et al*, 1988; Longtine *et al*, 1992; Ansari and Gartenberg 1997).

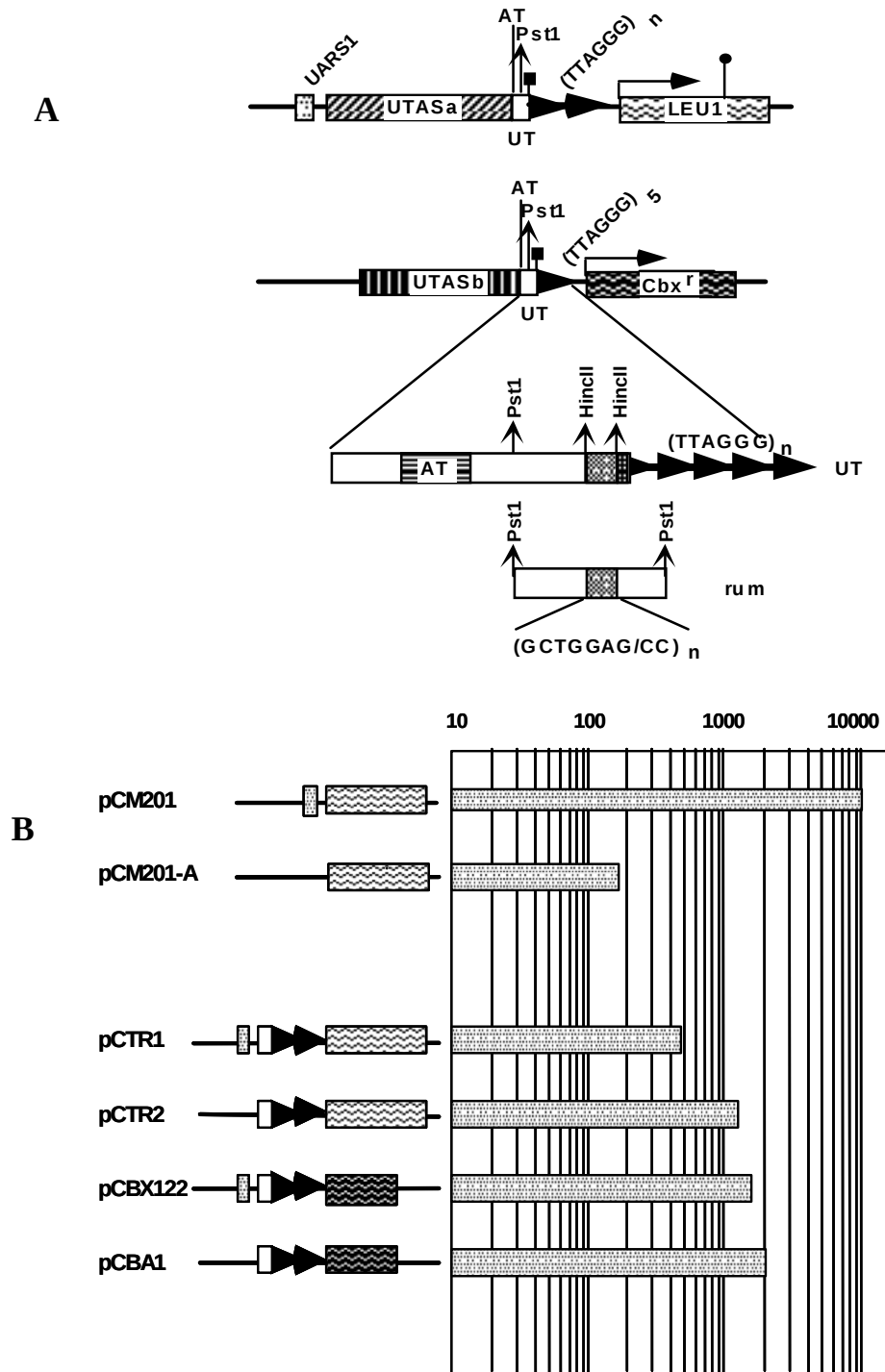


Fig. 9: Efecto de las Secuencias Teloméricas sobre la frecuencia de transformación. A. Representación esquemática de los plásmidos utilizados para analizar la frecuencia de transformación de las construcciones que portan secuencias teloméricas. B. Frecuencia de transformación de los plásmidos portadores de la región telomérica usando como marcador de selección a *LEU1* y el casete de resistencia a carboxin.

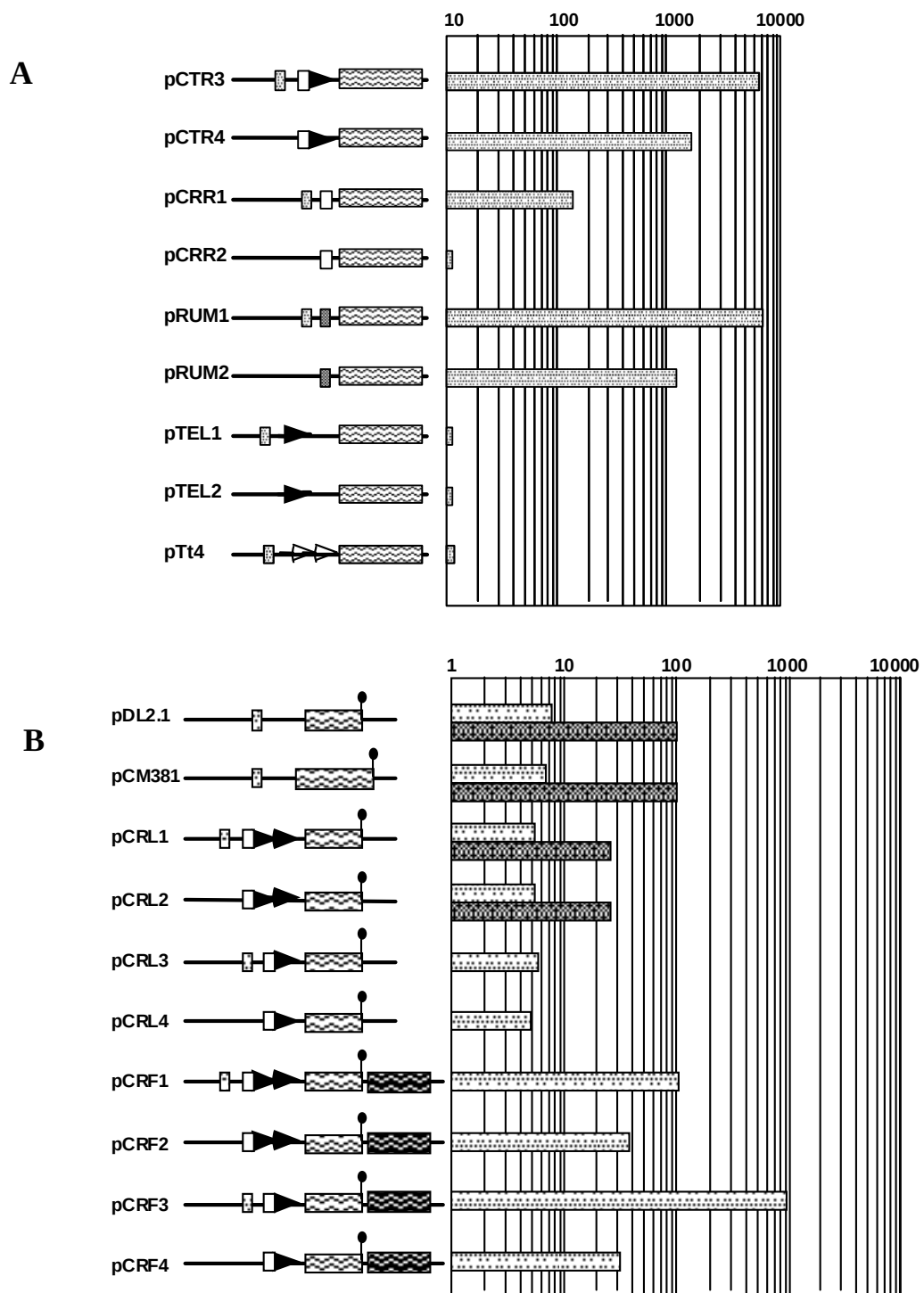


Fig. 10: Efecto de las Secuencias Teloméricas sobre la frecuencia de transformación. A. Frecuencia de Transformación de plásmidos que portan o no repetido telomérico, con o sin *rumT* y repetido telomérico de Arabidopsis. B. Efecto de la región subtelomérica sobre plásmidos de prueba para recombinación.

Por otra parte, la subclonación de *rumT+* (RT) 39 sobre vectores no replicativos, mostró un aumento discreto en la frecuencia de transformación y estabilidad mitótica, que se mantiene a pesar de la disminución del número de unidades de repetido telomérico (Fig. 10).

Este segundo efecto parece ser dependiente de la presencia de ambas secuencias *rumT+* (RT)_n sobre el vector y parece ser similar al reportado en *S. cerevisiae* como un efecto de estabilización debido a una mejor participación del vector. Se especula que este fenómeno puede ser debido a la interacción del complejo telómero-proteínas de unión al extremo cromosomal con proteínas de membrana nuclear (Galy *et al*, 2000; Feuerbach *et al*, 2002).

En *S. cerevisiae* y *S. pombe* se observó que plásmidos portadores del repetido telomérico (TRS) son más estables que plásmidos control durante la segregación mitótica. En *S. cerevisiae* la estabilidad de los primeros depende de la interacción de los repetidos teloméricos con Rap1p (Longtine *et al*, 1992). En *Plasmodium falciparum* se mostró que un plásmido que contiene una secuencia Rep20 (repetido más largo de las secuencias TAREs en la región subtelomérica de este parásito) mejoro la segregación debido a la unión física del plásmido con el extremo de los cromosomas (O'Donnell *et al*, 2002).

Hacia el extremo centrómero proximal de la región telomérica se encuentran dos tipos de elementos estructurales asociados al telómero denominados: *UTASa* y *UTASb* (Ustilago Telomere Associated Sequence) los cuales son estructuralmente similares a los elementos X y Yö de *S. cerevisiae*. *UTASa* es una secuencia muy conservada, localizada en los extremos cromosomales del hongo; al igual que el elemento X alberga un marco de lectura abierto de 2664 pb aquí denominado *USHER* con los siete motivos conservados de la subfamilia de helicasas tipo RecQ (Sánchez Alonso and Guzmán, 1998; Vaquero-Vera, 2003) (Fig.8). Recientemente, se ha demostrado la presencia de productos de transcripción de *USHER* mediante ensayos de RT-PCR. Los productos de transcripción se detectaron en cepas con un alto número de copias del elemento repetido sobre la región subtelomérica, sin embargo existen cepas con un transcrito indetectable (Vaquero-Vera, 2003). La subclonación de *UTASa* sobre vectores replicativos y no replicativos no modifico la frecuencia de transformación y estabilidad mitótica, no mostrando algún efecto sobre la secuencia de replicación autónoma de nuestro vector replicativo. (Anastacio-Marcelino, 2001).

UTASb comparte semejanzas con el elemento X de *S. cerevisiae*, su tamaño es variable y presenta una región conservada de aproximadamente 1 kb semejante al ócentro X ϕ de *S. cerevisiae* (Fig.8) (Sánchez-Alonso and Guzmán, 1998).

En este trabajo realizamos ensayos para determinar la capacidad de las secuencias del elemento *UTASb*, para modificar la frecuencia de transformación y estabilidad mitótica. Partiendo de la hipótesis de que la similitud de *UTASb* con el elemento X de *S. cerevisiae* pudiera ser también funcional, decidimos determinar el papel de estas secuencias para mejorar la segregación de plásmidos o mantener el efecto de silenciamiento de *RumT*+RT, aspectos en los que subyace la capacidad de unión de *rumT* a proteínas específicas del extremo cromosomal en el efecto del silenciamiento transcripcional. Este análisis nos permitió por un lado redondear los datos sobre el estudio funcional en *Cis* de la región subtelomérica de *U. maydis* y por otro lado hacer un análisis general de ambos elementos subteloméricos

HIPOTESIS

El elemento *UTASb* de la región subtelomérica desempeña algún papel funcional similar al de X de *S. cerevisiae* en el extremo cromosomal.

OBJETIVOS

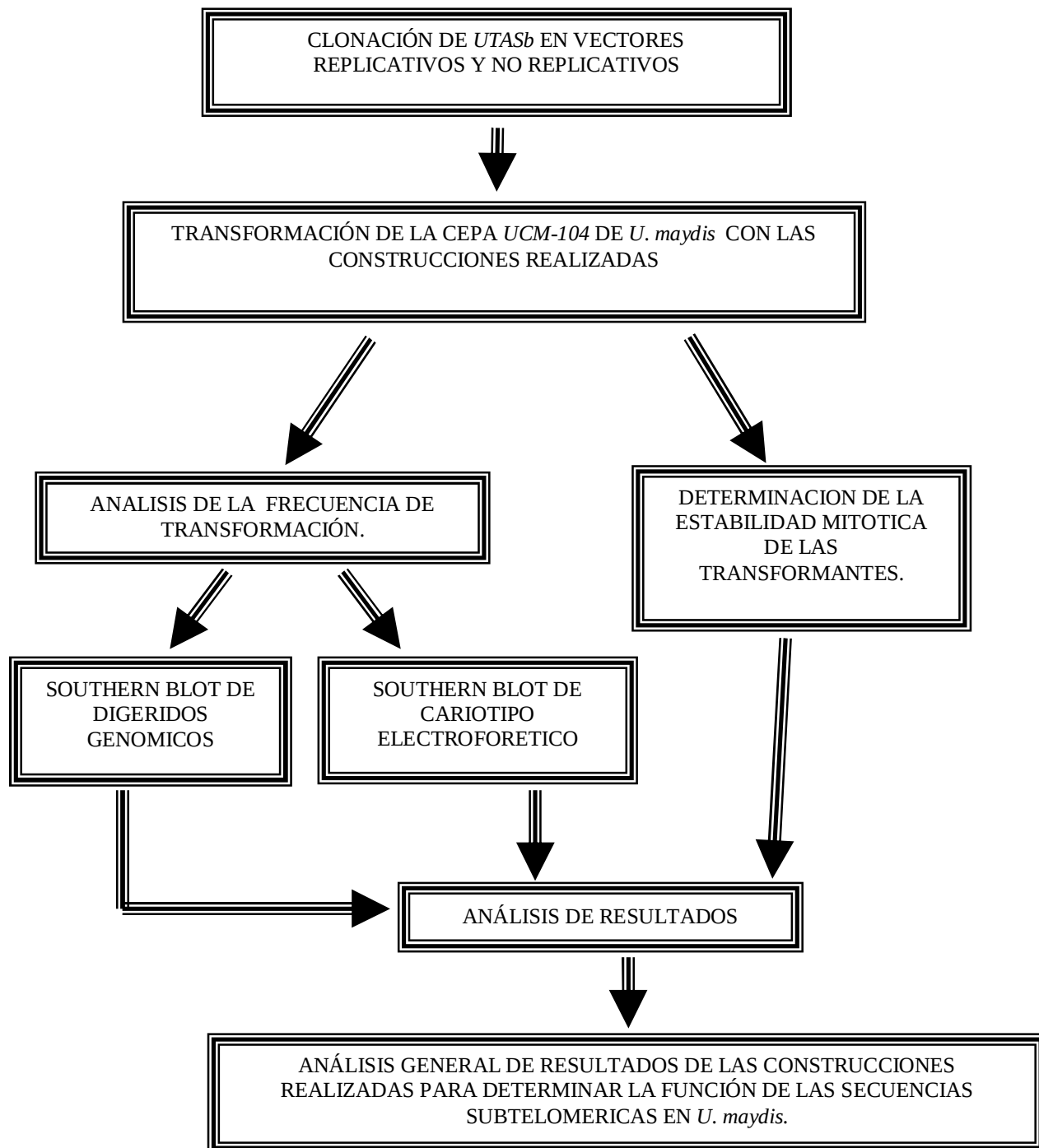
OBJETIVO GENERAL:

Estudiar la dinámica del extremo cromosomal tipo b de *Ustilago maydis*, utilizando un sistema de plásmidos autorreplicativos y no autorreplicativos.

OBJETIVOS PARTICULARES:

1. Analizar la frecuencia de transformación y estabilidad mitótica de plásmidos portadores de las secuencias *UTASb* del extremo cromosomal de *U. maydis*.
2. Determinar el comportamiento molecular de los anteriores plásmidos en las transformantes de *U. maydis*.
3. Identificar o proponer un papel funcional de *UTASb* con base a los resultados anteriores.

ESQUEMA DE TRABAJO



MATERIAL Y METODOS

MATERIAL BIOLÓGICO

Las cepas utilizadas durante los experimentos fueron *U. maydis* UCM-104, *a1b2 leu1-1*, auxótrofa para leucina y las cepas de *E. coli*: XL1 BLUE MRFö (*supE44 hsdR17 recA1 endA1 gyrA46 thi relA1 lac*⁻) y DH5ÚFö (*supE44 ΔlacU169 (Ø80 lacZΔM15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1*), fueron utilizadas como hospederos para la amplificación de plásmidos utilizados en este trabajo. Los vectores utilizados se describen en la siguiente tabla.

Tabla1: Descripción de vectores utilizados en este trabajo.

PLÁSMIDO	CARACTERÍSTICAS	REFERENCIA
pBluescripII KS-	Fagémido de 2961 pb derivado de pUC19, permite α-complementación tiene sitio de clonación múltiple y el gen de resistencia a ampicilina.	Stratagene Cloning Systems
pCM201	Vector con marcador de selección para Leucina, <i>UARS1</i> y un sitio de clonación múltiple.	Onel <i>et al</i> 1995
pCM201-A	Vector con marcador de selección para Leucina, sin <i>UARS1</i> y un sitio de clonación múltiple.	Sánchez-Alonso 1998

MEDIOS DE CULTIVO

El medio utilizado fue Luria-Bertani (LB), suplementado con ampicilina (100 μg/ml) para crecer cepas transformantes de *E. coli*.

U. maydis fue crecido en los siguientes medios: YEPS (extracto de levadura 1%, peptona de caseína 2% y sacarosa 2%), medio mínimo (Nitrato de Amonio 1.5 g, solución de sales 63 ml, sacarosa al 1% y glicina 100mg/ml) y medio completo de Holliday modificado (Holliday, 1974), a una temperatura de 28°C. Los medios utilizados para las transformaciones fueron suplementados con sorbitol 1M.

TRANSFORMACION DE *Ustilago maydis*.

La transformación de *U. maydis* con las construcciones diseñadas se realizaron con los vectores replicativos y no replicativos como se ha descrito (Fotheringham and Holloman, 1990).

De un precultivo de *U. maydis* cepa UCM-104 crecido en medio YEPS por 24 horas, se inocularon 50^{-1} en un matraz de 250 ml conteniendo 50 ml de medio YEPS y se incubó a 28°C en agitación (200 rpm) hasta obtener una $\text{DO}_{600} = 1.0-1.2$ (2.5×10^7 células/ml). Una vez obtenido el cultivo se centrifugó para obtener el paquete celular y lavar 2 veces con SCS (sorbitol 1 M, Citrato de Sodio 50 mM, pH 5.8). Se resuspendió el paquete celular en 500 μl de SCS y se adicionaron 50 mg de Lyzing Enzyme from *Trichoderma harzianum* (SIGMA-ALDRICH lote: 1412) disuelta en 500 μl de solución SCS. Se mezcló suavemente e incubó a 37°C por 10 minutos con movimientos ocasionales. Una vez formados los protoplastos se centrifugó a 1000 rpm por 5 minutos y lavaron 2 veces los protoplastos con SCS y una vez con STC (sorbitol 1M, CaCl_2 100mM, Tris-HCl 10mM pH=7.0), posteriormente se resuspendieron en 1 ml de STC (la densidad celular de los protoplastos estuvo aproximadamente $10^7/\text{ml}$). Se realizaron alícuotas de 50 μl de protoplastos y se les adicionaron 2 μl de heparina (50 mg/ml) y 500 ng de DNA (cuantificado por fluorometría) resuspendido en 1 μl de agua, con movimientos suaves se mezcló e incubó en hielo por 15 minutos. Transcurrido el tiempo se agregó 8ml de medio TOP (medio mínimo de Holliday, sorbitol 1M, agar bacteriológico 0.8%) a 45°C , se mezcló muy bien y se vertió en placas con medio mínimo (medio mínimo de Holliday, sorbitol 1M, agar 1.6%). Las placas se incubaron a 28°C de 4 -5 días.

EXTRACCION DE DNA GENÓMICO.

Para el aislamiento del DNA genómico se usó un procedimiento modificado (Sherman *et al.*, 1986). De un cultivo de 30 ml con $\text{DO}_{600} = 1.5$ (aprox. 2×10^7 células/ml), se centrifugó a 2000 rpm por 10 minutos, el paquete celular obtenido se lavó dos veces con SCS, y se resuspendió en 500 μl del mismo buffer adicionándole 12 mg de la enzima Lyzing Enzyme from *Trichoderma harzianum* (SIGMA-ALDRICH) disuelta en 100 μl de buffer SCS. La mezcla se incubó por una hora a 37°C y se centrifugó a 1000 rpm por 5 minutos. Al paquete obtenido se le agregó 0.5 ml de Buffer para extracción de hongo (Tris-HCl pH= 8.5 200 mM; NaCl 250 mM; EDTA 25 mM; SDS 0.5 %) se mezcló muy bien la muestra hasta obtener una lisis completa. Se agregó 500 μl de fenol-cloroformo y se mezcló suavemente. Se centrifugó la muestra por 30 minutos 14000 rpm en frío. Se separó la fase acuosa y agregó 2 μl de RNAsa al 0.1 % e incubó por 30 minutos a 37°C . Se agregó un volumen de fenol-cloroformo y centrifugó por 15 minutos a

14000 rpm en frío. Se separó la fase acuosa y agrego 0.5 volumen de acetato de amonio y 2 volumen de etanol absoluto frío. Se mezcló suavemente e incubo a $\sim 20^{\circ}\text{C}$ por 20 minutos. Posteriormente se centrifugó por 10 minutos, se desechó el sobrenadante y se lavó la pastilla dos veces con etanol frío al 70 %. Por último se resuspendió la pastilla en $100\ \mu\text{l}$ de agua estéril y se almaceno a $\sim 20^{\circ}\text{C}$ hasta su uso.

ELECTROFORESIS EN GEL DE CAMPOS PULSADOS (PFGE, Pulsed Field Gel Electrophoresis).

Se prepararon los bloques de agarosa de bajo punto de fusión con DNA de *U. maydis* como se describe en Guzmán and Sánchez (1994). De un cultivo de 20 ml de células transformantes crecidas en medio mínimo a una D.O.₆₀₀=1.0-1.2 se obtuvo el paquete celular y se lavó dos veces con SCS (Sorbitol 1M, Citrato de Sodio 50 mM, pH=5.8). Posteriormente se resuspendió el paquete celular en 450 μl de SCS y se agregó 10 mg de la enzima Lyzing Enzyme from *Trichoderma harzianum* disuelta en 100 μl de SCS y 750 μl de agarosa de bajo punto de fusión al 1% (grado cromosómico) disuelta en 125 mM de EDTA. La mezcla se vertió en moldes para bloques y se dejo en hielo por 5 minutos. Posteriormente se desmoldaron los bloques y se colocaron en tubos falcón de 15 ml agregándoles aproximadamente 2 ml de buffer LET (EDTA 500 mM, Tris-HCl 10 mM, β -mercaptoetanol 30 mM, pH=7.0) y se dejó incubando a temperatura ambiente por 24 horas. Una vez transcurrido el tiempo se le cambio el buffer LET por el Buffer LDS (Duodesil Sulfato de Litio 1%, EDTA 100%, Tris HCl pH=8.0) e incubo a 50°C por 24 horas. Por último se lavaron los bloques dos veces con EDTA 50 mM y se almacenaron hasta su uso en 50 mM de EDTA a 4°C , evitando cambios bruscos de temperatura.

HBRIDACIÓN RADIATIVA.

Para la transferencia se utilizo membrana Nylon (Hybon N. Amersham), y amortiguador SSPE 10X. Para la hibridación se utilizó el material radiactivo Random Priming con [^{32}P] dCTP para marcar la sonda *LEUI* (un fragmento SalI de 1500 pb del plásmido pCM201) y la sonda KS- (plásmido pBluescripKS- linealizado). La hibridación se realizo a 65°C . Para detectar la señal se realizaron los siguientes lavados: 2(X) por 15 minutos a temperatura ambiente (2X SSPE, 0.1% SDS), 1 X por 10 minutos a 65°C (0.4X SSPE, 0.05% SDS). Sin dejar secar el filtro completamente se envolvió en papel Saran wrap y se expuso la membrana a una película

fotográfica. Para regenerar membrana se uso 500 ml de la solución 0.1X SSPE y 0.5% SDS a 95 °C y se expuso nuevamente la membrana a películas fotográficas para asegurar que la sonda fue eliminada totalmente.

DETERMINACIÓN DE LA ESTABILIDAD MITÓTICA.

Las clonas transformantes de *U. maydis* se crecieron en dos ml de medio completo de Holliday (medio sin presión de selección) por 30 generaciones a 28 °C en agitación constante. Estos cultivos líquidos se resembraron en placas de medio completo de Holliday gelificado. Se seleccionaron 100 colonias al azar y se resembraron en parches sobre placas de medio mínimo (presión de selección) y medio completo (sin presión de selección).

El porcentaje de estabilidad mitótica se reporto como:

$$\left(\frac{\text{Colonias Leu+ crecidas sobre medio con presión de selección}}{\text{Total de colonias crecidas sobre medio sin presión de selección}} \right) \times 100$$

EXTRACCIÓN DE PLÁSMIDOS, TRANSFORMACIÓN EN *E. coli* Y PURIFICACIÓN DE PLÁSMIDOS.

Los procedimientos de extracción de DNA de plásmidos por lisis alcalina, y las minipreparaciones se llevaron a cabo como se describe en Sambrook (1989). La transformación en *E. coli* se llevó a cabo como describe Millar (1987). La recuperación de insertos de bandas de agarosa y limpieza por fenolización se efectuó conforme a Silhavy (1984). Las digestiones de DNA se hicieron de acuerdo a las instrucciones del proveedor.

CONSTRUCCIÓN DE VECTORES QUE PORTAN LAS SECUENCIAS *UTASb* DE LA REGION SUBTELOMERICA DE *U. maydis* EN VECTORES REPLICATIVOS Y NO REPLICATIVOS.

Para la clonación de la secuencia *UTASb* en el vector replicativo y no replicativo se utilizó como base al vector pCM201 y su derivado pCM201-A carente de secuencia de replicación autónoma respectivamente. La secuencia *UT8* (1620 pb) + 22 repetidos teloméricos (RT) (Sánchez Alonso and Guzmán 1998) fue clonado en los sitios *KpnI* y *SstI* de los vectores

pCM201 (vector replicativo) y pCM201-A (vector no replicativo). Los vectores obtenidos fueron nombrados pCUT8 y pCUT8-A respectivamente. Fig. 11 y 12.

Otra de las construcciones realizadas se obtuvo mediante la clonación de la secuencia *UT8* (2002 pb) + 14 RT (Sánchez Alonso and Guzmán, 1998) en los sitios de restricción *KpnI* y *SstI* de los vectores pCM201 y pCM201-A obteniendo las construcciones pCUT7 y pCUT7-A respectivamente. Fig. 13 y 14.

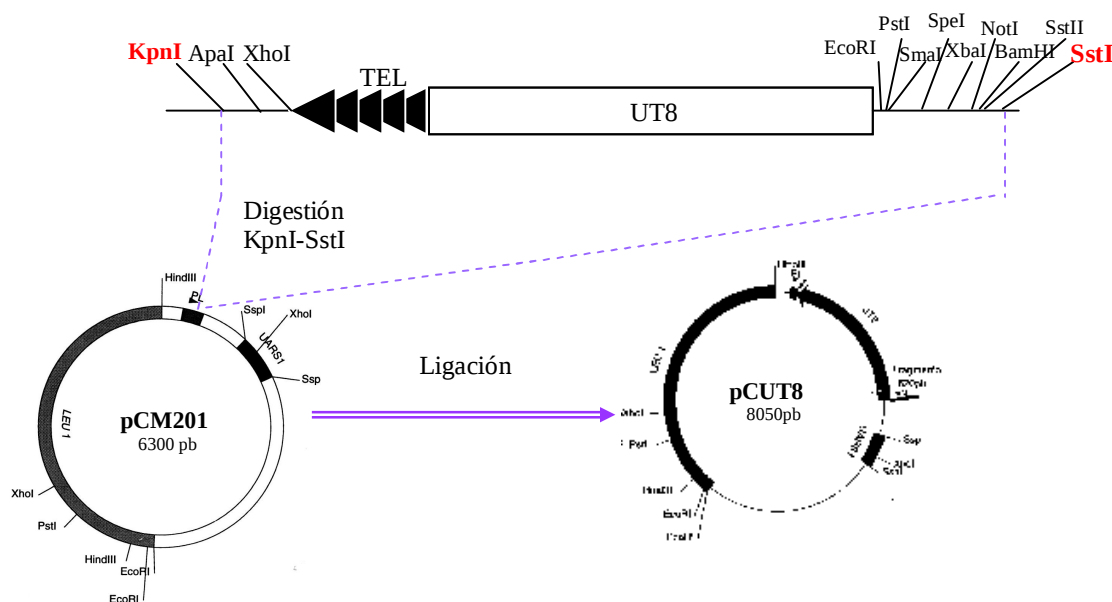


Figura 11. Construcción del plásmido pCUT8. En el diagrama se indican los sitios de restricción relevantes.

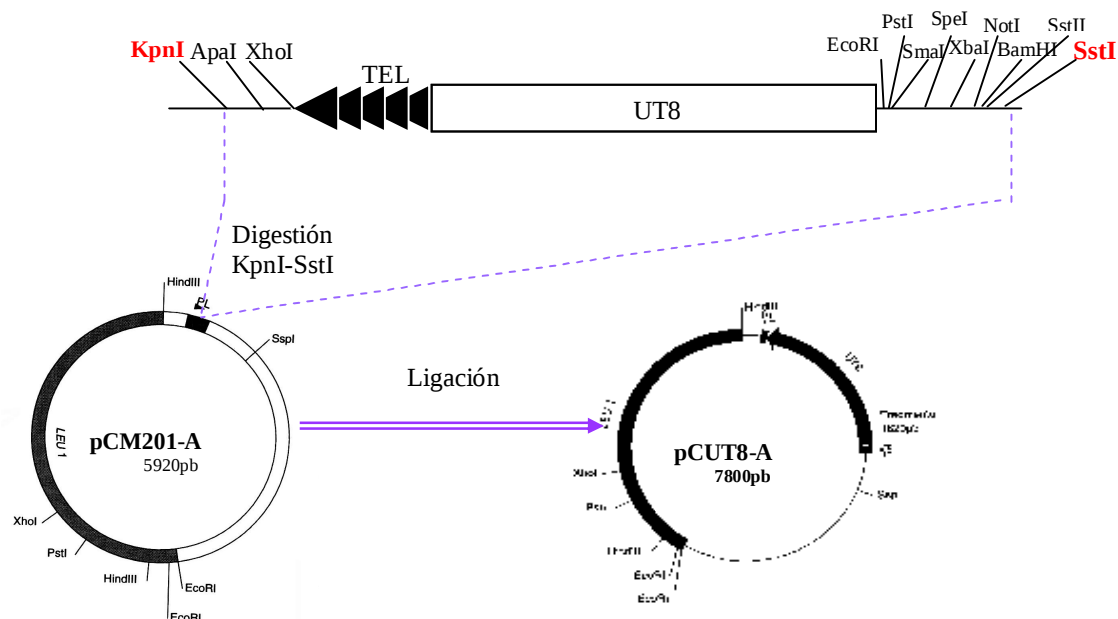


Figura 12: Construcción del plasmido pCUT8-A. En el diagrama se indican los sitios de restricción relevantes.

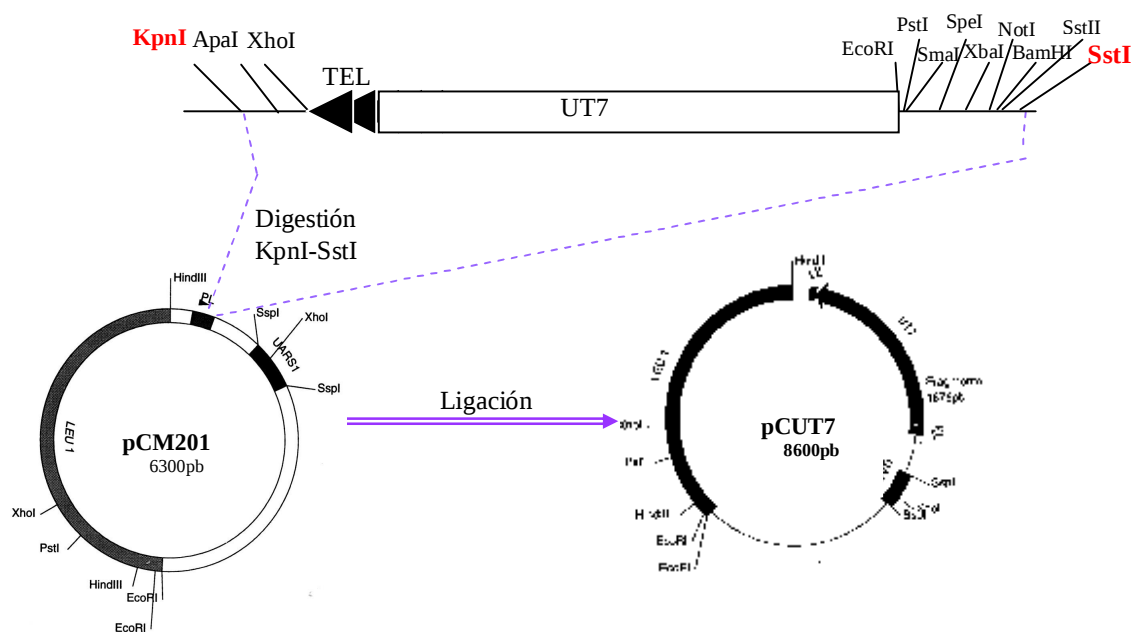


Figura 13. Construcción del plásmido pCUT7. En el diagrama se indican los sitios de restricción relevantes.

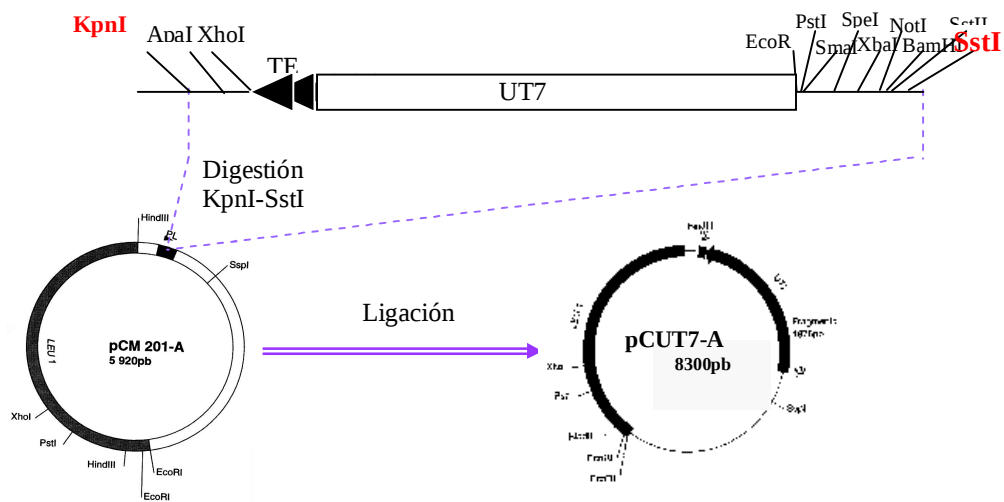


Figura 14. Construcción del plásmido pCUT7-A. En el esquema se muestran los sitios de restricción importantes.

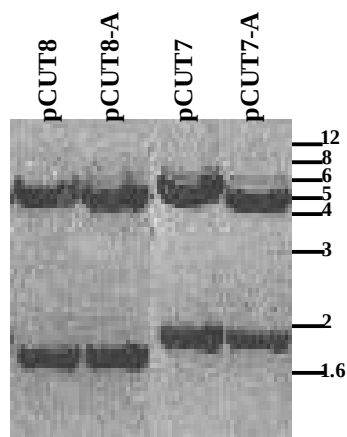


Figura 15. Análisis del patrón de restricción de las construcciones obtenidas. pCUT7, pCUT7-A, pCUT8 y pCUT8-A fueron digeridas con las enzimas KpnI y SstI.

RESULTADOS

Subclonación del elemento *UTASb*+RT (repetido telomérico) en vectores de *U. maydis*, tanto replicativos como carentes de capacidad de replicación.

Durante la caracterización del extremo cromosomal de *U. maydis* (Sánchez Alonso and Guzmán, 1998) se aislaron tres secuencias que hibridaron con la sonda para *UTASb*, una de ellas fue UT7 (Gene Bank, no. de acceso AF30888) de 2002 pb y otra fue UT8 (Gene Bank, no. de acceso AF030889) de 1620 pb, las cuales tienen 14 y 22 RT respectivamente. Ambas secuencias fueron clonadas en el vector replicativo pCM201 y en el vector no replicativo pCM201-A. A las construcciones obtenidas se les dio el nombre de pCUT7, pCUT7-A, pCUT8 y pCUT8-A (Tabla 2, Fig. 11 a 15).

Tabla 2: Características de las construcciones utilizadas en este trabajo.

Construcción	<i>UARS1</i>	Secuencia Clonada	No. de Repetido telomérico	Marcador de selección	Referencia
pCM201	Si	-	0	<i>LEUI</i>	Onel <i>et al.</i> 1995
pCM201-A	-	-	0	<i>LEUI</i>	Sanchez Alonso, 1996
pCUT8	si	UT8	22	<i>LEUI</i>	Este trabajo
pCUT8-A	-	UT8	22	<i>LEUI</i>	Este trabajo
pCUT7	si	UT7	14	<i>LEUI</i>	Este trabajo
pCUT7-A	-	UT7	14	<i>LEUI</i>	Este trabajo

pCUT7 y pCUT8 son los vectores replicativos, mientras que pCUT7-A y pCUT8-A son los vectores no replicativos. pCM201 es nuestro control replicativo y pCM201-A nuestro control integrativo.

Las construcciones se utilizaron para transformar genéticamente la cepa *UCM104* y registrar los cambios en los valores de frecuencia de transformación genética y de estabilidad mitótica; al realizar la prueba se utilizaron como controles los vectores pCM201 y pCM201-A. Antes de proceder se cuantificó la concentración de los plásmidos, los cuales deberían estar purificados y libres de RNA. Los plásmidos fueron cuantificados utilizando un Fluorómetro (BIO-RAD, Versa FluorTM, Fluorometer) y posteriormente se ajustó la concentración a 500ng/μl. La transformación fue realizada como se describe en material y métodos.

La frecuencia de transformación obtenida con el control replicativo pCM201 fue designada arbitrariamente como 100%. Los porcentajes de transformantes obtenidas con cada uno de los plásmidos restantes se expresaron como el número de transformantes obtenidas por μg

de DNA de cada uno de los plásmidos entre el número de transformantes obtenidas por μg de DNA del control pCM201 y multiplicado por 100. El plásmido pCM201-A fue utilizado como control para los vectores no replicativos (vectores que carecen de secuencia de replicación autónoma (*ARS*), y la frecuencia de transformación con este tipo de construcciones generalmente es inferior al 1%.

Las colonias transformantes de los plásmidos pCUT7, pCUT7-A, pCUT8 y pCUT8-A crecieron a los cinco días después de realizar la transformación, mientras que las transformantes con los plásmidos pCM201 y pCM201-A crecieron a los cuatro días. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 3.

Tabla3: Frecuencia de Transformación y Estabilidad Mitótica de los plásmidos pCUT7, pCUT7-A, pCUT8 y pCUT8-A al ser transformados en *U. maydis*.

Construcción	No. De Transformantes Por μg De DNA*	Frecuencia De Transformación	Estabilidad Mitótica (%)
pCM201	8648	100%	30
pCM201-A	138	1.59%	100
pCUT8	7656	88.52%	58.83
pCUT8-A	248	2.87%	66.5
pCUT7	7484	86.54%	33
pCUT7-A	357	4.12%	64.5

*Los resultados son el promedio de tres ensayos realizados, y cada ensayo se realizó por duplicado

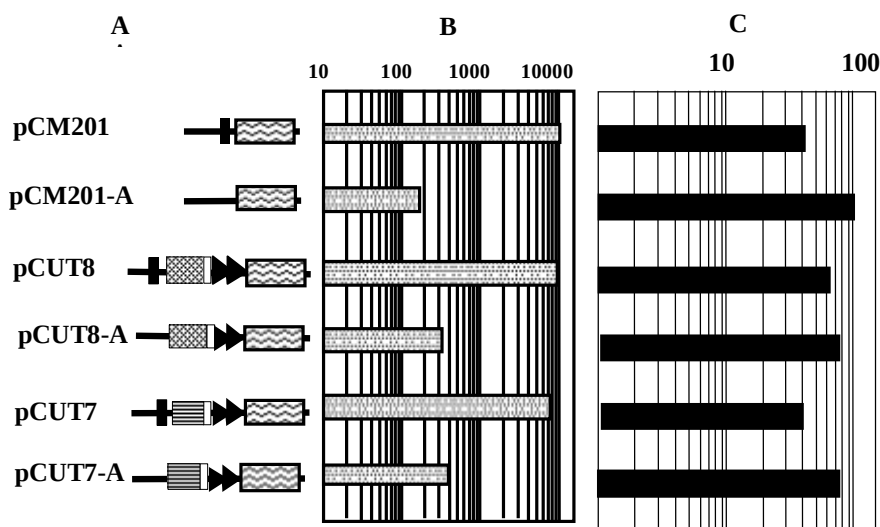
La frecuencia de transformación de los vectores no replicativos fue de 138 transformantes para pCM201-A, 248 para pCUT7-A y 357 para pCUT8-A, estos resultados son congruentes con lo esperado, sin embargo difiere un poco de lo reportado por Fotheringham and Holloman (1990), quien encuentra 10 transformantes/ μg de DNA para vectores no replicativos. Los resultados reportados para el vector control, aquí presentan un aumento mayor a 10 veces, cuestión que se discutirá en la siguiente sección, sin embargo, persiste un ligero aumento en la frecuencia de transformación de los plásmidos portadores de secuencias del extremo cromosomal previamente reportado, y que aquí es de 2.87% para pCUT7 y de 4.12 % para pCUT8-A (Fig. 16 B).

La frecuencia de transformación para el control pCM201 y los plásmidos replicativos pCUT7 y pCUT8 (8648, 7656 y 7484 transformantes respectivamente) muestran una diferencia de 11.48 y 13.46% respectivamente. Este decremento en la frecuencia de transformación respecto

del control parece ser parte de un efecto por posición del telómero residual, que persiste después de agrandar la distancia entre el repetido telomérico y *UARS1*.

Para conocer en qué medida la presencia de secuencias del extremo cromosomal influyeron en el mantenimiento del plásmido en la población de transformantes se procedió a determinar la estabilidad mitótica. La estabilidad mitótica de un plásmido se define por el porcentaje de las células de una población que retienen un plásmido cuando son crecidas en ausencia de presión de selección. La estabilidad mitótica, al igual que el índice de pérdida de cualquier plásmido, se ve afectada por parámetros como nivel de expresión del marcador de selección, eficiencia de replicación y eficiencia en la segregación del plásmido. Si un plásmido no replicativo se encuentra en estado episomal, su estabilidad mitótica es prácticamente nula; por otra parte un plásmido no replicativo se integra a los cromosomas, su estabilidad mitótica es la misma que la de los cromosomas, prácticamente 100%. En la tabla 3 se muestran los resultados de estabilidad mitótica y la grafica de estos resultados y de la frecuencia de transformación en la figura 16.

Figura 16: Gráfico de los resultados obtenidos en frecuencia de transformación y estabilidad mitótica de la secuencia *UTASb* de *U. maydis*.



A) Representación esquemática de los plásmidos utilizados en la transformación de *U. maydis*, las líneas delgadas horizontal indican las secuencias del plásmidos, los rectángulos con rayas onduladas representa al gen *LEU1*, Los triángulos negros representan al repetido telomérico, los rectángulos blancos a la secuencia *rumT*, rectángulos rellenos de rombos a la secuencia *UT7* y rectángulos rallados a la secuencia *UT8*. **B)** Frecuencia de transformación de los plásmidos analizados en este trabajo. **C)** Mediana de la estabilidad mitótica de las transformantes en porcentaje (análisis no paramétrico). Los resultados de frecuencia de transformación y estabilidad mitótica están graficados en ciclos de escala logarítmica.

Para determinar la estabilidad mitótica se procedió como se describe en material y métodos, utilizando seis transformantes elegidas al azar de cada uno de los plásmidos estudiados en este trabajo (CUT7, pCUT7-A, pCUT8, pCUT8-A), así como el de los controles pCM201 y pCM201-A.

En este trabajo se encontró que la estabilidad mitótica para las transformantes del control pCM201-A fue del 100%, lo que sugería la integración del vector en el genoma de *Ustilago maydis*. Los resultados de estabilidad mitótica para los plásmidos no replicativos que portan al elemento *UTASb* (pCUT7-A y pCUT8-A) tuvieron una media de 66.5 y 64 % con una dispersión de valores que abarcó todo el rango desde 0% hasta el 100%, presentando un comportamiento en general más estable a través de rondas sucesivas de replicación mitótica que las de los vectores replicativos portadores de la secuencia *UTASb* (pCUT7 y pCUT8). Estos plásmidos presentaron una estabilidad mitótica media de 58.83 y 33 % con una dispersión de valores también muy alta, que difiere en mucho del 30% de estabilidad mitótica que de manera homogénea mostró el control pCM201 en sus transformantes.

De estos resultados se concluye que el único efecto por la adición de las secuencias *UTASb* a las secuencias *rumT+RT* es la de disminuir el efecto por posición del telómero (TPE) que parece ejercer sobre *UARS1*. Esto parece llevarse a cabo sin disminuir lo que parece un efecto estabilizador por unión de proteínas de unión a telómero que de manera equilibrada siempre mantiene un nivel mínimo de frecuencia de transformación superior al del control 201-A.

El elemento *UTASb* en plásmidos replicativos para *U. maydis* permanece en estado episomal.

Los resultados anteriores nos llevaron a analizar el destino de los plásmidos en las transformantes obtenidas con pCUT7, pCUT7-A, pCUT8 y pCUT8-A. Se examinaron cinco transformantes a las que se les determinó la estabilidad mitótica para esclarecer el tipo de evento ocurrido durante la transformación. Se digirió 1 µg de DNA total libre de proteínas y RNA con dos enzimas por separado: una enzima que puede linearizar el plásmido (*KpnI*) y otra enzima que no corta al plásmido (*BamHI* y *EcoRV*) pero que si digiere el DNA del hongo. Al digerir con una enzima que lineariza el plásmido se puede determinar cualquier cambio de su tamaño cuando se encuentra en estado episomal; al digerir con una enzima que no corta el plásmido se puede determinar si el plásmido se encuentra integrado al genoma del hongo, y para ambos casos, el uso

de sondas específicas nos indica aproximadamente si los plásmidos se encuentran en estado episomal o integrados.

Los digeridos genómicos con las enzimas mencionadas se resolvieron por electroforesis en geles de agarosa al 0.8%, y fueron transferidos a membranas de nylon. Las hibridaciones se realizaron con dos sondas: la primera sonda fue un fragmento *SalI* de 1500 pb del gen *LEUI* aislado del vector pCM201 (en adelante sonda L) y la segunda sonda fue el plásmido pBluescript KS- linearizado. Como control utilizamos DNA genómico de UCM-104 sin transformar. En el ensayo también se utilizó el DNA de transformantes obtenidas de los vectores control pCM201 y pCM201-A.

La figura 17 muestra el patrón de hibridación del DNA de las transformantes obtenidas con el plásmido pCUT8. En el panel A de lado izquierdo se muestran los digeridos de DNA total de las transformantes con la enzima *KpnI* teñido con bromuro de etidio. El patrón de hibridación de los digeridos con la sonda KS- y la sonda L se muestran al centro y a la derecha respectivamente; en ambos casos se observa una señal de aproximadamente 8kb, tamaño similar al plásmido linearizado, en el patrón de hibridación también se observa una señal con un peso superior a 12 kb que corresponde al gen endógeno *leu1-1* de *U. maydis*. Estos resultados sugieren que la construcción se encuentra en un estado episomal. Para corroborar estos resultados el DNA total se digirió con *EcoRV*, endonucleasa que no corta el plásmido (Fig. 17, panel B). En el panel de la figura 17 de lado izquierdo se observa a los digeridos genómicos con la enzima *EcoRV* teñidos con bromuro de etidio, en el centro y de lado derecho se muestra el patrón de hibridación con la sonda KS- y la sonda L respectivamente. En el patrón de hibridación con la sonda KS- (Fig. 17, panel B, centro) se observa nuevamente una señal de tamaño aproximado a 8 kb similar al tamaño del plásmido digerido con la enzima *EcoRV*, y con la sonda L se muestra una banda del mismo tamaño pero también una señal de aproximadamente 4 kb que corresponde al gen endógeno *leu1-1* de *U. maydis*. En ninguno de los dos ensayos se observaron cambios en el tamaño, lo que sugiere que el plásmido se encuentra en estado episomal. El Southern blot del cariotipo electroforético de estas transformantes con la sonda KS- en la figura 19-A (centro) muestra un patrón de bandeo que no corresponde a alguno de los cromosomas de *U. maydis*, y con la sonda L (derecha) se observa al gen endógeno *LEU1* en el cromosoma III de *U. maydis* (tercer cromosoma más pequeño, con un tamaño estimado de 450 kb) donde las bandas

observadas ya sea con la sonda KS- o con la sonda L no coinciden con la zona de resolución de alguno de los cromosomas de *U. maydis*.

Este tipo de migración puede ser obtenido cuando un plásmido está covalentemente cerrado ya que no migra de manera proporcional a su tamaño en un gel de campos pulsados (Hightower, Metge and Santi 1987; Beverley 1988).

En el caso de las transformantes con pCUT7 (Fig. 18, paneles A y B) los resultados fueron similares a los obtenidos con el plásmido pCUT8. Los digeridos de DNA total con la enzima *KpnI* teñidos con bromuro de etidio (Fig. 18, panel A, lado izquierdo), se transfirieron a nylon (GeneScreen, Perkin Elmer Life Sciences) y se hibridaron con la sonda KS- (Fig. 18, panel A, centro) y con la sonda L (Fig. 18, panel A, lado derecho). Los patrones de hibridación se analizaron y se encontró que con la sonda KS- los digeridos muestran una señal de hibridación de 8 Kb aproximadamente que aparentemente corresponde al plásmido linearizado, y con la sonda L presenta la misma señal de 8Kb aproximadamente, y otra más sutil de tamaño superior a 12 Kb que corresponde al gen *leu1-1* endógeno de *U. maydis*. Estos resultados nos indican nuevamente que el plásmido se encuentra en estado episomal, sin embargo se verificó el resultado mediante análisis Southern blot utilizando una enzima que no cortara el plásmido. Los digeridos de DNA total (Fig. 18 panel B, carriles 2-6) con la enzima *BamHI* fueron resueltos por electroforesis y teñidos con bromuro de etidio (Fig. 18, panel B, lado izquierdo), el patrón de hibridación de éstos con la sonda KS- (Fig. 18, panel B, centro) y con la sonda L (Fig. 18, panel B, lado derecho) se muestran. Con la sonda KS- en los carriles 2, 3, 5 y 6 se muestran señales de hibridación sobre dos zonas de resolución que coinciden con la de las formas topológicas del plásmido sin linearizar una de 6 Kb aproximadamente y otra de un tamaño superior a 12 Kb. Aunque no se ha reportado si se conserva la topología de las secuencias extracromosomales durante su replicación en *Ustilago maydis*, los datos aquí obtenidos sugieren esta posibilidad. De manera interesante la transformante CUT73 (Fig. 18, paneles A y B, carril 4) mostró un desplazamiento de una de estas señales hacia una zona de resolución de alto P.M. (y de tamaño superior a los 12 Kb). De manera congruente el patrón de hibridación con la sonda L (Fig. 18, panel B, izquierda) nos muestra las mismas señales obtenidas con KS-, más la señal de hibridación del gen *leu1-1* endógeno (tamaño aproximado de 10 Kb). Estos resultados nos confirman que el plásmido se encuentra en estado episomal, y sugiere la posibilidad de que se encuentre superenrollado. Una posible explicación de lo que sucede con el plásmido en la transformante CUT73 es la formación de estructuras de

alto peso molecular como concatameros, los cuales se forman de manera espontánea con DNA linearizado en *Ustilago maydis* (Fotheringham and Holloman, 1990), posiblemente debido a la apertura también espontánea de plásmidos portadores de telómero (García-Pedrajas and Roncero, 1996; Cooke, 1995). Esto también explica la amplificación de pCUT7 en la transformante CUT73 (Fig. 18, panel A, carril 4 de imágenes central y derecha).

En la figura 19, paneles A y B se muestra el análisis Southern blot del cariotipo electroforético (paneles A y B, lado izquierdo) de las transformantes con los plásmidos pCUT7 y pCUT8. Los patrones de hibridación con la sonda KS- (paneles A y B, centro) y sonda L (paneles A y B, lado derecho), presentan en ambos casos, señales de hibridación sobre zonas de resolución diferentes al del cromosoma III y en algunos casos claramente visibles, sobre zonas que no corresponden a ningún otro cromosoma del complemento en *U. maydis*. Para el caso particular de pCUT7 (Fig. 19, panel B, carriles 2-6), las señales provenientes del plásmido y del gen endógeno pueden discriminarse fácilmente.

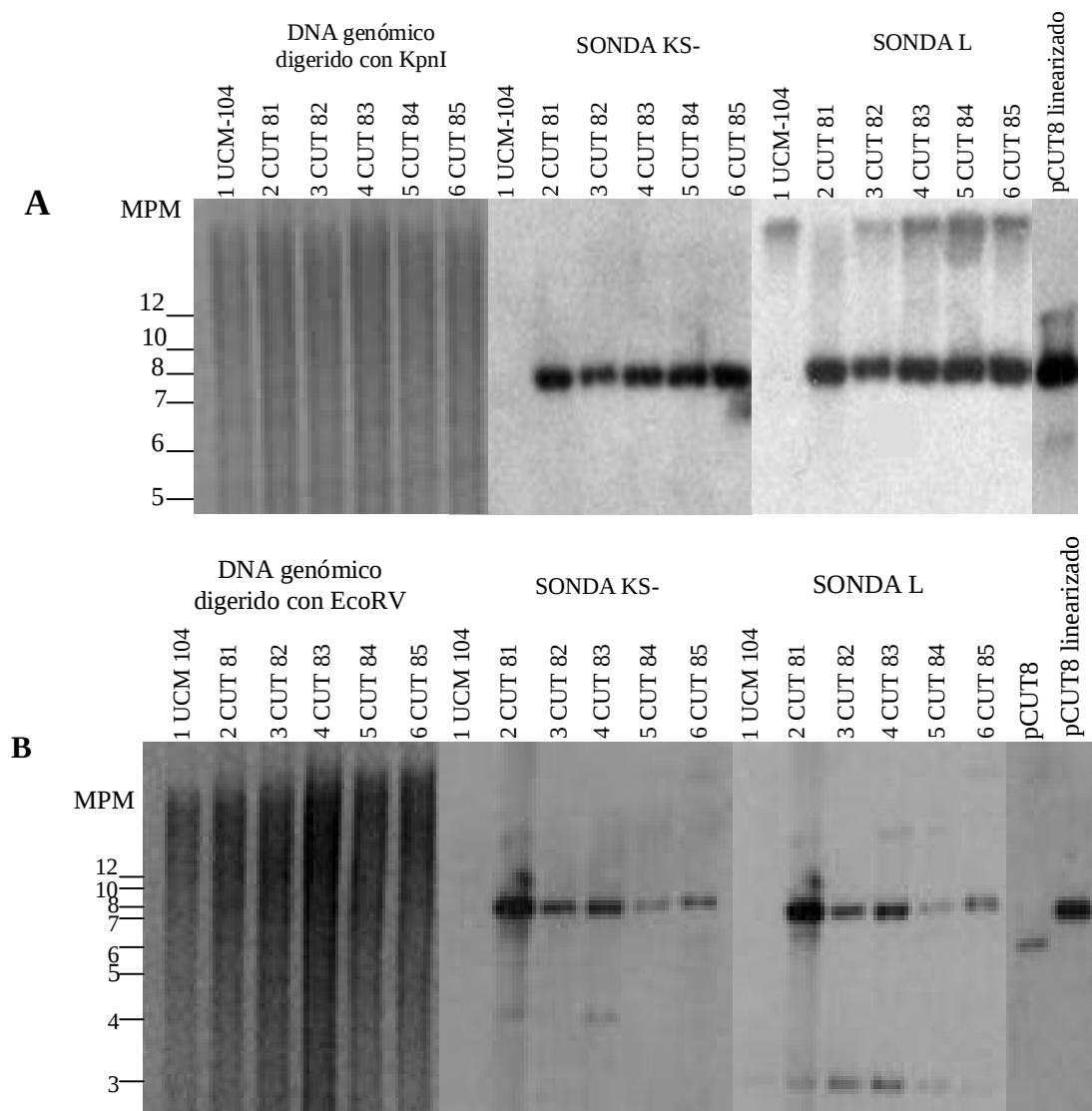


Fig. 17: Análisis Southern blot de las transformantes obtenidas con la construcción pCUT8. Panel A: DNA total de 5 transformantes elegidas al azar fueron digeridas con la enzima *KpnI* resuelto por electroforesis y teñido con bromuro de etidio (izquierda). En el panel B con la enzima *EcoRV*. El DNA fue transferido a una membrana de nylon e hibridado con una sonda de DNA plasmídico KS- linealizado o con un fragmento *SalI* de 1500 pb del gen *LEU1*. En ambos paneles se muestra el padrón de hibridación con la sonda KS- (centro) y la sonda L (derecha)

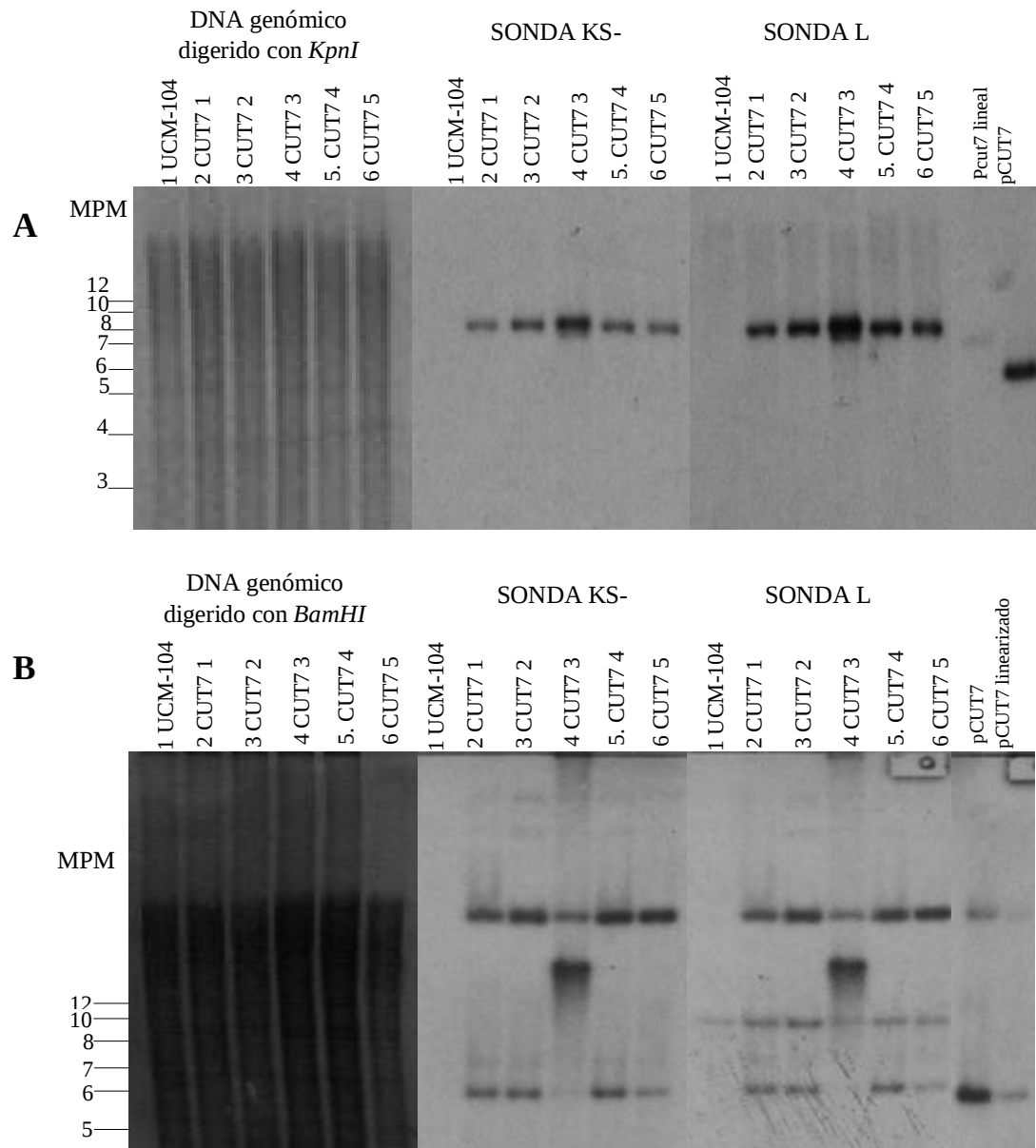


Fig. 18: Análisis Southern blot de las transformantes obtenidas con la construcción pCUT7. Panel A: DNA total de 5 transformantes elegidas al azar fueron digeridas con la enzima *KpnI* resuelto por electroforesis y teñido con bromuro de etidio (izquierda). En el panel B con la enzima *BamHI*. El DNA fue transferido a una membrana de nylon e hibridado con una sonda de DNA plasmídico KS- linealizado o con un fragmento *SalI* de 1500 pb del gen *LEU1*. En ambos paneles se muestra el padrón de hibridación con la sonda KS- (centro) y la sonda L (derecha)

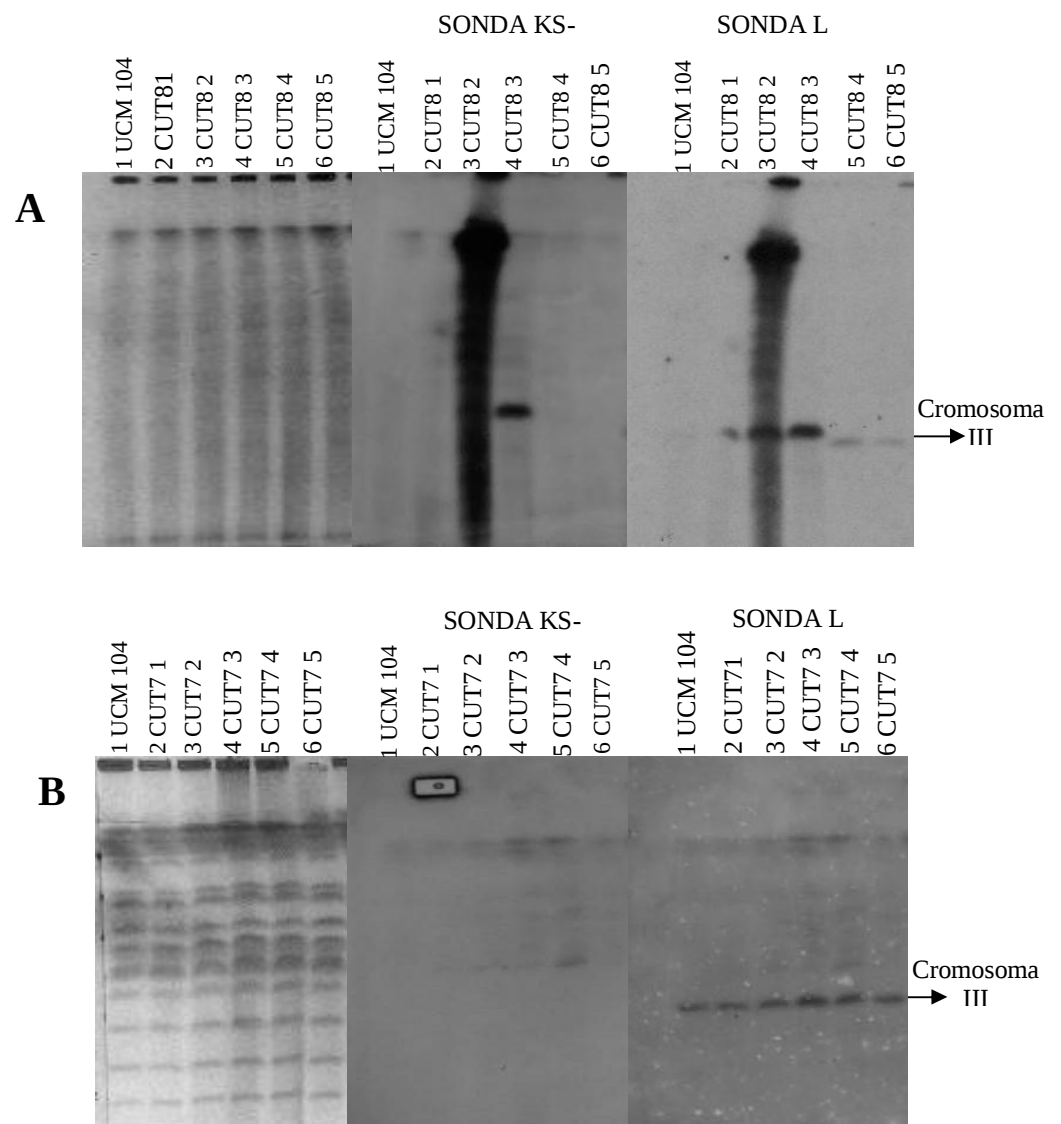


Figura 19: Hibridación tipo Southern blot de los Cariotipos Electroforéticos de las transformantes obtenidas con las construcción pCUT8 (A) y pCUT7 (B). En ambos paneles se muestra el patrón de hibridación con las sondas KS- (Izquierda) y la sonda L (derecha).

El elemento *UTASb* en plásmidos no replicativos forma rearrreglos en el genoma de *U. maydis*.

Respecto a la presencia de los extremos cromosomales CUT7 y CUT8 sobre plásmidos no replicativos, los resultados fueron interesantes: de acuerdo a los datos genéticos se obtiene una estabilización sutil e inconstante del plásmido, se disminuye (pero no totalmente) el efecto TPE, y se obtienen transformantes aparentemente capaces de replicarse. El análisis Southern blot de las transformantes sugiere que los mecanismos que subyacen para este efecto pueden ser aperturas, rearrreglos y formación de estructuras concataméricas por recombinación ilegítima como las descritas previamente por Holloman (Fotheringham and Holloman, 1990), de las cuales también hay hallazgos que sugieren que puede estar acoplada a una replicación no convencional.

Los digeridos genómicos de seis transformantes obtenidas con el plásmido pCUT8-A, con la enzima *KpnI* (que lineariza al plásmido) se muestran en la figura 20, panel A, y con la enzima *BamHI* en el panel B de la misma figura. Estos fueron resueltos por electroforesis como se indica en materiales y métodos y teñidos con bromuro de etidio (Fig. 20 paneles A y B, izquierda). Estos mismos fueron transferidos a Nylon (GeneScreen, Perkin Elmer Life Sciences) e hibridados con las sondas KS- (Fig. 20 paneles A y B, centro) y sonda L (Fig. 20 paneles A y B, derecha) anteriormente descritas. El patrón de hibridación de pCUT8-A en las transformantes (Fig. 20, paneles A y B carriles 2-7) con la sonda KS-, exhibe en los seis casos una señal de hibridación del tamaño del vector linearizado (mostrada en un extremo de la figura), esta señal sugiere la amplificación del plásmido en diferentes cantidades dentro de las transformantes (compare carriles 2, 3, 4 y 7 con los carriles 5 y 6). También se observan señales sobre zonas de resolución de menor masa molecular en los carriles 3 y 6 que sugieren rearrreglos del plásmido. Estas señales son congruentes con las que se exhiben cuando se híbrida el DNA del filtro con la sonda L (Fig. 20, panel A, derecha). En este caso el patrón de señales prácticamente no cambia, excepto en las transformantes pCUT8-A2, y pCUT8-A5 (carriles 3 y 6) donde se pierden las señales de los fragmentos de menor tamaño y aparece la señal (pCUT8-A2) de un fragmento de tamaño aproximado de 3.5 kb. En todos los casos aparece la señal del gen endógeno *leu1-1*, la cual en los carriles 6 y 7 muestran un sutil desplazamiento hacia una zona de resolución de menor masa molecular que posiblemente sea artefactual. Estos resultados sugieren que el plásmido sufrió una serie de rearrreglos que posiblemente propiciaron su permanencia dentro de la célula.

El patrón de hibridación (Fig. 20, panel B) de digeridos de DNA total con *EcoRV* que no corta sobre el plásmido refuerza la hipótesis de que el plásmido se encuentra rearmado. En la figura 20, panel B, al centro se muestra el patrón de hibridación con la sonda KS- y a la derecha con la sonda L. Las señales de hibridación de pCUT8-A con la sonda KS- fueron múltiples sobre diferentes zonas de resolución, principalmente sobre zonas de alto peso molecular (Fig. 20 panel B, centro, carriles 2, 4, 6 y 7), y algunas de menor peso molecular que pCUT8 (Fig. 20, panel B, centro, carriles 2, 3, y 4), también se observa eventos de reamplificación del plásmido (carriles 2, 3 y 4 de la misma figura). Esos rearmados posiblemente no involucran la integración homóloga sobre el alelo endógeno *leu1-1* que es la región de mayor homología del plásmido con el genoma del hongo, pues la señal del gen endógeno no sufre desplazamientos. Aunque no se descarta este tipo de eventos, es mucho más probable un evento de integración ectópica por recombinación no homóloga en las transformantes CUT8-A2, y CUT8-A3 (carriles 3 y 4), o en la persistencia de la forma episomal en CUT8-A5 por el tipo de señales obtenidas. Sin embargo, la presencia de señales definidas del peso molecular del plásmido linealizado en el panel A y la presencia de múltiples señales en zonas de resolución de alto peso molecular en las transformantes CUT8-A1, CUT8-A3, CUT8-A5, y CUT8-A6 (Fig. 20, panel B, centro y derecha, carriles 2, 4, 6, y 7), nos sugiere también, y fuertemente un estado intermediario en la formación de concatámeros lineales autorreplicables. Los resultados del cariotipo electroforético muestran señales de hibridación sobre zonas de resolución que no corresponden con cromosomas del hongo (Fig. 22 A carriles 2-7) cuando se utiliza la sonda KS- (centro), o la sonda L (derecha). Por otro lado, se tienen evidencias de estructuras lineales de tamaños de aprox. 100 kb, que se forman en transformantes con plásmidos no replicativos en trabajos anteriores (dato no mostrado). La presencia de este tipo de estructuras, y la amplificación del plásmido nos dejan en este momento solo con la idea de la persistencia rearmada de los plásmidos de manera diferente a la que se encuentra con el plásmido control pCM201-A (dato no mostrado). Para conocer el tipo de rearmados formados, se necesitaría realizar una serie de digestiones con enzimas que corten en el interior de la secuencia y analizar el patrón de señales de hibridación para poder decir si los rearmados se encuentran integrados ectópicamente, si lo hicieron en tándem, si se encuentran en la misma dirección o en forma invertida, etc.

Los resultados del análisis de las transformantes con el plásmido pCUT7-A (Figura 21, paneles A y B) fueron similares a los descritos anteriormente y refuerzan la idea de la apertura

espontánea de la construcción y la formación de concatámeros. En la figura 21, en el lado izquierdo de ambos paneles se muestra la tinción con bromuro de etidio de los digeridos del DNA total de las transformantes y del control, con las enzimas *KpnI* que lineariza la construcción (panel A), y *BamHI* (que no corta el plásmido). Al igual que en los casos anteriores, en el centro se muestran los patrones de hibridación de los mismos digeridos con las sondas KS- (centro) y sonda L (lado derecho). En la figura 21, panel A, carriles 2, 4 y 6 se muestran señales similares al plásmido linearizado, y en los carriles 2 y 4, también se muestran bandas adicionales de fragmentos de DNA de menor o mayor tamaño. En el panel A al centro y derecha, en el carril 3, (transformantes CUT7-A2) las señales de hibridación provienen de fragmentos de tamaños que no corresponden al plásmido pCUT7-A y en el carril 5 (CUT7-A4) la señal es del tamaño del plásmido no linearizado. El patrón de hibridación con la sonda L mostró básicamente el mismo resultado, y confirma que no hubo eventos de recombinación homóloga sobre el alelo *leu1-1*. Los resultados de las transformantes CUT7-A2, y CUT7-A4, pueden ser compatibles o ajustarse a eventos de delección (el primero) y o con eventos de integración ectópica (el segundo). En general el plásmido parece haber sido amplificado. Estos resultados coinciden con los obtenidos de las transformantes de pCUT7-A cuando se digirió con una enzima que no corta el vector. En este caso las transformantes pCUT7-A1, pCUT7-A3, y pCUT7-A5 (Fig. 21, panel B, centro y derecha, carriles 2, 4 y 6) muestran una señal de hibridación sobre una zona de resolución de masa molecular muy alta, o fragmentos de un tamaño mayor a 12 kb. Estas señales coinciden con la noción de la formación de concatámeros lineales y refuerzan la idea de una delección y de integración no homóloga. Tanto en el panel A como en el panel B (Fig. 21) el gen endógeno *leu1-1* muestra señales de hibridación del mismo tamaño que el control y no hay modificación en la intensidad de su señal.

La figura 22, paneles A y B muestra el análisis Southern blot del cariotipo electroforético de las transformantes con los plásmidos pCUT8-A y pCUT7-A (lado izquierdo del panel A y B). Los patrones de hibridación con la sonda KS- (paneles A y B, centro) y sonda L (paneles A y B, lado derecho), presentan en ambos casos, señales de hibridación sobre zonas de resolución del cromosoma III y en algunos casos claramente visibles, sobre zonas que corresponden a algún otro cromosoma del complemento en *U. maydis*. Para el caso particular de pCUT8-A (Fig. 22, panel A, carriles 2-6), las señales provenientes del plásmido y del gen endógeno pueden discriminarse fácilmente.

Los resultados hasta aquí obtenidos nos dan una idea general de la dinámica de los plásmidos que portan secuencias de la región telomérica. Estos resultados son de alguna manera similar a los encontrados previamente para transformantes con vectores portadores de *rumt*+*RT*+*UTASa*, y en ambos casos descartan la posibilidad de una función similar a la de centro X. Nuestros resultados también refuerzan la idea de que la función de *rumT* sea similar o equivalente a la del centro X de *Saccharomyces cerevisiae* (Anastacio-Marcelino *et al*, 2002), lo cual abre la perspectiva de construir vectores con marcadores de selección apropiados para el estudio de esta secuencia como protosilenciador.

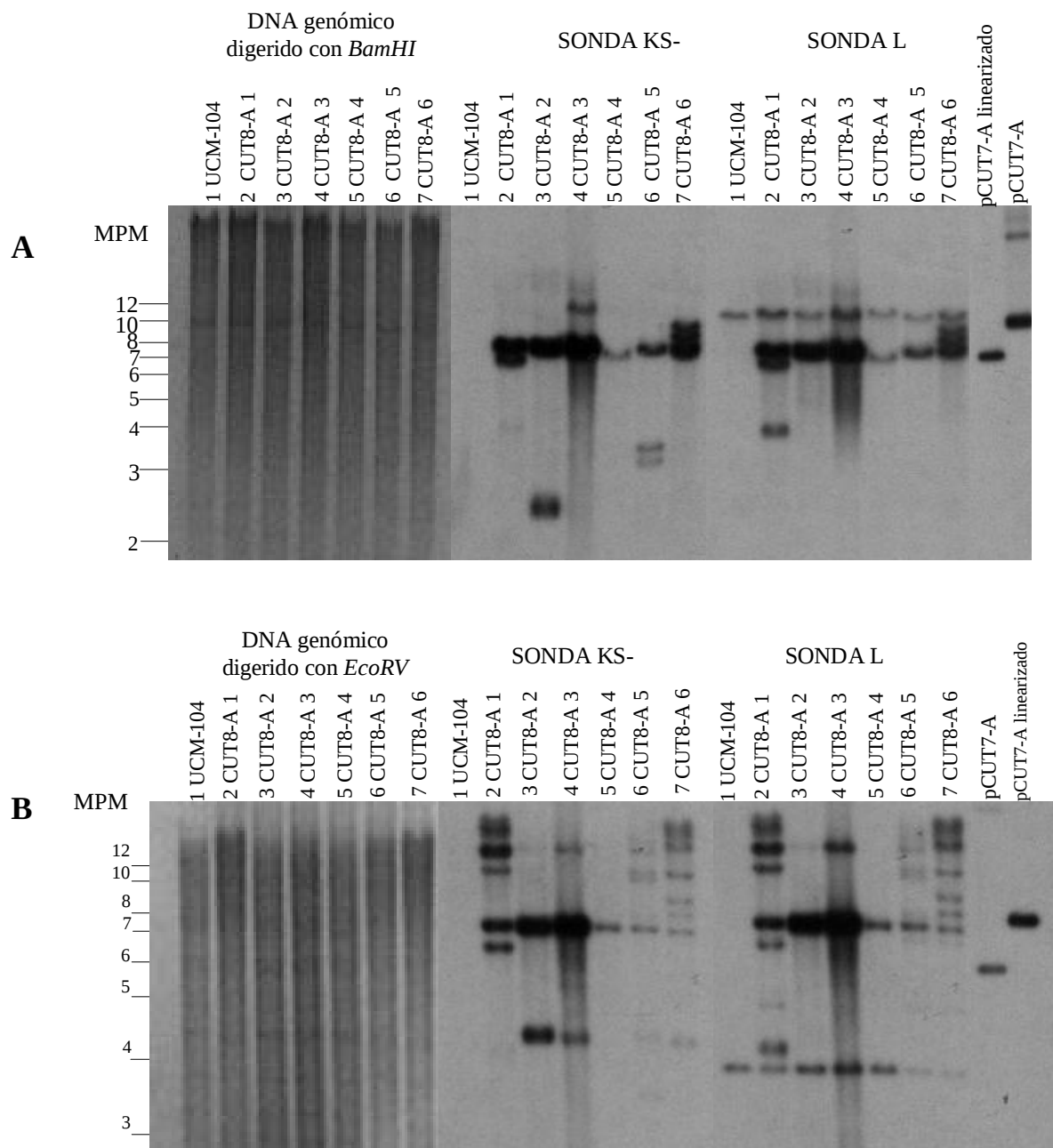


Fig. 20: Análisis Southern blot de las transformantes obtenidas con la construcción pCUT8-A. Panel A: DNA total de 6 transformantes elegidas al azar fueron digeridas con la enzima KpnI resuelto por electroforesis y teñido con bromuro de etidio (izquierda). En el panel B con la enzima EcoRV. El DNA fue transferido a una membrana de nylon e hibridado con una sonda de DNA plasmídico KS- linealizado o con un fragmento SalI de 1500 pb del gen *LEU1*. En ambos paneles se muestra el padrón de hibridación con la sonda KS- (centro) y la sonda L (derecha)

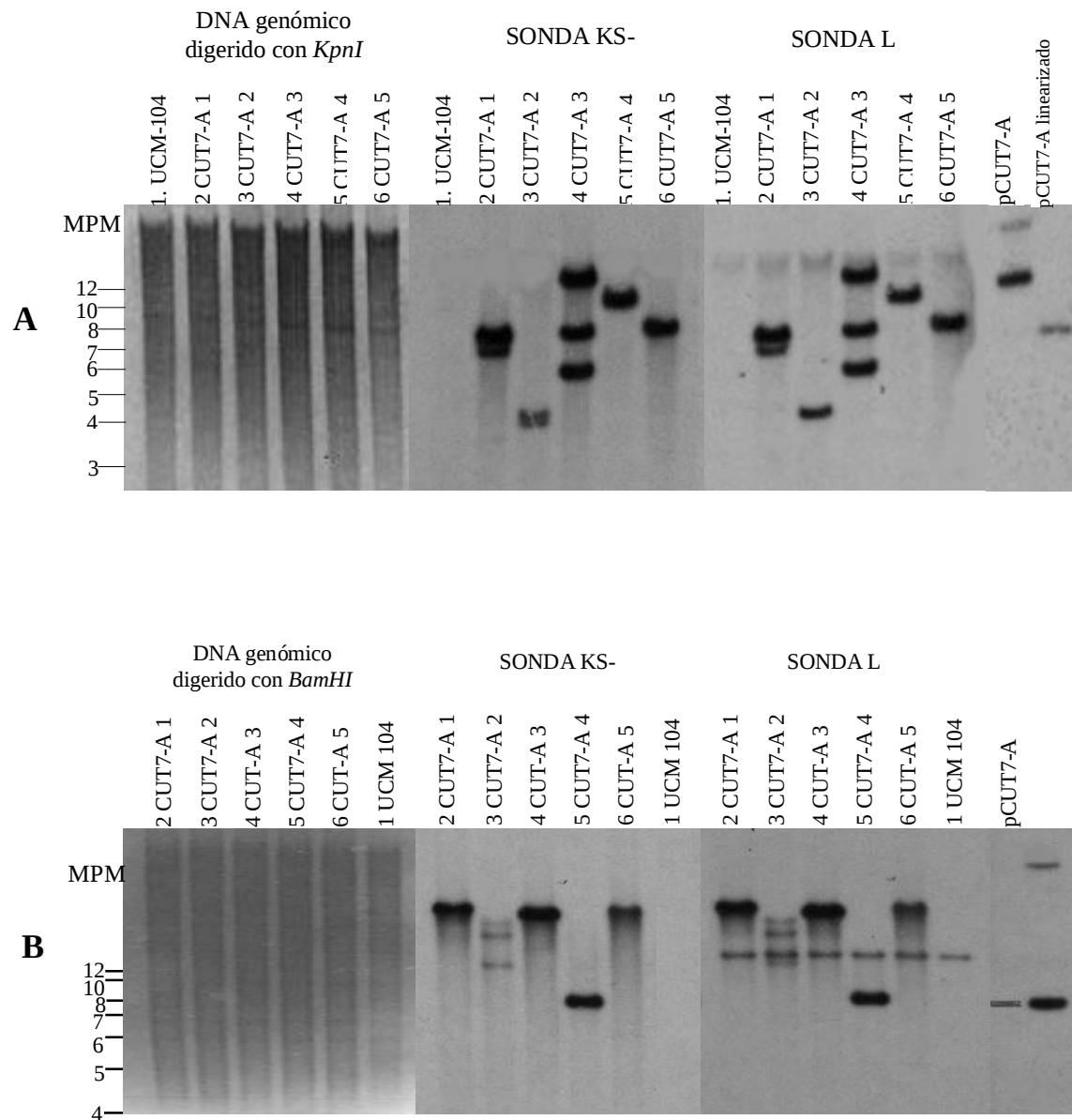


Fig. 21: Análisis Southern blot de las transformantes obtenidas con la construcción pCUT7-A. Panel A: DNA total de 5 transformantes elegidas al azar fueron digeridas con la enzima *KpnI* resuelto por electroforesis y teñido con bromuro de etidio (izquierda). En el panel B con la enzima *BamHI*. El DNA fue transferido a una membrana de nylon e hibridado con una sonda de DNA plasmídico KS- linearizado o con un fragmento *SalI* de 1500 pb del gen *LEU1*. En ambos paneles se muestra el padrón de hibridación con la sonda KS- (centro) y la sonda L (derecha)

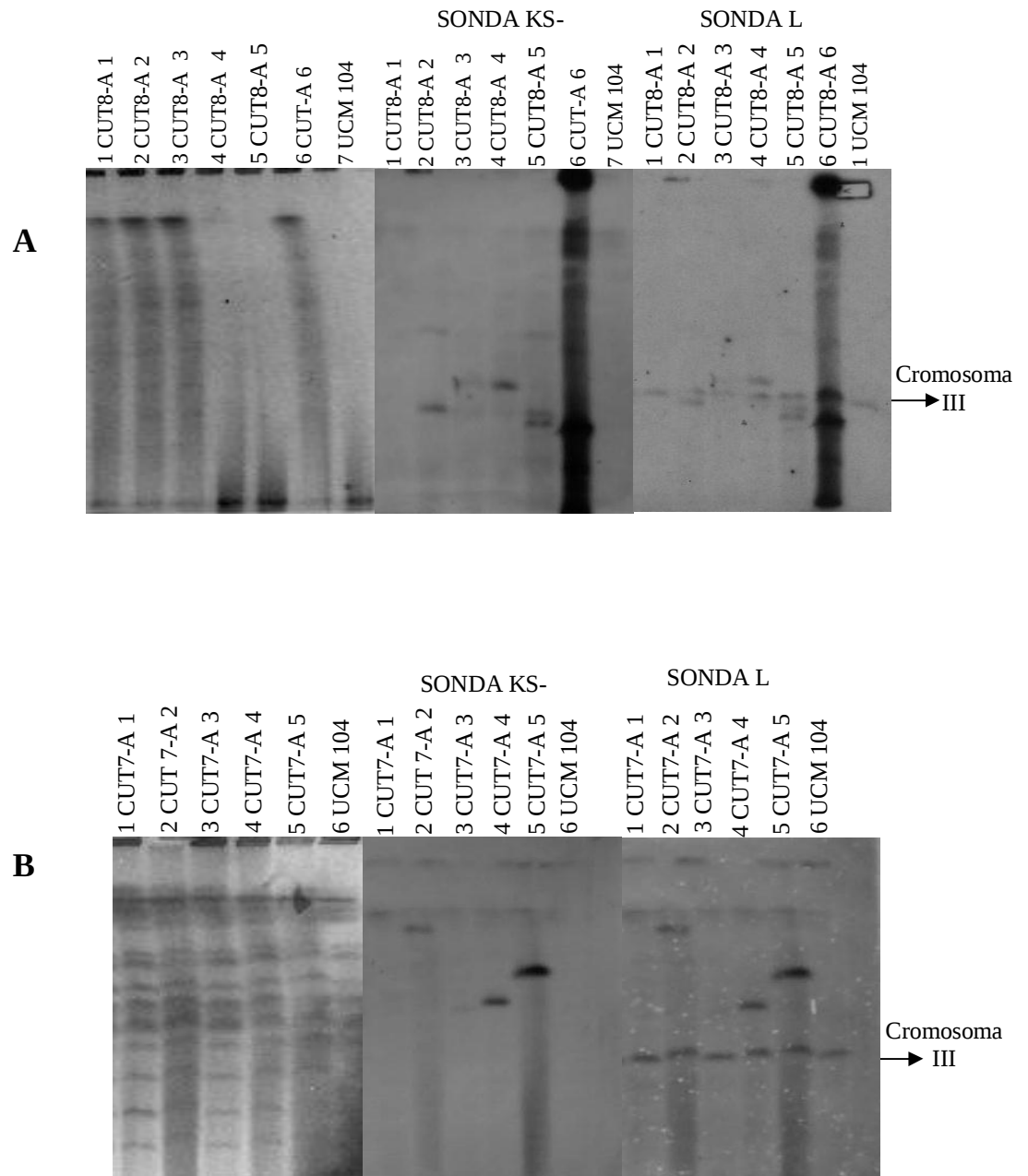


Fig. 22: Hibridación tipo Southern blot de los Cariotipos Electroforéticos de las transformantes obtenidas con las construcción pCUT8 (A), pCUT8-A (B), pCUT7 (C) y pCUT7-A (D). En ambos paneles se muestra el patrón de hibridación con las sondas KS- (Izquierda) y la sonda L (derecha).

DISCUSION

El estudio de la región subtelomérica de diversos organismos, incluyendo levaduras, ha ido aumentando en los últimos años, con el fin de conocer la relación estructural-funcional y la organización de las secuencias medianamente repetidas mejor conocidas como Secuencias Asociadas a Telómero (TAS) que la conforman (Brown et al, 1990; Louis et al, 1994). En levaduras, y prácticamente en todos los organismos que las poseen, las TAS varían en número de cromosoma a cromosoma, y entre cepas, además en muchos casos se pueden encontrar tramos cortos de repetidos teloméricos entre estas secuencias medianamente repetidas (Louis *et al*, 1994).

La función de las secuencias asociadas a telómero ha sido un punto de discusión y se han establecido modelos particulares de organismo a organismo en los cuales se trata de dar una explicación a la presencia de estas secuencias (aparentemente dispensables) sobre el extremo cromosomal (Louis 1994; Lundblad and Blackburn, 1993; Zakian 1996 y Muñoz-Jordán *et al*, 2001). En cualquiera de los casos las investigaciones convergen hacia la participación de estas secuencias como protosilenciadores y como espaciadores que delimitan los efectos de la función estabilizante de la región telomérica sobre las secuencias más próximas a éste (Fourel 1999, 2002b), y lo colocan como sitio preferido para eventos de recombinación (Craven and Petes 1999), posiblemente como un reflejo de del mantenimiento dinámico que la célula propicia sobre esa región esencial.

Previamente se ha ido analizando cual podría ser el papel de las secuencias de la región subtelomérica de *Ustilago maydis* (Sánchez-Alonso, 1997; Rendón-González 2001; Anastacio-Marcelino 2001 y Torres-Solís 2004). En este trabajo nuestro objetivo principal fue analizar el papel funcional de *UTASb* de *U. maydis* y determinar si al igual que el elemento X de *Saccharomyces cerevisiae* son capaces de modificar la frecuencia de transformación (FT) y estabilidad mitótica (EM) de vectores replicativos (Fotheringham and Holloman 1991) y no replicativos, además estos datos fueron corroborados mediante el análisis molecular de los plásmidos en las transformantes de *U. maydis*.

Nuestros resultados de manera general indicaron que el papel de *UTASb* en *Ustilago maydis* no es equivalente al de Centro X de *Saccharomyces cerevisiae* por dos razones principales: (1) aunque estructuralmente son similares, el Core X sostiene el efecto silenciador

del repetido telomérico en *S. cerevisiae* (Fourel, 1999), mientras en *Ustilago maydis* la presencia de *UTASb* interpuesto entre RT y *UARS1* alivia el efecto represor sobre el último, (2) Centro X junto con el repetido telomérico promueven un aumento en la estabilidad mitótica de las transformantes que portan esta secuencia junto con el repetido telomérico, en tanto en *Ustilago maydis*, éste efecto es menos marcado y actualmente podría ser atribuible a *rumT* (3).

Algunos rasgos característicos de este trabajo son la frecuencia de transformación encontrada al interponer *UTASb* entre RT+*rumT* y *UARS1* (Secuencia de replicación autónoma de *Ustilago maydis*), pero para iniciar debemos aclarar algunos aspectos sobre los controles. En este trabajo se obtuvo una frecuencia de transformación de alrededor de 200 transformantes/μg de DNA con el control pCM201-A, cifra 10 veces mayor a la reportada por Tsukuda *et al* (1988), quien demostró que los plásmidos covalentemente cerrados que poseen una secuencia *ARS* tiene una alta eficiencia de transformación (10^3 - 10^4) que es similar a la reportada aquí, mientras los plásmidos que carecen de esta secuencia su frecuencia es muy baja llegando a obtener menos de 10 transformantes por 1mg de DNA como han reportado Fotheringham and Holloman (1990). En este trabajo, el aumento en el número de transformantes posiblemente se deba a un diferente conteo de las colonias, en las que se tomaron en cuenta colonias muy pequeñas, que resultaron no ser transformantes reales o fueron transformantes abortivas. No obstante, en el análisis no paramétrico de Mann y Withney, y de Kolgomorov Smirnov (Sánchez-Alonso *et al*, 2002), los resultados son significativamente diferentes de los que portan las secuencias de la región telomérica.

La frecuencia de transformación de los plásmidos pCUT7 y pCUT8 presentan una disminución del 13% y 11% con respecto al control pCM201 (tabla 3). Brevemente recordemos que la presencia de RT+*rumT_n*, en la cercanía de *UARS1* disminuye drásticamente (alrededor de 100 veces) la frecuencia de transformación de plásmidos replicativos, y que la presencia de RT+*rumT₅* disminuye solo alrededor de un 10% la frecuencia de transformación, es decir, la presencia de *rumT*+RT_n (donde n puede ser cualquier número) sobre plásmidos replicativos, puede provocar un decremento en la frecuencia de transformación proporcional a la longitud del telómero. Un efecto similar se ha observado en ensayos en levaduras, en donde, secuencias *ARS* cercanas al telómero se ven afectadas en su actividad (Stevenson and Gottschling, 1999; Ferguson and Fangman, 1992) esto se ha explicado como una forma de represión sobre las secuencias de replicación autónoma, aunque también se conoce que el encendido de un *ARS* está

temporal y espacialmente regulado por sus secuencias contexto, y que el control del encendido de las *ARS* en regiones silenciosas se lleva a cabo durante la fase S tardía, lo cual nos pasa de un evento de silenciamiento regionalizado a uno local y las implicaciones pueden ser diferentes. La ligera disminución en la frecuencia de transformación podría aun ser parte de cualquiera de estos dos efectos que se persistiera a pesar de la distancia entre el *RT+rumT* y la secuencia *UARS1*.

En esta explicación sin embargo, debe tomar en cuenta también que el número de repetidos teloméricos en pCUT7 y pCUT8 es menor (alrededor de la mitad o menos) que en la clona *rumT+RT*₃₉. La explicación a favor de un efecto silenciamiento local debido al contexto, y a una interferencia con el encendido del *ARS* proviene del análisis de la frecuencia de transformación para las construcciones pCUT7-A, pCUT8-A. Para estos plásmidos la frecuencia de transformación fue congruente con su carencia de *ARS*, pero muestran un ligero aumento respecto al control de aprox. 2 veces al menos. Un efecto de silenciamiento regional no explica una mejoría en la frecuencia de transformación cuando se carece de *ARS*. Sobre este último punto también surgen preguntas importantes: ¿Cómo se replican o mantienen los plásmidos no replicativos en las transformantes?

A simple vista uno puede pensar en la mejoría de la estabilidad mitótica, la cual en efecto disminuye drásticamente por la presencia de *rumT+RT*, trabajo que no abordaremos más aquí. En los plásmidos pCUT7-A y pCUT8-A la presencia de las secuencias de la región subtelomérica provocan un comportamiento muy diferente al de los controles: mientras para pCM201-A la estabilidad mitótica claramente es del 100% por integración al genoma del hongo o inferior al 6% por su incapacidad de replicarse, para los plásmidos con secuencias de la región telomérica la estabilidad mitótica prácticamente es diferente para cada clona, abarcando rangos desde 1 hasta 100% centrándose entre el 20 y 80%, que están inminentemente relacionados con construcciones autorreplicativas.

Si la frecuencia de transformación es una medida de la eficiencia de la entrada exitosa del DNA foráneo, de los niveles de expresión de los marcadores de selección, y de la eficiencia de replicación, la estabilidad de la construcción va a estar determinada principalmente por la eficiencia de replicación, y de segregación de la construcción.

Para determinar la forma del vector que permitiera este efecto, se llevó a cabo el análisis molecular de las construcciones. Los resultados de los ensayos de Southern Blot y cariotipo electroforético realizados para estas transformantes, nos muestran que los plásmidos replicativos

permanecen en estado episomal (Fig. 17, 18 y 19). Mientras, las transformantes con plásmidos no replicativos indican una serie de rearrreglos del plásmido. En el caso de pCUT8-A pareciera que no hubo integración sobre el genoma de *U. maydis*, (Fig.20 y 22). Para pCUT7-A, se observa en tres casos (Fig. 21 carriles 1, 3 y 5) integración no homologa, también se observa una estructura con varios rearrreglos (Fig. 22, carril 2) y una estructura en forma episomal (carril 4), por lo tanto la presencia de estas estructuras nos explicaría el porqué la dispersión de valores en la estabilidad mitótica.

Uno podría pensar que esto mismo sucede con cualquier construcción no replicativa, sin embargo los resultados de estudios previos (Anastacio-Marcelino 2001) indican solo eventos de integración ectópica, reemplazo de locus, y pérdida de la construcción. Esto es congruente con lo reportado por Fotheringham and Holloman (1989) quienes analizaron que para transformantes con un plásmido circular no replicativo el mecanismo involucrado era predominantemente la integración no homologa, encontrando ocasionalmente eventos de reemplazo de gen. Cuando se transformaron plásmidos linearizados se encontraron eventos de integración homologa, así como casos en donde este plásmido se encontraba en forma rearrreglada, como concatameros arreglados en tándem y fueron capaces de replicarse como si tuviera una secuencia *ARS*. Esto se debe a la eficiencia de *Ustilago maydis* para conducir a las secuencias de DNA abiertas hacia eventos NHEJ (Unión de extremos no homólogos) y actualmente existen indicios que la recombinación no homologa pudiera estar acoplada a la replicación. Al analizar nuestros resultados de Southern Blot y cariotipo electroforético encontramos casos que sugieren (Fig. 20, 21 y 22) eventos de transformación con plásmidos linearizados.

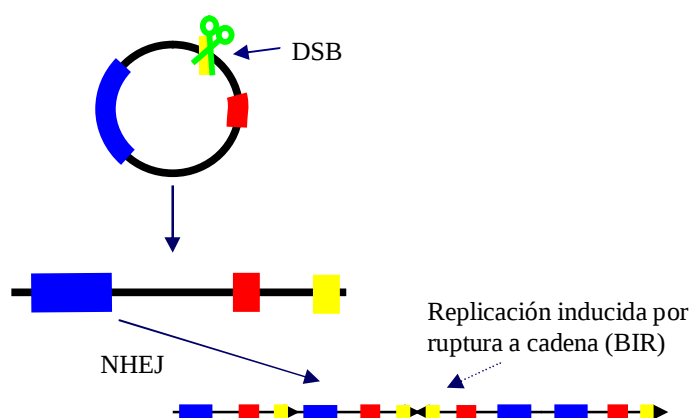


Fig. 23. Modelo propuesto para explicar los posibles mecanismos que se llevaron a cabo para la formación de rearrreglos en las Transformantes de *U. maydis*. La línea negra representa al plásmido; el rectángulo amarillo a *UTASb+rumT+RT*; el rectángulo rojo a la secuencia *ARS* y el rectángulo azul al marcador de selección

Una posible explicación para la formación de estructuras rearrregladas como las descritas en levaduras, que pueden promover la ruptura de doble cadena (DSBs) durante la replicación del telómero (Cooke, 1995) resultando rearrreglos e inestabilidad cromosómica (Bosco and Haber, 1998; Lo, *et al*, 2002), si estas lesiones no son reparadas produce un arresto en el ciclo celular, inducción de apoptosis y muerte celular mitótica causada por la pérdida de material genómico (Kolodner *et al*, 2002). En células de eucariotes superiores la reparación DSBs puede ser por dos rutas: por recombinación de extremos no homólogos (NHEJ) y por recombinación homóloga (Rothkamm *et al*, 2003). En *S. cerevisiae* la recombinación parece iniciar en un extremo del DNA de doble cadena roto, posteriormente el DNA nuevamente sintetizado es copiado del template y reinsertado en el cromosoma roto original por unión de extremos no homólogos (Davis and Symington, 2004; Haber 2000) este efecto también ha sido observado en células de ratón y en plantas de tabaco (Rothkamm *et al*, 2003) sucediendo la recombinación entre dos segmentos no funcionales en segmentos ectópicos y de esta manera producir un producto circular de replicación autónoma de forma circular casi estable dependiente tanto del mecanismo BIR y NHEJ, logrando soportar la replicación de posteriores generaciones (Fig. 23) (Natarajan and McEachem, 2002).

Los resultados hasta aquí discutidos nos conducen a las siguientes conclusiones.

CONCLUSIONES

1. La adición de secuencias *UTASb* entre la secuencia *rumT+RT* disminuye el efecto por posición del telómero que parece ejercer sobre la secuencia *ARS* por lo que se sugiere que esta secuencia pudiera tener la función de secuencia espaciadora, aisladora, búfer de secuencias que son utilizadas para el mantenimiento del extremo cromosomal en ausencia de telomerasa o exhibir alguna función no detectada en este estudio.
2. Los eventos de recombinación no homologa registrados para los rearrreglos mostrados en las transformantes pCUT7-A y pCUT8-A posiblemente sigan la ruta de replicación inducida por ruptura (BIR) que es un proceso de recombinación dependiente de replicación efectivo para reparar cromosomas rotos.
3. Los resultados de frecuencia de transformación y estabilidad mitótica descartan la posibilidad de que la secuencia *UTASb* tenga una función similar o equivalente a la del centro X de *S. cerevisiae*.

PERSPECTIVAS

Los resultados obtenidos en este trabajo nos dan un indicio del posible papel que pudieran tener las secuencias asociadas a telómero albergadas en el extremo cromosomal de *U. maydis*.

Ya que *rumT+RT* pudieran ser equivalentes a centro X (Anastacio-Marcelino *et al*, 2002) se sugiere analizar si estas secuencias pudieran tener función de protosilenciador.

Así mismo, ya que *UTASa* y *UTASb* parecen no aumentar el efecto exhibido por *rumT+RT* se sugiere analizar su papel como secuencia aisladora semejante al observado en las secuencias *STAR* del elemento X de *S. cerevisiae*.

BIBLIOGRAFÍA

- Anastacio-Marcelino, E.**, (2001). óAnálisis funcional de las secuencias *UTASa* provenientes de la región subtelomérica de *Ustilago maydis*°. Tesis Licenciatura. CICM-ICBUAP, Puebla, Puebla.
- Ansari, A., and Gartenberg, M.R.**, (1997). The yeast silent information regulator Sir4p anchors and partitions plasmids. *Mol. Cell. Biol.*, **17**:7061-7068.
- Aparicio, O.M., Billington, B. L., and Gottschling, D. E.** (1991). Modifiers of position effect are shared between telomeric and silent mating-type loci in *S. cerevisiae*. *Cell*, **66**:1279-1287.
- Barry, J.D., Graham, S.V., Fotheringham, M., Kobryn K., Wymer, B.** (1998). VSG gene control and infectivity strategy of metacyclic stage *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol*, **91**:93-105.
- Banks, G.R. and Taylor, S.Y.** (1988). Cloning of the *PYR3* gene of *Ustilago maydis* and its use in DNA transformation. *Moll. Cell. Biol.*, **8**:5417-5424.
- Banuett F.** (1992). *Ustilago maydis* the delightful blight. *Trends Genetics*, **8**:174-180.
- Banuett, F., and Herskowitz, I.** (1994). Morphological transitions in the life cycle of *Ustilago maydis* and their genetic control by the a and b loci. *Exp. Mycology*, **18**:247-266.
- Berman, J., Tachibana, C.Y. and Tye, B.K.** (1986). Identification of a telomere-binding activity from yeast. *Proc Natl Acad Sci. USA*, **83**:3713-3717.
- Bi, X., Braunstein, M., Shei, G. J. and Broach, J. R.** (1999). The yeast HMLI silencer defines a heterochromatin domains boundary by directional establishment of silencing. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **96**:11934-11939.
- Bi, X., and Broach, J. R.** (1997). DNA in transcriptionally silent chromatin assumes a distinct topology that is sensitive to cell cycle progression. *Mol Cell. Biol.*, **17**:7077-7087.
- Biessmann, H. and Mason, J.M.** (1997). Telomere maintenance without telomerase. *Chromosoma*, **106**:63-69.
- Bilaud, T., Koering, C.E., Binet-Brasselet, E., Ancelin, K., Pollice, A., Gasser, S.M. and Gilson, E.** (1996). The telobox, a Myb-related telomeric DNA binding motif found in proteins from yeast, plants and human. *Nucleic Acids Res.*, **24**:1294-1303.
- Blackburn, E.H.** (2001). Switching and signaling at the telomere. *Cell*, **106**:661-673.
- Boscheron, C., Maillet, L., Marcand, S., Tsai-Pfugfelder, M., Gasser, S.M., Gilson, E.** (1996). Cooperation at a distance between silencers and protosilencer at the yeast HML locus. *EMBO J.* , **15**:2184-2195.
- Bosco, G., and Haber, J.E.** (1998). Chromosome break-induced DNA replication leads to nonreciprocal translocation and telomere capture. *Genetics*, **150**:1037-10447.
- Braunstein, M., Rose, A. B., Holmes, S. G., Allis, C. D., and Broach, J. R.** (1993). Transcriptional silencing in yeast is associated with reduced nucleosome acetylation. *Genes Dev.*, **7**:592-604.

- Brewer, B.J. and Fangman W.L.** (1988). A replication fork barrier at the 3' end of yeast ribosomal RNA genes. *Cell*, **55**:637-643.
- Broccoli, D., Smogorzewska, A., Chong, L., and de Lange, T.** (1997). Human telomeres contain two distinct Myb-related proteins, TRF1 and TRF2. *Nat. Genet.*, **17**:231-235.
- Brown, W.R.A., MacKinnon, P.J., Villasante, A., Spurr, N., Buckle, V.J. and Dobson, M.J.** (1990). Structure and Polymorphism of human telomere-associated DNA. *Cell*, **63**:119-132.
- Bryan, T.M. and Cech, T.R.** (1999). Telomerase and the maintenance of chromosome ends. *Curr Opin Cell Biol.*, **11**:318-324.
- Bryk, M., Banerjee, M., Murphy, M., Knudsen, K.E., Garfinkle, D.J. and Curcio, M.J.** (1997). Transcriptional silencing of Ty1 elements in the RDN focus of yeast. *Genes Dev.* **11**:255-269.
- Chen, C.M., Wang, C.T., Wang, C.J., Ho, C.H., Kao, Y.Y. and Chen, C.C.** (1997). Two tandemly repeat telomere-associated sequences in *Nicotiana plumbaginifolia*. *Chromosome Res.*, **5**:561-568.
- Cheng, T. H., and Gartenberg, M. R.** (2000). Yeast heterochromatin is a dynamic structure that requires silencers continuously. *Genes Dev.*, **14**:452-463.
- Chong, L., van Steensel B., Broccoli, D., Erdjument-Bromage, H., Hanish, J., Tempst, P., and de Lange, T.** (1995). A human telomeric protein. *Science*, **270**:1663-1667.
- Cohn, M. and Edström, J.E.** (1992). Telomere-associated repeats in *Chironomus* from discrete subfamilies generated by gene conversion. *J Mol Evol.*, **35**:114-122.
- Cooke, H.** (1995) in *Telomeres*, eds. Blackburn, E.H., and Greider, C.W., (Cold Spring Harbor Lab. Press, Plainview, NY), pp219-245.
- Cooper, J.P., Nimmo, E.R., Allshire, R.C. and Cech, T. R.** (1997). Regulation of telomere length and function by a Myb-domain protein in fission yeast. *Nature.*, **385**:744-747.
- Craven R.J., and Petes T.D.** (1999). Dependence of the regulation of telomere length on the type of subtelomeric repeat in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, **152**:1531-1541.
- Dammann, R., Luchini, R., Koller, T., and Sogo, J. M.** (1993). Chromatin structures and transcription of rDNA in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res.*, **21**:2331-2338.
- Davis, A.P. and Symington L.S.** (2004). RAD51-Dependent break-induced replication in yeast. *Mol. Cell. Biol.*, **24**(6):2344-2351.
- Ferguson, B.M. and Fangman, W.L.** (1992). A position effect on the time of replication origin activation in yeast. *Cell*, **68**:333-339.
- Feuerbach, F., Galy, V., Trelles-Sticken, E., Fromont-Racine, M. And Jackier, et al.** (2002). Nuclear architecture and spatial positioning help establish transcriptional states of telomeres in yeast. *Nat. Cell Biol.* **4**:214-221.
- Figueiredo, L.M., Pirrit, L.A. and Scherf, A.** (2000). Genomic organisation and chromatin structure of *Plasmodium falciparum* chromosome ends. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **106**:169-174.

- Fotheringham, S., and Holloman, W.K.**, (1991). Extrachromosomal Recombination is deranged in the *rec2* mutant of *Ustilago maydis* genes. *Genetics*, **129**:1052-1060.
- Fotheringham, S., and Holloman, W.K.**, (1990). Pathways of transformation in *Ustilago maydis* determined by DNA conformation. *Genetics*, **124**:833-843.
- Fotheringham, S., and Holloman, W.K.**, (1989). Cloning and disruption of *Ustilago maydis* genes. *Mol. Cell. Biol.* **9**:4052-4055.
- Fourrel, G., Revardel, C. E., Koering and E. Gilson**, (1999). Cohabitation of insulators and silencing elements in yeast subtelomeric regions. *EMBO J.* **18**:2522-2537.
- Fourrel, G., Miyake, T., Defossez, P.A., Li, R., Gilson, E.** (2002a). General regulatory factors (GRFs) as genome partitioners. *J. Biol Chem*, **277(44)**:41736-41743.
- Fourrel, G., Lebrun, E. and Gilson, E.** (2002b). Protosilencer as building blocks for heterochromatin. *BioEssays*, **24**:828-835.
- Freitas-Junior, L.H., Bottius, E., Pirrit, L.A., Deitch, K.W., Scheidig, C., Guinet, F., Nehrbass, U., Welles, T.E. and Scherf, A.** (2000). Frequent ectopic recombination of virulence factor genes in telomeric chromosome clusters of *P. falciparum*. *Nature*, **407**:1018-1022.
- Fritze, C.E., Verschueren, K., Strich, R. and Esposito, R.E.** (1997). Direct evidence for *SIR2* modulation of chromatin structure at yeast rDNA. *EMBO J.*, **16**:6495-6509.
- Froelich-Ammon, S.J., Dickinson, B.A., Bevilacqua, J.M., Schultz, S.C. and Cech, T.R.** (1998). Modulation of telomerase activity by telomere DNA-binding proteins in *Oxytrichia*. *Genes Dev.*, **12**:1504-1514.
- Fu, G. and Barker, D.C.**, (1998). Characterization of *Leishmania* telomeres reveals unusual telomeric repeats and conserved telomere-associated sequence. *Nucleic Acids Res.*, **26**:2161-2167.
- Galy, V., Olivo-Marin, J.C., Doye, V., Rascalou, N., and Nehrbass, U.**, (2000). Nuclear pore complexes in the organization of silent telomeric chromatin. *Nature*, **403**:108-112.
- Gasser, S.M. and Cockell, M.M.** (2001). The molecular biology of the SIR proteins. *Gene* **279**:1-16.
- Georg, J. H., Jason, C. T., Adam, D. R., Scott, A.G., Sherwin, D., Steven, P. G., and Moazed, D.**, (2002). Steps in assembly of silent chromatin in yeast: Sir3-Independent binding of a Sir2/Sir4 complex to silencers and role for Sir2-dependent deacetylation. *Mol. Cell. Biol.* **22(12)**:4167-4180.
- Gold, S.E., Bakkeren, G., Davies, J.E. and Kronstad, J.E.**, (1994). Three selectable markers for transformation of *Ustilago maydis*. *Cell*, **81**:73-83.
- Gottschling, D.E., Aparicio, O.M., Billington, B.L. and Zakian, V.A.** (1990). Position effect at *S. cerevisiae* telomeres: reversible repression of Pol II transcription. *Cell*, **63**:751-762.
- Grewal, S.J.** (2000). Transcriptional silencing in fission yeast. *J. Cell Physiol.*, **184**:311-318.
- Guzmán, P.A. and Sánchez, J.G.** (1994). Characterization of telomeric regions from *Ustilago maydis*. *Microbiol.* **140**:551-557.

- Haber, J.E.**, (2000). Partners and pathways repairing a double-strand break. *Science*, **16(6)**:259-264.
- Haber, J.E.**, (1998). Mating-type gene switching in *Saccharomyces cerevisiae*. *Annu. Rev. Genet.*, **32**: 561-599.
- Heard, E., Clere, P. and Avner, P.** (1997) X-chromosome inactivation in mammals. *Annu. Rev. Genet.*, **31**:571-670.
- Hecht, A., Laroche, T., Strahl-blosinger, S., Gasser, S. M. And Grunstein, M.** (1995). Histone H3 and H4 N-termini interact with SIR3 and SIR4 proteins: a molecular model for the formation of heterochromatin in yeast. *Cell*, **80**:583-592.
- Hediger, F. and Gasser, S.M.** (2002). Nuclear organization and silencing: putting things in their place. *Nat. Cell. Biol.* **4**:E53-E55.
- Henikoff, S.** (2000). Heterochromatin function in complex genomes. *Biochim Biophys Acta*, **1470**:01-08.
- Henikoff, S.** (1995) Gene Silencing in *Drosophila*. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **197**:193-208.
- Henning, W.** (1999). Heterochromatin. *Chromosoma*, **108**:1-9
- Hernández-Rivas, R. And Scherf, A.** (1997). Separation and mapping of chromosomes of parasitic protozoa. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, **92**:815-819.
- Holliday, R.** (1974). *Ustilago maydis*. In Handbook of Genetics, R.C. King, ed. (New York: Plenum Press), pp. 575-595.
- Holliday, R.** (1961). The genetics of *Ustilago maydis*. *Genet. Res.* **2**:204-230
- Hoppe, G.J., Tanny, J.C., Rudner, A.D., Gerber, S.A., Danaie, S. et al.** (2002). Steps in assembly of silent chromatin in yeast: Sir3-independent binding of a Sir2/Sir4 complex to silencers and role for Sir2-dependent deacetylation. *Mol. Cell. Biol.*, **22**:795-800.
- Joseph A. B., Yinfg, Z., Jerry W. S., Woodrifng, E. W.** (2001). Telomere Position Effect in Human Cells. *Science*, **292**:2075-2077.
- Kammert, I., Nielsen, L., and Edstrom J.E.** (1998). A concertedly evolving region in *Chironomus*, unique within the telomere. *J Mol Evol.*, **46**:562-570.
- Keon, J.P.R., White, G.A., and Hargreaves, J.A.** (1991). Isolation, characterization and sequence of a gene conferring resistance to the systemic fungicide carboxin from the maize smut pathogen, *Ustilago maydis*. *Curr Genetics*, **19**:475-481.
- Kimmerly, W., Buchman, A., Kornberg, R., and Rine, J.** (1988). Roles of two DNA binding factors in replication, segregation and transcriptional repression mediated by a yeast silencer. *EMBO J.* **7**:2241-2253.
- Kolodner, R.D. Putnam, C., and Myung K.**, (2002) Maintenance of Genome Stability in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science*, **297**:552-557.
- Larson, G.P., Castanotto, D., Rossi, J.J. and Malafa, M.P.** (1994). Isolation and functional analysis of a *Kluyveromyces lactis* RAP1 homologue. *Gene.*, **150**:35-41.

- Lebrun E., E. Revardel, C. Boscheron, R. Li, E. Gilson and G. Fourel.** (2001). Protosilencers in *Saccharomyces cerevisiae* subtelomeric regions. *Genetics*, **158**:167-176.
- Liskens, M. and Huberman, J.A.** (1988). Organization of replication of ribosomal DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.*, **8**:4927-4935.
- Lo, A.W.I., Sprung, C.N., Fouladi, B., Pedram, M., Sabatier, L., Ricoul, M., Reynolds G.E., and Murnane, J.P.,** (2002). Chromosome instability as a result of double-strand breaks near telomeres in mouse embryonic stem cells. *Moll. Cell. Biol.*, **22(13)**:4836-4850.
- Longtine, M. S., S. Enomoto, S. L. Finstad, and J. Berman.** 1992. Yeast telomere repeat sequence (TRS) improves circular plasmid segregation, and TRS plasmid segregation involves the *RAP1* gene product. *Mol. Cell. Biol.* **12**:1997-2009
- Loo, S., Fox, C. A., Rine, J., Kobayashi, R., Stillman, B. and Bell, S.** (1995). The origin recognition complex in silencing, cell cycle progression and DNA replication. *Mol. Biol. Cell*, **6**:741-7565.
- Louis, E. J.** (1995). The chromosome ends of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, **11**:1553-1573.
- Louis, E., Naurrova, E.S., Lee, A., Naumov, G., Haber, J.E.** (1994). The chromosome end in yeast: its mosaic nature and influence on recomb national dynamics. *Genetics*, **136**:789-802.
- Lundbland, V. and Blackburn, E.H.** (1993), An alternative pathway for yeast telomere maintenance rescues est-senescence. *Cell*, **73**:347-360.
- Luo, K., Miguel, A. V. P. and Grunstein, M.** (2002). Rap1p-Sir4p binding independent of other Sir, yKu, or histone interactions initiates the assembly of telomeric heterochromatin in yeast. *Genes and Development*, **16**:1528-1539.
- Lusting, A. J.,** (1998). Mechanisms of silencing in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **8**:233-239.
- Millar, H.** (1987). *Practical aspects of preparing phage and plasmids*. In Guide to Molecular Cloning Techniques, Berger, S. L. and Kimmel, A. R., eds., San Diego, California: Academic Press Inc. pp. 145-172.
- Moazed, D.** (2001). Common themes in mechanism of gene silencing. *Mol. Cell* **8**:489-498.
- Moazed, D., Kistler, A., Axelrod, A., Rine, J. and Johnson, A. D.** (1997). Silent information regulator protein complexes in *Saccharomyces cerevisiae*: a SIR2/SIR4 complex and evidence for a regulatory domain in SIR4 that inhibits its interaction with SIR3. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **94**:2186-2191.
- Moretti, P., Freeman, K., Coodly, L., and Shore, D.** (1994). Evidence that a complex of SIR proteins interacts with the silencer and telomere-binding protein RAP1. *Genes Dev.*, **8**:2257-22669.
- Muñoz-Jordan, J.L., Cross G.A.M., de Lange T., and Griffith J.D.** (2001). T-loops at trypanosome telomeres. *EMBO J.* **20(3)**:579-588.
- Natarajan, S., and McEachern, M.J.,** (2002). Recombinational telomere elongation promoted by DNA circles. *Moll. Cell. Biol.*, **22(13)**:4512-4521.

Nugent, C.I., Hughes, T.R., Lue, N.F. and Lundblad, V. (1996) Cdc13p: a single-strand telomeric DNA-binding protein with a dual role in yeast telomere maintenance. *Science*, **274**:249-252.

O'Donnell R.A., Freitas-Junior, L.H., Preiser, P.R., Williamsom, D.H., Duraisingh, M., McElwain, T.F., Scherf, A., Cowman, A.F., and Crabb, B.S., (2002). A genetic screen for improved plasmid segregation reveals a role for Rep20 in the interaction of *Plasmodium falciparum* chromosomes. *EMBO J.*, **21**(5):1231-1239.

Okazaki, S., Ishikawa H. and Fujiwara, H. (1995) Structural analysis of TRAS1, a novel family of telomeric repeat-associated retrotransposons in the silkworm, *Bombys mori*. *Mol Cell Biol.*, **15**:4545-4552.

Pardue, M. (1995). *Drosophila* telomeres: another way to end it all. In telomeres, E. H. Blackburn and C. W. Greider, eds. (Plainview, N.Y: Cold Spring Harbor Laboratory Press).

Pryde, F.E., Gorham, H.C. and Louis, E.J. (1997). Chromosomes ends: all the some under their caps. *Curr. Opinion Genet. Dev.*, **7**:822-828.

Petes, T. D., and Botstein, D. (1977). Simple mendelian inheritance of the reiterated ribosomal DNA of yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**:5091-5095

Raghuraman, M.K., Brewer, B.J. and W.L.Fangman (1997). Cell cycle-dependent establishment of a late replication program. *Science*. **276**:806-809.

Regel-González L.L., (2001). Tesis Maestría, CICM-ICBUAP, Puebla, Puebla.

Rothkamm, K., Krüger, I., Thompson, L.H., and Löbrich, M., (2003). Pathways of DNA double-strand break repair during the mammalian cell cycle. *Moll. Cell. Biol.*, **23**(16):5706-5715.

Rouyer, F., de la Chapelle, A. and Weissenbach, J. (1990). An interspersed repeated sequence specific for human subtelomeric regions. *EMBO J.*, **9**:505-514.

Rubio, J.P., Thompson, J.K. and Cowman, A.F. (1996). The *var* genes of *Plasmodium falciparum* are located in the subtelomeric region of most chromosomes. *EMBO J.*, **15**:4069-4077.

Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning*. A Laboratory Manual. (New York: Cold Spring Harbor).

Sánchez-Alonso, M.P., Reyes-Cervantes H. Vásquez-Cruz, C., Anastacio-Marcelino, E., (2002). óAnálisis Estadístico para determinar la Función de elementos genéticosô. IX Semana de la Estadística. BUAP, Facultad de Ciencias Físico Matemáticas.

Sánchez-Alonso, M.P. and Guzmán, P., (1998). Organization of chromosome ends in *Ustilago maydis*. ReQ-like helicase motifs at telomeric regions. *Genetics*. **148**:1043-1054.

Sánchez-Alonso, M.P. (1997). Estudios sobre la estructura y la organización de la región telomérica de *Ustilago maydis*. Tesis doctorado. CINVESTAV- IPN, Irapuato, Guanajuato.

Sánchez-Alonso, P., Valverde, M.E., Paredes-López O., and Guzmán P. (1996). Detection of genetic variation in *Ustilago maydis* strains by probes derived from telomeric sequences. *Microbiol.* **142**:2931-2936.

- Sherman, F., Fink, G.R., and Hicks, J.B.** (1986). *Methodos in Yeast Genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory.
- Shore, D. and Nasmyth, K.** (1987) Purification and cloning of a DNA binding protein from yeast that binds to both silencer and activator elements. *Cell*, **51**:721-732.
- Shou, W., Seol, J. H., Shevchenko, A., Baskerville, C., Moazed, D., Chen, Z. W., Charbonneau, H. and Deshaies, R. J.** (1999). Exit from mitosis is triggered by Tem1-dependent release of the protein phosphatase Cdc14 from nucleolar RENT complex. *Cell*, **97**:233-244.
- Silhavy, T. J., Berman, M. L., and Enquist, L. W.** (1984). *Experiments with gene fusions*. (New York: Cold Spring Harbor Laboratory).
- Smith, J.S., and Boeke, J.D.** (1997). An unusual form of transcriptional silencing in yeast ribosomal DNA. *Genes Dev.*, **11**:241-254.
- Stavenhagen, J.B. and Zakian, V.A.** (1998). Yeast telomeres exert a position effect on recombination between internal tracts of yeast telomeric DNA. *Gene Dev.*, **12**:3044-3058.
- Stephane, R., Antoine, B. and Dominique A.** (2001). P-Element repression in *Drosophila melanogaster* by variegating clusters of P-lacZ-white transgenes. *Genetics*, **159**:1631-1642.
- Stephens, P., Horton, R., Humphray, S., Rowen, L., Trowsdale, J., Beck, S.** (1999). Gene organisation, sequence variation and isochore structure at the centromeric boundary of the human MHC. *J.Mol. Biol.*, **291**:789-799.
- Stevenson, J.B. and Gottschling, D.E.** (1999). Telomeric chromatin modulates replication timing near chromosome ends. *Genes Dev.* **13**:146-151.
- Straight, A. F., Shou, W., Dowd, G. J., Turck, C. W., Deshaies, R. J., Johnson, A. D. and Moazed, D.** (1999). Net1, a Sir2-associated nucleolar protein required for rDNA silencing and nucleolar integrity. *Cell*, **97**:245-256.
- Takahashi, H., Okasaki, S. and Fujiwara H.** (1997). A new family of site-specific retrotransposons, SART1, is inserted into telomeric repeats of the silkworm, *Bombyx mori*. *Nucleic Acids Res.*, **25**:1578-1584.
- Thomas, B., Catherine, E.K., Emmanuelle, B.-B., Katia, A., Alessandra P., Susan M. Gasser., E. Gilson.** (1996). The telobox, a Myb-related telomeric DNA binding motif found in proteins from yeast, plants and human. *Nucleic Acids Research*, **24**(7):1294-1303.
- Torres Solís S.** (2004). Caracterización funcional del MLA de una helicasa tipo RecQ en *U. maydis*. Tesis Maestría. CICM-ICBUAP, Puebla, Puebla.
- Triolo, T. and Sternglanz, R.** (1996). Role of interactions between the origin recognition complex and SIR1 in transcriptional silencing. *Nature*, **381**:251-253.
- Tsukuda, T., Carleton, S., Fotheringham, S., and Holloman, W.K.,** (1988). Isolation and Characterization of an autonomously replicating sequence from *Ustilago maydis*. *Mol. Cell. Biol.*, **8**:3703-3709.

- Vaquero-Vera, A.,** (2003). Búsqueda de los productos de expresión de la helicasa tipo RecQ de la Región Subtelomérica en *Ustilago maydis*. Tesis Maestría. CICM-ICBUAP, Puebla, Puebla.
- Vincent, G., Jean-Christopher, O.M., Harry, S., Valerie, D., Nadia, R. and Ulf, N.** (2000). Nuclear pore complexes in the organization of silent telomeric chromatin. *Nature*, **403**:108-112.
- Virta-Pearlman, V., Morris, D.K. and Lundbland, V.** (1996). Est1 has the properties of a single-stranded telomere end-binding protein. *Genes Dev.*, **10**:3094-3104.
- Ying, H.,** (2002). Transcriptional silencing in *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe*. *Nucleic Acids Research* **30(7)**:1465-1482.
- Zakian, V.A.** (1996). Telomere Functions: lessons from yeast trend. *Cell Biol.*, **6**:29-33
- Zakian, V.A.** (1989). Structure, Function and Replication of *Saccharomyces cerevisiae* Telómeros. *Ann Rev. Genetics*, **30**:141-172.
- Zhang, Y.J., Kammert, I., López, C.C., Cohn, M. and Edström, J.E.** (1994). A family of complex tandem DNA repeats in the telomeres of *Chironomus pallidivittatus*. *Mol Cell Biol.*, **14**:8028-8036.