



---

---

**“BENEMÉRITA UNIVERSIDAD  
AUTÓNOMA DE PUEBLA”**



**INSTITUTO DE CIENCIAS  
CENTRO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS  
MICROBIOLÓGICAS  
POSGRADO EN MICROBIOLOGÍA**

**“Análisis de la proteína hnRNP A1 putativa de  
*Ustilago maydis*”**

**TESIS  
PRESENTADA PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**MAESTRA EN CIENCIAS (MICROBIOLOGÍA)**

**PRESENTA:  
Quim. Mónica Martínez Montiel**

**ASESOR DE TESIS:  
D.C. Rebeca D. Martínez Contreras.**

**NOVIEMBRE 2016**



**BUAP**

Puebla, Pue. a 19 de octubre 2016.

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

Por este conducto los abajo firmantes, integrantes del Comité revisor de Tesis de Maestría de la alumna **Mónica Martínez Montiel**, les informamos que hemos revisado el escrito titulado:

**"Análisis de la proteína hnRNP A1 putativa de *Ustilago maydis*"**

A nuestro juicio, la alumna **Mónica Martínez Montiel** puede proceder a la impresión de la tesis y a la presentación del examen de grado correspondiente.

Sin más que agregar, nos despedimos afectuosamente de ustedes.

Atentamente.  
"Pensar Bien Para Vivir Mejor"

D.C. Margarita María de la Paz Arenas Hernández

D.C. Lucía Soto Urzúa

D.C. Eduardo Monjaráz Guzmán

D.C. Nancy Martínez Montiel

## **Agradecimientos**

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

La Quim. Mónica Martínez Montiel fue beneficiada con la beca 619093 otorgada por el consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT)

## **Agradecimientos**

A mi comité tutorial:

D.C Lucia Soto Urzua  
D.C Margarita Maria de la Paz Arenas Hernandez  
D.C. Eduardo Monjaraz Guzman.

Por el tiempo que me dedicaron en cada uno de mis tutorales así como en la revisión de esta tesis, he aprendido de cada uno de ustedes y les agradezco cada uno de los consejos y aportaciones a mi trabajo, así como sus palabras de aliento que me daban, me han ayudado en mi formación tanto profesional como personal.

Al D.C. Luis Ernesto por todo su apoyo durante mi estancia de maestría, por estar al pendiente de todos mis tramites y guiarnos en todo lo que podía.

A la D.C. Miguel al igual por su apoyo en todo este proceso de mi vida,, por darme ánimos cuando veia que la cosa estaba un poco perdida debido a mi formación de Química y alentarme a ver que también podía hacer las cosas.

Al D.C. Julio Hernández por la colaboración y por enseñarnos veinte mil veces a usar el programa.

A la D.C. Nora por estar al pendiente en estos últimos meses de todos lo que teníamos que hacer así como sus consejos para los últimos ensayos.

A la D.C .Rebeca por dejarme ser parte de este gran equipo de trabajo, que aunque todas tenemos algún defecto, siempre sacamos lo mejor de ello. Gracias por confiar en mi y en estos últimos dos años he aprendido tantas cosas de ti.

## Dedicatorias

A ti mamá por ser mi apoyo incondicional, por seguirme en cada locura que hago y escucharme siempre!!, por empezar conmigo cada uno de mis locas ideas así como de este trayecto en el cual decidí involucrarme sin tener la más mínima idea de lo que tenía que hacer o de lo que se trataba. Por ser siempre la persona que me anima, que me dice que sí puedo y que está atrás de mí cuando me caigo. Por soportarme el primer semestre en el cual llegaba frustrada por que era todo un cambio en mi vida y por el hecho de estar orgullosa de mí a pesar de todo. Te amo demasiado y definitivamente soy lo que soy por ti!

A ti papá por ser mi pilar y la persona que aunque te lo diga más importante para mí por que definitivamente no estaría en donde estoy si no fuera por ti. Por todo lo que hace por nosotras, y aunque a veces sufres bullying de nuestra parte te amo con todo mi corazón y sé que siempre estás ahí para mí. Que al igual que mi mamá sé que estarás ahí cuando me caiga, y que me apoya incondicionalmente en cualquier decisión que tome, por sentirte orgulloso de mí y decir que la inteligencia la saque de ti (aunque todos sabemos de donde fue jajaja). Te amo y siempre será así! Gracias por cada una de las cosas que haces por mí, las valoro demasiado y te amo masivamente!

A ti Nancy por ser simplemente mi hermana mayor, por que aunque al principio de este trayecto casi nos matamos nos logramos acoplar y aceptar tal cual, creo que por primera vez me siento tan cercana a ti aunque somos súper diferentes y siempre ha sido así, te amo infinitamente y agradezco todo lo que haces por mí en todos los aspectos y sabes que estoy muy orgullosa de ti y eres mi inspiración para seguir en este camino largo pero esperemos que con muchas satisfacciones y frutos en el futuro. Gracias por todo, por cada uno de los consejos tanto de trabajo como de vida!. Te amo mucho mamá y ahora que no estás te extraño más!

A ti Rebe, por ser mi jefa, cuñada y amiga, y sigo agradeciendo el día que llegaste a mi familia y te convertiste en parte de ella, gracias por darme la oportunidad de trabajar contigo, por que aunque ha sido difícil lo hemos sobrellevado, gracias también por enseñarme tantas cosas y tener confianza en mí y en que iba a poder hacer todo esto ya que era totalmente nuevo para mí, gracias por los consejos, por las enseñanzas y sobre todo gracias por tu cariño incondicional. Espero que sigamos trabajando juntas y que vengas muchas cosas buenas!!!!!! Valoro cada una de las cosas que haces por nosotros y sabes que te quiero mucho!

A ti tía Sara por que si estoy en donde estoy también es por ti por que tu me enseñaste todo lo que sé y aunque tome un rumbo un poco diferente sé que siempre estarás ahí para mí. Por que siempre has sido un gran ejemplo a seguir. Te quiero mucho! Y estoy infinitamente agradecida contigo.

A ti Peny por que también fuiste parte esencial de mi formación como estudiante, por apoyarme, por quererme y estar conmigo siempre! Estoy agradecida por tenerte en mi vida. Te quiero mucho!

A mis niños Paco, Danis y Lore por que siempre serán mis bebés y la alegría de mi vida!!!! Y ahora han llegado otros dos bebés que también se han unido a alegrarme mis días Santi y Sofi, los quiero a todos muchísimo e insisto siempre y para siempre serán mis bebés y con los que aprendo lo mejor de la vida que es disfrutarla a su lado.

Ale por ser siempre mi apoyo incondicional y se que siempre puedo contar contigo, y sabes que te adoro con todo mi corazón. Y te agradezco infinitamente estar conmigo en los buenos y malos momentos.

Dany, Nina, Iván y Manolo por ser mis sobrinos por apoyarme en cada locura, por estar conmigo y no dejarme caer en los peores momentos, por ser parte fundamental de mi vida y por simplemente crecer conmigo. Estoy muy orgullosa de cada uno de ustedes y de lo que han logrado!!

Sari y Mary por estar al pendiente de mi vida, de mis proyectos, por los consejos y buenos momentos!! Las quiero mucho y gracias simplemente por estar conmigo!!!!

A todos mis tíos y primos, que aunque a veces no entienden mucho lo que hago siempre de alguna forma están al pendiente y preguntándome como me va! Los quiero a cada uno de ustedes y son parte fundamental de mi vida.

A ti abue, por simplemente estar conmigo y preguntarme siempre como me va y estar al pendiente de todo lo que hago y ser simplemente tu!!! Te amo con todo mi corazón.

A mis compañeritas de trabajo:

A ti Mayra por que definitivamente la vida te pones personas en el momento preciso, gracias por ser mi amiga, mi confidente y mi paño de lágrimas, por regarla conmigo y no saber q hacer después, por festejar y hacer bailes ridículos cuando algo nos salía bien (rara vez jajajaja ) también estoy muy orgullosa de ti y de todo lo que has logrado, te quiero mucho y sabes que siempre tendrás una amiga en mi. Simplemente gracias por estar ahí conmigo en todo momento!

A ti Sonia por que desde que llegue al laboratorio me ayudaste a sentirme aceptadae integrada en el grupo, por todas esas tardes de platicas en el laboratorio en las cuales moríamos de risa o simplemente contábamos todos los chismes del momento (claro que también trabajábamos) Te aprecio mucho y sabes que te considero una muy buena amiga

A ti Jenny por que no se que haríamos sin la mas despistada del grupo! Por que le pones el sabor a las cosas. Sabes que aunque siempre estés en tu campana y nosotros en el laboratorio, eres una persona importante en mi vida y una amiga para mi!!! (ya te tocara a ti el próximo año titularte)

A mis amigos:

Mi banda gangrena que definitivamente mi transcurso en la maestría no hubiera sido el mismo sin ustedes!!! Tenia que llegar aquí para encontrar amigos que valieran realmente la pena!!!

Toñito, te adoro eres un encanto gracias por ser mi amigo, por cubrirme cuando tenia frio jajaja, por hacerme enojar cuando no hacías la tarea o llegabas a las siete de la mañana a hacer la expo de equipo, siempre has sido muy inteligente y te admiro por eso!!!! Te quiero mucho!!!

Lau por que definitivamente me equivoque de equipo jajajaja gracias por ser mi amiga, por esas tardes de chelas o memelas y platicas!!! Eres una gran amiga y una persona en la cual definitivamente puedo contar!!!! Te quiero mi Lau

Por ultimo pero no menos importante a ti Pablito, por ser mi amigo, por estar ahí cuando lloraba, por venirte en las mañanas conmigo a la uní, por esas platicas estúpidas que teníamos y por hacerme reír la mayor parte del día, por los dulces que nos subías y por estar simplemente a mi lado!!! Te quiero demasiado y sabes que siempre así será!!!!

A ti Gaby por que en esta vida no sabes en que momento conocerás personas que te cambian!!! Gracias por ser mi amiga, eres de las personas mas lindas que he conocido. Te quiero mucho y estoy infinitamente agradecida a la vida por ponerte en mi camino!!!!

A mis amigos de maestría Myriam, Les, Tere, por que a pesar de no convivir tanto afuera del salón, siempre serán de esos amigos que se que estarán ahí para una muy buena platica y echar el chisme, los quiero mucho chicos!!!!

A ti, esa nueva persona que llegó a mi vida en calidad de amigo, por que te ha tocado la parte mas estresante de todo el proceso y aun así sigues aquí, por decirme que me apure cuando tengo que hacerlo o simplemente tener detalles conmigo, por escuchar mis locas historias o estar conmigo cuando tengo malos ratos, valbro cada uno de los momentos que estamos juntos y que me hagas reír sin parar, agradezco que me sacaras de esa fea rutina que tenia y por ser una de las razones por las cuales no me he vuelto loca y sabes perfectamente que realmente te aprecio.

A ti innumerable también te agradezco y se que esto no lo vas a leer y será mas como terapia para mi, a pesar de cómo termino todo entre nosotros fuiste parte importante en esta etapa de mi vida y en un gran trayecto de esta, te quise te ame y te adore, estuviste conmigo cuando no sabia que hacer, cuando por fin me decidí y cuando la cosa se ponía fea por que no entendía nada jajajaja. Te agradezco infinitamente por que en estos últimos meses he crecido como persona he aprendido cosas y he aprendido a valorar otras. Que la vida te de cosas buenas!

***"Los desafíos de la vida no se supone que te paralicen, se supone que te ayudaran a descubrir quien eres."***

**Bernice Johnson Reagon**



# Índice

Agradecimientos

Lista de Figuras

Lista de Tablas

Abreviaturas

Resumen

## 1. Introducción

1.1 El *Splicing* alternativo

1.2 Mecanismo de *splicing*

1.2.1 Elementos en *cis*

1.2.2 Factores en *trans* que catalizan el *splicing*

1.3. Interacción de los factores de *splicing* con el pre-RNAm

1.4 Regulación del *splicing* alternativo

1.5 Relación entre *splicing* alternativo y las enfermedades humanas.

1.5.1. *Splicing* alternativo y el cancer

1.6 Proteínas hnRNP's

1.6.1 Motivos de unión al ARN

1.6.2 Características de las proteínas hnRNP A/B

1.6.3 Funciones biológicas de la hnRNP A1

1.6.4 hnRNP A1 y el *splicing*

1.6.5 hnRNP A1 y las enfermedades

1.7 *Ustilago maydis*

1.7.1 Ciclo de vida de *U. maydis*

1.7.2 *Ustilago maydis* como modelo de estudio

## 2. Antecedentes

2.1 Cristal de hnRNP A1 de *Homo sapiens*

2.2 RRM1 reconoce secuencias TTAGGG

## 3. Justificación

## 4. Hipótesis

## 5. Objetivos

5.1 Objetivo particular

5.2 Objetivos particulares

## 6. Materiales y métodos

6.1 Análisis bioinformático

6.1.1 Búsqueda de la secuencia putativa hnRNP A1 de *Homo sapiens* en *Ustilago maydis*

6.1.2. Alineamiento de las proteínas.

6.1.3 Análisis de la estructura terciaria de la proteína hnRNP A1

6.2 Microorganismos y condiciones de crecimiento

6.3 Medios de cultivo

6.4 Plásmidos empleados en este estudio

## 6.5 Técnicas generales de biología molecular

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

6.5.2 Extracción de ADN plamídico mediante Lisis Alcalina (Green & Sanbrook, 2012)

6.5.3 Extracción de RNA mediante la técnica de Fenol caliente ( Modificado Aiba y cols. 1981)

6.5.4 Cuantificación de RNA mediante espectroscopia (Green & Sanbrook, 2012)

6.5.5 Electroforesis de ADN y RNA en geles de agarosa (Green & Sanbrook, 2012)

6.5.6 Retrotranscripción (M-MuLV Reverse Transcriptase, Fermentas)

6.5.7 Amplificación de fragmentos de cDNA y ADN mediante la Reacción en Cadena de la polimerasa PCR (New England BioLabs)

6.5.8 Análisis con enzimas de restricción

6.5.9 Ligación de fragmentos de ADN en el vector pJET1.2 blunt

6.5.10 Purificación

6.5.10.1 Purificación de fragmentos de ADN y plásmidos en solución mediante glucógeno

6.5.10.2. Purificación de fragmentos de ADN y plásmidos en gel de agarosa mediante glucógeno

6.5.11 Subclonación en el vector de expresión pPROExHTa

## 6.6 Técnicas de transferencia genética

6.6.1 Preparación de Células competentes de *E. coli DH5α* por el método de Cloruro de calcio

6.6.2 Transformación de células competentes

## 6.7 Técnicas de proteínas recombinantes

6.7.1 Inducción de proteínas recombinantes en pPROExHTa

6.7.2 Electroforesis de proteínas (SDS-PAGE)

6.7.3 Western-blot

## 7. Resultados

7.1 Análisis in silico de la proteína hnRNP A1 putativa de *Ustilago maydis*

7.2 Identificación de los posibles sitios de regulación mediados por hnRNP A1 en el genoma de *Ustilago maydis*

7.3 Generar la proteína recombinante para hnRNP A1 putativa en *Ustilago maydis*, así como para diferentes versiones truncas de la misma

7.4 Corroborar la capacidad de umhnRNP A1 de interactuar con secuencias de unión reportadas.

## 8. Discusión de resultados

8.1 Análisis in silico de la proteína hnRNP A1 putativa de *Ustilago maydis*

8.2 Identificación de los posibles sitios de regulación mediados por hnRNP A1 en el genoma de *Ustilago maydis*

8.3 Generar la proteína recombinante para hnRNP A1 putativa en *Ustilago maydis*, así como para diferentes versiones truncas de la misma

8.4 Corroborar la capacidad de umhnRNP A1 de interactuar con secuencias de unión reportadas.

- 9. Conclusiones
- 10. Perspectivas.
- 11. Bibliografía

## Abreviaturas

°C	Grados celsius
3'ss	3' Sitio aceptor de splicing
5'ss	5' Sitio donador de splicing
A	Absorbancia
aa	Aminoacidos
AD	Enfermedad Alzheimer
Ad2	Adenovirus 2
Ade	Adenina
ADN	Acido desoxirribonucleico
Ala	Alanina
Amp	Ampicilina
APS	Persulfato de amonio
Arg	Arginina
ARN	Acido ribonucleico
Asp	Aspartato
ATP	Trisfosfato de adenosina
BLAST	Basic Local Alignment Search
BPS	Branchpoint
BRCA2	Cancer de seno tipo 2
DLFT	Degeneracion lobular frontotemporal
dNTP	Deoxynucleotido
EDTA	Acido etilendiaminotetraacetico
ELA	Esclerosis lateral amiotrofica
EMSA	Ensayo de cambio en la corrida electroforetica
ESE	Exonic splicing enhancer
ESS	Exonic splicing silencer
FWD	Forward
g	Gramos
Glu	Glutamina
Gly	Glicina
GRD	Dominio rico en glicinas
GST	Glutationtransferasa
Gua	Guanina
H <sub>2</sub> O	Agua
HCl	Acido clorhidrico
HEPES	Acido 4-(2-hydroxietil)-1-piperazineetansulfonico
hnRNA	ARN heterogeno nuclear
hnRNPs	Ribonucleoproteinas heterogeneas nucleares

hrs	Horas
HSP	Paraparesia espástica hereditaria
Ile	Isoleucina
IPTG	Isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido
IRF	Interferon regulatory factor
ISE	Intronic splicing enhancer
ISS	Intronic splicing silencer
kb	Kilobase
kDa	Kilodaltons
KOH	Hidroxido de sodio
L	Litros
LB	Luria-Bertani
Leu	Leucina
Lys	Lisina
Mb	Mega base pairs
Met	Metionina
mg	Miligramos
MgCl <sub>2</sub> ,	Cloruro de magnesio
min	Minutos
mL	Militros
mM	Milimolar
MS	Esclorisis multiple
mV	Milivolts
NaCl	Cloruro de Sodio
NCBI	Centro Nacional de Informacion Biotecnológica
ng	Nanogramos
nm	Nanometros
NMD	Nonsense-mediated decay
nt	Nucleotidos
O.D.	Densidad Optica
OH	Hidroxilo
P.M.	Peso molecular
p/v	Peso/volumen
pb	Pares de bases
PBS	Tampon fosfato salino
PCR	Reaccion en cadena de la polimerasa
PDB	Protein Data Bank
pH	Potencial de Hidrofeno
Phe	Fenilalanina
PKM	Piruvato kinasa
pre-RNAm	pre RNA mensajero
PTB	Dominio de union con fosfotirosina
PVDF	Polifluoruro de vinilideno

Py	Pirimidinas
Qk	Quaking
R	Arginina
RBPs	Proteínas de unión a RNA
REV	Reverso
RGG	Arginina, Glicina, Glicina
rpm	Revolución por minutos
RRM	ARN recognition motif
S	Serina
SDS	Dodecilsulfato sódico
SMA	Atrofia muscular espinal
SMN2	Survival of motor neuron 2
snRNPs	Ribonucleoproteínas nucleares pequeñas
ssADN	Ácido desoxirribonucleico monocatenario
STRING	Funcional protein association networks
TAE	Tris-Ácido acético-EDTA
TBE	Tris-Ácido bórico-EDTA
TdT	Transferasa terminal deocinucleotidil
TEMED	Tetrametiletildiamina
Thr	Treonina
Tris	Tris(hidroximetil)aminoetano
Tyr	Tirosina
u	Unidad
UFC	Unidad formadora de colonia
UTR	Untranslated region
Val	Valina
VIH	Virus de inmunodeficiencia humana
x g	Por gravedad
YEPS	Yeast extract/Peptone/Sucrose
μl	Microlitros

## Índice de Figuras.

Figura 1	Procesamiento de pre-RNA.
Figura 2	Mecanismo de <i>splicing</i> alternativo.
Figura 3	Tipos de <i>splicing</i> alternativo.
Figura 4	Elementos en cis que regulan el <i>splicing</i> de del pre RNA.
Figura 5	Composición molecular del <i>spliceosoma</i> .
Figura 6	Reacciones de transesterificación durante el <i>splicing</i> .
Figura 7	Consecución de las reacciones de <i>splicing</i> .
Figura 8	Regulación del <i>splicing</i> alternativo.
Figura 9	Familia de proteínas hnRNPs.

- Figura 10 Estructura del motivo RRM.
- Figura 11 Estructura de las proteínas hnRNPs A1, A2, A3 y A0 e isoformas de *splicing*.
- Figura 12 Diferentes mecanismos empleados por hnRNP A1 para controlar el *splicing*.
- Figura 13 *Ustilago maydis* en mazorca de maíz.
- Figura 14 Ciclo de vida de *Ustilago maydis*.
- Figura 15 Comparación del proteoma de *U. maydis*, *S. cerevisiae* y *H. sapiens*.
- Figura 16 Estructura del complejo de UP1 de *Homo sapiens*.
- Figura 17 Vista general del complejo UP1-TR2.
- Figura 18 Estructura de UP1 unida al ADN.
- Figura 19 Interacciones entre UP1 y TR2.
- Figura 20 hnRNP A1 se une a la telomerasa humana.
- Figura 21 Unión de hTR a UP1.
- Figura 22 Alineamiento global de la proteína hnRNP A1 de *Homo sapiens* con hnRNP A1 putativa en *Ustilago maydis*.
- Figura 23 Alineamiento del dominio RRM1 de *Ustilago maydis* y *Homo sapiens*.
- Figura 24 Alineamiento del dominio RRM2 de *Ustilago maydis* y *Homo sapiens*.
- Figura 25 Alineamiento de la seña de exportación M9 en *Homo sapiens* y *Ustilago maydis*
- Figura 26 Estructura de UP1 de *Homo sapiens*.
- Figura 27 Análisis de los aminoácidos conservados en *Ustilago maydis*
- Figura 28 Modelo de la proteína hnRNP A1 de *Ustilago maydis*
- Figura 29 Superposición de la UP1 de *Homo sapiens* y de la hnRNP A1 de *Ustilago maydis*.
- Figura 30 Superposición del dominio RRM1 de UP1 de *Homo sapiens* y de RRM1 de hnRNP A1 de *Ustilago maydis*.
- Figura 31 Superposición del dominio RRM2 de UP1 de *Homo sapiens* y de RRM2 de hnRNP A1 de *Ustilago maydis*.
- Figura 32 Interacción entre los dominios RRM1 y RRM2 de UP1.
- Figura 33 Interacción entre UP1 y la secuencia TTAGGG.
- Figura 34 Análisis de la proteína UMAG\_02420 de *Ustilago maydis* y de la proteína hnRNP A1 de *Homo sapiens* con el programa STRING
- Figura 35 Análisis de las interacciones de la proteína UMAG\_0240 de *Ustilago maydis* ampliando el rango a 20 proteínas
- Figura 36 Frecuencia observada para las diferentes secuencias de pegado de reportadas para hnRNP A1.
- Figura 37 Estructura del locus UMAG\_02420.
- Figura 38 Proteína hnRNP A1 putativa en *Ustilago maydis*.
- Figura 39 Estructura de la proteína hnRNP A1 putativa en *Ustilago maydis*.
- Figura 40 Validación de los oligos
- Figura 41 Amplificación de la versión A1SNRRM.
- Figura 42 Gel de electroferisis de los plasmidos de las clonas pJET-A1SNRRM/*DH5 $\alpha$*
- Figura 43 Esquema y análisis de restricción de la versión A1SNRRM

- Figura 44 Esquema de electroforesis de la PCR para confirmar la inserción del inserto en orientación 5'-3'.
- Figura 45 Esquema y gel de electroforesis de el corte con las enzimas *XbaI* y *XhoI*.
- Figura 46 Electroforesis de la digestión y purificación del vector pPROExHTa.
- Figura 47 Electroforesis de la purificación de A1SNRRM.
- Figura 48 Gel de electroforesis para la verificación de las clonas positivas de A1SNRR- pPROExHTa
- Figura 49 Electroforesis de la PCR A1RRM1 y RRM2
- Figura 50 Esquema y electroforesis del análisis de restricción de la versión A1RRM1 y RRM2
- Figura 51 Esquema y electroforesis de la PCR para confirmar la clonación del inserto en orientación 5'-3' de A1RRM1 y A1RRM2
- Figura 52 Esquema y gel de electroforesis del corte con las enzimas *XbaI* y *XhoI*. de las construcciones pJETA1RRM1/DH5 $\alpha$  y de pJETA1RRM2/ DH5 $\alpha$
- Figura 53 Gel de electroforesis de la purificación de A1RRM1 y RRM2
- Figura 54 Gel de electroforesis de A1RRM2- pPROExHTc cortadas con la enzima *EcoRV*.
- Figura 55 Amplificación por PCR de A1RRM2 clonado en pPROExHTc.
- Figura 56 Electroforesis de ARN.
- Figura 57 Amplificación por PCR a partir de cDNA empleando los oligos A1Fwd y A1Rev.
- FIGURA 58 Proteínas truncas recombinantes umHis-pPROA1SNRRM/DH5 $\alpha$  y umHis-pPROA1RRM2/DH5 $\alpha$  de hnRNP A1 de Ustilago maydis
- Figura 59 Western blot de las proteínas umHis-pPROA1SNRRM/DH5 $\alpha$  y umHis-pPROA1RRM2/DH5 $\alpha$



## Índice de Tablas

Tabla 1	Cambios en la expresión de algunos factores de <i>splicing</i> en diferentes tipos de cáncer
Tabla 2	Clasificación científica de <i>U. maydis</i>
Tabla 3	Cepas empleadas
Tabla 4	Componentes del medio YEPS
Tabla 5	Componentes del medio LB
Tabla 6	Plásmidos empleados en la construcción de las clonas
Tabla 7	Componentes para la reacción de PCR
Tabla 8	Programas de PCRC para cada uno de los genes
Tabla 9	Componentes para la reacción con enzimas de restricción
Tabla 10	Componentes para la reacción de ligación
Tabla 11	Componentes para la subclonación en pPROExHTa
Tabla 12	Componentes para el Gel separador
Tabla 13	Componentes para el Gel concentrador
Tabla 14	Homólogo para la proteína hnRNP A1 en <i>Ustilago maydis</i>
Tabla 15	Dominios RRM en <i>Homo sapiens</i> y <i>Ustilago maydis</i>
Tabla 16	Proteínas con las cuales interacciona UMAG_02420
Tabla 17	Proteínas con las cuales interacciona hnRNP A1 de <i>Homo sapiens</i>
Tabla 18	Análisis de las proteínas con las cuales interacciona hnRNP A1 de <i>Ustilago maydis</i>
Tabla 19	Genes de humano que presentan un homólogo en <i>Ustilago maydis</i> para los cuales la secuencia de reconocimiento para la proteína hnRNP A1 se encuentra también conservada.
Tabla 20	Oligos empleados para la amplificación de las diferentes versiones de hnRNP A1 putativa de <i>Ustilago maydis</i> .

## Resumen

Se le denomina *splicing* a un proceso que se lleva a cabo en eucariotas en el cual el ARN mensajero sufre la eliminación de secuencias internas no codificantes llamadas intrones y la unión de secuencias codificantes denominadas exones. Empleando este mecanismo un mismo transcrito primario o pre-ARNm puede sufrir diversos procesos de *splicing*, permitiendo que a partir de un mismo gen se obtengan diversas proteínas, a este proceso se le denomina *splicing* alternativo. Este mecanismo es catalizado por un complejo de factores en *trans* denominado *spliceosoma*, formado por diferentes proteínas, las cuales se unen a secuencias consenso denominados elementos en *cis* que se encuentran en la misma secuencia del pre-ARNm. Además del *spliceosoma*, en el *splicing* alternativo participan las proteínas reguladoras que corresponden a las SR y hnRNPs. La proteína hnRNP A1 se une al pre-ARNm y en general favorece la omisión ya sea de los intrones o de los exones. Esta proteína está constituida por dominios estructurales ligados por un conector de longitud variable. El dominio que prevalece en estas proteínas es el denominado RRM, el cual presenta una estructura tridimensional característica ( $\beta 1-\alpha 1-\beta 2-\beta 3-\alpha 2-\beta 4$ ) y además incluye dos secuencias RNP altamente degeneradas, RNP-1 y RNP-2. Los mecanismos por los que hnRNP A1 reprime un sitio de empalme se han examinado en pocos casos. Por otro lado, se ha visto que en algunos tipos de cáncer la proteína hnRNP A1 se ve sobreexpresada, haciendo importante su estudio.

En este trabajo se analizó la proteína putativa de hnRNP A1 de *Ustilago maydis*. Inicialmente, se realizó el análisis *in silico* de la proteína para identificar al homólogo en *Ustilago maydis* y se comparó la estructura tridimensional de ambos péptidos, así como su interacción con otras proteínas. Pudimos observar que ambas proteínas espacialmente son similares y que los aminoácidos responsables de la interacción con el pre-ARNm se encuentran conservados. Se buscaron las secuencias de pegado reportadas para hnRNP A1 en el genoma de *U. maydis* empleando el programa GeneFinder, encontrando que la secuencia más prevalente fue el repetido AGGGA, encontrado en el 42.5% del genoma del hongo, sugiriendo que pudiera tener una función relevante en la regulación de la expresión en este organismo. De manera interesante, algunos de los genes que presentan esta secuencia reguladora se encuentran también en los homólogos para humano y dichos homólogos están implicados en cáncer o en enfermedades humanas. Por otro lado, se construyeron versiones truncas de la proteína umhnRNP A1, las cuales incluían diferentes dominios de unión al ARN. Una vez obtenidas las proteínas recombinantes, se llevó a cabo su expresión y su identificación mediante Western Blot. En general, las evidencias obtenidas sugieren que hnRNP A1 se encuentra altamente conservada entre *U. maydis* y humano y se propone que pueda tener una función similar en ambos organismos.

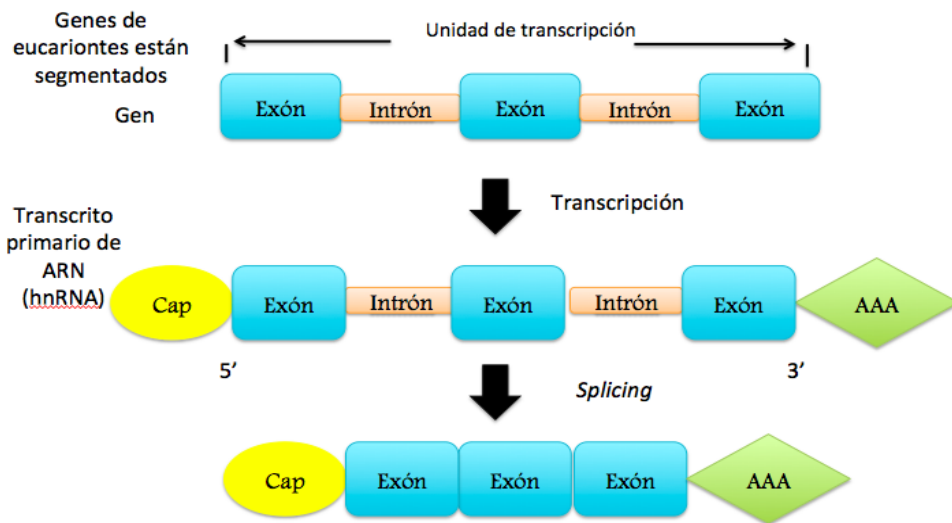
## 1. Introducción

La relación que existe entre la información almacenada en el ADN, el mensaje transmitido a través del ARNm y su expresión en la secuencia aminoacídica había sido demostrado en los organismos procariotas y se pensaba que a pesar de su mayor complejidad, los organismos eucariotas seguían las mismas pautas (Valpuesta 2008). Sin embargo, en los años sesenta se dieron las primeras evidencias de que esto no ocurría así. El grupo de Jim Darnell detectó en el núcleo un ARN de mayor tamaño que el que posteriormente se detectaba en el citoplasma. Este tipo de ARN fue denominado ARN heterogéneo nuclear (hnRNA) y se describió como algún tipo de precursor del ARNm (Scherrer y Darnell 1962), sin embargo su caracterización se vio impedida durante años por la falta de técnicas adecuadas (Valpuesta 2008).

En 1977, Roberts y Sharp encontraron que la secuencia de nucleótidos de los genes de adenovirus 2 (Ad2) contenían segmentos de ADN con información para la producción de proteínas (codificantes) alternadas con secuencias que no contenían información para ello (no codificantes); es decir, que los genes de estos virus estaban segmentados (Chow y cols. 1977, Berget y cols. 1977). Los transcritos primarios de estos genes se producían como moléculas grandes que requerían ser cortadas para eliminar los segmentos no codificantes denominados intrones y religar los segmentos codificantes denominados exones, a este proceso se le denominó *splicing* (Jiménez-García y cols. 2007). El ARNm producido a partir de estos genes de adenovirus tenía un tamaño menor a la secuencia correspondiente en el ADN genómico de la cual era copiado. Estos datos permitieron ofrecer una explicación para las observaciones de Darnell de que el ARN nuclear era de mayor tamaño que el del citoplasma (Scherrer y Darnell 1962).

Actualmente se conoce que los genes de eucariotes están segmentados, lo que lleva a la producción de un transcrito primario de igual tamaño que el gen, llamado ARN pre-mensajero (pre-RNm) o ARN heterogéneo nuclear (hnRNA) (Jiménez-García y cols. 2007). Estos transcritos inmaduros son procesados o madurados mediante tres eventos principales que se describen a continuación (Fig. 1):

- La metilación en el extremo 5' consiste en la adición del grupo 7-metilguanosa, denominado cap, que es necesario para la unión al ribosoma durante la traducción (Shatkin 1976).
- La polidensilación en el extremo 3' que se refiere a la adición de adeninas en todos los ARNm excepto los de las histonas, la cual está formada por una secuencia de aproximadamente 50 a 250 nucleótidos y evita la degradación del ARN (Darnell y cols. 1971).
- El *splicing*, que es el proceso mediante el cual se eliminan las secuencias no codificantes o intrones y se unen o empalman los exones para generar el ARN mensajero maduro (Jiménez-García y cols. 2007).

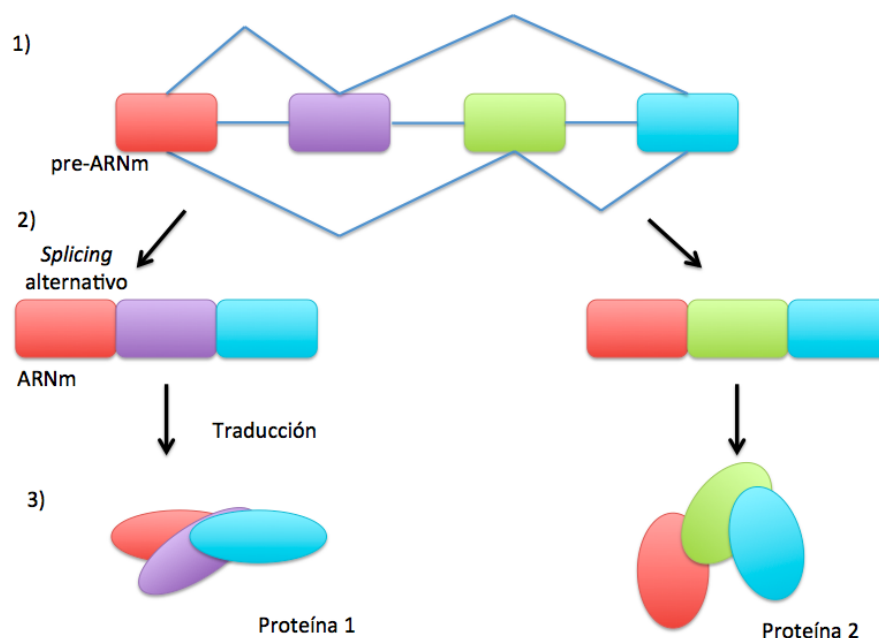


**Figura 1.**

**Procesamiento del pre-RNA<sub>m</sub>.** Los genes de los eucariontes se encuentran segmentados y sufren ciertos procesos para su maduración, entre los que se encuentran la adición del grupo 7-metilguanósina, denominado cap, en el extremo 5', así como la adición de adeninas (poli A) en el extremo 3' y por último el mecanismo de *splicing*.

### 1.1 El *Splicing* alternativo

El *splicing* alternativo es un proceso regulado en eucariotes que conduce a diferentes ARNm a partir de un mismo gen, los cuales codifican para proteínas diferentes, ampliando enormemente la diversidad del proteoma (Black 2003) con especial énfasis en las implicaciones que tiene el *splicing* alternativo para el humano (Kornblihtt y cols. 2013), ya que en humano este evento ocurre en el 95% de todos sus genes (Wang y cols. 2008) (Figura 2).

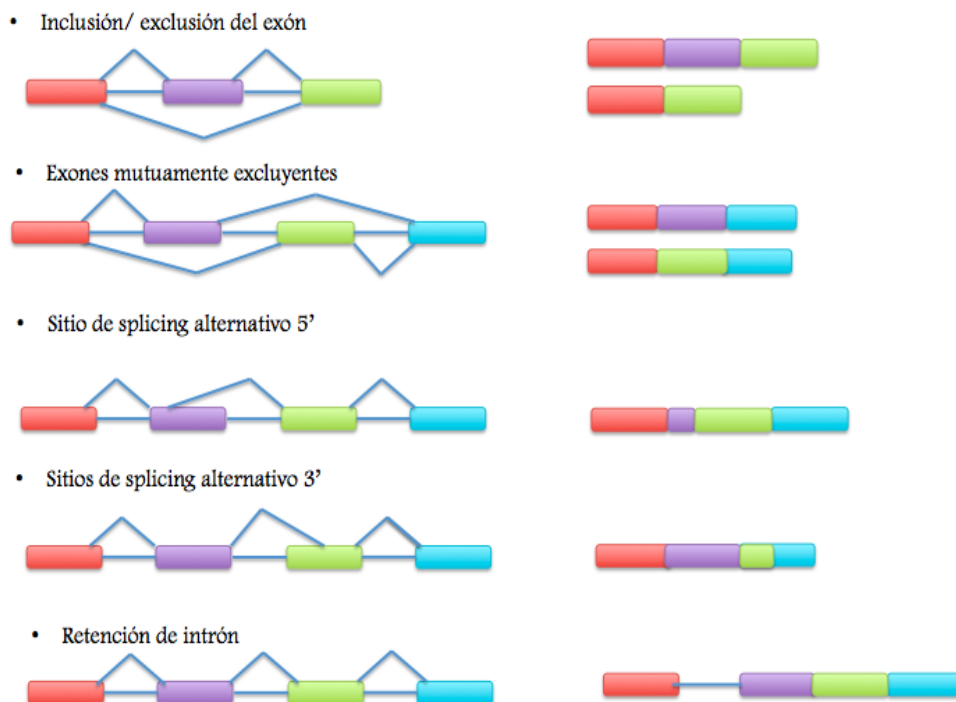


**Figura 2. Mecanismo de *splicing* alternativo.** A partir de un mismo gen (paso 1) se pueden crear diferentes ARNm (paso 2) ,generando diversas proteínas (paso 3).

El *splicing* alternativo ocurre cuando algunos exones, intrones o porciones de los mismos son incluidos de manera diferencial para producir diversas moléculas de ARNm a partir de un mismo pre-ARNm (Martínez-Montiel N y cols. 2015).

Existen diferentes tipos de *splicing* alternativo (Fig. 3) entre los que se encuentran los siguientes: la inclusión o exclusión de un exón completo, la elección de exones mutuamente excluyentes, la retención de un intrón, así como el uso de sitios de *splicing* alternativos hacia el 3' o hacia el 5' y secuencias alternativas de poliadenilación o para el inicio de la transcripción (Koren y cols. 2007; Galante y cols. 2004). La retención de intrón es uno de los casos menos estudiado y puede deberse a que dicho intrón exhibe señales de *splicing* débiles aunque también se ha asociado a genes que presentan intrones cortos (Ding y cols. 2009).

El *splicing* alternativo puede generar isoformas de proteínas con diferentes propiedades biológicas como en su interacción con otras proteínas, localización subcelular o capacidad catalítica. Más de una cuarta parte de los exones alternativos introducen codones de paro prematuros y estos pueden dar lugar ya sea a la formación de proteínas truncas o a la degradación del ARNm mediante el NMD (Pan y cols. 2006).



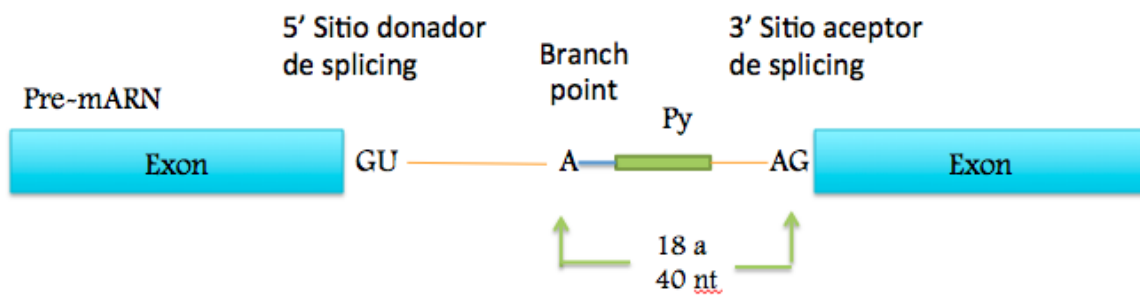
**Figura 3. Tipos de *splicing* alternativo.** Se observan los diferentes eventos de *splicing* mediante el cual se pueden crear diferentes isoformas de una proteína. En barras azules se muestran los intrones y con rectángulos de diversos colores los exones.

## 1.2 Mecanismo de *splicing*

El mecanismo mediante el cual se lleva a cabo el *splicing* está regulado por numerosos elementos que actúan en *cis* que son secuencias contenidas en el pre-ARNm además de diversos factores en *trans* que corresponden a diferentes proteínas nucleares y que en conjunto regulan la producción de diferentes transcritos.

### 1.2.1 Elementos en *cis*

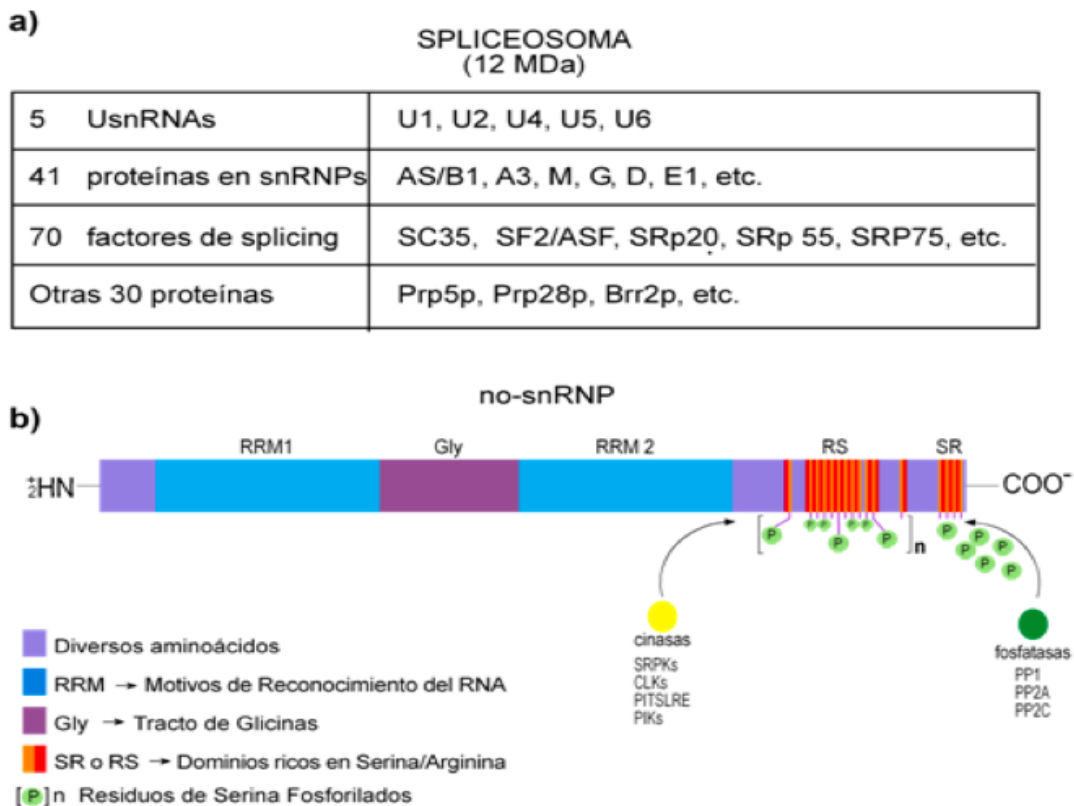
El pre-ARNm se forma a partir de un gen interrumpido y tiene varios sitios en *cis* o elementos presentes dentro de la misma secuencia. Las secuencias más conservadas son las que limitan las uniones entre los exones y los intrones: el sitio de *splicing* 5' o sitio donador de *splicing* que presenta el dinucleótido GU al inicio del intrón y el sitio de *splicing* 3' o el sitio aceptor de *splicing* que incluye el dinucleótido AG (Fig. 4). Otro elemento importante es la secuencia de ramificación o BPS (branchpoint) que mantiene una secuencia consenso degenerada que incluye una adenina. Entre el sitio BPS y el dinucleótido AG se encuentra una región rica en pirimidinas (uracilos usualmente) llamada la región Py (Reed 2000, Hastings y Krainer 2001).



**Figura 4. Elementos en *cis* que regulan el *splicing* del pre-RNAm.** Se muestran en barras color azul los exones y en líneas rojas los intrones. Flanqueando el intrón se encuentran el sitio donador de *splicing* (5'ss) con el dímero GU y el sitio aceptor de *splicing* (3'ss) con el dímero AG. Se indica también el tracto rico en pirimidinas (barra color verde) y una adenina (A) conservada a 18-40 nt denominada BPS (*branch point sequence*).

### 1.2.2 Factores en *trans* que catalizan el *splicing*

El fraccionamiento de los extractos celulares con actividad en el *splicing* permitió la identificación del *spliceosoma* (Brody y Abelson 1985) como un enorme complejo multiproteico a menudo comparado con el ribosoma por su estructura y composición enzimática. El *spliceosoma* está compuesto por partículas ribonucleoproteicas nucleares pequeñas o snRNPs, que se unen secuencialmente a los intrones y/o entre sí (Figura 5). El proceso de ensamblado del *spliceosoma* necesita además de proteínas no-snRNPs, como las proteínas hnRNPs, llamadas así porque forman un complejo al asociarse al ARN heterogéneo nuclear (hnARN).



**Figura 5. Composición molecular del spliceosoma.** a) Diferentes componentes del spliceosoma, incluyendo elementos proteicos y de ARN. b) Esquema genérico de factores de *splicing* no -snRNPs (proteínas SR) con los dominios estructurales que las componen y las cinasas y fosfatasa que los modifican (Modificado de Jiménez-García LF y cols. 2007).

Al centro de cada snRNP se encuentran los ARN pequeños nucleares cuyas longitudes oscilan entre 60 y 300 nucleótidos y son ricos en residuos de uracilo (UsnRNA) y que conforman a las cinco UsnRNPs: U1, U2, U4, U5 y U6. Estas moléculas de ARN son transcritas por la RNA polimerasa II, salvo el U6 snRNA, que lo transcribe la RNA polimerasa III. En el núcleo, los UsnRNAs se asocian a diversas proteínas específicas para formar ribonucleoproteínas pequeñas nucleares (UsnRNPs) (Jiménez-García y cols. 2007).

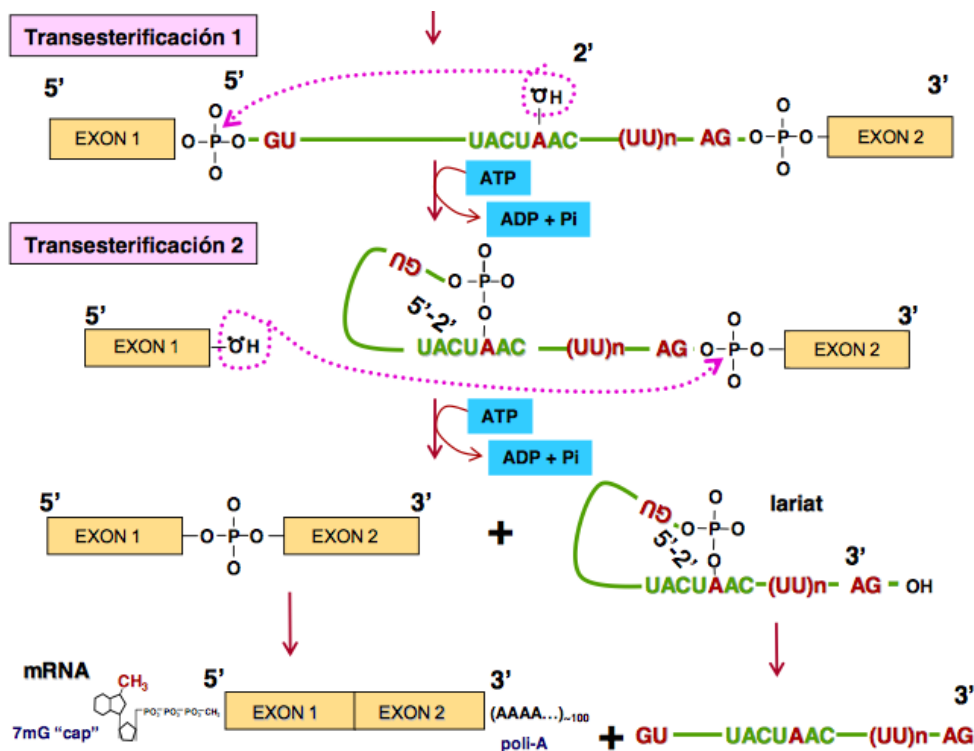
Otro grupo importante de factores en trans incluye a las proteínas SR (proteínas con dominios ricos en Serina y Arginina) y representan una familia de factores de *splicing* que se reporta en vertebrados, invertebrados y plantas. La secuencia de aminoácidos en estas proteínas es rica en residuos de serina (S) y arginina (R) en el extremo carboxilo, formando el dominio SR. Estas proteínas tienen varios papeles reguladores en el *splicing* como son la definición de los sitios de *splicing* y el acercamiento de los mismos. Estas proteínas nucleares tienen masas de 20 a 75 kDa y tienen la capacidad de fosforilarse, como se esquematiza en la figura 5b (Jiménez-García y cols. 2007).

Además de las snRNPs, durante el *splicing* se asocian al pre-ARNm las hnRNPs que cumplen una función estabilizadora, impidiendo la formación de estructuras secundarias dadas por el apareamiento de bases; de ésta manera el pre-ARNm permanece accesible para interactuar con otras moléculas.

### 1.3 Interacción de los factores de *splicing* con el pre-RNA<sub>m</sub>

Químicamente, el *splicing* es un proceso que se lleva a cabo mediante dos reacciones sucesivas de transesterificación. El corte y empalme son dependientes de la hidrólisis de ATP y son catalizadas por el “*spliceosoma*”. Este proceso dará como resultado la formación del ARNm que será transportado al citoplasma en donde será traducido a diversas proteínas. El *splicing* se lleva a cabo en el núcleo aunque hay reportes de que también puede ser citoplasmático (Eran 2005).

En el primer paso de transesterificación, el grupo OH de la ribosa del residuo de adenina en el sitio de *splicing*, realiza un ataque nucleofílico hacia el sitio de *splicing* 5', generando la ruptura del enlace fosfodiéster. Al mismo tiempo la guanina del dinucleótido realiza un enlace a través de su extremo 5' con la posición 2' del residuo de adenina en el sitio de *splicing*. A continuación ocurre la segunda reacción de transesterificación, en la cual el grupo OH del extremo del exón realiza un ataque nucleofílico hacia el sitio de *splicing* 3'. Como resultado, se libera el intrón como una estructura en forma de lazo o “*lariat*”, al mismo tiempo que se unen los exones para generar el ARNm maduro. El intrón en forma de lazo se rompe nuevamente en su enlace 5'-2' y se lineariza, posibilitando que sea degradado o bien procesado nuevamente para dar lugar a un RNA pequeño nucleolar rico en uracilo (UsnoRNA) (Figura 6) (Reed 2000)

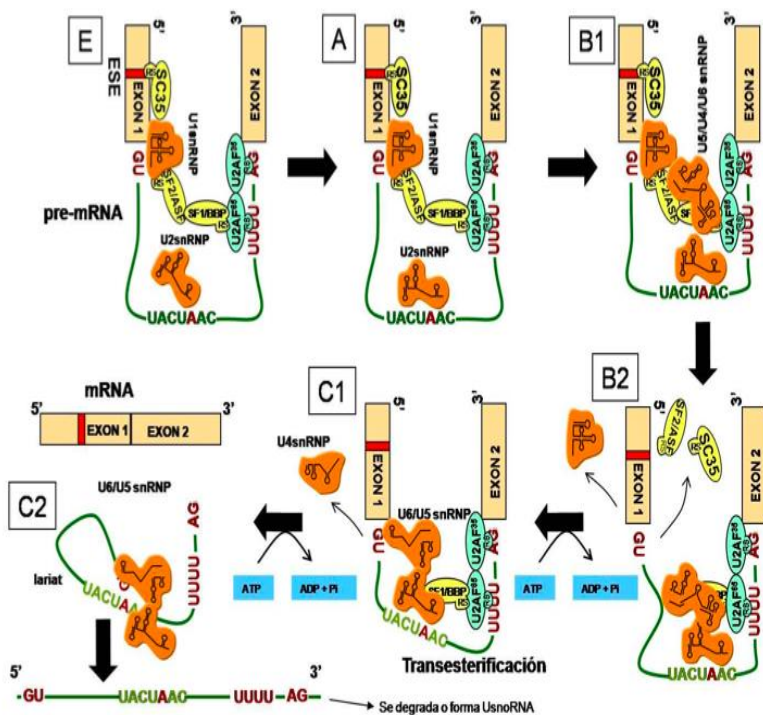


**Figura 6. Reacciones de transesterificación durante el *splicing*.** Para catalizar el *splicing* ocurren dos pasos de transesterificación en donde se requiere de ATP. En la reacción se libera el intrón y se ligan los exones (Modificada de Jiménez- García y cols, 2007).



Los factores de *splicing* interactúan con el pre-mRNA, formando complejos ribonucleoproteicos transitorios que permitirán que ocurran los dos pasos de transesterificación (Fig. 7), en el orden que se describe a continuación:

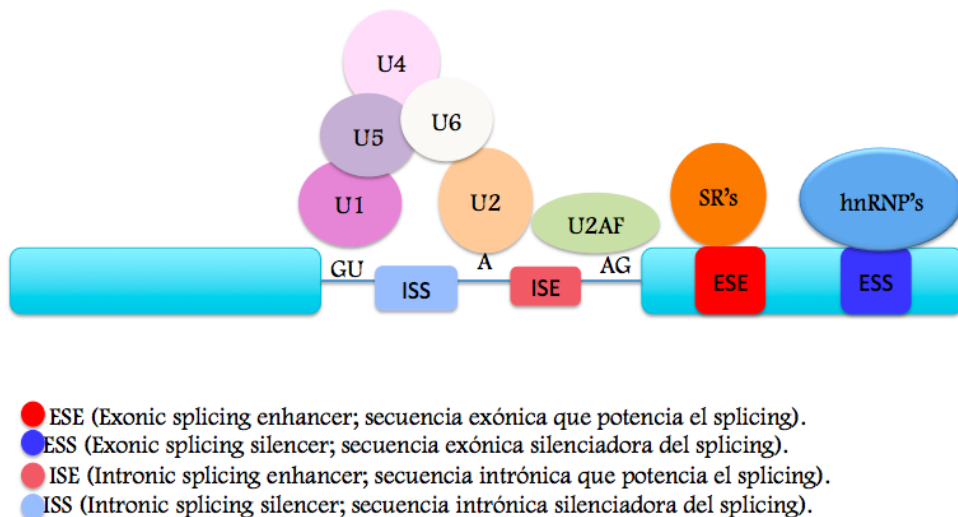
- En el primer paso se forma el complejo **E**, que se caracteriza por la unión del U1snRNA que forma parte de la U1snRNP con el 5'ss; este reconocimiento está dado por una secuencia presente en el U1snRNA, la cual es complementaria con el sitio de unión exón-intrón, provocando un apareamiento con los primeros seis nucleótidos del intrón, delimitando así el exón 1. Para la formación de este complejo ocurre también la unión del factor U2AF (que presenta un dominio SR) con la secuencia rica en pirimidinas (Py). También puede darse la participación en el complejo de factores SC35, SF2/ASF, SFI/BBP y del U2snRNA.
- Posteriormente, el complejo **E** se transforma en el complejo **A** cuando el U2snRNP se une al 3'ss.
- El complejo **B1** se forma por la asociación del trímero U4/U5/U6snRNP preensamblado. Así, el U5snRNA se une al sitio de *splicing* 5' y el U6snRNA se une al U2snRNA. Este complejo forma un *spliceosoma* maduro.
- A continuación se forma el complejo **B2** en donde se libera el U1snRNA, el U5snRNA se traslada del exón hacia el intrón y el U6snRNA se une al 5'ss. Este paso se lleva a cabo mediante un apareamiento de aproximadamente 20 bases entre el U1snRNA y el U4snRNA. Como consecuencia, se activa el *spliceosoma* para llevar a cabo la catálisis. La función del U5snRNA consiste en interactuar con secuencias del exón al lado del 5'ss y del 3'ss.
- El complejo **C1** se forma cuando se libera el U4snRNA y el U5snRNA se une al exón en el 3'ss. En este punto ocurre la primera transesterificación, con lo que ocurre un corte en el 5'ss y se forma el *lariat*.
- Finalmente se forma el complejo **C2** que contiene el trímero U2/U5/U6snRNAs, que permite el corte en el sitio de *splicing* y se ligan las secuencias exónicas flanqueantes.



**Figura 7. Consecución de las reacciones de *splicing*.** Para completar el proceso de splicing, es necesario que ocurran varios pasos de manera secuencial, los cuales son catalizados por el *spliceosoma* (complejos E -> A-> B1-> B2 -> C1 -> C2). Los factores auxiliares como U2AF65/35 (verde) y las proteínas SR (amarillo) interactúan con los factores snRNP (naranja), participando en el reconocimiento y acercamiento de los sitios de unión intrón-exón, conduciendo a las dos reacciones de transesterificación (Jiménez-García y cols. 2007).

#### 1.4 Regulación del *splicing* alternativo

La regulación del *splicing* alternativo depende de la interacción de un gran número de factores de *splicing* y de elementos reguladores en el pre-mRNA. Dentro de este grupo se encuentran una serie de proteínas ampliamente expresadas que parecen tener diversas funciones en la biogénesis del ARNm. Este grupo incluye a las proteínas SR y a la familia de las hnRNP, donde las primeras tienden a promover la inclusión del exón mientras que las últimas por lo general tienen un efecto contrario (Ouyang 2009). Estos factores reguladores pueden reconocer a diversos elementos en *cis* (Goren y cols. 2006) que pueden facilitar (*enhancer*) o reprimir (*silencer*) el *splicing* y que pueden localizarse en el exón o en el intrón (Fig. 8)



**Figura 8. Regulación del *splicing* alternativo.** El *splicing* se regula por elementos en *cis* que pueden ser reconocidos por dos grupos principales: las proteínas SR que se unen por lo general a elementos potenciadores y las proteínas hnRNPs, las cuales reconocen sobre todo a sitios silenciadores.

Los elementos reguladores localizados en los exones suelen ser motivos muy cortos de 4-18 nucleótidos y corresponden a ESE o ESS dependiendo de si promueven o inhiben la inclusión del exón en el que residen (Goren y cols. 2006). Por su parte, los elementos intrónicos pueden considerarse ISE o ISS dependiendo de si favorecen o inhiben el uso de sitios de *splicing* adyacentes a una ubicación intrónica.

#### 1.5 Relación entre el *splicing* alternativo y las enfermedades humanas.

Existen pocos informes de mutaciones en los elementos básicos de la maquinaria de *splicing* que resulten en enfermedades. Por ejemplo la retinitis pigmentosa autosómica dominante es causada por la mutación en los factores de *splicing* PRPF31/U4-61k (Vithana y cols. 2001) y PRP8 (Boon y cols. 2007).

Es posible que los defectos en la maquinaria básica de *splicing* no sean compatibles con la vida, mientras que cambios en el *splicing* pueden ser tolerados por el organismo a pesar de que estos cambios se podrán manifestar como una enfermedad. El *splicing* alternativo afecta numerosos genes, de donde no resulta sorprendente que estos cambios se asocien con enfermedades humanas.

Aún se desconocen las funciones específicas para la mayoría de las isoformas generadas mediante *splicing* alternativo; sin embargo, existen numerosos ejemplos de cómo distintas isoformas muestran diferencias dramáticas en sus propiedades y funciones biológicas (Nilsen y Graveley 2010). Un ejemplo es el receptor Fas/CD95 implicado en la activación del proceso de apoptosis, en donde la inclusión o no del exón 6, el cual codifica para la región de inserción en la membrana de la célula, da lugar a dos isoformas con propiedades distintas. La inclusión del exón genera un ARNm maduro que genera la versión del receptor capaz de unirse a la membrana de la célula y que al ser activada por el ligando correspondiente, induce la apoptosis. Por el contrario, cuando se excluye el exón 6, el *splicing* entre los exones 5 y 7 genera un ARNm que codifica la versión de un receptor soluble, el cual es secretado al medio extracelular donde puede unirse al ligando sin señalizar al interior celular, inhibiendo el procesos de apoptosis. De esta forma la célula toma una decisión radicalmente distinta sobre su propio destino (Tejedor y cols. 2015)

### **1.5.1 *Splicing* alternativo y el cáncer**

El caso de Fas/CD95 es uno de los numerosos ejemplos en los que el proceso de *splicing* alternativo puede modular la función de genes importantes para la transformación tumoral y la progresión del cáncer, contribuyendo a procesos que incluyen desde la proliferación y muerte celular hasta el procesos de formación de vasos sanguíneos en el tumor (angiogénesis) o la migración celular y metástasis a otros tejidos (David y Manley 2010, Bonnal y cols. 2012)

Como ejemplo se tiene el gen de la piruvato kinasa (PKM), implicado en el mecanismo molecular del efecto Warbur, por el cual las células cancerosas adquieren la capacidad de obtener energía a través de la glicólisis en condiciones aeróbicas, lo que confiere una mayor capacidad proliferativa. El gen PKM contiene dos exones alternativos que son mutuamente excluyentes: el exón 9 se incluye en células de tejidos adultos, dando lugar a la isoforma PKM1, mientras que el exón 10 se incluye en tejidos embrionarios y en células cancerosas, dando lugar a la isoforma PKM2. La expresión de la isoforma PKM2 capacita a las células cancerosas para llevar a cabo la glicólisis aeróbica (Christofky cols. 2008).

Trabajos recientes han establecido que la activación del oncogen c-myc en células tumorales induce la expresión de tres proteínas hnRNP A1, hnRNP A2 y PTB que se unen al transcrito primario del gen PKM en la región del exón 9 impidiendo su reconocimiento por la maquinaria de *splicing* permitiendo así la incorporación del exón 10 y la expresión de la isoforma PKM2 (David y Manley 2010). Estudios recientes enfatizan la relevancia del proceso de *splicing* en varios tipos de cáncer y sugieren posibilidades terapéuticas basadas en la modulación de este proceso (Bonnal y cols. 2012).

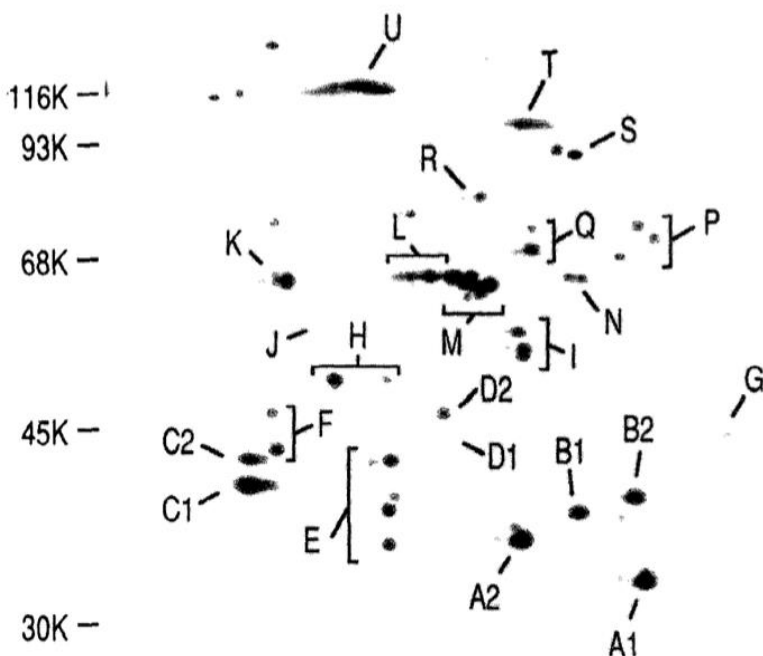
La importancia de alteraciones en el *splicing* alternativo para la progresión tumoral, la prevalencia de mutaciones en factores de *splicing* en ciertos tipos de cáncer y las propiedades antitumorales de drogas cuyos blancos terapéuticos sean factores de *splicing* sugieren que una comprensión más completa de los mecanismos implicados en este proceso tiene gran potencial para explicar los mecanismos moleculares responsables de enfermedades oncológicas y para el desarrollo de terapias innovadoras (Varcárcel 2003).

## 1.6 Proteínas hnRNP

En la última década, los avances en la investigación genómica han puesto de relieve el papel fundamental que los eventos post-transcripcionales desempeñan en la regulación de la expresión génica. Las proteínas de unión al ARN (RBPs) controlan y regulan las diversas etapas de la maduración de los transcritos nacientes. Las RBPs modulan el proceso de la unión del cap en el extremo 5' el *splicing*, la poliadenilación en el extremo 3', la exportación nuclear, así como la estabilidad y la traducción de los ARNm, mediante el reconocimiento de secuencias específicas o estructuras secundarias de unión dentro de los transcritos. Las proteínas hnRNP se encuentran entre las más estudiadas y constituyen la familia más grande de RBPs (Jacques y cols. 2003).

Las hnRNPs (ribonucleoproteínas heterogéneas nucleares) son un conjunto de proteínas principalmente nucleares que se unen a los transcritos nacientes producidos por la ARN polimerasa II (Dreyfuss y cols. 1993). El término hnRNP fue acuñado inicialmente para indicar a un grupo de proteínas asociadas con el ARN de alto peso molecular nuclear (Piñol-Roma S y cols. 1988); estas proteínas se conservan en eucariotas y están involucradas en una variedad de eventos de procesamiento del ARN incluyendo el *splicing*, el transporte y la traducción (Martínez-Contreras y cols. 2007).

La base de esta definición se puede encontrar en la historia de los procedimientos experimentales usados para aislar a las hnRNPs. Originalmente, los gradientes de densidad de sacarosa se usaron para separar los complejos ARN-proteína, lo que llevó a la identificación de las partículas de 40S que comprenden las hnRNP A/B y C (Beyer y cols. 1977). Posteriormente se hizo uso del *cross-linking* para aislar RBPs de células intactas con mayor especificidad, ampliando la gama de hnRNPs detectadas (Van Eekelen y cols. 1981). Sin embargo, la lista definitiva de hnRNPs se generó por inmunopurificación con anticuerpos monoclonales contra hnRNP C en combinación con electroforesis en gel de dos dimensiones (Piñol-Roma y cols. 1988) que produjo una colección de 20 proteínas que fueron nombradas como hnRNP A-T (Figura 9) con pesos moleculares que van de 34 a 120 kDa (Dreyfuss y cols. 1993).



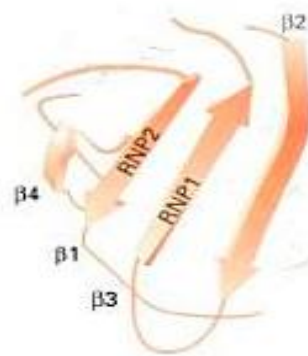
**Figura 9. Familia de proteínas hnRNPs.** Para separar estas proteínas se realizó la inmunopurificación con el anticuerpo monoclonal 4F4 de la proteína C en células HeLa y se separaron mediante electroforesis bidimensional. Las proteínas individuales se indican con una línea y con corchete las posibles isoformas. La relación estructural entre la proteína indicada y otras proteínas que presentan migraciones similares, son detectables en este gel (Dreyfuss y cols. 1993).

La producción de anticuerpos monoclonales específicos contra las hnRNPs proporcionó una herramienta esencial para el aislamiento de hnRNPs individuales y la posterior caracterización de sus secuencias y estructuras. Por otro lado, la inmunotinción utilizando los mismos anticuerpos reveló que por lo general tienen una distribución en el nucleoplasma (Hang y cols. 2010).

### 1.6.1 Motivos de unión al ARN

Las hnRNPs comparten una estructura modular que consiste en uno o más dominios de unión a RNA (RBDS) (Jacques y cols. 2003). El motivo más prevalente entre las proteínas hnRNP es el RRM (motivo de reconocimiento de ARN, por sus siglas en inglés; Hoffman y cols 1991). Estos dominios globulares son altamente conservados y se encuentran en varias otras familias de proteínas (Hang y cols. 2010).

Este motivo de  $\approx 80$  aminoácidos presenta una estructura tridimensional característica ( $\beta 1$   $\alpha$ -1- $\beta 2$ - $\beta 3$ - $\alpha 2$ - $\beta 4$ ) y además incluye dos secuencias RNP altamente degeneradas, RNP-1 y RNP-2 (Birney 1993), las cuales se encuentran separadas por aproximadamente 30 aminoácidos (Dreyfuss y cols. 1988). El octapéptido RNP1 (Lys/Arg-Gly-Phe/Tyr- Gly/Ala-Phe-Val-X-Phe/Tyr) es el segmento más altamente conservado del motivo RNP (Adam SA y cols. 1986). La secuencia RNP2 es un hexapéptido menos conservado pero rico en aminoácidos aromáticos y alifáticos (Dreyfuss y cols. 1988). El RRM se conecta al ARN utilizando las secuencias de RNP-1 y RNP-2 que están presentes en las láminas  $\beta 3$  y  $\beta 1$  respectivamente (Adam y cols. 1986); sus cadenas laterales establecen múltiples contactos con una región de cadena sencilla de ARN. El ARN de cadena sencilla se ubica a lo largo de la superficie de la hoja  $\beta$  con las hebras RNP1 y RNP2 que forman una superficie cargada positivamente que interactúa con los fosfatos de RNA cargados negativamente, como se muestra en la figura 10 (Hang y cols. 2010).



**Figura 10. Estructura del motivo RRM.** Diagrama del dominio RRM que muestra las dos hélices y las cuatro hebras B que caracterizan a este motivo. Las regiones conservadas RNP1 y RNP2 se localizan en las dos hebras B centrales (Lodish, 2005).

La caja RGG es otro motivo de unión al ARN que se encuentra en proteínas hnRNP, contiene cinco repeticiones Arg-Gly-Gly (RGG) con varios aminoácidos aromáticos entremezclados. Aunque aún no se ha determinado la estructura cristalina de este dominio, su naturaleza rica en arginina es similar a la de los dominios de unión al RNA de la proteína Tat del VIH (Hang y cols. 2010).

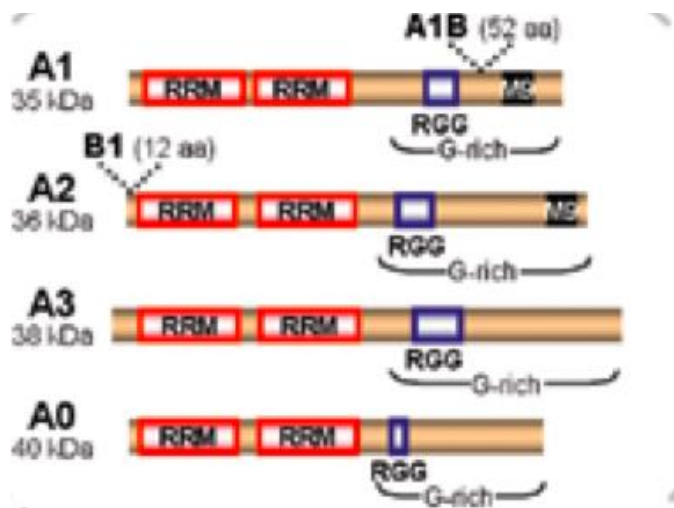
El motivo KH de 45 residuos se encuentra en la proteína hnRNP K y en otras proteínas de unión al RNA, comúnmente hay dos o mas copias del motivo KH intercaladas con repeticiones RGG. La estructura tridimensional de los dominios KH representativos es similar a la de los dominios de RRM, pero mas pequeña, compuesta de una lamina  $\beta$  de tres hebras sustentadas desde uno de los lados por dos hélices  $\alpha$ . El ARN se une al motivo KH mediante interacciones con una superficie hidrofóbica por las hélices  $\alpha$  y una cadena  $\beta$ . Por lo tanto, a pesar de la similitud en sus estructuras, los motivos RRM y KH interactúan en forma diferente con el RNA (Hang y cols. 2010).

### 1.6.2. Características de las proteínas hnRNP A/B

Una característica clave de las hnRNPs es que pueden transportarse libremente entre el núcleo y el citoplasma (Gorlach y cols. 1993). Dicha característica propició que estas proteínas se propusieran originalmente como medio de transporte para que el ARNm saliera del núcleo y es también esencial para el cumplimiento de numerosas funciones citoplasmáticas en las que participan las hnRNPs (Chow y cols. 1977).

Las hnRNPs, en particular hnRNP A/B y C, se encuentran entre las proteínas más expresadas en la célula mostrando niveles comparables con los de las histonas (Piñol-Roma y cols. 1988); sin embargo, no presentan una distribución uniforme dentro de la célula, mostrando una organización difusa en el nucleoplasma, localizándose principalmente en el núcleo (Hang y cols. 2010).

El grupo de las hnRNPs A/B consta de cuatro parálogos: A1, A2/B1, A3 y A0, siendo esta última la única sin datos funcionales reportados actualmente (Hang y cols. 2010). Las proteínas hnRNP A1 y A2 contienen dos motivos de reconocimiento de ARN (RRM) seguido de un dominio rico en glicina (GRD), caracterizado por repeticiones de un motivo arginina-glicina-glicina (RGG) (Figura 11).



**Figura 11. Estructura de las proteínas hnRNPs A1, A2, A3 y A0.** Los pesos moleculares de cada proteína se indican debajo del nombre, y se han agrupados en función de la similitud entre RRM. hnRNP A1 y A2 comparten una identidad del 60% (80% para los RRM) y mediante *splicing* alternativo generan las isoformas A1B y B1. A1 y A2 contienen una señal de exportación al citoplasma denominada M9 (Martínez-Contreras y cols. 2007).

### 1.6.3. Funciones biológicas de hnRNP A1

hnRNP A1 es una de las proteínas nucleares más abundantes y juega un papel importante en la biogénesis y la expresión del ARNm. La caracterización de las secuencias de ARN específicas reconocidas por esta proteína y la evidencia de sus funciones tanto en el metabolismo del ADN y ARN rápidamente definió su papel como un importante regulador de la expresión genética (Jean-Philippe y cols. 2014).

hnRNP A1 se une al pri-miR-18a de humano y es necesaria para el procesamiento eficaz de los pre-miARN por Drosha (Guil y Caceres 2007). Además, se acumula en gránulos citoplasmáticos de estrés, tanto en las células activadas por estrés, como en su recuperación (Guil y cols. 2006). hnRNP A1 puede alterar además la transducción de señales de la hormona esteroide mediante la supresión de la actividad de receptor de la vitamina D, lo que contribuye a la resistencia a esta vitamina (Chen y cols. 2003). Por otro lado, hnRNP A1 se une directamente a la nucleasa de FEN, estimulando su actividad, aumentando así la eficiencia en la maduración del fragmento de Okazaki durante la replicación del ADN (Chai y cols. 2003). Se ha reportado que hnRNP A1 participa en la regulación de APOE (apolipoproteína E) y de la actividad de su promotor, lo cual es importante en el desarrollo de la enfermedad cardíaca coronaria y la enfermedad de Alzheimer (Campillos y cols. 2003).

hnRNP A1 juega un papel destacado en la replicación viral y patogénesis, de acuerdo con los estudios bioquímicos y funcionales destinados a la caracterización de los complejos mecanismos que regulan la expresión del VIH-1 (Jacques y cols. 2003).

hnRNP A1, A2/B1, A3 se unen al ADN de los telómeros y al ARN de la telomerasa y pueden actuar como adaptadores moleculares que regulan las interacciones entre la telomerasa y los telómeros (Ding y cols. 1999, LaBranche y cols. 1998). Estas proteínas pueden interactuar además con otras hnRNP y factores de unión a telómeros pueden influir en la estructura de orden superior de los telómeros y proteger de la degradación o regular el acceso a la telomerasa manteniendo así la estabilidad del genoma (Ford y cols. 2002).

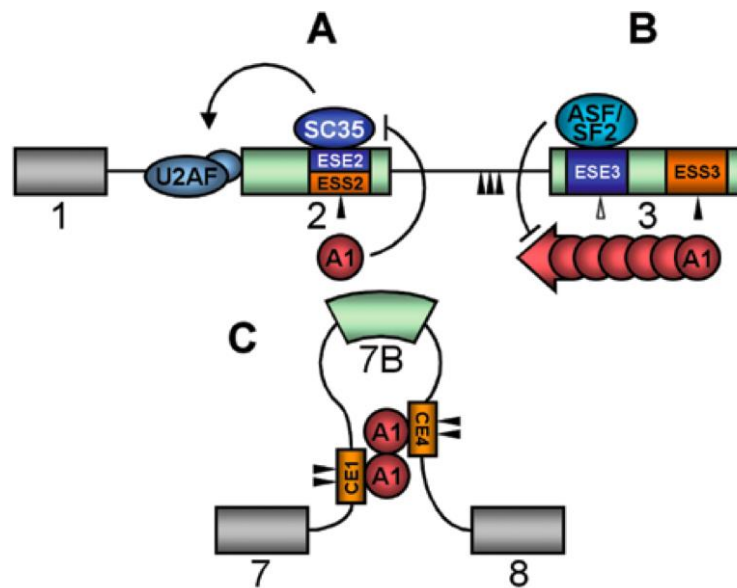
### 1.6.4. hnRNP A1 como regulador en eventos de *splicing*

hnRNP A1 fue la primera proteína de su clase a la cual se le atribuyó una función en la selección del sitio de *splicing* debido a su capacidad para antagonizar la actividad de la proteína ASF/SF2 en un ensayo de selección *in vitro* de 59 sitios de *splicing* (Beyer y cols. 1977).

El papel de hnRNP A1 en el *splicing* se sugiere por el análisis proteómico integral de los complejos de *splicing*, el cual indica que esta proteína participa en todas las etapas de montaje del *spliceosoma* (Jurica y cols. 2002). Otra prueba para el papel de hnRNP A1 en la actividad de la maquinaria del *splicing* está dada por los resultados recientes que muestran que se forma un complejo ternario con el factor esencial U2AF y que ayuda a la maquinaria de *splicing* a discriminar entre 3' ss funcionales (Tavanez y cols. 2012).

El papel de hnRNP A1 como un modulador del *splicing* alternativo se ha estudiado ampliamente: hnRNP A1 se identificó inicialmente como un interruptor para la selección del sitio de *splicing* utilizando el modelo del adenovirus E1A y se convirtió rápidamente en uno de los represores del *splicing* más estudiados en ambos sistemas celulares y virales (Mayeda y Krainer 1992). De igual manera, la unión de hnRNP A1 a

varias secuencias exónicas e intrónicas de alta afinidad se ha identificado como esencial para la represión del *splicing* en genes humanos y virales. Los estudios bioquímicos y estructurales han descubierto varios mecanismos utilizados por hnRNP A1 para modular el *splicing* (Jacques y cols. 2003). En algunos casos en los exones se superponen las secuencias ESE y ESS, por lo que hnRNP A1 compite son las proteínas SR por un sitio de unión (Figura 12A). Ejemplos de este tipo de regulación son la hormona de crecimiento bovino en el exón 5 (Sun y cols. 1993) en el exón N1 de *c-src* (Rooke y cols. 2003), el exón *tat 2* de VIH1 (Zahler y cols. 2004) y en el exón 7 de SMN2 (Cartegni y Krainer 2002). En otro caso hnRNP A1 puede unirse cooperativamente a lo largo del exón, lo que limita el acceso de las proteínas SR u otros factores de *splicing* a sus sitios de unión (Figura 12B). Un trabajo detallado para el mecanismo de unión cooperativa de hnRNP A1 mostró que, después de la unión a un sitio de alta afinidad, hnRNP A1 se extiende preferentemente en sentido de 3' a 5' (Okunola y Krainer 2009). También existen sitios de unión específicos para las proteínas hnRNP A/B en intrones y pueden inhibir la unión del regulador clave de *splicing* en regiones intrónicas cercanas. La inclusión del exón 2 y 3 del gen de *IRF-3* depende de un ISS reconocido por hnRNP A1 dentro del primer intrón del gen, de donde desplaza a SF2 y regula el *splicing* de los exones subsiguientes (Figura 12C) (Guo y cols. 2013).



**Figura 12. Diferentes mecanismos empleados por hnRNP A1 para controlar el *splicing*.** A) Oclusión. B) Nucleación. C) *Looping out*. (Martínez-Contreras y cols. 2007)

La cantidad cada vez mayor de los datos obtenidos a través de enfoques genómicos, celulares y moleculares indican que la regulación del *splicing* alternativo por hnRNP A1 es un fenómeno generalizado en todo el transcriptoma humano y utiliza una serie de mecanismos en sinergia con otros factores de empalme (Jacques y cols. 2003).



### 1.5.5. El papel de hnRNP A1 en enfermedades humanas

Teniendo en cuenta sus múltiples funciones en la expresión génica y el metabolismo celular, hnRNP A1 ha mostrado tener un papel clave en la enfermedad humana. Una serie de estudios ha dado a conocer el papel de hnRNP A1 en deficiencias genéticas así como en el desarrollo del cáncer, la metástasis, neurodegeneración y la replicación de patógenos virales (Jacques y cols. 2003). Por ejemplo, se ha observado que en algunos tipos de cáncer existe un incremento de la expresión de la proteína hnRNP A1, como se observa en la tabla 1 (Martínez-Montiel y cols. 2015). También se ha encontrado que estas proteínas promueven la invasión tumoral y se ha relacionado a un mal pronóstico en el carcinoma hepatocelular (Zhou y cols. 2002).

**Tabla 1. Cambios en la expresión de algunos factores de *splicing* en diferentes tipos de cáncer. (Martínez-Montiel N. 2015)**

Tipo de cáncer	Expresión aumentada	Expresión disminuida
Cervical	SFRS4	
Colon	SR-A1 SFRS1 SFRS3	SFRS6
Leucemia	hnRNP A1 SFRS1 SFRS3 SFRS4 SFRS5 SFRS6	
Linfoma	SFRS3 SFRS4 SFRS7	SFRS1 SFRS6
Mama	SR-A1 SFRS1 SFRS2	SFRS4 SFRS5 SFRS7
Nasofaríngeo	hnRNP A1	SFRS6
Óseo	SFRS2	
Ovario		SR-A1 SFRS2
Páncreas	SFRS1 SFRS3	
Pituitaria	SFRS2 SFRS3 SFRS5 SFRS7	
Próstata	SR-A1 SFRS5 hnRNP A1	SFRS3
Pulmón	SR-A1 SFRS1 SFRS2	SFRS3 SFRS4 SFRS5 SFRS6 SFRS7
Renal	SFRS4	
Tiroides		SFRS3

hnRNP A1 desempeña varios papeles clave en las funciones neuronales y puesto que su expresión provoca cambios drásticos en el metabolismo del ARN, la variación en su abundancia contribuye a enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad del Alzheimer (AD), la atrofia muscular espinal (SMA), esclerosis múltiple (MS), esclerosis

lateral amiotrofica (ELA), degeneración lobular frontotemporal (DLFT) y paraparesia espástica hereditaria (HSP), entre otros (Bekenstein y cols. 2012). Los pacientes con Alzheimer muestran una reducción en la expresión de hnRNP A1 en el cerebro y en el modelo de ratón, la pérdida de hnRNP A1 se asocia con deterioro de la función cognitiva (Berson y cols. 2012). También se ha demostrado que hnRNP A1 modula el *splicing* alternativo del gen PP que afecta a la generación del péptido  $\beta$  que se acumula en las placas amiloides características de la enfermedad de Alzheimer (Donev y cols. 2007). Los cambios inversos en los niveles de hnRNP A1 en tumores y enfermedades neurodegenerativas pueden señalar diferencias claves en la patologías moleculares de tales enfermedades (Jacques y cols. 2003). Aunque muchas patologías humanas y las respuestas fisiológicas se correlacionan con un cambio en el nivel de expresión de hnRNP A1, se conoce poco de los mecanismos que regulan la abundancia de esta proteína. El análisis de los blancos celulares de la proteína asociado con el quaking (Qk) que se requiere para la formación de la mielina asociada con la enfermedad, mostró que el UTR del mensajero de hnRNP A1 en el 3' contiene un sitio de unión para esta proteína. Qk regula el nivel general de hnRNP A1 mediante la estabilización de su ARNm (Kim y cols. 2013). Un enfoque diferente ha sido recientemente utilizado para inhibir la proliferación y la migración de una línea celular de hepatocarcinoma. hnRNP A1 es altamente expresada en tejidos de cáncer de hígado en comparación con controles benignos. La expresión de un aptámero específico de ADN monocatenario bloquea la actividad de hnRNP A1 y mostró un efecto inhibitor más fuerte sobre la proliferación de células de hepatoma en cultivo (Li y cols. 2012). El desarrollo de reactivos y compuestos que regulen específicamente la actividad de hnRNP A1 podría ser de gran ayuda en el desarrollo de nuevas terapias para una serie de enfermedades (Jacques y cols. 2003).

### 1.7. *Ustilago maydis* como modelo de estudio

*U. maydis* es un hongo basidiomiceto del grupo de los Ustilaginales (Tabla 2.). Los Ustilaginales constituyen un importante grupo de hongos fitopatógenos con mas de 50 géneros y 1200 especies, que infectan a mas de 4000 plantas monocotiledóneas divididas en 75 familias en todo el mundo. Dada la especificad de huésped, *U. maydis* es un parasito que evolucionó a partir de un antecesor común con otros *Ustilago* spp (Ruiz-Herrera y Martínez-Espinoza 2008).

Tabla 2. Clasificación científica de *U.maydis*

<b>Reino</b>	<i>Fungi</i>
<b>División</b>	<i>Basidiomycota</i>
<b>Clase</b>	<i>Ustilaginomycetes</i>
<b>Orden</b>	<i>Ustilaginales</i>
<b>Familia</b>	<i>Ustilaginaceae</i>
<b>Género</b>	<i>Ustilago</i>
<b>Especie</b>	<i>U.maydis (DC.) Corda</i>

*U. maydis* causa el carbón de maíz, una enfermedad de distribución mundial que ocasiona graves pérdidas económicas. Este hongo infecta el maíz dulce (*Zea mays*) y su progenitor el teocintle (*Zea mexicana subesp. perviglumis y subesp mexicana*).

La enfermedad se caracteriza por la formación de zonas cloróticas y rojizas en las hojas, por la producción de antocianinas, la disminución del crecimiento y la formación de tumores en hojas, espigas, tallos y mazorcas, debido a la proliferación celular del tejido meristemático. Los tumores contienen esporas (teliosporas) cubiertas por una membrana blanca y verdosa que se oscurece y mas tarde se torna gris- plateada (Figura 13) (Banuett 1995).



**Figura 13. *Ustilago maydis* en mazorca de maíz.** Tumor característico del carbón del maíz en la mazorca (Gonzalo y Ribes )

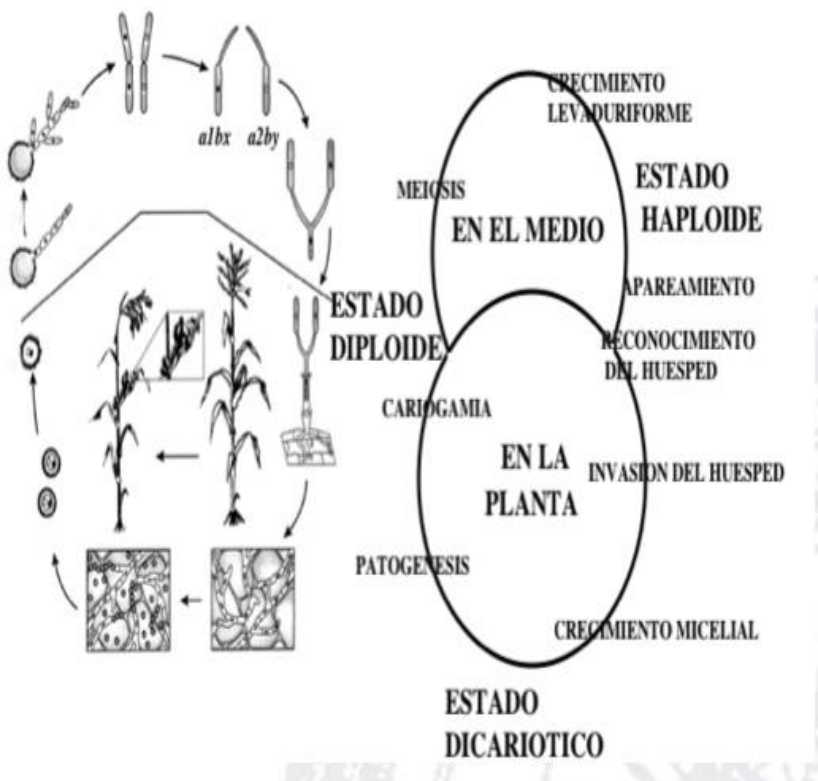
### 1.7.1. Ciclo de vida de *U. maydis*

*U. maydis* no es un parásito obligado, pero requiere de uno de sus dos huéspedes naturales para completar su ciclo sexual. Solamente los dicariontes y los diploides son infecciosos, lo que muestra la interrelación entre los aspectos de sexualidad, morfogénesis y patogénesis; además de que revela la complejidad de los tres procesos. Durante el ciclo de vida de *U. maydis* se distinguen dos fases; una de ellas es saprofítica, durante la cual el hongo crece en forma de levaduras haploides alargadas que se reproducen por gemación (también llamadas esporidias). La gema aparece en la zona de máxima curvatura formando un ángulo de 30-45° grados con respecto a la célula madre. La gemación bipolar es común en contraste con la levadura *S. cerevisiae*. *U. maydis* no es un colonizador eficiente de nichos naturales, ya que el rango de las fuentes de carbono que puede utilizar es muy restringido (Bölker 2001).

La segunda fase del ciclo de vida de este basidiomiceto es la micelial y patogénica, durante la cual el hongo crece en forma de hifas dicarióticas que solo se desarrollan en el interior del huésped. Esta fase se inicia con el apareamiento de dos células que compartan *loci* de apareamiento (sexuales) *a* y *b* compatibles. La cercanía de células compatibles provoca la inhibición de la gemación y la formación de filamentos delgados (tubos de conjugación) que se dirigen el uno hacia el otro por una acción quimiotrópica, para finalmente fusionarse en el extremo apical para formar el micelio dicariótico infeccioso, el cual continúa su crecimiento y es capaz de invadir a un huésped susceptible a través de aberturas naturales, por los estomas, por los órganos florales o activamente formando el apresorio. Se ha sugerido que los estigmas son la

más importante ruta de infección, ya que en los tumores presentes en las mazorcas son los más prominentes. Es importante señalar que también los diploides son infecciosos, pero no las cepas haploides.

En el interior de la planta el hongo crece de manera intracelular o extracelular sin causar gran daño al huésped originalmente en forma de micelio delgado. La mayor parte del crecimiento ocurre en los tejidos meristemáticos de la planta con la formación final de las agallas o tumores en los cuales ocurre la esporulación del hongo. Las hifas adquieren formas irregulares y se fragmentan, cubriéndose finalmente con una pared gruesa equinulada y pigmentada (Caltrider y Goltlieb 1965) Durante una fase de este proceso ocurre la citocinesis con la formación del estado diploide del hongo. Las esporas maduras (teliosporas) son liberadas cuando las agallas se secan y se abren. Las teliosporas constituyen el estado diploide del hongo y hasta el momento no se ha logrado su formación fuera de las plantas del maíz o teocintle (Ruiz-Herrera 2008). Los síntomas de la enfermedad son principalmente la formación de tumores, aunque también ocurre clorosis, distorsiones y enanismo de la planta y acumulación de antocianinas. La inducción de tumores probablemente involucra fitohormonas y citocinas como ocurre en algunas infecciones de plantas producidas por bacterias fitopatógenas. Las teliosporas germinan rápidamente en un medio nutritivo e incluso en agua, aunque se ha descrito que la presencia de disacáridos favorecen el proceso. La gemación de la teliospora se inicia con la formación de un tubo germinal denominado promicelio. El núcleo de la espора migra hacia el promicelio y en este punto ocurre la meiosis. A partir del promicelio se forman cuatro basidiosporas en forma acropétela las cuales germinan para reiniciar el ciclo de vida, como se muestra en la figura 14 (Ruiz-Herrera y Martínez-Espinoza 1998).



**figura 14. Ciclo de vida de *Ustilago maydis*.**

Izquierda: se muestra la gemación de las teliosporas con la formación del promicelio y las cuatro basidiosporas. Éstas se desprenden y se multiplican en la forma de levadura. A continuación se representa la conjugación de dos esporidios sexualmente compatibles para formar el dicarion que invade la planta y se multiplica en forma micelial, dando lugar a los tumores donde se forman teliosporas. Éstas germinan fuera de la planta para reiniciar el ciclo.

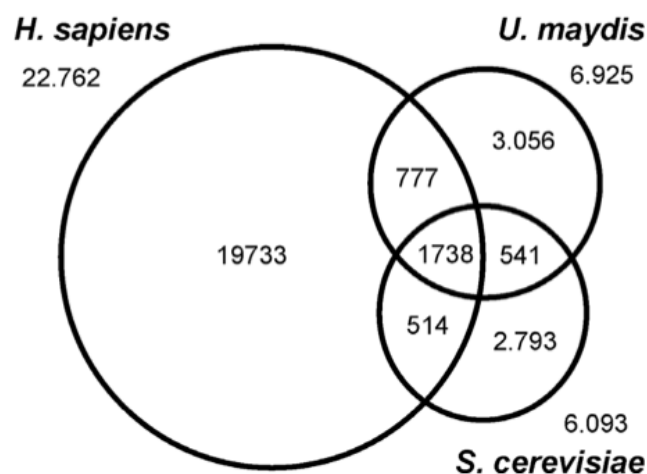
Derecha: se indican los diferentes estadios del hongo, el sitio donde proliferan y la secuencia de eventos que ocurren durante el ciclo de vida del hongo (Ruiz-Herrera 2008).

### 1.7.2. *Ustilago maydis* como modelo de estudio

*Ustilago maydis* ha sido considerado como modelo biológico desde mediados de la década de los 40's para el estudio básico de la patogénesis fúngica en plantas, la especificidad en el apareamiento, la recombinación genética, los genes que participan y controlan el proceso de dimorfismo entre otros (Banuett y Herskowitz 1996). Este particular interés lo ha convertido en el miembro de orden de Ustilaginales más estudiado en la actualidad (Ruíz-Herrera y Martínez-Esponiza 1998). El genoma de *U. maydis* ha sido secuenciado y anotado (Krecic y Swanson 1999), revelando que posee un genoma relativamente pequeño (20.5 Mb) que codifica aproximadamente 6,500 genes y poseen un reducido número de intrones (Martínez-Espinoza y cols 2002).

*U. maydis* es un organismo de genética simple que ha sido utilizado para estudiar complejos mecanismos como la recombinación y al reparación del ADN en células eucariontes. Sorprendentemente se ha encontrado que algunos genes que se consideraban exclusivos de mamíferos cuentan con homólogos en *U. maydis*. Tal caso es el de BRCA2 implicado en la predisposición al cáncer de mama en humano (Holliday 2004) y cuyo homólogo en *Ustilago* es necesario para la reparación y recombinación del ADN. A la fecha, existen cada vez mas evidencias del alto grado de conservación entre *U. maydis* y humano, tanto a nivel de sus genomas como en su organización y función celular (Figura 15), por lo que se ha propuesto como un sistema modelo para el estudio de diferentes procesos celulares que ocurren en mamíferos (Klosterman 2007).

Se ha reportado que algunas proteínas que codifican para factores de *splicing* en humano están conservados en *U. maydis* pero no en levaduras. Más aun, el análisis del genoma de *U. maydis* sugiere que en dicho hongo se presentan los mismos tipos de *splicing* alternativo que se han observado en humano (Klosterman 2007).

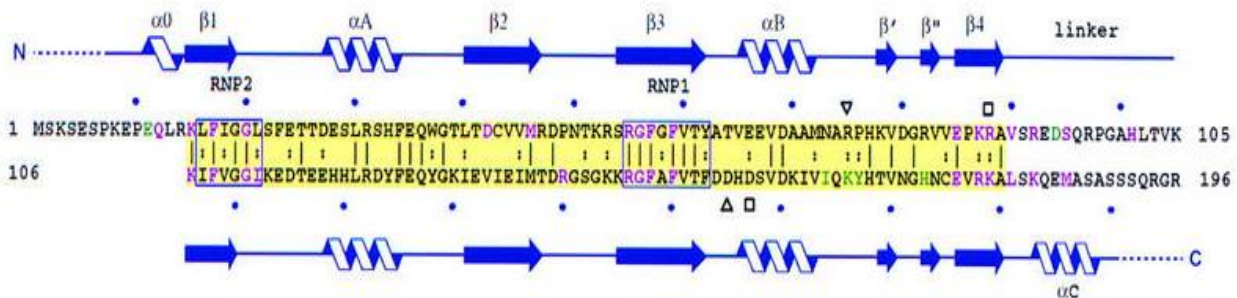


**Figura 15. Comparación del proteoma de *U. maydis*, *S. cerevisiae* y *H. sapiens*.** Se indican las proteínas conservadas entre los diferentes organismos considerando aquellas que mostraron al menos 20% de identidad sobre la longitud total (Munsterkötter M. 2007)

## 2. Antecedentes

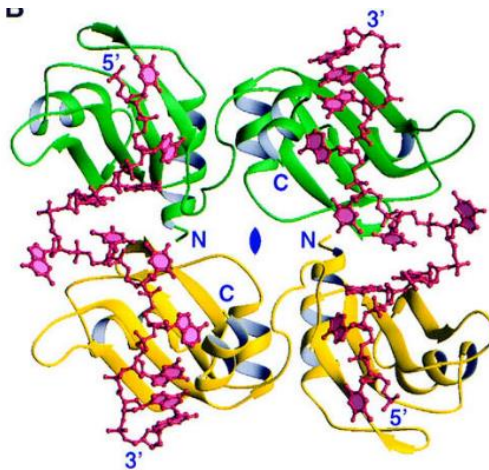
### 2.1 Cristal de hnRNP A1 de *Homo sapiens*

La estructura cristalina de UP1 humana se ha determinado a 2.1 Å de resolución y corresponde al dominio amino terminal de la hnRNP A1 de *Homo sapiens*, el cual contiene dos motivos de reconocimiento a ARN (Figura 16) unidos a un ADN de 12 nucleótidos de una sola cadena telómerica (Ding y cols. 1999).



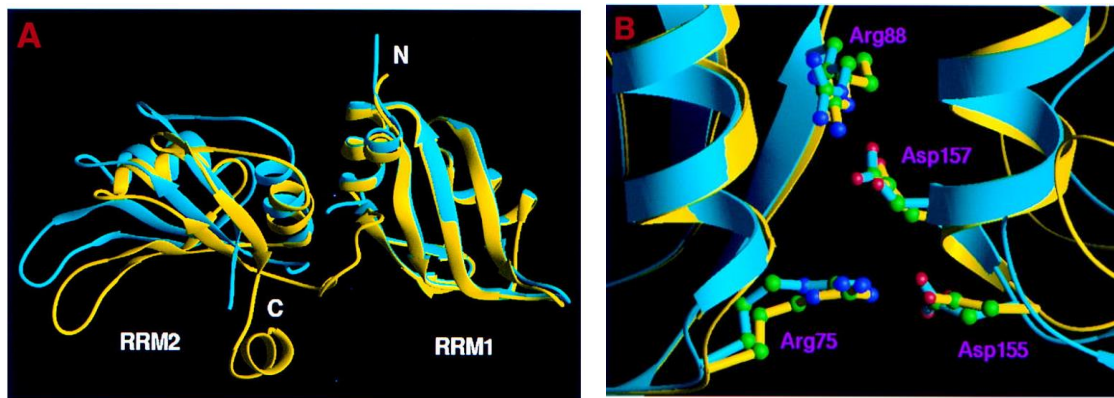
**Figura 16. Estructura de UP1 de *H. sapiens*.** Se muestra la secuencia de aminoácidos, indicando los dos dominios RRM en amarillo y los submotivos RNP2 y RNP1 en cajas. Los elementos de estructura secundaria se muestran por encima y por debajo de la secuencia. (Ding y cols. 1999)

El dominio UP1 consta de 196 aminoácidos y se co-cristalizó con un ssADN de 12 nucleótidos d(TTAGGGTTAGGG) designado TR2. La estructura general del complejo UP1-TR2 incluye dos cadenas de TR2 unidas a dos moléculas de proteína. Las dos moléculas de ssADN son antiparalelas (Figura 17) (Ding y cols. 1999).



**Figura 17. Vista general del complejo UP1-TR2.** Las cadenas de la proteína se muestran en color amarillo o verde, el ADN en rojo como un modelo de bolas y palos. Los monómeros de proteínas están relacionadas por un eje (azul), perpendicular al plano de la figura. Las hebras de ADN antiparalelas tienen la misma relación de simetría. El ADN y las proteínas terminales están marcados en azul. (Ding y cols. 1999)

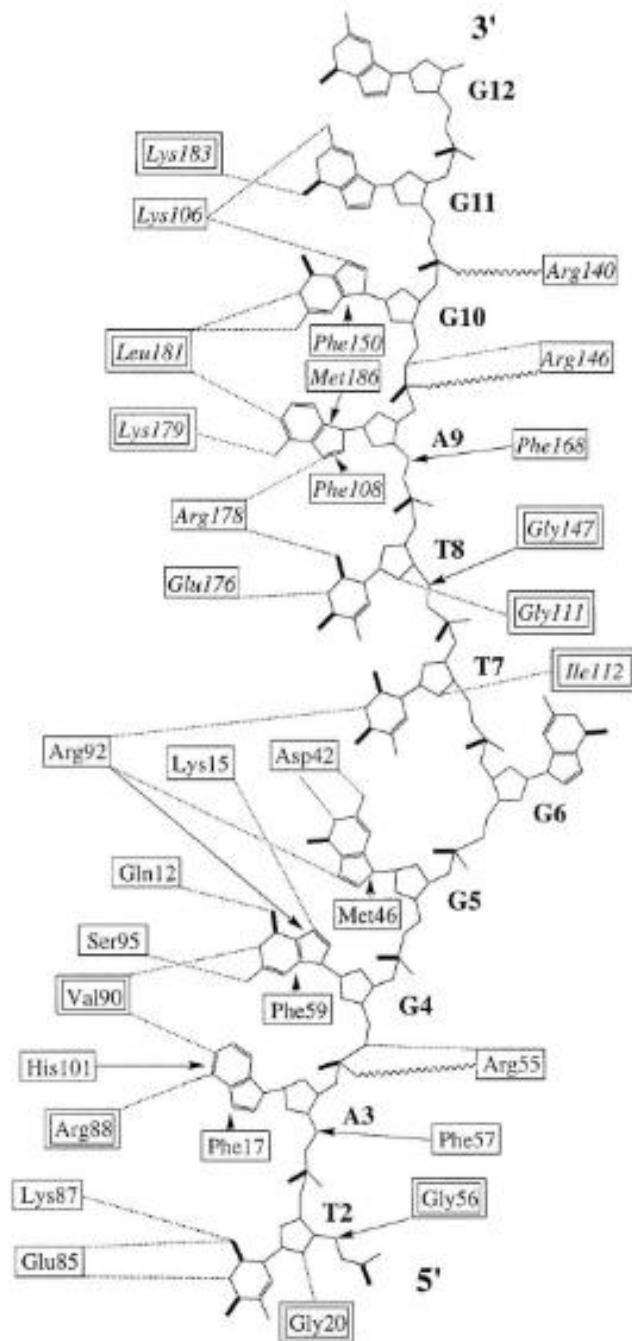
Se observan cambios conformacionales significativos de UP1 en la unión al ADN (Figura 18 A). Hay un cambio de 15° en la posición relativa de los dos RRM en comparación con la proteína sola, con lo que las dos superficies de las láminas  $\beta$  están más juntas (Shamoo y cols. 1997, Xu y cols. 1997). Esta rotación se articula en torno a los dos pares conservados de Asp-Arg (Figura 18 B); a pesar del gran movimiento de los dominios, hay solo cambios menores dentro de cada RRM (Ding y cols. 1999)



**Figura 18. Estructura de UP1 unida al ADN.** (A) La superposición de las cadenas de UP1 del complejo UP1-TR2 (amarillo) y de la estructura de la proteína sola (azul) muestran el movimiento atribuible a la unión al ADN. (B) Un acercamiento de las interacciones muestran los pares de argininas y aspartatos en la representación de bola y palo. (Ding y cols. 1999)

Muchos de los contactos con ssDNA son similares para ambos dominios RRM, una característica consistente con el alto grado de homología de secuencia entre los dos RRM. Dos fenilalaninas conservadas (Phe-17 y Phe-59 en RRM1, y Phe-108 y Phe-150 en RRM2) ubicados en los submotivos RNP-2 y RNP-1 de cada RRM interactúan directamente con el dinucleótido AG (Ade-3-Gua-4, y Ade-9-Gua-10, respectivamente) por el anillo aromático (Figura 19). Una tercera fenilalanina, Phe-57 en RRM1 y Phe-148 en RRM2 no hace contacto con las bases directamente, sino que interactúa con la columna vertebral de una guanina (Gua-3 y Gua-9) a través de interacciones de van der Waals. Otro residuo de RNP-1, Arg-55 en RRM1 y Arg-146 en RRM2, interactúa con la columna vertebral de una guanina (Gua-4 y Gua-10, respectivamente) a través de interacción de carga con la unión de fosfato de hidrógeno y con O del 5'. La lisina (Lys-15 en RRM1 y Lys-106 en RRM2) forma un enlace de hidrógeno con el átomo de N7 de esta misma guanina. Además, dos residuos cargados (Glu-85 y Lys-87 en RRM1, Glu-176 y Arg-178 en RRM2) ubicados en  $\beta 4$  interactúan con una timina: Thy-2 en RRM1 y Thy-8 en RRM2, respectivamente. Arg-178 también interactúa con Ade-9. Aparte de las interacciones de cadena lateral, enlaces de hidrógeno similares para

los átomos de la cadena de aminoácidos 88-90 y 179-181 se forman con dinucleótidos AG, es decir, Ade-3-Gua-4 y Ade-9-Gua-10, respectivamente (Figura 19) (Ding y cols. 1999).

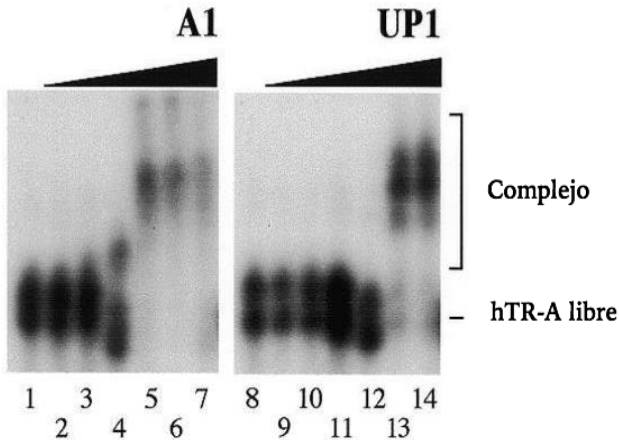


**Figura 19. Interacciones entre UP1 y TR2.** Los residuos encerrados en cajas de una sola línea indican los contactos de la cadena lateral con ADN; residuos en cuadros de doble línea de contacto con el ADN con la cadena principal de átomos. Líneas de puntos son enlaces de hidrógeno; líneas onduladas son interacciones de carga; las flechas indican interacciones de de van der Waals. Para la molécula de ADN, la línea gruesa representa un grupo carbonilo en la base o oxígenos con doble enlace fosfato. (Ding y cols. 199)



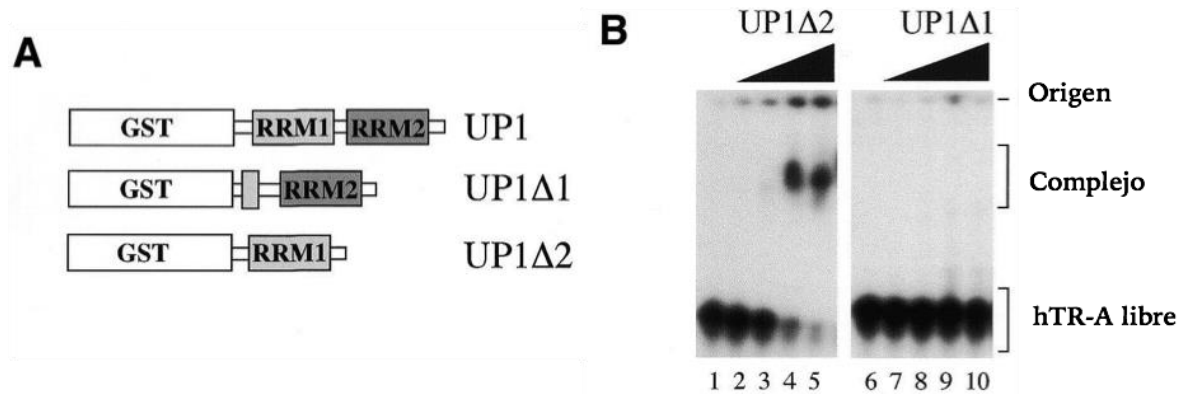
## 2.2. RRM1 reconoce secuencias TTAGGG

Se ha demostrado previamente que empleando una columna hecha con GST-UP1 se puede recuperar específicamente la unión de la telomerasa a partir de un extracto de células. Por otro lado, tanto hnRNP A1 recombinante como UP1 pueden interactuar con el ARN de la telomerasa, como se muestra en la figura 20 (Fiset y Chabot 2001).



**Figura 20. hnRNP A1 se une a la telomerasa humana.** Ensayo de retardo en la movilidad electroforética (EMSA) que muestra la capacidad de unión de las diferentes versiones de hnRNP A1 y UP1 con el ARN telomérico (hTR-A). Los ensayos de unión se realizaron con 1 fmol de hTR-A en presencia de concentraciones crecientes de proteína. (Modificado de Fiset y Chabot 2001)

Mediante el empleo de un oligonucleótido que lleva 10 repeticiones teloméricas (TS10) se encontró que una versión trunca de UP1 que contiene el dominio RRM1 (UP1Δ2), es suficiente para la unión específica de esta proteína a la secuencia telomérica mediante ensayos tipo EMSA, pero no puede unirse al hTR-A. Por el contrario, UP1Δ1 (que carece del dominio RRM1) forma un complejo con hTR-A. Estos resultados sugieren que los dos RRM de hnRNP A1 tienen especificidades distintas: RRM1 se une a secuencias de ADN telomérico mientras RRM2 interactúa con el componente ARN de la telomerasa (Figura 21 B) (Fiset y Chabot 2001)



**Figura 21. Unión de hTR a UP1.** (A) Estructura de los derivados de UP1. UP1Δ1 carece de los aminoácidos 13 a 134, mientras que UP1Δ2 carece de los aminoácidos 107-196. (B) ensayo EMSA de UP1Δ1 y UP1Δ2 con el oligonucleótido TS10 de ADN telomérico radiactivo (10 fmol). Cantidades crecientes de los derivados de UP1 se utilizaron para ambas proteínas (0,5, 1,0, 1,5 y 2,0 pmol) (Modificada de Fiset S y cols. 2001)

### **3. Justificación**

El *splicing* alternativo es un proceso que se lleva a cabo en todos los eucariotes por medio del cual a partir de un solo gen se obtienen diferentes ARNm los cuales pueden codificar para diversas proteínas y con esto aumentar la capacidad codificante del genoma. Se ha predicho que en humano hasta el 95% de los genes sufren algún tipo de *splicing* alternativo y las alteraciones en este mecanismo se ha relacionado con diversas enfermedades. Debido a lo anterior, surge la importancia de estudiar tanto el proceso de *splicing* como a los factores involucrados en su regulación.

En este trabajo se analizará la proteína hnRNP A1 que juega un papel regulador importante debido a su capacidad para promover la omisión del exón y reprimir el sitio de *splicing*. Nuestro modelo de estudio será *Ustilago maydis* debido a que es un eucariote sencillo en donde el mecanismo de *splicing* y los componentes del *spliceosoma* descritos en humano se encuentran conservados.

### **4. Hipótesis**

El hongo dimórfico *Ustilago maydis* posee la proteína reguladora del *splicing* alternativo hnRNP A1 y ésta presenta características estructurales y funcionales semejantes a las descritas para el homólogo humano.

## **5. Objetivos**

### **5.1 Objetivo General**

Analizar las propiedades estructurales y purificar el factor de splicing hnRNP A1 putativo de *Ustilago maydis*

### **5.2 Objetivos Particulares**

- 1) Realizar el análisis *in silico* de la proteína hnRNP A1 putativa en *Ustilago maydis*
- 2) Buscar posibles sitios de regulación mediados por hnRNP A1 en el genoma de *Ustilago maydis*.
- 3) Generar la proteína recombinante para hnRNP A1 putativa en *Ustilago maydis*, así como para diferentes versiones truncas de la misma.

## 6. Materiales y métodos.

### 6.1 Análisis bioinformático

En los últimos años la bioinformática se ha convertido en una herramienta muy útil para analizar secuencias de diferentes organismos. En este trabajo se utilizaron diferentes programas para analizar la secuencia de hnRNP A1 putativa de *Ustilago maydis*, tales como BLAST, SWISS MODEL, CLC Sequencer Viewer 7, Swiss.PdbViewer y STRING

#### 6.1.1 Búsqueda de la secuencia putativa de hnRNP A1 de *Homo sapiens* en *Ustilago maydis*

Para la búsqueda de la secuencia aminoacida de hnRNP A1 se tomó la secuencia reportada para esta proteína en humano (NP\_002127) y se buscó el homólogo putativo en *Ustilago maydis* mediante el algoritmo “Basic Local Alignment Search Tool” (BLAST) desarrollado por el Centro Nacional de Información Biotecnología (NCBI) (Altschul y cols., 1997).

#### 6.1.2. Alineamientos de las proteínas

Los alineamientos globales y locales de la proteínas completas y parciales de *Homo sapiens* y de *Ustilago maydis* se hicieron mediante el programa CLC Sequence Viewer 7. El rango de los dominios de interacción RRM1 y RRM2 se obtuvieron de la base de datos del NCBI.

#### 6.1.3 Análisis de la estructura terciaria de la proteína hnRNP A1 putativa de *Ustilago maydis*

Para el análisis de la estructura de la proteína hnRNP A1 putativa de *Ustilago maydis* se obtuvo el cristal de la hnRNP A1 de *Homo sapiens* (2lv1) en la base de datos Protein Data Bank (PDB); a partir de este cristal, el modelado se obtuvo empleando el programa SWISS-MODE, las interacciones de las proteínas se realizaron en el programa STRING

### 6.2. Microorganismos y condiciones de crecimiento

Las cepas que se utilizaron en este trabajo se muestran a continuación.

<b>Cepa</b>	<b>Descripción</b>	<b>Referencia</b>
<i>Ustilago maydis</i> FBI	Cepa de referencia	Broad Institute
<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$	De uso rutinario en biología molecular	Taylor, 1993

### 6.3. Medios de cultivo

Se utilizaron los siguientes medios de cultivo líquidos y sólidos cuya composición y preparación se detalla a continuación.

YEPS (Yeast extract/Peptone/Sucrose) Medio de cultivo para *U. maydis*. (Ausubel y cols. 1994).

<b>Tabla 4. Componentes del medio YEPS</b>	
<b>Componentes</b>	<b>Cantidad para 1L</b>
Peptona de Caseína	20g
Extracto de Levadura	10 g
Dextrosa	20 g

En caso de utilizar medio sólido se agregan 15g /L de agar. A un pH 7

LB (Luria-Bertani). Medio de cultivo para *E. coli DH5α*. (Sambrook et al., 1989)

<b>Tabla 5. Componentes del medio LB</b>	
<b>Componentes</b>	<b>Cantidad para 1L</b>
Peptona de Caseína	10 g
Extracto de Levadura	5 g
NaCl	10 g

Para utilizar medio solido se agregan 15g /L de agar. A un pH 7

El medio LB fue suplementado en algunos casos con ampicilina (amp) (Sal sódica, Roche) la cual se utilizó en una solución concentrada a 100 mg/mL, preparada en agua bidestilada estéril. La concentración final empleada en el medio de cultivo fue de 100 µl/ mL.

#### 6.4. Plásmidos empleados para la clonación

Los plásmidos utilizados en este trabajo se detallan en la siguiente tabla.

<b>Tabla 6. Plásmidos usados en la construcción de las clonas</b>			
<b>Plásmido</b>	<b>Uso</b>	<b>Descripción</b>	<b>Referencia</b>
pJET 1.2	Reservorio para productos de PCR	rep (pMB1), bla (ap), eco 47IR, PlacUV5, promotor T7, sitio múltiple de clonación	ThermoFisher
pPROExHTa	Expresión de proteínas recombinantes	rep (pBR322), His (6) N-terminal, bla (Ap), lacI, promotor Tcr, sitio múltiple de clonación (SMC)	ThermoFisher

#### 6.5. Técnicas generales de biología molecular.

##### 6.5.1. Extracción de ADN genómico (Kit Wizard Genomic DNA Purification).

Para la extracción de ADN genómico de *Ustilago maydis* con el Kit Wizard Genomic DNA Purification, se cultivó *U. maydis* en 5 mL de medio YEPS y se dejó creciendo toda la noche a 30 °C en agitación constante. Se añadió 1 ml del cultivo crecido a un tubo de microcentrifuga de 1.5 ml. Se centrifugó a 16,000 x g durante 2 min para sedimentar las células y se eliminó el sobrenadante, se resuspendió el botón celular en 500 µl de 50 mM EDTA y se añadió 25 µl de 20 mg/ml de lincasa, se mezcló suavemente y se incubó la muestra a 37°C durante 60min para digerir la pared celular, posteriormente se enfrió a temperatura ambiente y se volvió a centrifugar la muestra a 16,000 x g durante 6 minutos. Se retiró el sobrenadante y se añadieron 300 µl de *Nuclei Lysis*

*Solution*, se pipeteó suavemente para mezclar y se añadió 100 µl de *Protein Precipitation Solution*, se mezcló con vortex durante 10 min y se dejó la muestra en hielo durante 10 min. Se centrifugó nuevamente a 16,000 x g durante 10 min y se transfirió el sobrenadante que contiene ADN a un tubo de microcentrifuga de 1.5 ml limpio que contenía 500 µl de isopropanol, se mezcló suavemente por inversión hasta que se vieron filamentos similares a hilos de ADN. Se centrifugó a 16,000 x g durante 10 min y se decantó cuidadosamente el sobrenadante. Se añadieron 300 µl de etanol al 70% y suavemente se invirtió el tubo varias veces para lavar el sedimento de ADN. Se centrifugó a 16,000 x g durante 10 min y se aspiró con cuidado el etanol. Se invirtió el tubo sobre papel absorbente limpio y se dejó que el precipitado se secase al aire durante 10 min. Finalmente para la rehidratación se añadió a la pastilla de ADN 50 µl de Rehydration Solution incubando a 4 °C durante toda la noche.

### **6.5.2 Extracción de ADN plasmídico mediante Lisis Alcalina (Green & Sanbrook, 2012).**

Se inoculó una UFC en 5 ml de caldo LB/amp y se deja incubando el cultivo a 37 °C (20 hrs) con agitación (150 rpm). Al otro día se centrifuga al máximo por 5 min, se forma la pastilla y se decanta el medio. Para la lisis alcalina se agregan 200 µl de solución I, se homogeniza y se pasan a tubos de microcentrifuga de 1.5 mL. Se vortexea durante 5 min. Posteriormente se añaden 200 µl de solución II (FRESCA) y se mezcla por inversión 10 veces. Se añaden 200 µl de la solución III y se vortexea 10 seg. Se centrifuga al máximo 5 min y el sobrenadante se traslada a un nuevo tubo. Para precipitar el plásmido se agregan 800 µl de etanol absoluto, se vortexea y se dejan a 4°C durante 15 minutos. Pasando este tiempo se centrifuga al máximo por 5 min, se retira el sobrenadante y se lava la pastilla con 400 µl de etanol al 70%. Se centrifuga durante 5 min y se retira el sobrenadante. Se deja secar la pastilla durante 5 min y se le agregan 50 µl de agua con RNasa.

### **6.5.3. Extracción de ARN empleando Fenol caliente (Modificado Aiba y cols. 1981)**

Se cultiva *U. maydis* en 5 ml de medio YEPS y se deja creciendo toda la noche a 30 °C con agitación constante. Al otro día se mide la O.D. <sub>550nm</sub> que sea aproximadamente entre 0.6-0.8. Una vez obtenida la O.D. se centrifugó a 5000 x g y se resuspendió el botón celular en 500 µl de Buffer (20 mM de acetato de sodio pH 5.5, 5% de SDS, 1mM de EDTA pH 8). Se agregó a la suspensión de células 500 µl ml de fenol saturado en buffer de acetatos (20mM de acetato de sodio pH 5.5, 0.5% de sarcosinato de sodio, 1 mM de EDTA pH 8). Se mezclaron las bases mediante agitación suave y se incubó a 60 °C durante 5 min realizando agitaciones suaves ocasionales. La mezcla se dejó enfriar. Se centrifugó nuevamente a 5,000 x g para separar la fase acuosa y se volvió a extraer con fenol una vez más. Después de obtener la fase acuosa, se agregaron 15 µl de acetato de sodio 3M (pH 5) y 1 ml de etanol absoluto; para precipitar el RNA se dejó 24 h a -80 °C. Posteriormente se centrifugó a 13000 x g en frío y se formó una pastilla, la cual se lavó con alcohol al 70%, se agitó y se volvió a centrifugar. Se dejó secando la pastilla y se le agregaron 50 ml de agua libre de nucleasas. Posteriormente se realizó un gel de agarosa al 1.5% y se corrió a 50 mV.

#### **6.5.4. Cuantificación de RNA mediante espectroscopía (Green & Sanbrook, 2012).**

Una vez que ya se obtuvo el RNA se realizó la cuantificación mediante espectroscopía. Se tomaron 5 µl de la muestra y se le agregaron 495 µl de agua. Se midió la absorbancia en celdas de cuarzo a 260 nm y 280 nm y se emplearon los valores para realizar los siguientes cálculos.

Concentración

$$C=(A_{260}) \times 100/5 \times 40 \mu\text{L}/\text{ml de RNA}$$

Pureza:

$$P= A_{260}/A_{280}$$

#### **6.5.5. Electroforesis de ADN y RNA en geles de agarosa (Green y Sanbrook 2012).**

Para llevar a cabo la electroforesis se usaron geles al 1% (p/v) para ADN y al 1.5% (p/v) para RNA en tampón TAE (40 mM de Tris-acetato pH 8 y 1 mM de EDTA) y se les agregaron 2 gotas de bromuro de etidio (10 mg/60 ml), para llevar a cabo el corrimiento se uso este mismo tampón.

Las muestras de ADN y RNA se mezclaron con un tampón de carga 10X Loading Buffer (Invitrogen), se depositaron en los pocillos del gel ya solidificado. Las muestras de ADN se corrieron a 100 mV y las muestras de RNA se corrieron a 50 mV. Como referencia se utilizó el marcador de peso molecular de 1 kb de Fermentas. Posteriormente los genes se visualizaron en un transluminador de luz ultravioleta (300 nm de longitud de onda).

#### **6.5.6. Retrotranscripción (M-MuLV Reverse Transcriptase, Fermentas)**

Para la obtención de transcritos a partir de ARN se empleó la técnica de retrotranscripción usando una enzima transcriptasa reversa para la obtención de ADN complementario (cDNA). Se agregaron a un tubo de 1.5 mL los siguientes componentes: 2 µl de ARN total, 0.5 µl (100ng/ µl ) del oligo A1 REV y 4.8 µl H<sub>2</sub>O pisa. Se mezclaron los componentes y se dejaron incubando a 65°C durante 5 min; una vez pasado ese tiempo se trasladó a hielo para después agregar 2 µl de 5X Buffer de reacción, 1 µl de dNTP mix (10 mM) y 0.7 µl de M-MuLV Reverse transcriptase (20 U/ µl). La reacción se incubó 60 min a 42°C.

#### **6.5.7. Amplificación de fragmentos de cDNA y DNA mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa PCR (New England BioLabs).**

La amplificación de las diferentes versiones de hnRNP A1 se realizó en un termociclador *MultiGene OptiMax* empleando un volumen final de 25 µl que de acuerdo a los siguientes componentes.

Reactivo	A1SNRRM	A1RRM1	A1RRM2	A1
H <sub>2</sub> O	20.37 µl	20.37 µl	20.37 µl	20.37 µl
ThermoPol ® Reaction Buffer (10X)	2.5 µl	2.5 µl	2.5 µl	2.5 µl
dNTP's 10mM	0.5 µl	0.5 µl	0.5 µl	0.5 µl
A1 Fwd (100ng/ µl )	0.5 µl	0.5 µl	0.5 µl	0.5 µl
A1SNRRM (100ng/ µl )	0.5 µl	---	---	---
A1RRM1 Rev (100ng/ µl )	---	0.5 µl	---	---
A1RRM2 Rev (100ng/ µl )	---	---	0.5 µl	---
A1 Rev (100ng/ µl )	---	---	---	0.5 µl
Templado	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl
Taq Polimerasa	0.125 µl	0.125 µl	0.125 µl	0.125 µl
<b>Volumen Final</b>	<b>25 µl</b>	<b>25 µl</b>	<b>25 µl</b>	<b>25 µl</b>

Los programas utilizados para cada uno de los amplicones se muestran en la tabla siguiente:

Condiciones	A1SNRRM1		A1RRM1		A1RRM2		A1RRM2	
Pre-alineamiento	95 °C	5 min	95 °C	5 min	95 °C	5 min	95 °C	5 min
Desnaturalización	95 °C	30 seg	95 °C	30 seg	95 °C	30 seg	95 °C	30 seg
Alineamiento	62 °C	30 seg	62 °C	30 seg	62 °C	30 seg	62 °C	30 seg
Extensión	72 °C	30 seg	72 °C	1 min	72 °C	1:10min	72 °C	1:50 min
Extensión Final	72 °C	10 min	72 °C	10 min	72 °C	10 min	72 °C	10 min
Ciclos	30		30		30		30	

### 6.5.8 Análisis con enzimas de restricción

Las enzimas de restricción , también conocidas como endonucleasas, son enzimas que cortan los enlaces fosfodiéster del material genético a partir de una secuencia que reconocen. Las enzimas que se utilizaron en este trabajo son de las casas comerciales Fermentas, Roche y Jena Bioscience y se utilizaron siguiendo las instrucciones del fabricante. Las reacciones se incubaron a 37 °C durante 2 horas o 24 horas. La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 15 µl agregando los siguientes componentes.

Reactivo	Volumen
Agua libre de nucleasas	8.3 µl
Buffer 10X (correspondiente a la enzima que se usa)	1.5 µl
Plásmido	5 µl
Enzima 10u/µl	0.2 µl
<b>Volumen total</b>	<b>15 µl</b>

La eficiencia de la restricción se comprobó mediante electroforesis en gel de agarosa.



### 6.5.9. Clonación de fragmentos de ADN en el vector pJET1.2 blunt

Se ligaron los productos obtenidos de la reacción de PCR con el vector pJet1.2, el cual sirve como reservorio. Para ligar se utilizó la ligasa T4, la reacción se realizó en un volumen final de 10 µl adicionando los siguientes reactivos.

<b>Reactivo</b>	<b>Volumen</b>
2 X Reaction Buffer	5 µl
Productos no purificados de PCR o productos purificados de PCR/ u otro fragmento de ADN con extremos romos	Dependiendo de la concentración de la muestra
pJET1.2/blunt cloning vector (50 ng/ µl)	0.5 µl
Agua libre de nucleasa	Dependiendo de los demás componentes
T4 DNA ligasa 5 u/ µl	0.5 µl
Volumen total	10 µl

Se dejó la mezcla de ligación incubando durante dos días a temperatura ambiente.

### 6.5.10. Purificación de muestras de ADN

#### 6.5.10.1 Purificación de fragmentos de ADN y de plásmidos en solución mediante glucógeno

Para llevar a cabo la purificación de los fragmentos de ADN y de los plásmidos linearizados se empleó glucógeno. En un tubo de 1.5 mL se agregaron 20 µl de DNA o 45 µl del plásmido a purificar, 1 µl de glucógeno (20 mg/ml) y 500 µl de etanol absoluto. Se mantuvo la mezcla 30 min a -80 °C. Posteriormente se centrifugó a 12000 rpm 30 min y se decantó el sobrenadante, se añadieron 350 µl de etanol 70 % y se centrifugó a 12000 rpm 5 min, se volvió a decantar el sobrenadante y se dejó secando la pastilla, por último se resuspendió en 12 µl de agua libre de nucleasas.

#### 6.5.10.2. Purificación de fragmentos de ADN y de plásmidos a partir de gel de agarosa mediante glucógeno

Para llevar a cabo la purificación de los fragmentos de ADN y de los plásmidos linearizados en gel de agarosa es necesario correr el ADN o el plásmido en un gel de agarosa al 1% (p/v) (Sec 6.4.4.). Se cortó la banda deseada y se depositó en un tubo de 1.5 mL (se pesó primero el tubo vacío y posteriormente ya con la banda, para obtener el peso de esta); dependiendo del peso de la banda se agrega la mitad de Buffer TE (10 mM de Tris-HCl pH 8, 1 mM EDTA) y se calentó a 62 °C hasta que la banda desaparece (se usa el vortex cada 5 minutos). Posteriormente se centrifugó a 5,000 x g durante 5 minutos y se obtuvo el sobrenadante, éste se pasó a otro tubo de 1.5 mL y se agregó 1 µl de glucógeno (20 mg/ml) y 500 µl de etanol absoluto. Se mantuvo la mezcla 30 min a -80 °C. Posteriormente se centrifugó a 12000 rpm 30 min y se decantó el sobrenadante, se añadieron 350 µl de etanol al 70 % y se centrifugó a 12000 rpm 5 min, posteriormente se volvió a decantar el sobrenadante y se dejó secando la pastilla, por último se resuspendió en 12 µl de agua libre de nucleasas.

### 6.5.11. Subclonación en el vector de expresión pPROExHTa (ThermoFisher)

Para llevar a cabo la subclonación, se realizó la siguiente mezcla.

Componentes	Volumen
Buffer 2X	1.5 $\mu$ l
Fragmento de ADN	Dependiendo de la concentración
Vector	1 $\mu$ l
Ligasa 5 u/ $\mu$ l	1 $\mu$ l
Agua libre de nucleasas	Hasta 14 $\mu$ l

Se dejó a temperatura ambiente durante dos días

### 6.6. Técnicas de transferencia genética.

#### 6.6.1. Preparación de células químicamente competentes de *E. coli* DH5 $\alpha$ empleando cloruro de calcio (Green y Sanbrook, 2012).

Se transfirió una colonia de *E. coli* DH5 $\alpha$  a 5 mL de medio LB y se incubó a 37°C con agitación durante toda la noche. Se transfirió 1 mL del cultivo a 50 mL de medio LB y se incubó a 37°C con agitación, hasta que la OD<sub>590 nm</sub> fue aproximadamente de 0.6, se transfirieron los 50 mL de células a un tubo de propileno frío y estéril y se mantuvieron por 10 min a 4°C, posteriormente se centrifugó a 6000 rpm por 10 min y se decantó el sobrenadante. Se resuspendió el paquete celular en 25 ml de CaCl<sub>2</sub> estéril (0.1M frío) y se colocó el tubo en hielo durante 10 min a 4°C, se centrifugó a 6000 rpm por 10 min a 4°C, se decantó el sobrenadante y con la ayuda de una pipeta pero con extremo cuidado, se resuspendió el paquete celular en 25 ml de CaCl<sub>2</sub> estéril (0.1M frío), se colocó el tubo en hielo durante 10 min a 4°C y se centrifugó a 6000 rpm por 10 min a 4°C, se decantó el sobrenadante y finalmente se agregaron 2 mL de CaCl<sub>2</sub> 0.1M/Glicerol al 15%. Se realizaron alícuotas y se almacenaron a -70°C.

#### 6.6.2. Transformación de células *E. coli* DH5 $\alpha$ químicamente competentes

Se realizó la transformación de las células competentes de la siguiente manera. Se tomaron 100  $\mu$ l de células competentes y se colocaron en microtubos de 1.5 ml. Se agregaron 10  $\mu$ l de la ligación correspondiente y se incubó el tubo 40 min en hielo. Se indujo el choque térmico a 42 °C durante 90 segundos, posteriormente se transfirió el tubo a hielo y se incubó durante 90 segundos. Se agregaron 750  $\mu$ l de LB sin antibiótico y se incubó a 37 °C por 40 min en agitación. Se tomaron 100  $\mu$ l de la ligación y se sembraron en placas con medio LB/amp. En algunos casos se centrifugó el volumen restante para obtener el paquete celular y sembrarlo en otra placa. Se dejaron incubando las placas 24 horas a 37 °C.

Una vez que se observaron colonias se llenaron tubos con LB/Amp líquido y con palillos se tomaron colonias, se pusieron en el medio y se dejaron incubando en agitación constante un día a 37 °C.

## 6.7. Obtención de proteínas recombinantes

### 6.7.1. Inducción de proteínas recombinantes en pPROExHTa en la cepa *E. coli DH5α* (pPROEx HT Prokaryotic Expression System)

Para la inducción de las proteínas recombinante de la clona 6 pPROA1SNRRM/DH5α y la clona 2 pPROA1RRM2/DH5α se realizó lo siguiente. Dos ml de medio LB/amp se inocularon con una sola colonia. Se dejó incubando el cultivo durante toda la noche a 37 °C en agitación. Al siguiente día se inocularon 10 ml de LB/ amp con 0.1 ml del cultivo anterior. Se dejó crecer a 37 °C en agitación, cuando el cultivo llegó a A<sub>590</sub> 0.5-1 se removió 1 ml y se centrifugó por 1 min, se desechó el sobrenadante y se resuspendieron las células en 100 µl de PBS 1X . Esta fue la muestra no inducida. Al cultivo restante se le agregó IPTG a la concentración final de 0.6 mM y se continuó la incubación del cultivo a 37 °C en agitación, se removió una alícuota de 1 ml transcurridas 1, 2 y 3 hrs después de la inducción. Al tiempo transcurrido se centrifugaron las células y se resuspendió el botón en 100 µl de PBS.

### 6.7.2. Electroforesis de proteínas SDS-PAGE (Miniprotean4 BioRad)

Para verificar la expresión e identificar a la proteína de interés se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida al 12% (SDS-PAGE). El gel de poliacrilamida consta de dos geles: el gel Separador y el gel Concentrador. Primero se preparó el gel Separador agregando los siguientes componentes para un volumen de 10 mL.

<b>Tabla 12. Componentes para el gel Separador</b>	
<b>Reactivo</b>	<b>Volumen</b>
Agua	3.4 mL
Acrilamida 30%	4 mL
Buffer (1.5 M Tris-HCl pH 8.8)	2.5 mL
SDS 10%	0.1 mL
<b>Volumen Total</b>	<b>10 mL</b>

Se mantiene la mezcla de reactivos a temperatura ambiente y para iniciar la polimerización se agregaron 5 µl de TEMED y 50 µl de persulfato de amonio. Inmediatamente se mezcló y se vertió la solución en los vidrios (molde), sin tener burbujas. Se eliminó la curvatura (menisco) en la superficie, agregando etanol. Se dejó que polimerizara el gel (15-30 min). Una vez gelificado se decantó el exceso de etanol y se realizó la mezcla de los componentes para el gel concentrador, pero a un volumen final de 3 ml.

<b>Tabla 13. Componentes para el gel Concentrador</b>	
<b>Reactivos</b>	<b>Volumen</b>
Agua	1.02 mL
Acrilamida 30%	1.2 mL
Buffer (1.5 M Tris-HCl pH 8.8)	0.75 mL
SDS 10%	30 $\mu$ l
<b>Volumen Total</b>	<b>3 mL</b>

Se mezclaron los componentes del gel superior y para iniciar la polimerización se agregaron 3  $\mu$ l de TEMED y 15  $\mu$ l de persulfato de amonio. Una vez que se agregaron los catalizadores se mezclaron y se vertieron de inmediato, se puso el peine y se dejó gelificando (15- 30 minutos).

Para preparar las muestras se calentaron a 95 °C durante 5 minutos y se cargaron 20  $\mu$ l (0.4  $\mu$ g/  $\mu$ l) de la muestra en los pozos; como patrón de referencia se utilizó el marcador de proteínas con un rango de 15-170 kDa (Page Ruler Fermentas). La electroforesis se corrió en un Buffer Tris-Glicina (500 mM Tris, 500 mM glicina) a 80 mV durante 2-3 horas. Después de la electroforesis el gel se coloca en un recipiente y se tiñó con Azul de Coomassie (0.1 % de Azul brillante de Coomassie, 45% metanol, 10 % ácido acético) durante 10 minutos. Posteriormente se retiró el exceso de colorante y el gel se lavó con agua. Finalmente el gel se colocó en un volumen de solución de desteñir (10% metanol, 5% ácido acético) dejando en agitación durante toda la noche, después de este tiempo el gel se visualizó sobre un fondo blanco.

### **6.7.3. Western -blot**

Para el análisis tipo Western-blot se utilizaron los extractos de la inducción de nuestra proteína recombinante. Se preparó el gel de poliacrilamida al 12% como en el protocolo de SDS-PAGE (Secc. 6.6.2) y se cargaron 20  $\mu$ l de la muestra (0.4  $\mu$ g/  $\mu$ l). Para la transferencia de la proteína se utilizó una membrana de PVDF la cual se activó en metanol 100% durante 10 minutos, se dejó la membrana durante 5 minutos en el Buffer de transferencia y se mojaron las esponjas durante 5 minutos.

La transferencia se montó de la siguiente manera: Primero se puso la esponja, después papel filtro y el gel de poliacrilamida, posteriormente se puso la membrana de PVDF, se puso otra vez papel filtro, y por último otra esponja.

Se dejó transfiriendo el gel a la membrana toda la noche en un sistema húmedo de BioRad a 30 volts y 15 mA. Al día siguiente se retiró el gel y la membrana se dejó bloqueando con una mezcla de Casec (Nestle) al 5% en PBS 1X con el anticuerpo primario (anti-His; Santa Cruz Biotechnology en una dilución de 1:1000 con PBS 1X) toda la noche en agitación constante. Al otro día se lavó la membrana con PBS 1X 5 veces por 10 minutos y se colocó el anticuerpo secundario (anti raton igG- HRP Santa Cruz Biotechnology en una dilución 1:5000 con PBS 1X) se dejó incubando durante dos horas. Se lavó la membrana con PBS 1X 5 veces durante 10 minutos, para llevar a cabo el revelado.

Los anticuerpos están acoplados a peroxidasa por lo que se detectó la proteína con luminol (Millipore). Se dejó incubando la membrana durante 5 min con el luminol y posteriormente se drenó el exceso, se cubrió con una mica y se eliminó cualquier burbuja de aire, se le puso una película radiográfica y se dejó exponiendo 30 seg.

Pasado este tiempo se retiró la película y se sumergió la placa radiográfica en soluciones de revelado Kodak.

#### **6.7.4. Purificación de una proteína recombinante (kit His-Spin Protein miniprep de ZYMO)**

1. Resuspender la pastilla de las muestras inducidas en 1 ml de His-binding Buffer
2. Lisar las células por sonicación
3. Centrifugar a 12 000 rpm a 4 °C por 5 minutos (para remover restos celulares)
4. Tomar 200 µl del sobrenadante
5. Transferir 250 µl de la resina "His-Affinity Gel" a la columna Zymo-Spin P1 (colocar la columna en un tubo colector)
6. Centrifugar de 5 a 10 segundos (asegurándose de que la resina quede seca)
7. Agregar 150-300 µl del lisado celular inducido que incluya a la proteína recombinante soluble y resuspender la resina por agitación
8. Dejar interactuar la muestra con la resina durante 2 minutos con agitación periódica
9. Centrifugar 5-10 segundos, descartar el eluido
10. Agregar 250 µl de "His-Wash Buffer" y resuspender la resina
11. Repetir los 2 pasos anteriores 2 veces mas
12. Eluir con 150 µl de "His-elution Buffer"
13. Centrifugar de 5 -10 segundos . Este eluido contiene a la proteína recombinante concentrada y pura
14. Verificar la purificación en gel de poliacrilamida desnaturalizante.

## 7. RESULTADOS

### **7.1 Análisis *in silico* de la proteína hnRNP A1 putativa de *Ustilago maydis***

Se hizo la búsqueda de la secuencia aminoacídica de la proteína hnRNP A1 de *Homo sapiens* en la base de datos del NCBI (NP\_02127). Una vez obtenida esta secuencia de aminoácidos en la misma página se realizó un BLAST de proteína (empleando el algoritmo Smith-Waterman) con el genoma de *Ustilago maydis* para obtener el homólogo de la hnRNP A1, el cual nos arrojó como resultado la proteína UMAG\_02420 con una identidad del 34% (Tabla 14).

Tabla 14. Homólogo para la proteína hnRNP A1 en *Ustilago maydis*.

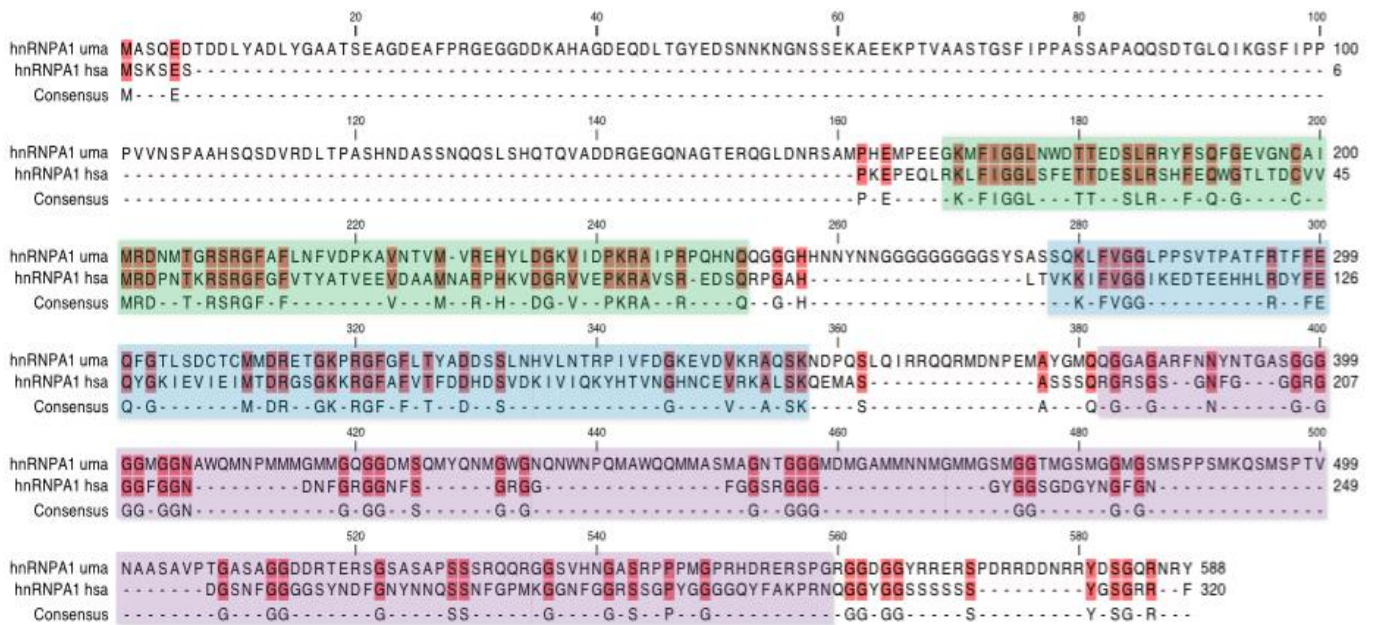
Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident
hypothetical protein UMAG_02420	131	131	58%	2E-34	34%

A las secuencias de proteína tanto de *Ustilago maydis* como de *Homo sapiens* se les buscó los dominios RRM en la base de datos del NCBI, ya que éstos son los que intervienen en la interacción proteína-RNA (Tabla 15).

Tabla 15. Dominios RRM en *Homo sapiens* y *Ustilago maydis*.

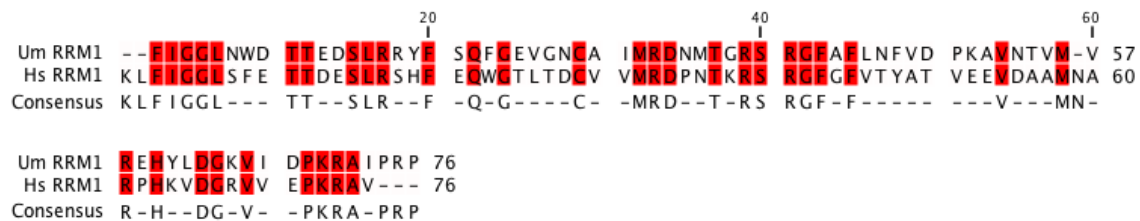
	<i>Homo sapiens</i> (aa)	<i>Ustilago maydis</i> (aa)
<b>Dominio RRM1</b>	12-92	171-246
<b>Dominio RRM2</b>	105-181	277-353

Una vez teniendo estos datos se realizó un alineamiento global (Figura 22) usando el programa CLC Sequence Viewer, en el cual podemos observar en rojo los aminoácidos que comparten ambas proteínas, con color verde se observa el dominio RRM1, en el cual se puede ver una gran homología, mientras que en color azul se encuentra el dominio RRM2 y con color morado se observa el tracto rico en glicinas en el cual efectivamente se encuentra este aminoácido en mayor proporción con un porcentaje del 73% G.

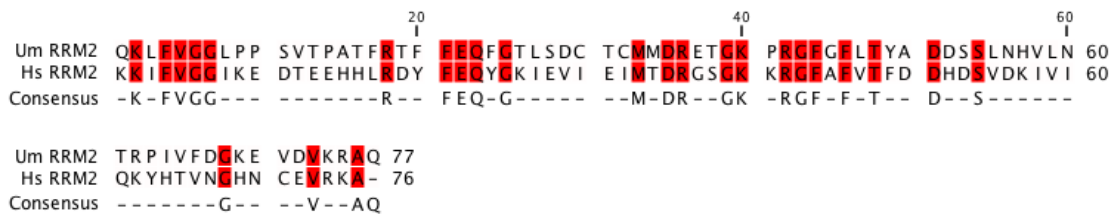


**Figura 22. Alineamiento global de la proteína hnRNP A1 de *Homo sapiens* con hnRNP A1 putativa en *Ustilago maydis*.** La primera secuencia de hnRNP A1 es la de *Homo sapiens*, mientras que la segunda secuencia es la de hnRNP A1 putativa de *Ustilago maydis*. En color verde se observa el dominio RRM1, en color azul el dominio RRM2 mientras el que tracto rico en glicinas se observa de color morado. Los aminoácidos conservados se observan en color rojo y en la parte de abajo en donde dice consenso se encuentran señalados estos aminoácidos.

Posteriormente se realizó un alineamiento local con las secuencias aminoacídicas de los dominios RRM1 y RRM2 de hnRNP A1 de *Homo sapiens* y con el homólogo de *Ustilago maydis* (Figura 23 y 24). En rojo podemos observar los aminoácidos que se encuentran conservados en ambos dominios. Con lo anterior podemos observar que el dominio RRM1 se encuentra más conservado con un porcentaje de identidad del 48% mientras que el dominio RRM2 tiene un porcentaje de identidad del 35%.

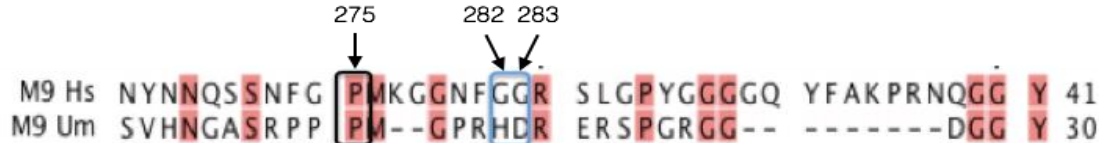


**Figura 23. Alineamiento del dominio RRM1 de hnRNP A1 entre *Ustilago maydis* y *Homo sapiens*.** En la parte de arriba se encuentra la secuencia de *Homo sapiens* mientras que la secuencia de abajo es la de *Ustilago maydis*. Los aminoácidos conservados se indican en rojo, se obtuvo una identidad global del 48%.



**Figura 24 . Alineamiento del dominio RRM2 de hnRNP A1 entre *Ustilago maydis* y *Homo sapiens*.** En la parte de arriba se encuentra la secuencia de *Homo sapiens* mientras que la secuencia de abajo es la de *Ustilago maydis*. Los aminoácidos conservados se muestran en rojo; la identidad global fue del 35%.

La proteína hnRNP A1 de *Homo sapiens* tiene una señal de exportación nuclear (NLS) en el carboxilo terminal denominada M9 y se ha demostrado que esta señal es suficiente para indicar tanto la exportación como la importación nuclear. Esta señal se encuentra ya descrita (Siomi y cols. 1995). En este trabajo se idéntico esta señal en la proteína putativa hnRNP A1 de *Ustilago maydis* y posteriormente se realizó un alineamiento con la de *Homo sapiens* (Figura 25). Se sabe que al mutar P275L (recuadro negro en la Figura 25), la cual está conservada en ambos organismos, se ve afectada la exportación e importación nuclear, mientras que si se mutan las glicinas no conservadas G282L/G283L (recuadro azul en la Figura 25) no se ve afectada la exportación e importación (Michael y cols. 1993).



**Figura 25. Alineamiento de la señal de exportación M9 de hnRNP A1 en *Homo sapiens* y *Ustilago maydis*.** Se muestran con color rojo los aminoácidos conservados. Se señala con un rectángulo negro el aminoácido 275 responsable de la exportación e importación nuclear, mientras que con un rectángulo azul se encuentran los aminoácidos 282 Y 283 que al ser mutados no interfieren en la exportación e importación nuclear.

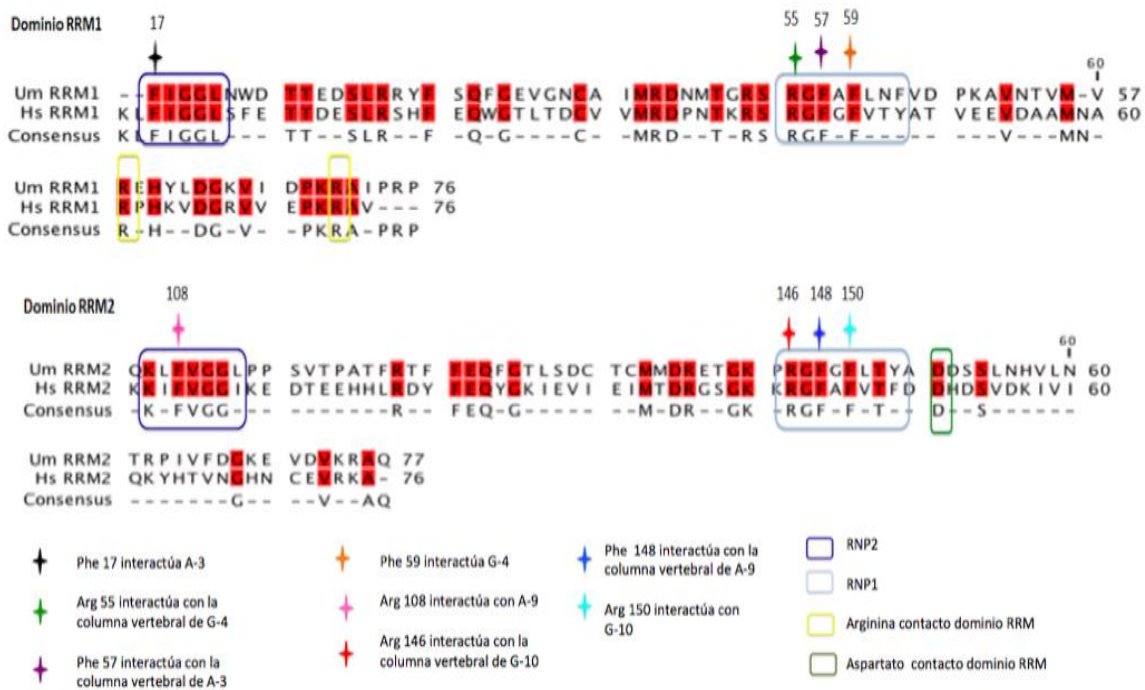
Por otra parte, como se menciona en los antecedentes se encuentra ya descrito el cristal de hnRNP A1 de *Homo sapiens* que es una versión corta de esta y que se denomina UP1, esta proteína tiene los dos dominios RRM, pero carece del dominio rico en glicina en el extremo carboxilo terminal y consta de 196 aminoácidos. (Figura 26).



**Figura 26. Estructura de UP1 de *Homo sapiens*.** Se muestran los dos dominios RRM en cajas de color rojo y el tamaño global es de 196 aminoácidos.



En la descripción del cristal (Ding J. 1999) se mencionan los aminoácidos importantes en las secuencias consenso RNP1 y RNP2 que están involucrados en la interacción con el ARN, así como los aminoácidos que sirven para el plegamiento de la proteína y la interacción de ambos dominios por lo que se usaron los alineamientos locales elaborados anteriormente y se encontró que las fenilalaninas son fundamentales para llevar a cabo la interacción con el ARN se encuentran conservadas en ambos organismos. También se encuentran conservados los aminoácidos que interactúan con la columna vertebral de la secuencia de nucleótidos con la que se sabe que



interacciona la proteína hnRNP A1 de *Homo sapiens* (10 repetidos de TTAGGG), así como los aminoácidos que sirven para la interacción entre ambos dominios RRM (Figura 27)

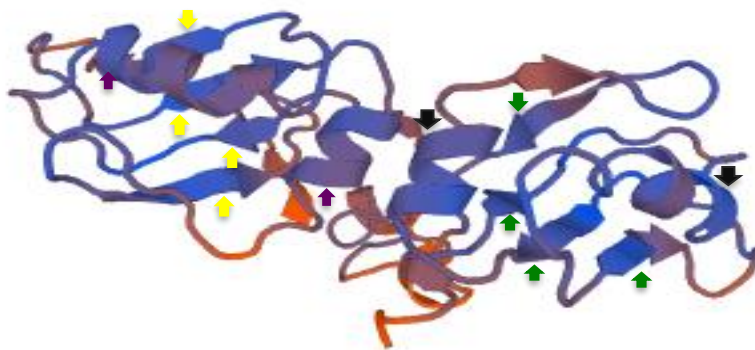
1-T 2-T 3-A 4-G 5-G 6-G 7-T 8-T 9-A 10-G 11-G 12-G

**Figura 27. Análisis de los aminoácidos conservados en *Ustilago maydis*.** Se muestran los dominios RRM1 y RRM2 en los que se muestra con un rectángulo las secuencias consenso RNP2 y RNP1, y con una estrella de diferentes colores se pueden observar los aminoácidos conservados que interactúan con la secuencia de RNA (TTAGGG). En la parte posterior se encuentra la secuencia repetida de TTAGGG indicando el número de nucleótido que le corresponde.

Se ha reportado que la fenilalanina que se encuentra en las secuencias consenso RNP2 es la responsable de la interacción con el ARN ya que al mutar las Phe 57, 59, 148 y 150 presentes en la secuencia consenso RNP1 de los dominios RRM1 y RRM2 (Mayeda A. 1992) se observó que la interacción con el ARN se ve disminuida. Estas

fenilalaninas están conservadas en el homólogo para hnRNP A1 de *Ustilago maydis* (Figura 27).

Una vez analizados los alineamientos, se procedió a la construcción de modelos tridimensionales para analizar ahora la posición espacial de los aminoácidos que componen los dominios RRM. Para ello, se tomó la secuencia amonoacídica del locus UMAG\_02420 y se construyó un modelo tridimensional empleando el programa SWISS-MODEL (Figura 28), y como templado el cristal de UP1 (2lv1). En el modelado se pueden observar en color azul las zonas que presentan un arreglo tridimensional conservado y que corresponden a los dominios RRM, mientras que en rojo se observan las regiones que no se alinearon espacialmente.



**Figura 28. Modelo de la proteína hnRNP A1 de *Ustilago maydis*.** En azul se muestran las áreas conservadas de la proteína que corresponde a los dominios RRM y en rojo aquellas que no están conservadas en la proteína de *Ustilago maydis*. El modelo se construyó usando como templado el PDB de UP1 de *Homo sapiens* usando el programa SWISS-MODEL. Con flechas de color amarillo se indican las 4  $\beta$  plegadas y con flechas de color morado se indica las 2  $\alpha$  hélices del dominio RRM1. Con flechas de color verde se indican las 4  $\beta$  plegadas y con flechas de color negro se indican las 2  $\alpha$  hélices del dominio RRM2.

En la base de datos del Protein Data Bank se obtuvo el PDB del cristal UP1 de *Homo sapiens* que está co-cristalizado con la secuencia de repeticiones TTAGGG. Este se usó como templado para realizar el modelado de la proteína putativa hnRNP A1 de *Ustilago maydis* usando el programa Swiss-PdbViewer. Primero se hizo la superposición de ambas proteínas y se puede observar que los dominios RRM son similares espacialmente.(Figura 29).



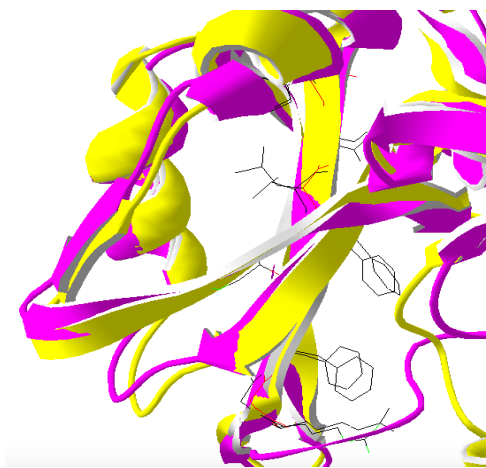
**Figura 29. Superposición de la UP1 de *Homo sapiens* y *Ustilago maydis*.** De color magenta se puede ver el cristal de UP1 de *Homo sapiens* mientras que en color amarillo se observa el modelo para la región equivalente en *Ustilago maydis*.

Posteriormente se hizo la superposición por dominios y para el caso del dominio RRM1 (Figura 30A) se puede observar que ambas proteínas presentan una organización espacial similar, ya que en ambos casos se observan las 4 betas plegadas y las dos alfa hélices en una posición conservada.

Posteriormente se analizó en detalle la superposición para las secuencias consenso RNP1 y RNP2 para identificar los aminoácidos que se encuentran en cada una de estas secuencias. Se analizó la secuencia RNP1 del dominio RRM1 identificado en UP1 de *Homo sapiens* y de *Ustilago maydis* (Figura 30B), en el cual podemos observar que existen aminoácidos conservados desplegando la misma posición espacial en ambas secuencias, tal es el caso de Arg 55, Gly 56, Phe57, Phe 59 de *Homo sapiens* que corresponden a los residuos Arg 210, Gly 211, Phe212, Phe214 de *Ustilago maydis*.

Se realizó el mismo análisis para la secuencia consenso RNP2 (Figura 30C). Se puede observar que existen aminoácidos conservados y éstos se encuentran espacialmente en posiciones similares. En el caso de esta secuencia los aminoácidos conservados son Phe17, Ile18, Gly19, Gly 20 y Leu21 de *Homo sapiens* y Phe172, Ile173, Gly174, Gly175 y Leu176 para *U. maydis*.





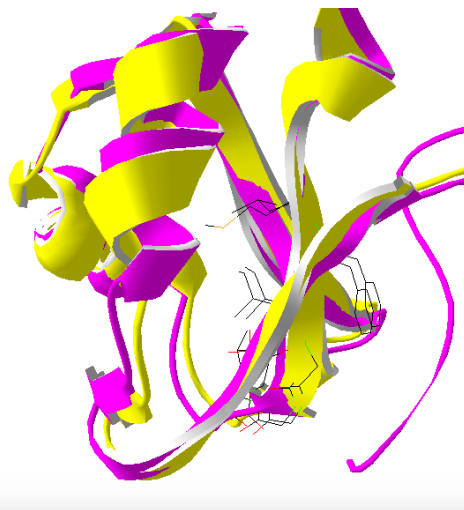
**RNP1 del  
dominio  
RRM1 (*Hsa*)**

Arg-55  
Gly-56  
Phe-57  
Gly-58  
Phe-59  
Val-60  
Thr-61  
Tyr-62

**RNP1 del  
dominio RRM1  
(*Uma*)**

Arg-210  
Gly-211  
Phe-212  
Ala-213  
Phe-214  
Leu-215  
Asn-216  
Phe-217

C)



**RNP2 del  
dominio  
RRM1 *Homo  
sapiens***

Leu-16  
Phe-17  
Ile-18  
Gly-19  
Gly-20  
Leu-21

**RNP2 del  
dominio RRM1  
*Ustilago  
maydis***

Met-171  
Phe-172  
Ile-173  
Gly-174  
Gly-175  
Leu-176

**Figura 30. Superposición del dominio RRM1 de UP1 de *Homo sapiens* y de *Ustilago maydis***

**A)** En color magenta se observa el dominio RRM1 de UP1 de *Homo sapiens* y en color amarillo la porción equivalente del homólogo de *Ustilago maydis*, en donde se observan las dos alfa hélices y las 4 betas plegadas característica de los dominios RRM1. **B)** En el extremo izquierdo esta la superposición de la secuencia consenso RNP1 del dominio RRM1 tanto de UP1 de *Homo sapiens* en color magenta y en color amarillo la de *Ustilago maydis*. En el extremo derecho se muestran los aminoácidos que se encuentran en cada una de estas secuencias. **C)** En el extremo izquierdo se muestra la superposición de la secuencia consenso RNP2 del dominio RRM1 tanto de UP1 de *Homo sapiens* en color magenta y en color amarillo la hnRNP A1 de *Ustilago maydis*. De lado derecho se muestran los aminoácidos involucrados en las interacciones. En ambos casos con color rojo de muestran los aminoácidos que se encuentran conservados en ambas secuencias consenso del dominio RRM1

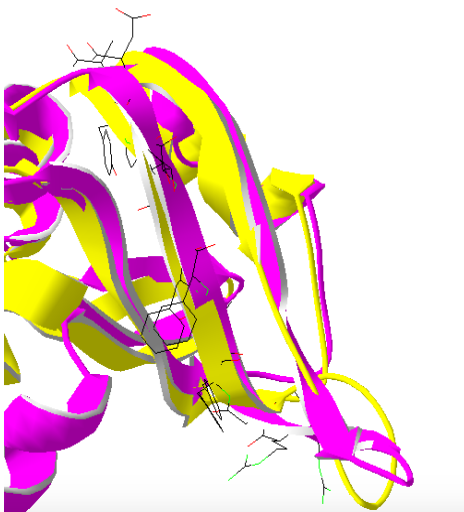
También se hizo la superposición del dominio RRM2 de UP1 de *Homo sapiens* y de *Ustilago maydis* (Figura 31A), en donde se pueden observar las 4 beta plegadas y las 2 alfa hélices que son específicas de los dominios RRM, también se puede observar la  $\beta$ -1 y la  $\beta$ -3 en donde se encontraran las secuencias consensos RNP2 y RNP1

respectivamente . Por otra parte se hizo también la superposición de la secuencia RNP1 de UP1 Y de hnRNP A1 de *Ustilago maydis* del dominio RRM2 (Figura 31B) en la cual se puede observar los aminoácidos que se encuentran conservados así como la posición espacial de cada uno de estos, por lo que se puede decir que evidentemente existen aminoácidos conservados y que la posición espacial es también similar entre los aminoácidos conservados se encuentran Arg146, Gly147, Phe148, Phe15, Thr152, de *Homo sapiens* y Arg319, Gly320, Phe321, Phe323, Thr325 en *Ustilago maydis* . Al mismo tiempo se realizo la superposición de la secuencia consenso RNP2 de UP1 y de hnRNP A1 de *Ustilago maydis* (Figura 31C) , en donde al igual se puede observar los aminoácidos que conforman cada uno de estas secuencias en ambas proteínas y se puede ver que al igual que las demás secuencias consenso RNP1 y RNP2 tanto del dominio RRM1 como del dominio RRM2, existen aminoácidos conservados que se encuentran espacialmente en la misma posición, los aminoácidos conservados son Phe108, Val109, Gly110, Gly111 en *Homo sapiens* y Phe281, Val282, Gly283, Gly284 de *Ustilago maydis*

A)



B)



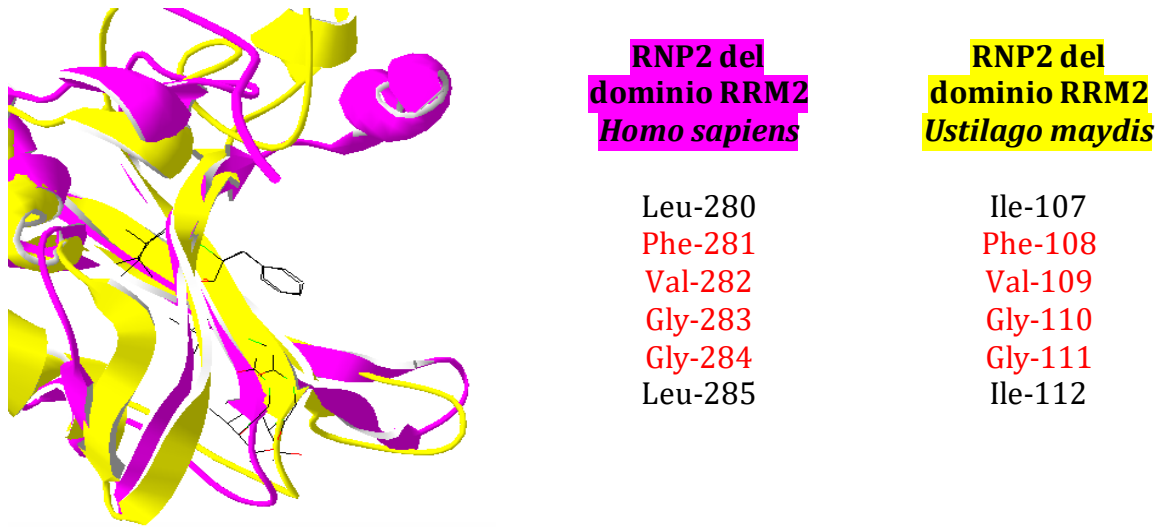
**RNP1 del dominio  
RRM2 de *Homo  
sapiens***

Arg-146  
Gly-147  
Phe-148  
Ala-149  
Phe-150  
Val-151  
Thr-152  
Phe-153  
Asp-154

**RNP1 del dominio  
RRM2 de *Ustilago  
maydis***

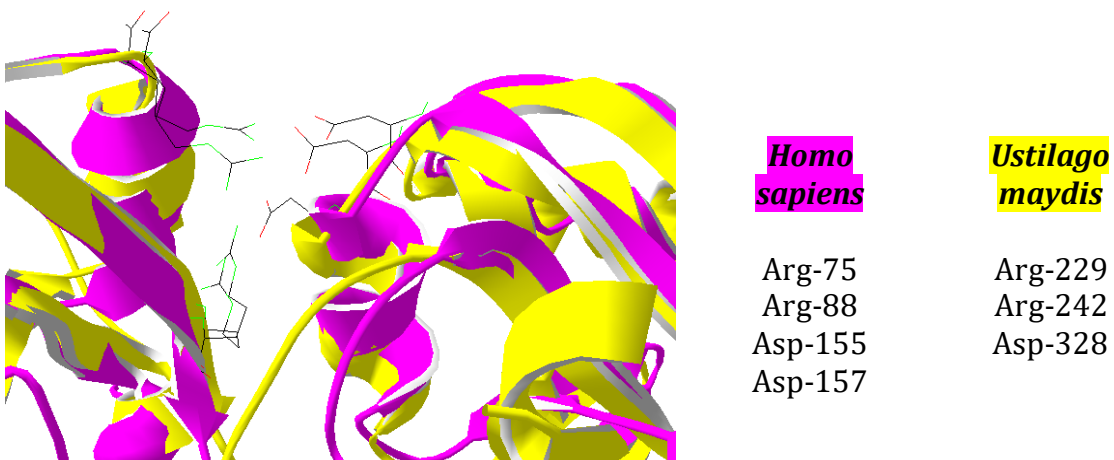
Arg-319  
Gly-320  
Phe-321  
Gly-322  
Phe-323  
Leu-324  
Thr-325  
Tyr-326  
Ala-327

C)



**Figura 31. Superposición del dominio RRM2 de UP1 de *Homo sapiens* y de RRM2 de hnRNP A1 de *Ustilago maydis*.** A) En color magenta se observa el dominio RRM2 de UP1 de *Homo sapiens* y en color amarillo el dominio RRM2 de hnRNP A1 de *Ustilago maydis*, en donde se observa las dos alfa hélice y las 4 betas plegadas característica de los dominios RRM1 B) En el extremo izquierdo se encuentra la superposición de la secuencia consenso RNP1 del dominio RRM2 tanto de UP1 de *Homo sapiens* en color magenta y en color amarillo la hnRNP A1 de *Ustilago maydi*. Mientras que en el extremo derecho de muestran los aminoácidos que se encuentran en cada una de estas secuencias. C) En el extremo izquierdo esta la superposición de la secuencia consenso RNP2 del dominio RRM2 tanto de UP1 de *Homo sapiens* en color magenta y en color amarillo la hnRNP A1 de *Ustilago maydis*. Mientras que en el extremo derecho de muestran los aminoácidos que se encuentran en cada una de estas secuencias,. En ambos casos con color rojo de muestran los aminoácidos que se encuentran conservados en ambas secuencias consenso del dominio RRM1

Los dos dominios RRM de la proteína se encuentran comunicados mediante algunos aminoácidos los cuales también se encuentran conservados (Figura 32), estos aminoácidos son Arg75, Arg88, Asp155, Asp157 en *Homo sapiens*, mientras que en *Ustilago maydis* son Arg229, Arg242 y Asp328, también estos aminoácidos se encuentran en la misma posición así como espacialmente.



**Figura 32 Interacción entre los dominios RRM1 y RRM2 de UP1.** A la izquierda se muestra la superposición de UP1 de *Homo sapiens* en color magenta y en color amarillo la hnRNP A1 de *Ustilago maydis*. De lado derecho de muestran los aminoácidos involucrados en la interacción de estas secuencias.

Mediante el estudio del cristal de UP1 se analizaron también los aminoácidos que interactúan con la secuencia (TTAGGG)<sub>10</sub> que corresponde a diez repetidos de este hexámero. Entre los aminoácidos que interactúan con este repetido se encuentran las secuencias consenso RNP1 y RNP2, considerando que todos estos aminoácidos se encuentran conservados (Figura 33).

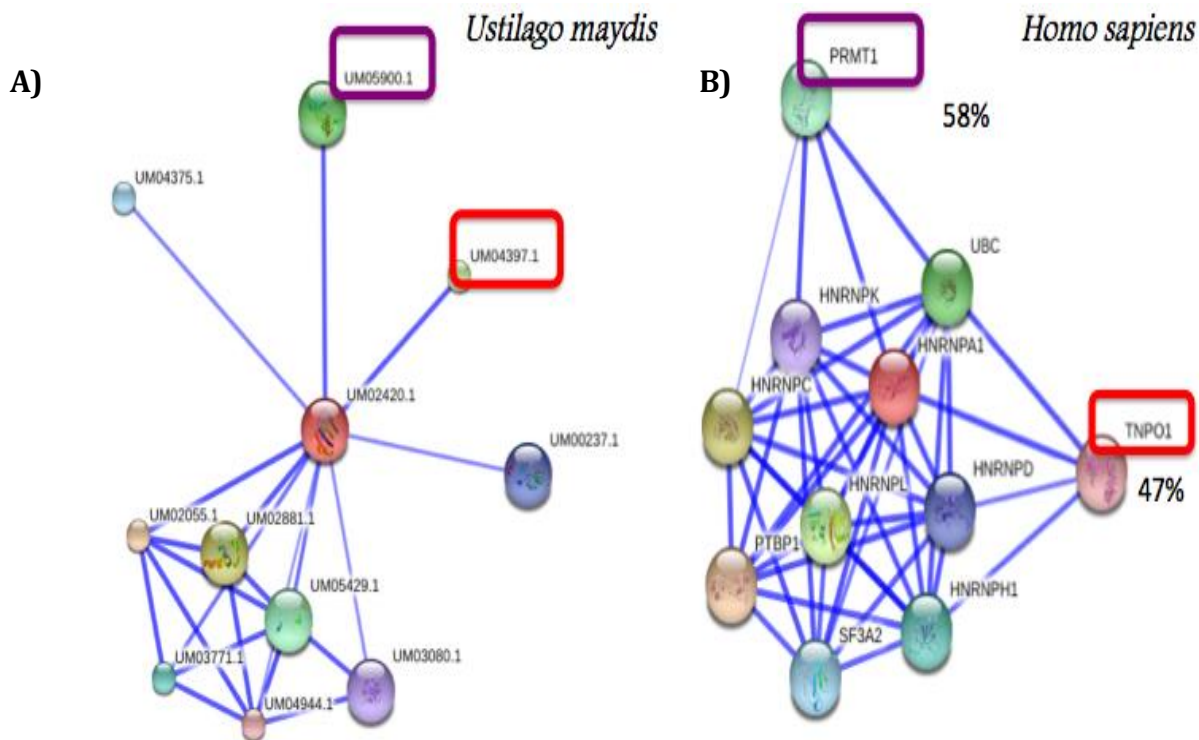


<i>Homo sapiens</i>	<i>Ustilago maydis</i>	
---------------------	------------------------	--

Phe 17	Phe172	Interactúa con A-3(RNP2 Dominio RRM1)
Phe 59	Phe214	Interactúa con G-4 (RNP1 Dominio RRM1)
Arg 55	Arg210	Interactúa con la columna vertebral de G-4 (RNP1 Dominio RRM1)
Phe 57	Phe212	Interactúa con la columna vertebral de A-3 (RNP1 Dominio RRM1)
Phe 108	Phe281	Interactúa con A-3 (RNP2 Dominio RRM2)
Arg 146	Arg319	Interactúa con la columna vertebral de G-10 (RNP1 Dominio RRM2)
Phe 150	Phe323	Interactúa con G-10 (RNP1 Dominio RRM2)

**Figura 33. Interacción entre UP1 y la secuencia de repetidos TTAGGG.** Se muestra la superposición de la estructura de hnRNP A1 putativa de *Ustilago maydis* en amarillo y en morado la de hnRNP A1 de *Homo sapiens*. Abajo se indican los aminoácidos involucrados en la interacción con la secuencia TTAGGG empleando el mismo código de colores.

Para verificar las interacciones de la proteína hnRNP A1 de *Homo sapiens* así como de la proteína hnRNP A1 putativa con el extracto proteico total de *Ustilago maydis* se uso el programa STRING. Se realizó la interacción de hnRNP A1 putativa de *Ustilago maydis* (UMAG\_02420) con el proteoma del mismo y se analizó cada una de las proteínas con las que interacciona con hnRNP A1 de *Ustilago maydis* por lo que se realizo un blast de proteínas comparando con *Homo sapiens*. (Figura 34 y tabla 16). Se hizo el mismo análisis con la proteína hnRNP A1 de *Homo sapiens* y se vio con que proteínas interactuaba, se realizo un Blast de proteínas para buscar los homólogos en *Ustilago maydis* (Figura 34 y tabla 17)



**Figura 34. Análisis de la proteína UMAG\_02420 de *Ustilago maydis* y de la proteína hnRNP A1 de *Homo sapiens* con el programa STRING. A)** Se puede observar con que proteínas del proteoma de *Ustilago maydis* interacciona la proteína UMAG\_02420. En un círculo rojo se encuentra la proteína UMAG\_02420 mientras que en diversos círculos de colores se encuentran las proteínas con las que interacciona, mientras que en líneas de color azul se emplean para unir a las dos proteínas involucradas. **B)** Se observar las interacciones que tiene la proteína hnRNP A1 de *Homo sapiens* con el proteoma de este mismo. En un círculo rojo se observa la proteína hnRNP A1 de *Homo sapiens* y con diferentes círculos de colores se observan las proteínas con las que interacciones mientras que en líneas de color azul se emplean para unir a las dos proteínas involucradas. En cuadros rojos se encuentran las proteínas que están conservados en ambos análisis (TNPO1-UMAG\_04397) al igual que las que se encuentran en un cuadro morado (PRMT1-UMAG\_05900).



**Tabla 16. Proteínas con las cuales interacciona UMAG\_02420.**

Locus	Aminoacidos	<i>Ustilago maydis</i>	<i>Homo sapiens</i>	Identidad
UMAG_05900	346 a.a	arginina omega-N metiltransferasa HTM1	Arginina metiltransferasa	58%
UMAG_04397	924 a.a	Proteina hipotetica	Transportin 1 (TRN1)	47%
UMAG_04375	618 a.a	Proteina hipotetica	arginina metiltransferasa 1 Isoforma CRA_a	36%
UMAG_11428	1088 a.a	Proteina hipotetica	Proteina putativa de NMD RNA helicasa dependiente de ATP (UPF1)	66%
UMAG_05429	366 a.a	Proteina hipotetica	Subunidad 4 de factor de escision y de poliadenilacion	33%
UMAG_03030	331 a.a	subunidad catalitica proteina serina/treonina fosfatasa tipo 1 (Glc7)	serina/treonina fosfatasa subunidad catalitica PP1-beta	86%
UMAG_04944	1597 a.a	Proteina hipotetica	factor 1 de escision y poliadenilacion	32%
UMAG_03771	739 a.a	Proteina hipotetica	proteina de union a RNA	32%
UMAG_02055	945 a.a	Proteina hipotetica	Subunidad 3 de factor de estimulacion de escision isoforma X1	34%
UMAG_02881	403 a.a	Proteina hipotetica	Subunidad 2 de factor de estimulacion de escision isoforma X2	68%

**Tabla 17. Proteínas con las cuales interacciona hnRNP A1 de *Homo sapiens*.**

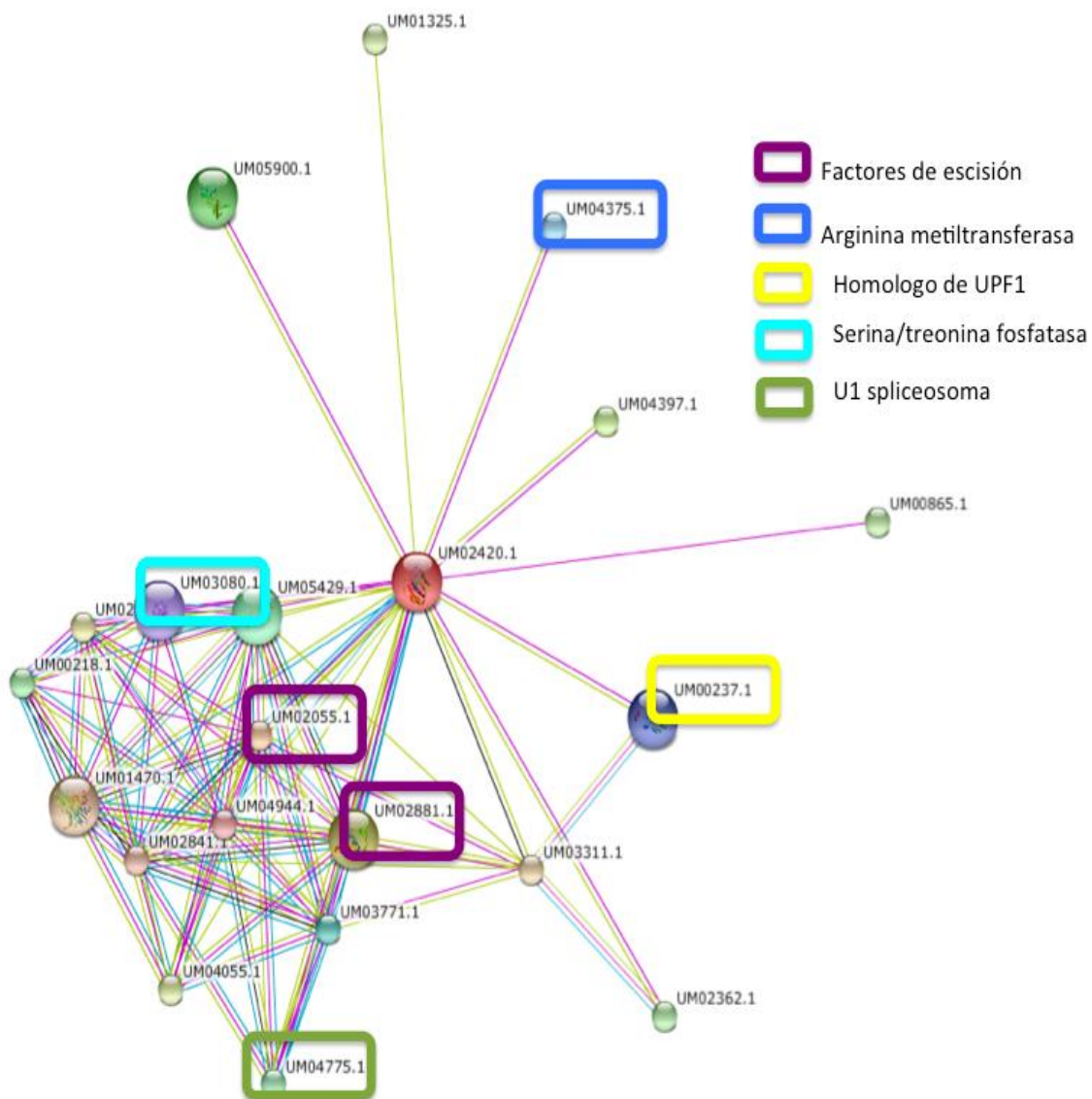
<i>Homo sapiens</i>	Funcion	Aminoacidos	Locus	<i>Ustilago maydis</i>	Identidad
PTB1	Proteina de union al tracto de polipirimidinas	557 a.a	UMAG_00516	Proteina hipotetica	48%
HNRNPC	Ribonucleoproteina heterogenea nuclear L	306 a.a	UMAG_15022	Proteina hipotetica	29%
HNRNPL	Ribonucleoproteina heterogenea nuclear C	589 a.a	UMAG_02472	Proteina hipotetica	22%
UBC	Ubiquitina C	685 a.a	UMAG_11911	Ubiquitina putativa	97%
PRMT1	Protein arginine methyltransferase	371 a.a	UMAG_05900	Arginina metiltransferasa	60%
HNRNPH1	Ribonucleoproteina heterogenea nuclear H1	449 a.a	UMAG_11552	Proteina hipotetica	35%
SF3A2	Factor de splcing 3a subunidad 2	464 a.a	UMAG_11019	Proteina hipotetica	55%
HNRNPD	Ribonucleoproteina heterogenea nuclear D	355 a.a	UMAG_06193	Proteina hipotetica	32%
HNRNPK	Ribonucleoproteina heterogenea nuclear K	464 a.a	UMAG_03654	Proteina hipotetica	30%
TNPO1	Transportin 1	898 a.a	UMAG_04397	Proteina hipotetica	47%

Alguna de las proteínas con las que interacciona hnRNP A1 putativa de *Ustilago maydis* (UMAG\_02420), podemos encontrar una arginina metiltransferasa (UMAG\_05900) con 58% de identidad así como una fosfatasa (UMAG\_03030) con 86% de identidad. Esta reportado que la proteína hnRNP A1 de *Homo sapiens* sufre de modificaciones postraduccionales como la metilación de las argininas que se encuentran en la caga RGG y que actúan para modular la unión de ácidos nucleicos (Kim y cols. 1997), al igual varios residuos de serina en los dominios RRM y el dominio rico en glicinas se ha demostrado que pueden ser fosforilados tanto in vitro como in vivo (Municio y cols 1995, Buxade y cols. 2005) y se ha demostrado que si se fosforila una serie de residuos de serina puede reducir la capacidad de interacción de hnRNP A1 con secuencias de RNA así como para regular su localización (Allemand y cols 2005). Al igual interacciona con el homologo de UPF1 (UMAG\_11428) con un porcentaje de identidad del 66%, el cual forma parte del sistema de NMD, el cual es un sistema de vigilancia de los mensajeros (Tabla 16).

En el caso del análisis de la proteína hnRNP A1 de *Homo sapiens* podemos observar que interacciona con otras proteínas hnRNP's lo cual también ya se ha reportados (Jacques y cols 2005) . Tambien se puede observar la interacción con una metiltransferasas (PRMT1) , asi como una proteína SR (SF3A2) la cual también es una proteína reguladora del splicing, las cual llevan a cabo la retención del exón. (Figura 34, Tabla 17)

Podemos observar que existen dos proteínas que se conservan en ambos análisis que son la arginina metiltransferasa (UMAG\_05900) y la proteína TNP01 (UMAG\_04397) la cual es una proteína de transporte nuclear y como se sabe la proteína hnRNP A1 se puede transportar del núcleo hacia el citoplasma (Figura 34).

Para ampliar el rango de proteínas que interaccionan con la proteína Se hizo el hnRNP A1 de *Ustilago maydis* se realizó un análisis pero ahora usando un máximo de 20 proteínas (Figura 35 y Tabla 18)



**Figura 35. Análisis de las interacciones de la proteína UMAG\_0240 de *Ustilago maydis* ampliando el rango a 20 proteínas.** Se pueden ver con que proteínas que puede interaccionar hnRNP A1 putativa de *Ustilago maydis*. En el diagrama se usó el programa STRING con un máximo de 20 proteínas. En un círculo rojo se encuentra la proteína UMAG\_0240 mientras que en círculo de diferentes colores se encuentran las proteínas con las que interacciona, mientras que en líneas de color azul se emplean para unir a las dos proteínas involucradas. En recuadros de colores se encuentran las proteínas que resultaron importantes en estas interacciones.

**Tabla 18. Análisis de proteínas con las cuales interacciona hnRNP A1 de *Ustilago maydis*.**

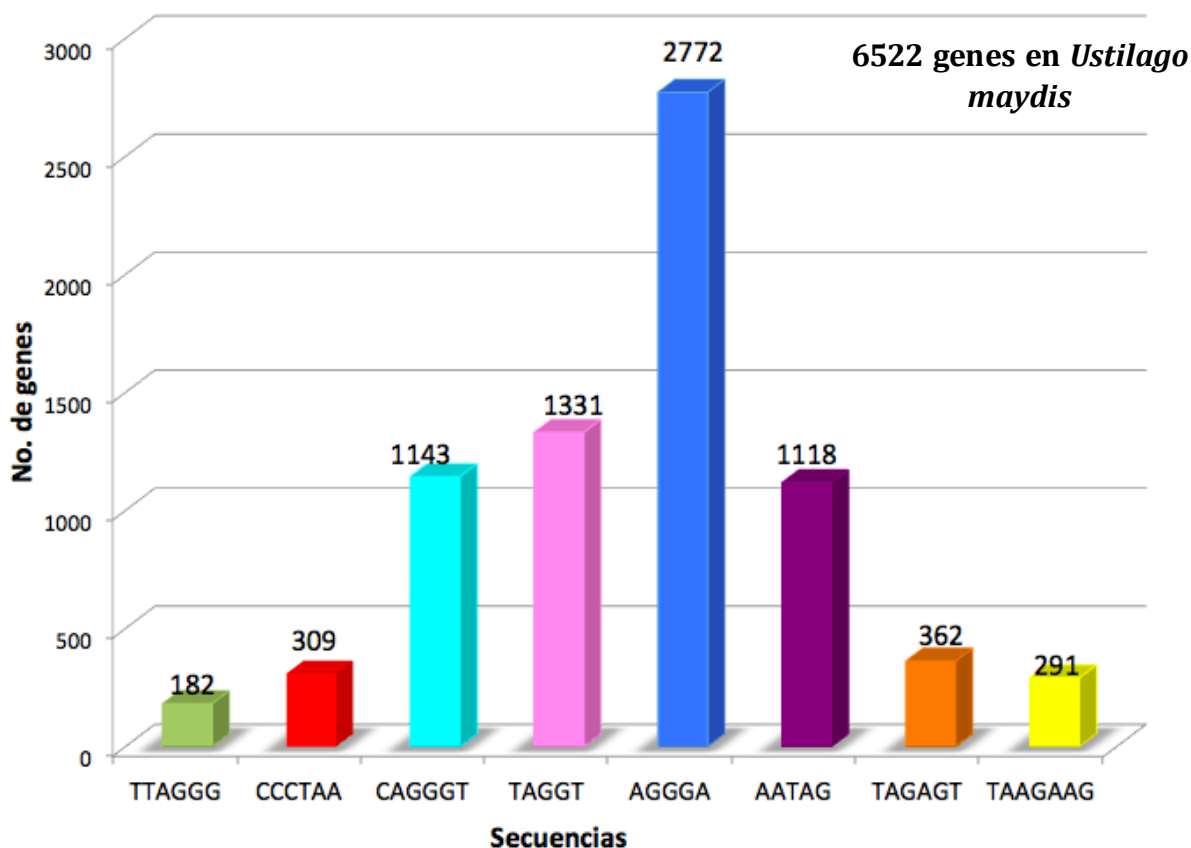
Locus	<i>Ustilago maydis</i>	a.a.	Homologo en <i>Homo sapiens</i>	Identidad
UM02055.1	mRNA 3-end-processing protein RNA14; Componente of the cleavage factor IA (CFIA) complex	945	Cleavage stimulation factor 3' pre ARN subunit 3 77kD	69%
UM02881.1	hypothetical protein	403	Cleavage stimulation factor 3' pre ARN subunit 2 64 kD	48%
UM04397.1	hypothetical protein	924	Transportin	47%
UM05900.1	Putative protein- arginine omega -N methyltransferase HMT1	346	PRMT1 protein	99%
UM05429.1	mRNA 3' processing protein YTH1 Component of the cleavage factor I (CF I)	366	Cleavage and polyadenylation specific factor 4	82%
UM03771.1	hypothetical protein	738	Probable RNA binding protein	32%
UM04375.1	hypothetical protein	618	protein arginine methyltransferase	36%
UM00237.1	Putative onsen-mediated mRNA decay protein ATP dependent RNA helicase	1088	Homolog of yeast UPF1	66%
UM03080.1	Serine/threonine-protein phosphatase	331	serine/threonine phosphatase	86%
UM04944.1	hypothetical protein	1597	cleavage and polyadenylation specific factor 1, 160 kD	32%
UM02841.1	hypothetical protein	979	cleavage and polyadenylation specific subunit 2	47%
UM01470.1	Endoribonuclease YSH1 Component of the cleavage factor I (CF I)	880	cleavage and polyadenylation specific factor subunit 3	51%
UM03311.1	hypothetical protein	1081	Poly (a) binding protein	43%
UM02650.1	hypothetical protein	334	WD repeat containing protein 82	34%
UM04055.1	hypothetical protein	627	pre mRNA cleavage complex 2 protein Pcf11	27%
UM01325.1	hypothetical protein	397	Transformer-2 protein homolog beta isoform 2	42%
UM00865.1	hypothetical protein	440	Serine tRNA ligase cytoplasmic	44%
UM02362.1	hypothetical protein	1604	Estructural and functional insights into the human upf1 helicase core	38%
UM00218.1	hypothetical protein	636	pre-mRNA 3' end processing protein WDR33	41%
UM04775.1	hypothetical protein	342	Crystal structure of human spliceosomal U1 snrnp	42%

En este estudio en el cual se usaron un total de 20 proteínas podemos observar proteínas analizadas anteriormente como la arginina metiltransferasa, el homólogo de UPF1 y la fosfatasa, además de estas proteínas se observa factores de escisión con una identidad del 69% y 48% correspondiente a UMAG\_02055 y UMAG\_02881 ya que una de los pasos para la maduración del pre-RNA es la adición de la cola de poliA, también se muestra una interacción con el homólogo de U1 con una identidad del 42% (UMAG\_02362) que forma parte del *spliceosoma* (Figura 35 y tabla 18)

## 7.2 Identificación de posibles sitios de regulación mediados por hnRNP A1 en el genoma de *Ustilago maydis*.

Para buscar los posibles sitios activos de regulación mediados por hnRNP A1 en *Ustilago maydis*, se hizo una búsqueda bibliográfica con los sitios de unión que han sido reportados para esta proteína en *Homo sapiens* (Jacques 2012). Con ayuda del programa GeneFinder se buscaron estas secuencias en el genoma de *Ustilago maydis*

dándonos como resultado que la secuencia AGGGA es la más prevalente con un 43% de abundancia (2772 genes), mientras que la secuencia TTAGGG que es la que se usa en los ensayos ya descritos para interacción con hnRNP A1 de *Homo sapiens* se encuentra solo en el 3% (182 genes) (Figura 36).

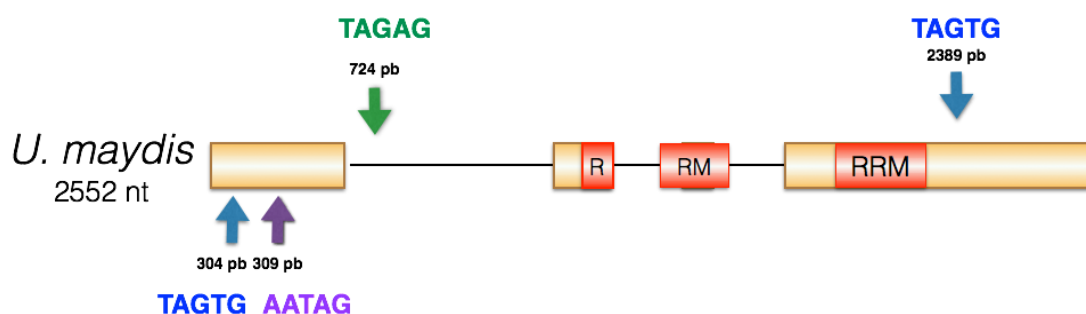


**Figura 36. Frecuencia observada para las diferentes secuencias de pegado reportadas para hnRNP A1 en el genoma de *Ustilago maydis*.** En la gráfica se observan con una barra azul el número de genes que contienen la secuencia AGGGA, en la barra color verde se observa secuencia TTAGGG reportada como sitio de pegado de hnRNPA1 de *Homo sapiens* (Programa GeneFinder Hernández-Pérez y cols.)

Como ejemplo de genes que contiene 2 secuencias de TTAGGG tenemos el gen UMAG\_02992 que corresponde al homólogo de una transposasa, el cual consta de 1446 pb y codifica para una proteína de 312 aa y produce una isoforma, presumiblemente por *splicing* alternativo y tiene sitios de pegado para la proteína hnRNP A1.

Por otro lado, se sabe que hnRNP A1 en humano genera diversas isoformas y presenta una autorregulación. Aunque hemos observado que la hnRNP A1 putativa de *Ustilago maydis* también tiene intrones, sería necesario validar experimentalmente

mediante un ensayo in vitro que también tiene la capacidad de generar diferentes isoformas y que igual que en humano puede autorregularse. La secuencia de pegado reportada en trabajos anteriores para hnRNPA1 de *Homo sapiens* no se encuentra en la hnRNP A1 putativa de *Ustilago maydis*, pero se sabe también que existen otras secuencias de reconocimiento para esta proteína, por lo que con el programa de GenFinder, se buscaron las diferentes secuencias de reconocimiento en el locus UMAG\_02420 y se encontró que cuenta con otros sitios de pegado de esta proteína, por lo que se podría pensar que si tiene la capacidad de autorregularse, pero mediante otra secuencia (Figura 37).



**Figura 37. Estructura del locus UMAG\_02420.** Se encuentran señaladas con diferentes flechas de colores las secuencias de pegado de hnRNP A1 que se encontraron en la secuencia del locus UMAG\_02420. En color verde se encuentra la secuencia TAGAG a 724 pb en el primer intrón, con flechas azules las dos secuencias de TAGTG una a 304 pb en el primer exón y la otra a 2389 pb en el cuarto exón y con una flecha morada la secuencia AATAG a 209 pb en el primer exón.

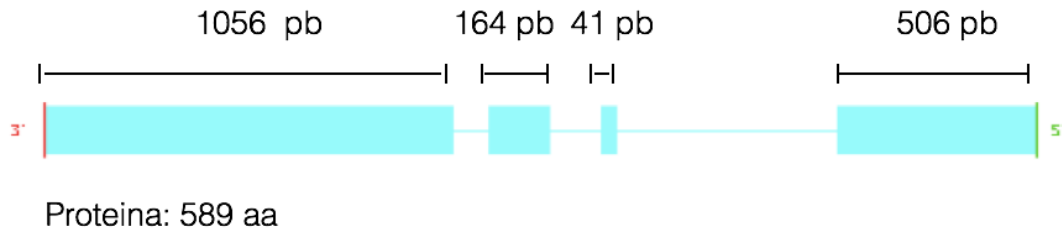
Para relacionar las secuencias de pegado de hnRNPA1 de *Ustilago maydis* encontradas por el programa GeneFinder con hallazgos reportados, se buscaron homólogos en *Ustilago maydis* de genes que se sabe que se regulan mediante la proteína hnRNP A1 y genera isoformas que pueden causar ciertas enfermedades. De esta manera se obtuvieron los resultados mostrados en la tabla 16 en donde podemos ver que existen diferentes genes homólogos en los cuales la secuencia de pegado para la proteína hnRNP A1 está conservada (Tabla 19).

**Tabla 19 Genes de humano que presentan un homólogo en *Ustilago maydis* para los cuales la secuencia de reconocimiento para la proteína hnRNP A1 se encuentra también conservada.**

Gen <i>Homo sapiens</i>	Locus <i>Ustilago maydis</i>	Secuencia
<i>Medium-chain acyl-CoA dehydrogenase (MCAD)</i>	UMAG_01049	CAGGGT
<i>Insulin receptor gene (INSR)</i>	UMAG_02834	AGGGA
<i>Breast cancer 1 (BRCA1)</i>	UMAG_04947	AATAG
<i>Fibroblast growth factor receptor 2 (FGFR2)</i>	UMAG_02244	TAGAGT
<i>Microtubule-associated protein (MAPT)</i>	UMAG_00786	TAAGAAG

### 7.3 Generación de la proteína recombinante hnRNP A1 putativa en *Ustilago maydis*, así como para diferentes versiones truncas de la misma.

Una vez que ya tenemos la secuencia de aminoácidos de la proteína y el análisis *in silico*, procedimos a diseñar los oligonucleótidos iniciadores para la amplificación de diferentes longitudes que codifica para la proteína hnRNP A1 por PCR y después obtener la proteína recombinante. (Figura 38).



**Figura 38. Proteína hnRNP A1 putativa en *Ustilago maydis*.** Esquema en donde se muestran los intrones como líneas y los exones como rectángulos en la parte superior se encuentra señalado la longitud en pb de cada uno de los exones. En la parte de abajo se muestra la longitud de la proteína hnRNP A1 de *Ustilago maydis* (NCBI)

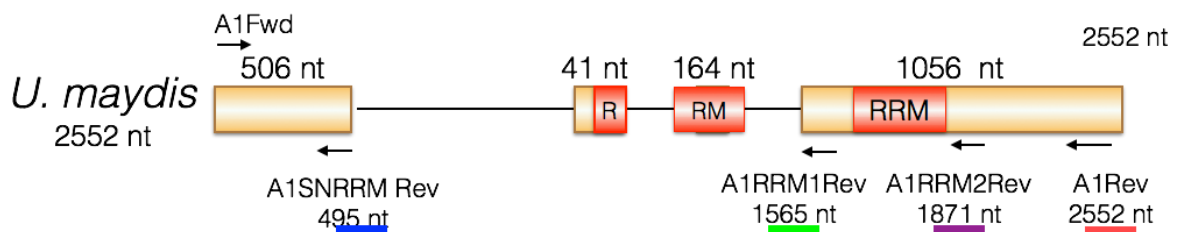
Se diseñaron 4 diferentes oligonucleótidos iniciadores para obtener un fragmento que codifica para la proteína completa y 3 versiones recortadas. (Figura 40).

A1SNRRM: esta secuencia es de 495 nucleótidos y 155 aminoácidos, esta versión se puede obtener a partir de DNA ya que no hay ningún intrón interrumpiéndolo.

A1RRM1: esta secuencia es de 780 nucleótidos y 260 aminoácidos, esta versión se obtendrá a partir de RNA ya que hay un intrón interrumpiéndolo.

A1RRM2: esta secuencia es de 1086 y de 362 aminoácidos, esta versión se obtendrá de RNA así como la anterior.

A1: esta versión es de 1776 nucleótidos y 592 aminoácidos y se obtendrá a partir de RNA como las anteriores



**Figura 39. Estructura de la proteína hnRNP A1 putativa en *Ustilago maydis*.** Se indica la ubicación de los dominios RRM, así como la posición relativa de los oligonucleótidos iniciadores empleados para

la amplificación de los diferentes fragmentos del gen que codifica para la proteína. En la parte de arriba de la secuencia se indica la longitud de cada uno de los exones, así como con una flecha negra en donde inicia el primer oligonucleótido iniciador denominado A1 Fwd. En la parte de abajo de la secuencia se observan con una línea de color azul en donde se encuentra el oligonucleótido iniciador denominado hnRNP A1-SNRMM el cual se usó para la obtención de la versión denominada A1SNRRM de 495 nt de longitud. En color verde se encuentra el oligonucleótido iniciador denominado hnRNP A1-RRM1 el cual se usó para la obtención de la versión denominada A1RRM1 de 1565 nt de longitud si es amplificado a partir de DNA y de 780 nt si es amplificado a partir de RNA. En color morado se encuentra el oligonucleótido iniciador denominado hnRNP A1-RRM2 el cual se usó para la obtención de la versión denominada A1RRM2 de 1871 nt de longitud si es amplificado a partir de DNA y de 1086 nt si es amplificado a partir de RNA. En color rojo se encuentra el oligonucleótido iniciador denominado hnRNP A1 el cual se usó para la obtención de la versión denominada A1 de 2552 nt de longitud si es amplificado de DNA y de 1776 nt si es amplificado de RNA.

Para la obtención de estas proteínas se sintetizaron los *primers* específicos para cada una de estas versiones los cuales se presentan en la tabla 20.

**Tabla 20. Oligos empleados para la amplificación de las diferentes versiones de hnRNP A1 putativa de *Ustilago maydis*.**

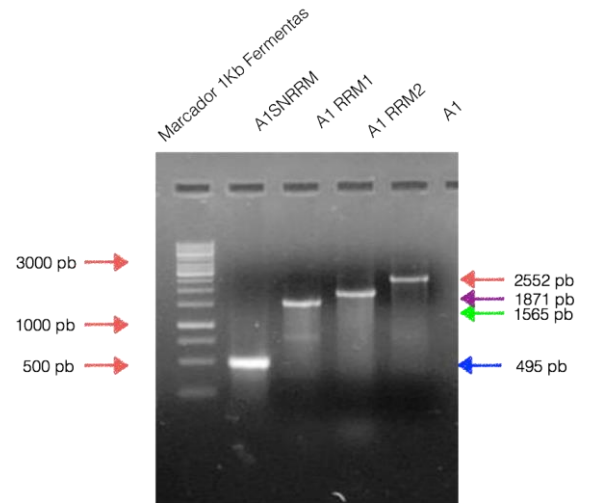
Oligo	Secuencia (5' - 3')	Prod (pb)	Longitud	Tm
hnRNP A1-SNRMM	catttcgtaggcatagcaga	495	21 nt	62 °C
hnRNP A1 RRM1	gtaattggtatggtgtccacca	780	22 nt	62 °C
hnRNPA 1 RMM2	caatgactgcggatc gttctt	1086	21 nt	62°C
hnRNP A1 rev	Tcaatacctgttgcgctgtc	1767	20 nt	60 °C
hn RNP A1 fwd	Atggtaagtcaggaagacac		20 nt	62°C

Para verificar la funcionalidad de nuestros oligos, se hizo una PCR usando como templado ADN genómico, teniendo como resultado las bandas correspondientes al tamaño predicho para cada versión del que codifica para hnRNP A1 (Figura 40).

## PCR

### ADN genómico y los primers para cada versión

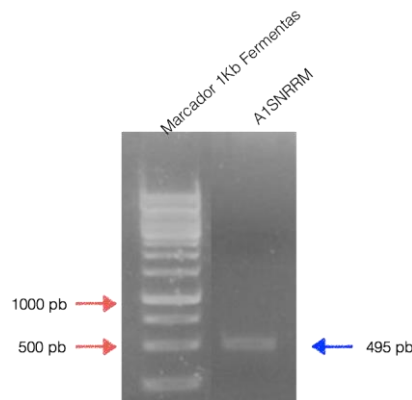
Oligos	pb
A1Fwd- A1SNRRMRev	496 pb
A1 Fwd- A1 RRM1Rev	1565 pb
A1 Fwd- A1 RRM2Rev	1871 pb
A1 Fwd- A1Rev	2552 pb



**Figura 40. Validación de los oligos.** De lado izquierdo se indican los *primers* que se usaron para cada una de las versiones de la proteína así como las longitudes aproximadas para cada uno, en este caso se usó como templado ADN genómico. A la derecha se muestra el gel de la electroforesis con las bandas esperadas para cada una de las versiones amplificadas.

### • Construcción pPROA1SNRR/ DH5 $\alpha$

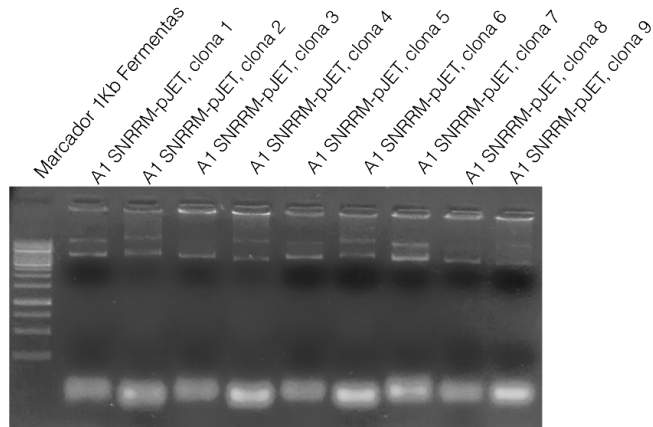
Se llevo a cabo una PCR con el oligo A1Fwd y A1SNRRM1Rev usando como templado el DNA de *Ustilago maydis* (Figura 41).





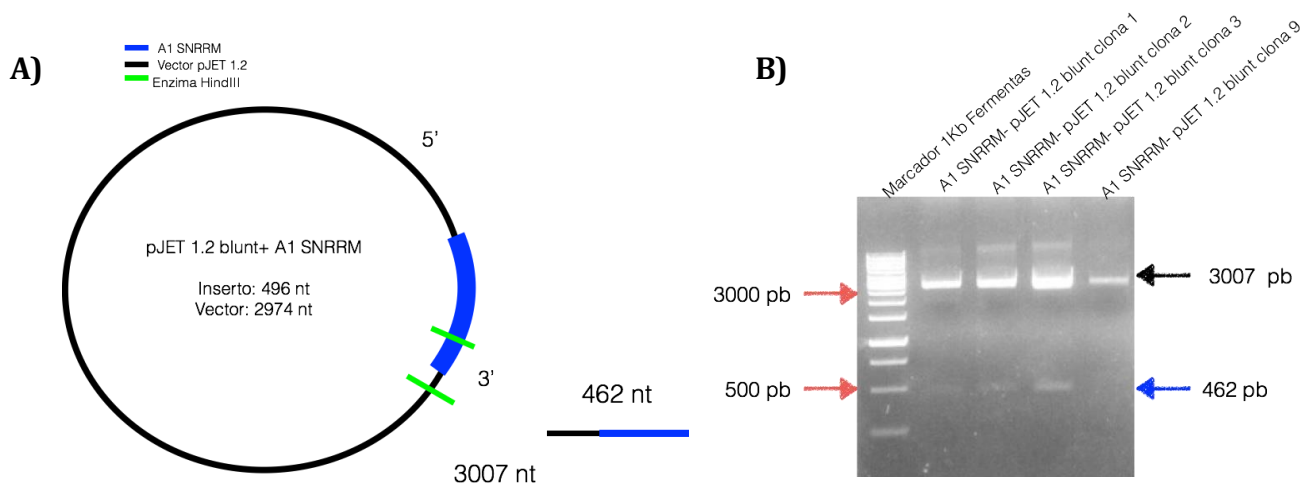
**Figura 41. Amplificación de la versión A1SNRRM.** Se observa una banda única de aproximadamente 495 pb.

Este producto de PCR se clonó en el vector pJET 1.2 blunt el cual nos servirá como reservorio, se llevó a cabo una transformación en células quimiocompetentes de *E. coli*, *DH5α* para posteriormente hacer una extracción de plásmido y seleccionar las clonas posibles. (Figura 42).



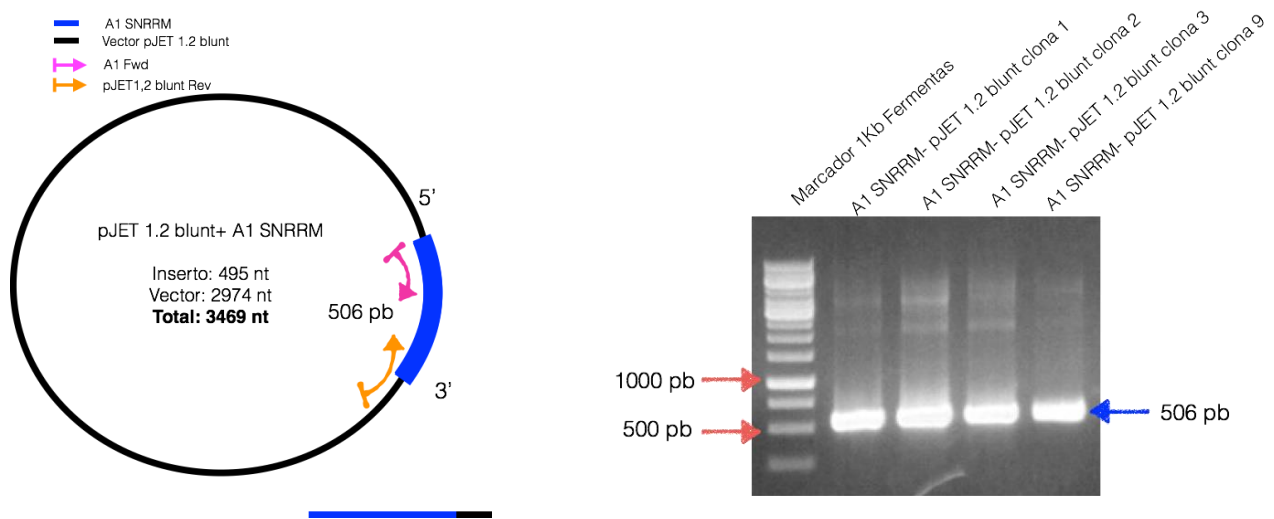
**Figura 42 . Gel de electroforesis de los plasmidos de las clonas pJET-A1SNRRM/DH5α** Electroforesis en donde se pueden observar los plasmidos extraídos de *E. coli* *DH5α* mediante el método de lisis alcalina. Se puede observar en las clonas diferentes bandeos debido a que no todas las clonas tienen el inserto.

Para verificar en que orientación entró el inserto se lleva a cabo un análisis con la enzima de restricción *HindIII*, esta enzima corta tanto en el vector como en el inserto y nos dio como resultado la obtención de cuatro clonas positivas: 1, 2, 3 y 9 (Figura 43)



**Figura 43. Esquema y análisis de restricción de la versión A1SNRRM.** A) Se muestra un esquema del vector (negro) con el inserto A1RRM1 (azul) indicando el sitio de corte para la enzima HindIII (verde). B) Electroforesis en donde se pueden observar dos bandas de aproximadamente 462 pb y 3007 pb.

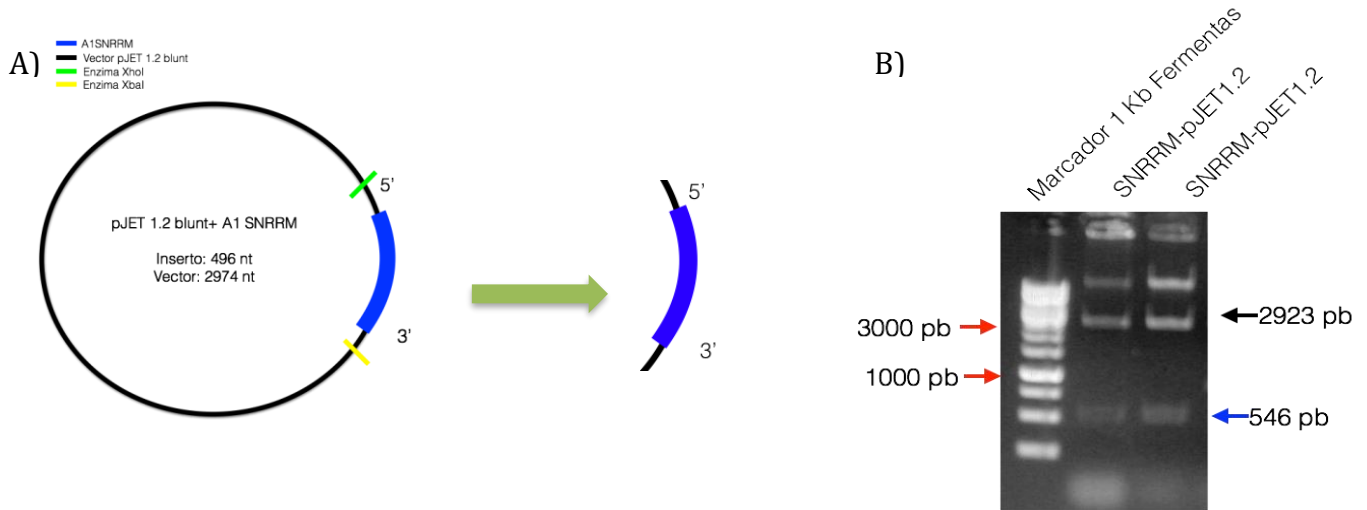
Para corroborar la inserción, se llevó a cabo una PCR con los oligos A1Fwd y pJET1.2 Rev este oligo alinea en el extremo 3' del vector para obtener el fragmento correspondiente SNRMM(Figura 44).



Construcción	A1 fwd 5'-3'	pJET1.2 Rev 5'-3'	Tamaño pb
A1 SNRRM	ATGGCAAGTCAGGAAGACACA	GACGGTACCTTTTAGCTACAAGAA	506

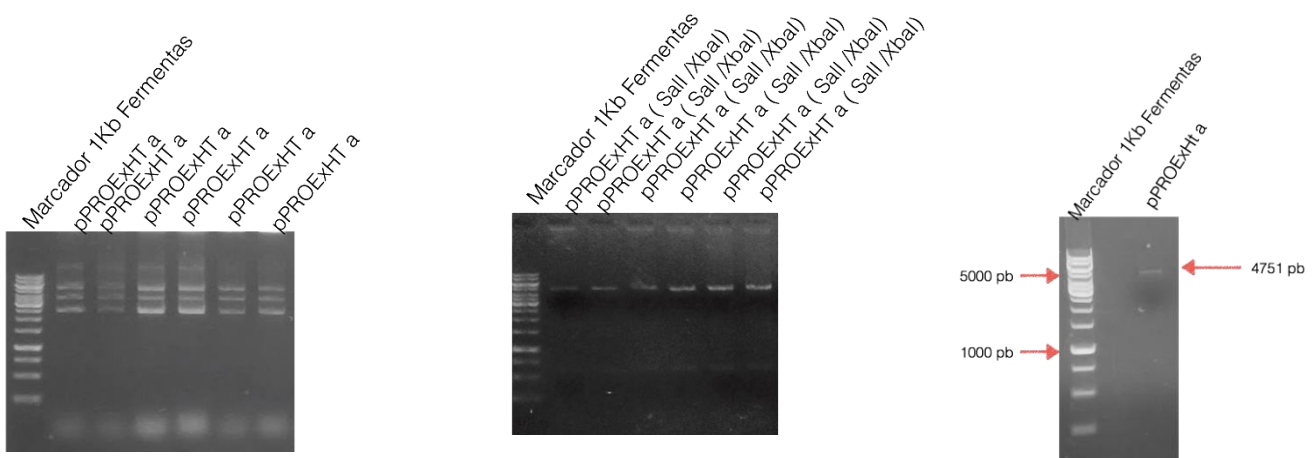
**Figura 44. Esquema y electroforesis de la PCR para confirmar la inserción del inserto en orientación 5'-3'.** A) con flechas se pueden observar los oligos que se usaron para verificar si nuestro inserto esta en el vector B) Electroforesis en donde se observa una banda de aproximadamente 500 pb correspondiente al amplificado de A1SNRRM. En la tabla de abajo se muestra la secuencia de los oligos que se usaron para la amplificación así como el tamaño correspondiente del fragmento amplificado.

Para llevar a cabo la subclonación de este inserto en el vector pPROExHTa se cortó la clona positiva (en este caso se usó la clona 2) con las enzimas *XbaI* y *XhoI* para rescatar el inserto A1SNRRM. La enzima *XhoI* corta en el extremo 5' mientras que la enzima *XbaI* corta en el extremo 3 (Figura 45).



**Figura 45. Esquema y gel de electroforesis del corte con las enzimas XbaI y XhoI.** A) Se muestra el vector (negro), el inserto A1SNRRM (azul) y con color verde en donde corta la enzima XhoI y con amarillo en donde corta la enzima XbaI. B) Gel de electroforesis en donde se observa dos bandas una de aproximadamente 546 pb correspondiente al inserto y otra de aproximadamente 2923 pb correspondiente al vector pJET1.2 blunt

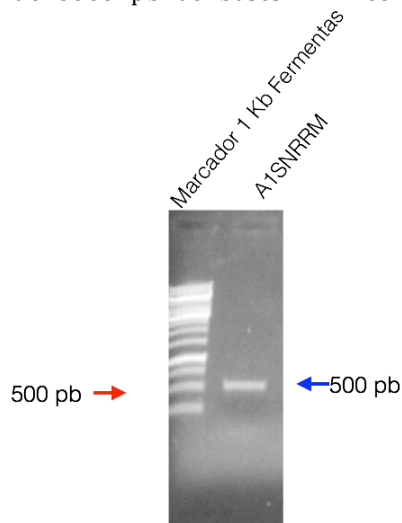
Posteriormente se llevó a cabo la purificación del inserto con el protocolo de glucógeno. De igual manera se cortó el vector pPROExHTa con las enzimas XbaI y Sall y se purificó con el mismo protocolo que el inserto (Figura 46 y 47).



**Figura 46. Electroforesis de la digestión y purificación del vector pPROExHTa.**

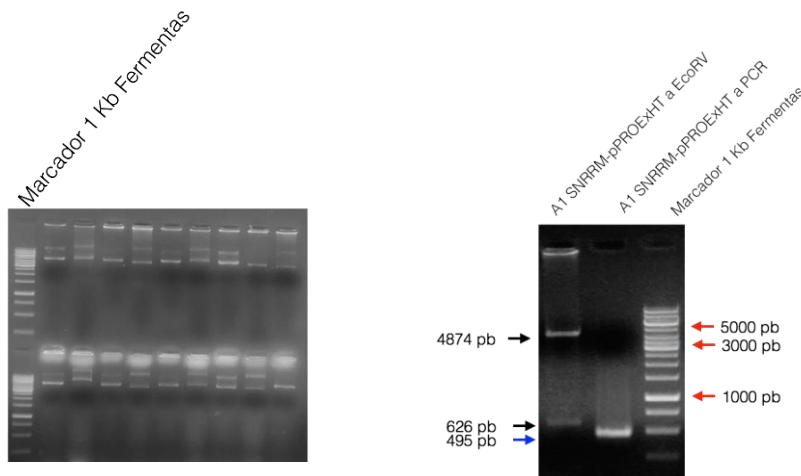
A) Digestión del vector pPROExHTa con las enzimas XbaI y XhoI, en donde se puede observar en el segundo carril el vector sin digerir, mientras que en el carril tres esta el vector en digestión. B) Gel de

electroforesis de la purificación del vector pPROExHTa en donde puede observar una banda aproximada de 5000 pb de bases correspondientes al vector linearizado .



**Figura 47. Electroforesis de la purificación de A1SNRRM.** En el gel se puede observar una banda de aproximadamente 500 pb correspondiente al inserto A1SNRRM purificado

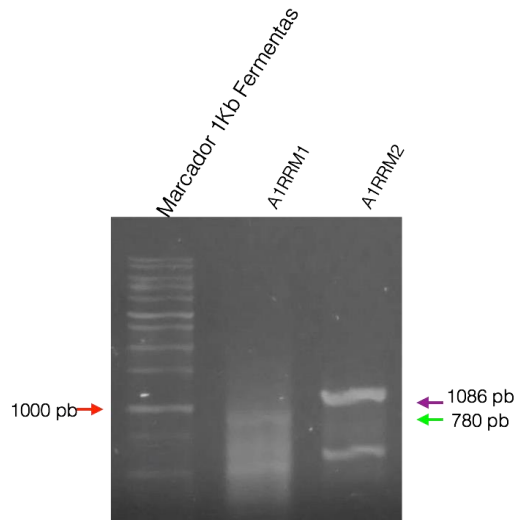
Posteriormente se llevó a cabo la clonación de A1SNRRM en el vector pPROExHTa. Para analizar las clonas obtenidas se hizo el análisis con enzimas de restricción. Primero con la enzima EcoRV se liberó el inserto del vector y nos dio una banda aproximada de 500 pb y después se llevó a cabo una PCR para confirmar que el inserto se encontraba en la orientación correcta (Figura 48).



**Figura 48. Gel de electroforesis de plásmidos de las clonas A1SNRR- pPROExHTa de y para la verificación de las clonas positivas de A1SNRR- pPROExHTa.** A) Plásmidos de las clonas que posiblemente tengan nuestra construcción A1SNRR- pPROExHTa. B) Se hizo el corte con la enzima EcoRV y se obtuvieron dos bandas: una de aproximadamente 4874 pb y otra de 626 pb. También se realizó una PCR para verificar si se encontraba el inserto y se obtuvo una banda de 495 pb.

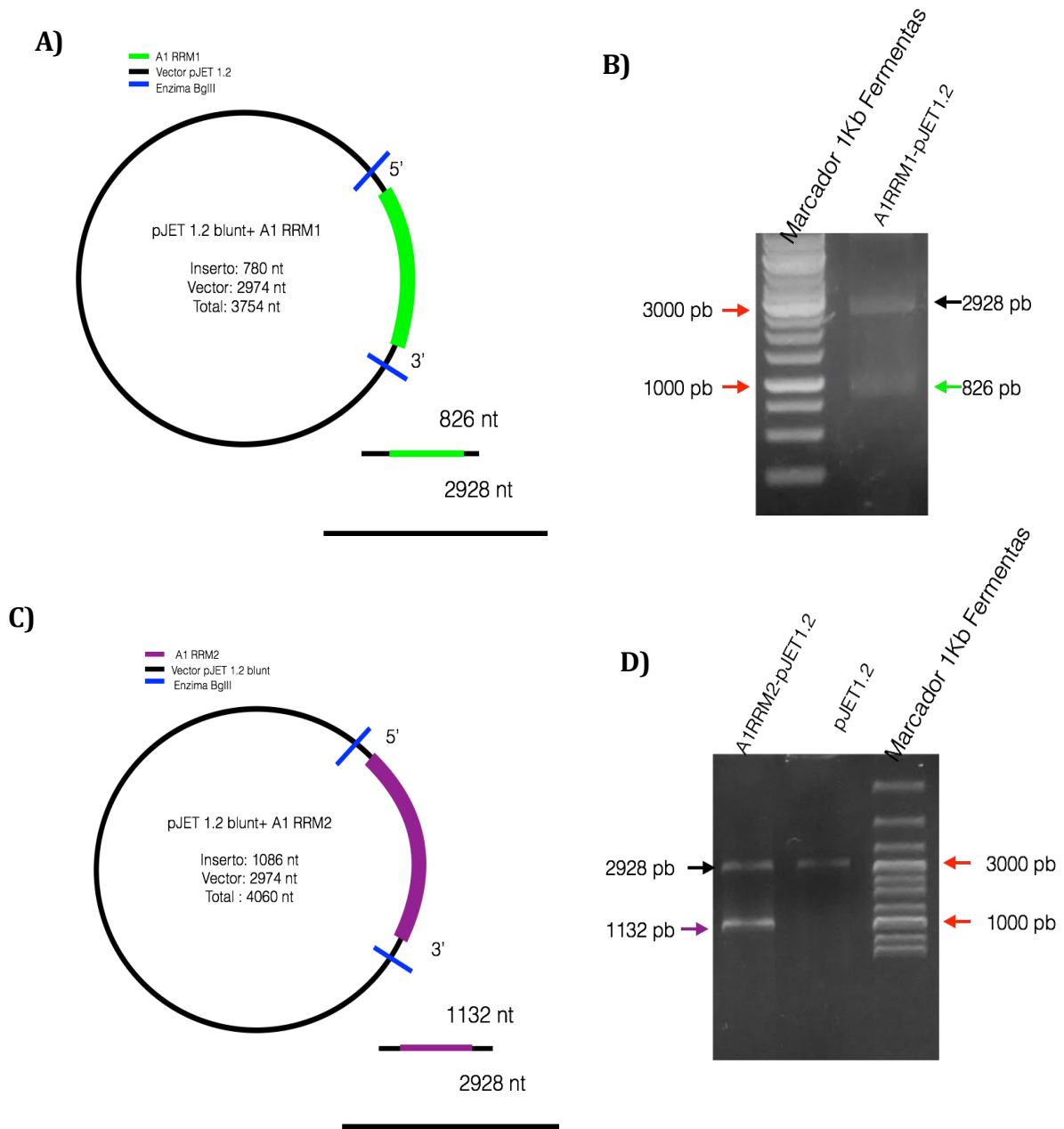
- **Construcción de pPROA1RRM1/DH5 $\alpha$  y de la construcción pPROA1RRM2/DH5 $\alpha$**

Se obtuvo el inserto A1RRM1 y A1RRM2 a partir de cDNA amplificado con los *primers* A1fwd y A1RRM1Rev y A1fwd y A1RRM2Rev (Figura 49).



**Figura 49. Electroforesis de la PCR A1RRM1 y A1RRM2.** Se observa una banda de 780pb correspondiente a la versión A1RRM1 y una bande aproximadamente 1086 pb correspondiente a RRM2

Posteriormente estos insertos se clonaron en el vector pJET 1.2 blunt y para verificar la identidad de las clonas se llevó a cabo el análisis de restricción, usando la enzima BglIII obteniendo tres clonas positivas de pJETA1RRM1/DH5 $\alpha$  (clona 8, 14 y 15) y una clona de pJETA1RRM2/DH5 $\alpha$  (clona 2) (Figura 50).

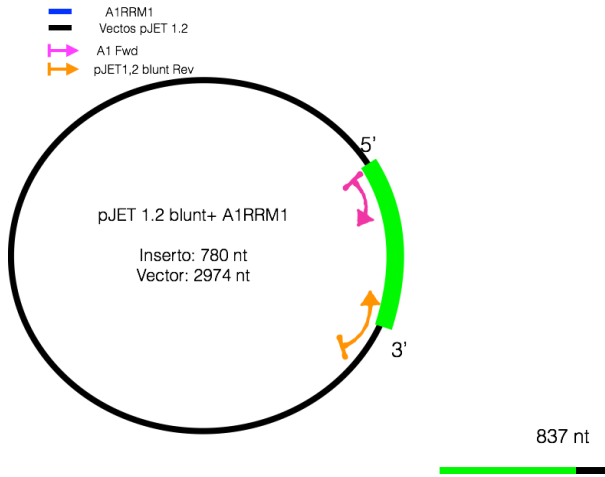


**Figura 50. Esquema y electroforesis del análisis de restricción de la versión A1RRM1 y A1RRM2.** A) Se muestra un esquema del vector (negro) con el inserto A1RRM1 (verde) y marcado el sitio de corte para la enzima BglII (azul). B) Gel de electroforesis en donde se pueden observar dos bandas de 826pb y de 2926pb, respectivamente. C) Esquema del vector (negro) con el inserto A1RRM2 (morado) y marcado el sitio de corte para la enzima BglII (azul). D) Gel de electroforesis en donde se puede observar dos bandas: una de aproximadamente 2928pb y otra de 1132 pb.

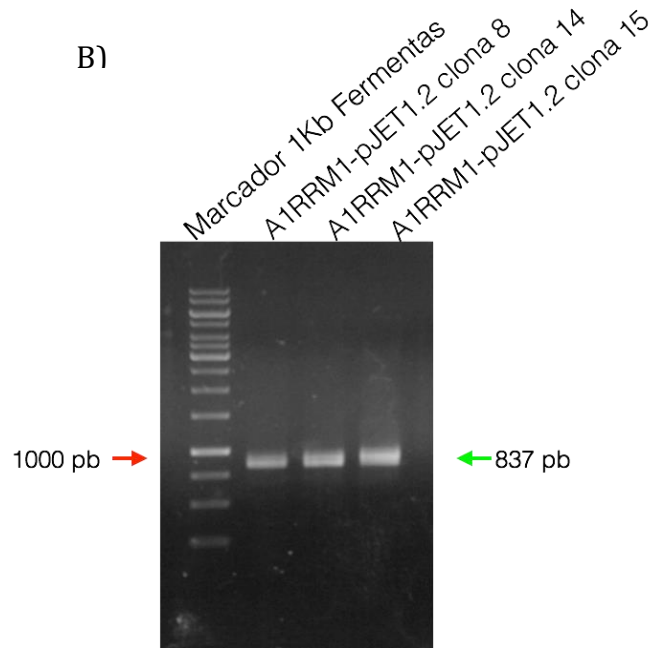
De igual manera, se realizó una PCR para corroborar la clonación del inserto en orientación 5'-3'. Esta se hizo para los plásmidos que nos dieron positivos en el

análisis de restricción con los oligos A1fwd y pJET1.2 Rev para ambas construcciones (Figura 51).

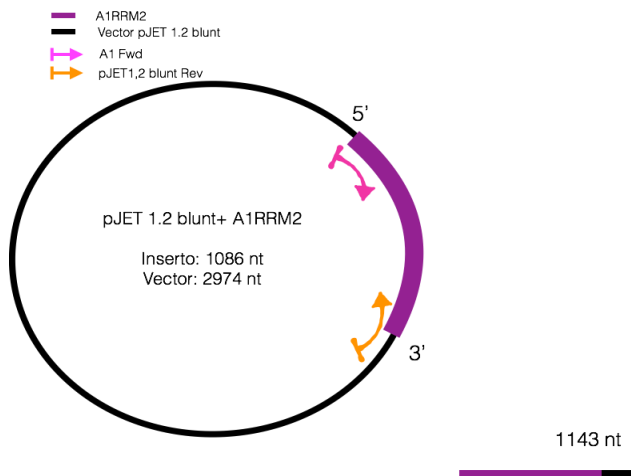
A)



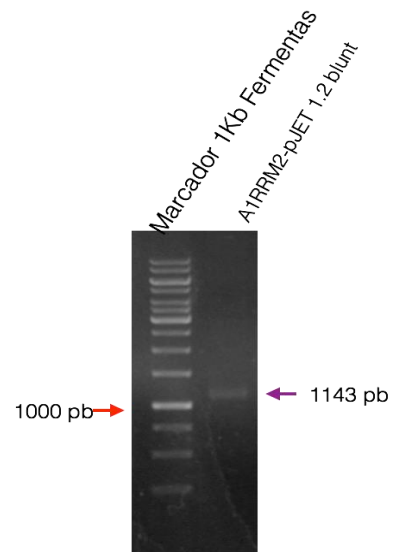
B)



C)

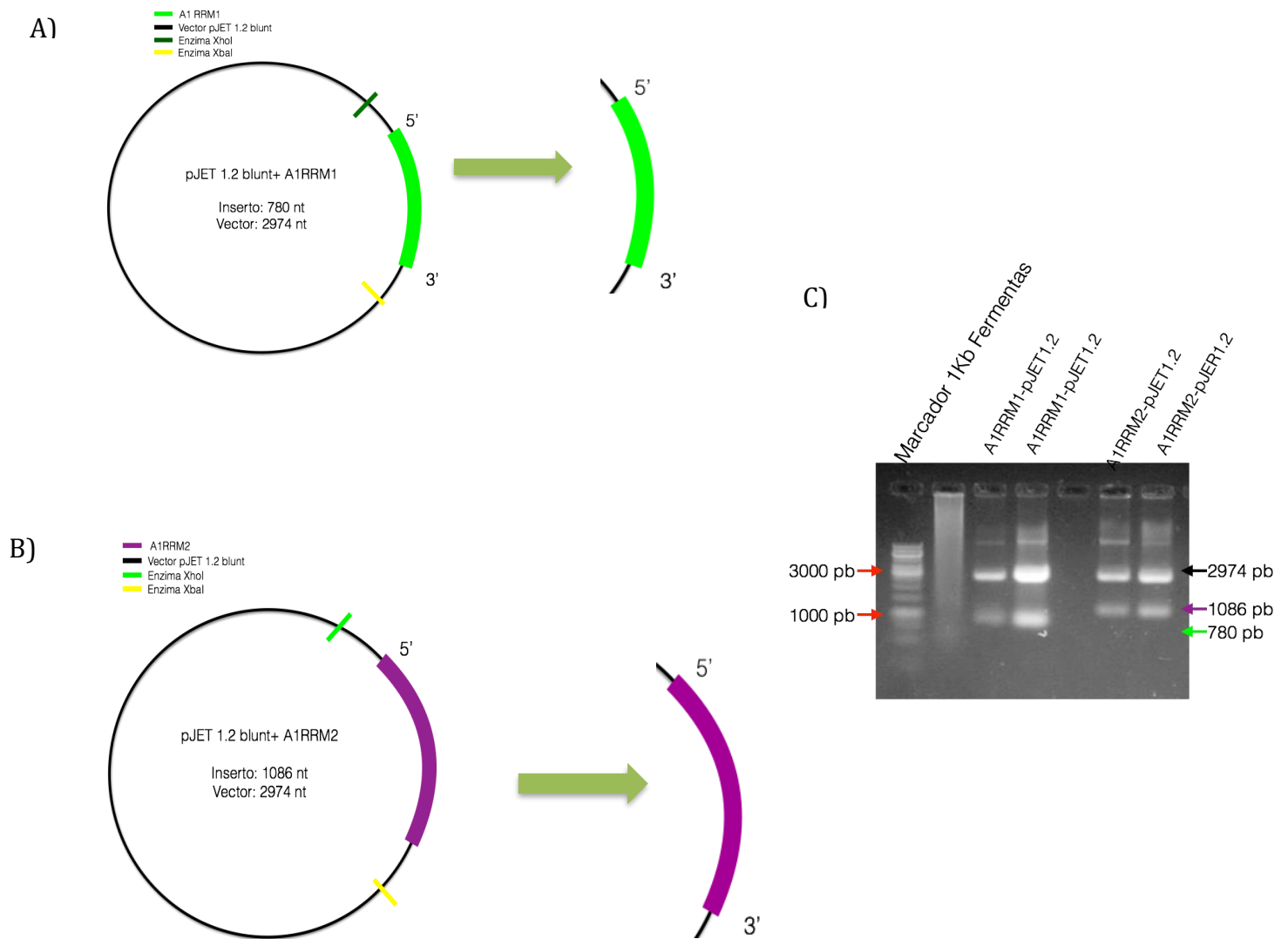


D)



**Figura 51. Esquema y electroforesis de la PCR para confirmar la clonación del inserto en orientación 5'-3' de A1RRM1 y A1RRM2.** A) con flechas se pueden observar los oligos que se usaron para verificar si nuestro inserto se encontraba clonado en el vector B) Electroforesis en donde se observa una banda de 837 pb correspondiente al inserto A1RRM1 C) con flechas se pueden observar los oligos que se usaron para verificar si nuestro inserto se encontraba clonado en el vector B) Electroforesis en donde se observa una banda de 1143 pb correspondiente al inserto A1RRM2.

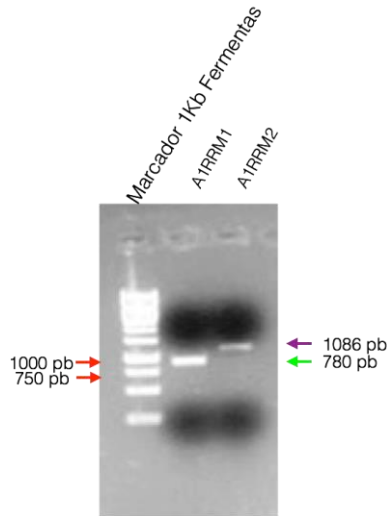
Para realizar la subclonación, primero se hizo una digestión de las clonas positivas de pJETA1RRM1/DH5α Y pJETA1RRM2/DH5α (5'-3') con las enzimas *Xba*I y *Xho*I (Figura 52).



**Figura 52. Esquema y gel de electroforesis del corte con las enzimas XbaI y XhoI de las construcciones pJET A1RRM1/DH5 $\alpha$  y de pJET A1RRM2/ DH5 $\alpha$**  A) se muestra el vector (negro), el inserto A1RRM1 (verde) y con color verde el sitio de corte para la enzima XhoI y con amarillo el corte para la enzima XbaI. B) se muestra el vector (negro), el inserto A1RRM2 (morado) y con color verde el sitio de corte para la enzima XhoI y con amarillo el corte para la enzima XbaI. C) Gel de electroforesis en donde se observan dos bandas: una de aproximadamente 780 pb correspondiente al inserto A1RRM1 y otra de aproximadamente 2974 pb correspondiente al vector pJET 1.2 blunt. Y dos bandas una de 2974 y otra de 1086 correspondiente al inserto A1RRM2

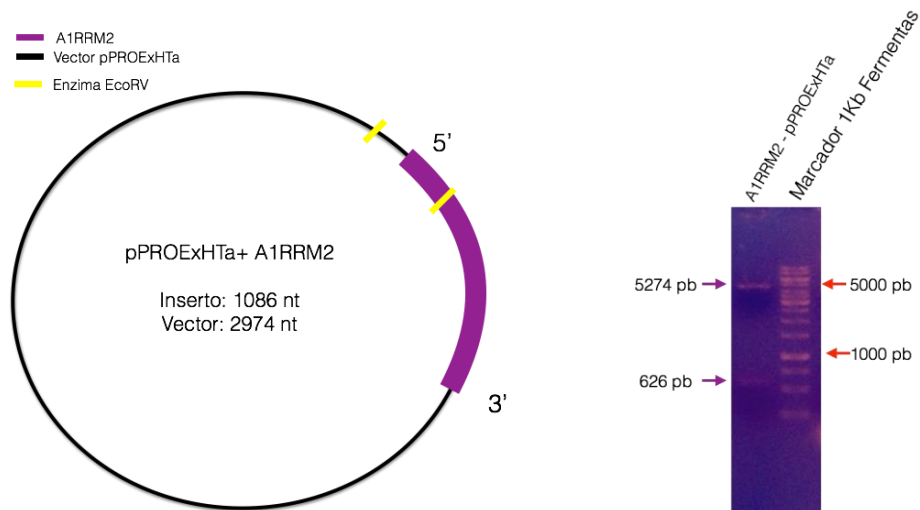
Posteriormente se llevó a cabo la purificación de los insertos A1RRM1 y A1RRM2 mediante la técnica de glucógeno. Una vez que se tenía ya purificado los insertos se realizó la subclonación (Figura 53).





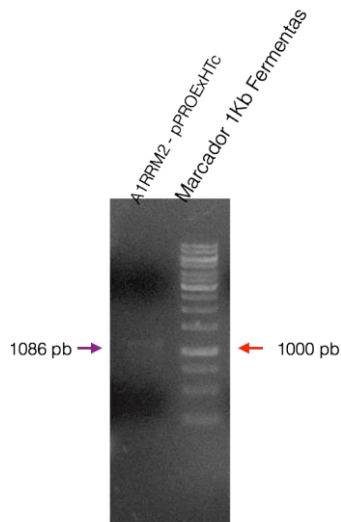
**Figura 53. Gel de electroforesis de la purificación de A1RRM1.** En el gel se puede observar una banda de aproximadamente 780 pb correspondiente al inserto A1RRM1 purificado y a aproximadamente a 1086 correspondiente al inserto RRM2

Una vez ya purificado el inserto se procedió a la subclonación en el vector pPROExHT a también cortado con las enzimas *Sall* y *XbaI* estas se transformaron en *E. coli* DH5  $\alpha$  Las clonas de la construcción pPROA1RRM2/DH5 $\alpha$  obtenidas de se cortaron con la enzima *EcoRV* si se tenían el inserto (Figura 54).



**Figura 54. Esquema de electroforesis de A1RRM2- pPROExHTa cortadas con la enzima EcoRV.** A) se muestra el vector (negro), el inserto A1RRM1 (morado) y con color amarillo el sitio de corte para la enzima EcoRV. B) se muestra el vector (negro), el inserto A1RRM2 (morado) y con color verde el sitio de corte para la enzima XhoI y con color amarillo el corte para la enzima XbaI. En el gel se observan las bandas de 626 pb y 5274 pb las cuales corresponde a la versión orientación 5'-3'.

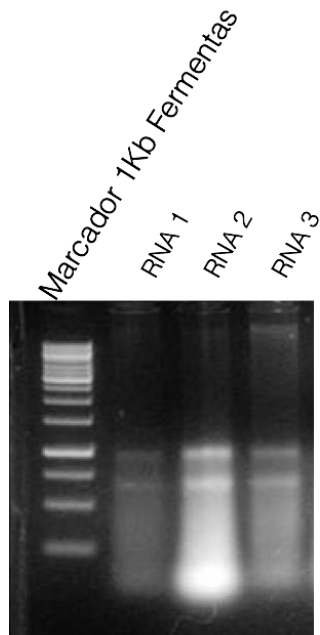
Para corroborar la clonación del inserto en la orientación adecuada, se llevó a cabo una PCR con los oligos A1Fwd y A1RRM2 Rev (Figura 55).



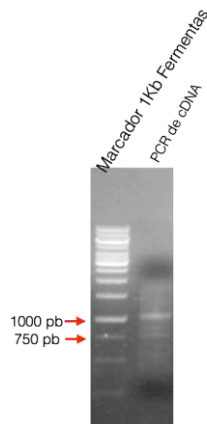
**Figura 55. Amplificación por PCR de A1RRM2 clonado en pPROExHTc.** En el gel se observa la banda de 1086 correspondiente al inserto A1RRM2.

Por otro lado se ha llevado a cabo la extracción del RNA para obtener la construcción de A1 (1776 nt)

Al realizar la amplificación a partir del cDNA se observaron dos bandas, las cuales se obtuvieron de manera reproducible (Figura 56).



**Figura 56. Electroforesis de ARN.** En el gel se observan las bandas correspondientes al ARN para el 28S y el 18S, indicando la integridad de la muestra de ARN.



**Figura 57. Amplificación por PCR a partir de cDNA empleando los oligos A1Fwd y A1Rev.** En el gel se observan tres bandas de aproximadamente 1000 pb , 750 pb y de 500 pb que pudieran corresponder a isoformas de A1 generadas por splicing alternativo.

#### 7.4 Obtención de proteínas recombinantes de hnRNP A1 de *Ustilago maydis*

La obtención de las proteínas recombinantes pPROA1SNRRM y pPROA1RRM2 se hicieron en la cepa *E. coli DH5α*

Para el caso de la inducción se probaron diferentes condiciones de tiempo y concentración de IPTG, para la inducción máxima de ambas proteínas que fue en un tiempo de 24 horas con una concentración de IPTG de 0.6 μM. Debido a que menores tiempo no era posible distinguir la inducción de estas proteínas

Para la inducción de la proteínas recombinantes es necesario saber el peso molecular de cada una de estas. Este peso aproximado se calculó de acuerdo con la siguiente fórmula:

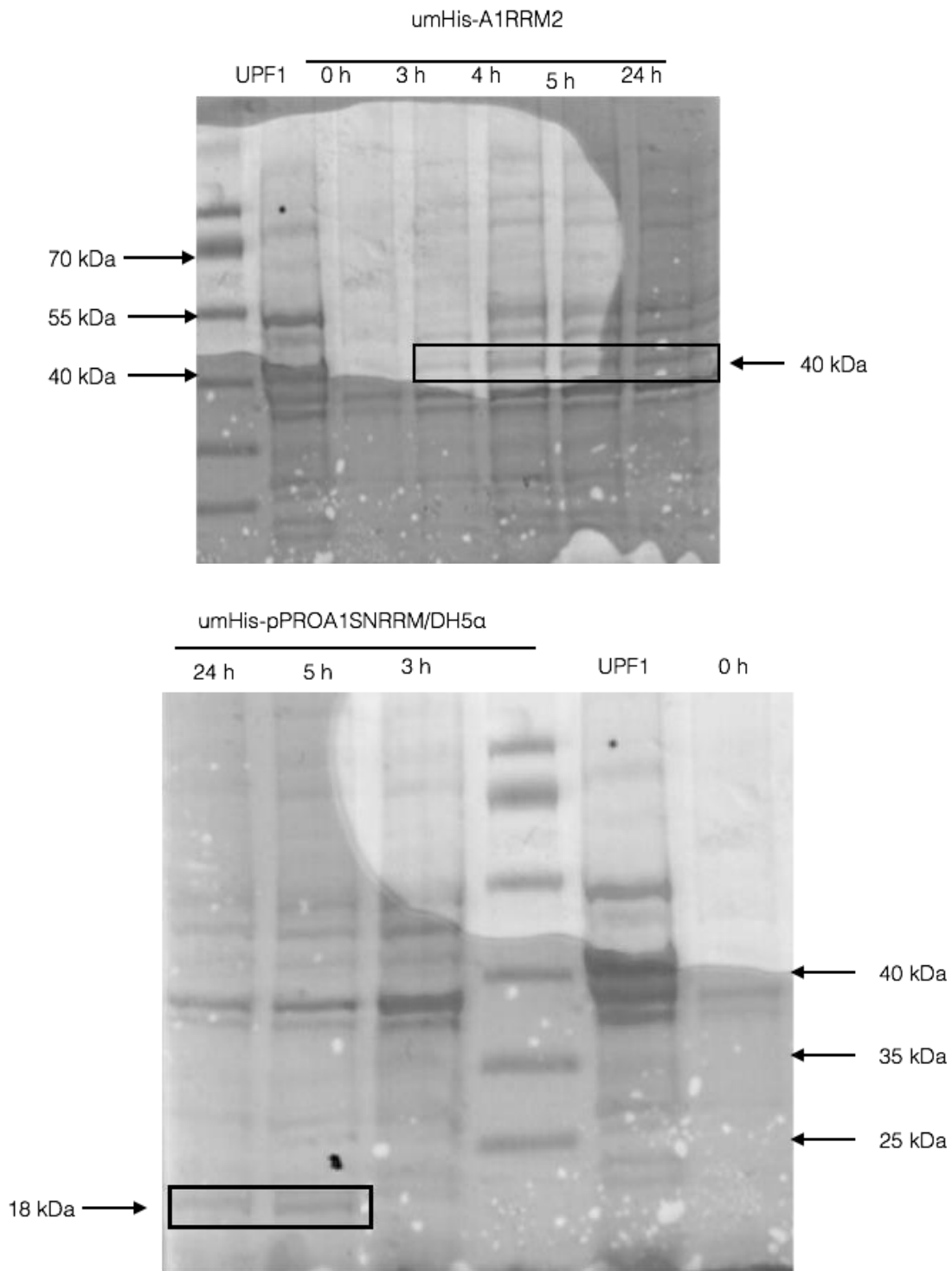
$$\text{No. de aminoácidos} \times 110$$

A el número de aminoácidos de la proteína se le suman 6 aminoácidos mas debido a que el vector pPROExHTa codifica para una cola de 6 Histidinas

**Tabla 21. Pesos moleculares de las proteínas recombinantes**

Proteína recombinante	Pb	a.a	P.M kDa
hnRNP A1SNRRM	495	165+ 6	18.10
hnRNP A1 RRM2	1086	362+6	40.48

Una vez obtenido los rangos de tiempo y concentración se pueden observar en el gel de poliacrilamida al 12% una banda de aproximadamente 40 kDa correspondiente a la proteína hnRNP A1 RMM2 (Figura 62)



**Figura 58. Proteínas truncas recombinantes umHis-pPROA1SNRRM/DH5α y umHis-pPROA1RRM2/DH5α de hnRNP A1 de *Ustilago maydis*.** Se muestra las imagen del gel de poliacrilamida teñidos con azul de Coomasie en donde se verifico la inducción para las proteínas recombinante A) Se observa en el gel una banda aproximadamente de 40 kDa correspondientes a las proteína A1RRM2 B) Se observa una banda aproximadamente a 18 kDa correspondiente a la clona A1SNRRM

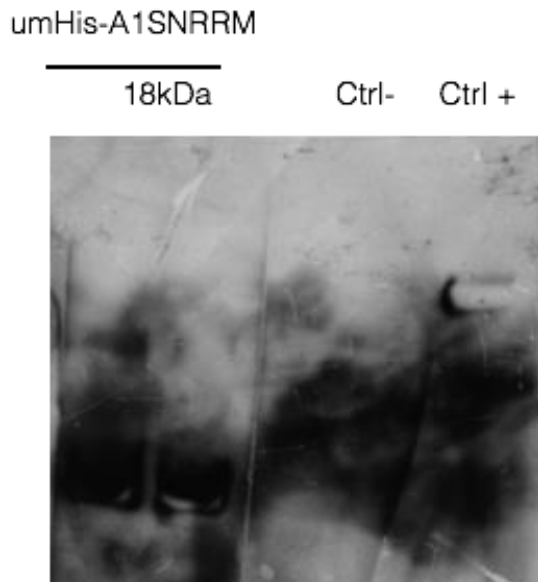
## 7.5 Western- blot

Para comprobar que se tratara de nuestras proteínas recombinantes se realizo el Western blot usando el anticuerpo contra la cola de poli- Histidinas (Figura 63)

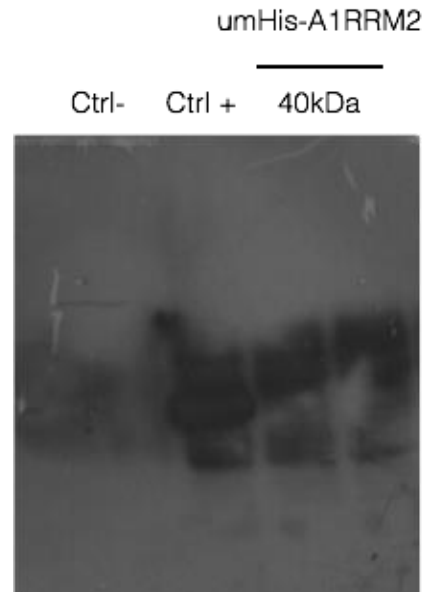
En el cual usamos como control positivo la proteína UPF1 putativa de *Ustilago maydis* realizada en nuestro grupo de trabajo con un peso aproximado de 37 kDa y como control negativo la muestra sin inducir.

Se puede observar las bandas correspondiente a nuestras es umHis-pPROA1SNRRM/DH5 $\alpha$  y umHis-pPROA1RRM2/DH5 $\alpha$  con pesos de aproximadamente 18 kDa y 40 kDa correspondiente.

A)



B)



**Figura 59 . Western blot de las proteínas umHis-pPROA1SNRRM/DH5 $\alpha$  y umHis-pPROA1RRM2/DH5 $\alpha$**  Western blot donde podemos observar que las proteínas recombinantes umHis-pPROA1SNRRM/DH5 $\alpha$  y umHis-pPROA1RRM2/DH5 $\alpha$  son identificadas con el anticupero anti-His (SantaCruz) y usando como control negativo la muestra sin inducir y como control positivo la proteína UPF1 putativa de *Ustilago maydis* A) Western Blot de la proteína umHis-pPROA1SNRRM/DH5 $\alpha$  en donde se observa una banda correspondiente al peso aproximado de 18 kDa. B) Western Blot de la proteína umHis-pPROA1ARRM2/DH5 $\alpha$  en donde se observa una banda correspondiente al peso aproximado a 40 kDA

## 8. Discusión de resultados

Cuando la secuencia del genoma humano fue elaborada y dada a conocer en el 2013, una de las cosas que sorprendió fue la baja cantidad de genes que este tiene (aproximadamente 25 000 genes) . Se sabe que los seres humanos producen alrededor de 90 mil diferentes tipos de proteínas por lo que se estimaba que el numero de genes fuera similar. Debido a la complejidad del ser humano se pensaba que este tuviera mas genes que organismos mas simples. En el 2000 se obtuvo la secuencia del genoma de *Arabidopsis thaliana*, siendo el primer genoma de planta secuenciado, con aproximadamente 25 mil genes, en el 2002 *Caenorhabditis. elegans* fue el primer organismo multicelular cuyo genoma pudo secuenciarse completamente y se descubrió que su genoma posee aproximadamente 19mil 500 genes y ya en el año 2009 con la secuenciación del maíz (*Zea mays*) se identifico que posee 32 mil genes. Cuando se estableció que el genoma humano tenia tan solo 25 mil genes, invalida la idea de que para cada gen una proteína, por lo cual a partir de mecanismos de evolución se pudo aumentar la diversidad de proteínas con menos cantidad de genes y este proceso es explicado como *splicing*.

El *splicing* alternativo es un proceso post-transcripcional que se lleva a cabo generalmente en eucariotes o algunos virus en el cual se genera a partir de un pre-ARNm distintas moléculas de ARNm, y por lo tanto una variedad de proteínas, este fenomeno se lleva acabo cuando se remueven los intrones y ligan los exones. Este mecanismo es importante ya que el 90% de los genes humanos experimentan *splicing* alternativo. Este mecanismo se regula mediante un complejo denominado spliceosoma, y por proteínas silenciadoras (hnRNP) o potenciadoras (SR).

Las proteínas hnRNP son proteínas de gran abundancia y entre las mas importantes se encuentra la proteína hnRNP A1, la cual se une a secuencias silenciadoras llevando a cabo la exclusión ya sea de un intron o de un exón. Esta proteína tiene dominios de union a ARN denominado RRM. Y son importantes debido a la variedad de isoforma que se crean y a que se ha visto que están relacionadas con enfermedades tales como algunos tipos de cáncer.

Además se sabe que el *splicing* alternativo esta relacionado con enfermedades, en el 2008 Christofk y colaboradores, publicaron que el gen que codifica para la piruvato kinasa (PKM) implicado en el mecanismo molecular del efecto de Warburg en el cual las células cancerosas adquieren la capacidad para obtener energía a través de la glicolisis en condiciones aeróbicas, y esto le confiere una mayor capacidad proliferativa. El gen PKM contiene dos exones alternativos que son mutuamente excluyentes, el exón 9 se incluye en las células de tejido adulto, dando lugar a la isoforma PKM1, mientras que el exón 10 se incluye en tejidos embrionarios y en células cancerosas, dando lugar a la isoforma PKM2, la expresión de esta isoforma capacita a las células cancerosas para llevar a cabo glicolisis aeróbica.

## 8.1 Análisis *in silico* de la proteína hnRNP A1 putativa en *Ustilago maydis*

Se realizó la búsqueda del homólogo de la proteína hnRNP A1 de *Homo sapiens* en el genoma de *Ustilago maydis*, el cual nos dio como resultado el gen denominado UMAG\_02420 con una identidad del 34% (Figura 14).

La proteína que codifica este gen UMAG\_02420 es de 588 aminoácidos mientras que la de *Homo sapiens* es de 320 aminoácidos, la diferencia de tamaño no nos puede decir por sí solo si las proteínas tienen o no la misma función, por lo que se procedió a realizar los diferentes alineamientos, modelados tridimensionales así como generar proteínas recombinantes para estudiar las propiedades de dicha proteína.

Para analizar la homología de la proteína de *U. maydis* con aquella de *H. sapiens* se realizaron alineamientos globales y locales, en el caso del alineamiento global se analizaron las secuencias de ambas proteínas y se observó que existen varios aminoácidos conservados en ambos dominios y en la zona rica en glicinas, por lo cual podemos ver que hay una gran similitud entre ambas proteínas (Figura 22).

Posteriormente se hicieron los alineamientos locales de cada uno de los dominios, el análisis de los resultados indica que el dominio RRM1 se encuentra más conservado con una identidad global del 48% mientras que el dominio RRM2 tiene una identidad global del 35% (Figura 23), por lo que como se mencionó en los antecedentes en el 2001 Fiset y Chabot, hicieron versiones truncas de la proteína hnRNP A1 de *Homo sapiens* y mediante experimentos de retardamiento (EMSA) se observó que es esencial el dominio RRM1 para la interacción con el ARN (TTAGGG), por lo cual es importante que este sea el que tenga una mayor homología (Figura 20 y 21).

Al igual se sabe que la proteína hnRNP A1 de *Homo sapiens* tiene una señal de exportación e importación nuclear denominada M9 de la cual se obtuvo la secuencia aminoácida que va del 264 al 305 aa y se llevó a cabo un análisis del alineamiento (Figura 25). En base a lo ya reportado por Michael W.M, 1994 en este trabajo se mutaron algunos aminoácidos de esta secuencia y se llegó a observar que al mutar la Pro275 ya no se llevaba a cabo el proceso de importación y exportación nuclear, se observó que esta Pro546 se encuentra conservada en la proteína hnRNP A1 putativa de *Ustilago maydis*, y podría ser uno de los esenciales para llevar a cabo el proceso de importación y exportación nuclear en nuestro modelo de estudio.

En 1994 Mayeda U. y colaboradores, mutaron las fenilalaninas que se encuentran en la secuencia consenso RNP1 del dominio RRM1 (Phe148 y Phe 150) y del dominio RRM2 (Phe 57 y Phe 59) cuando mutaban solo las fenilalaninas del dominio RRM2 la unión al RNA no se veía afectada, mientras que si se mutaban las del dominio RRM1 la unión con el RNA disminuía. Estas fenilalaninas se encuentran conservadas en el homólogo putativo de hnRNP A1 de *Ustilago maydis* (Phe 212, 214, 321 y 323), por lo que podríamos deducir que esta proteína tiene los aminoácidos esenciales en la secuencia RNP1 del dominio RRM1 para la interacción con el RNA (Figura 27).

En 1997 Xu R.M y colaboradores describieron el cristal de UP1 que es la proteína hnRNP A1 de *Homo sapiens* sin la región rica en glicinas (Figura 26) con el que se realizó un alineamiento con la hnRNP A1 putativa de *Ustilago maydis* y se analizaron los aminoácidos de las secuencias consenso RNP1 y RNP2 que se encuentran en los dominios RRM y que son las que tienen que intervienen en la interacción con el ARN, en ambos dominios estas secuencias se encuentran conservadas y en el caso del que el aminoácido no estuviera conservado, este correspondía al mismo grupo de aminoácidos como por ejemplo la Gly-58 de la secuencia RNP1 del dominio RRM1 de *Homo sapiens*, en *Ustilago maydis* se encuentra una Ala-213, estos dos aminoácidos son no polares, por lo cual no hay un cambio evidente y así sucede con los demás aminoácidos no conservados (Figura 27).

También se describieron los aminoácidos del cristal de UP1 que interactúan con la cadena principal y los que interactúan con la cadena lateral o la columna vertebral del ADN en este caso se usaron 10 repetidos de la secuencia TTAGGG. La mayoría de estos aminoácidos se encuentran conservados y son los que en estudios anteriores han sido mutado y se ha visto cambios en la interacción con el RNA, como es el caso de las Phe de las secuencia consenso RNP1 y estas interactúan con la columna vertebral del ADN. Entre otros aminoácidos que se encuentran conservados encontramos la Phe17 de *Homo sapiens* y Phe172 de *Ustilago maydis* que interactúa con la Adenina-3, o la Arg55 de *Homo sapiens* y la Arg 213 de *Ustilago maydis* que interacciona con la columna vertebral de la Guanina-4 (Figura 27).

Debido a que algunos aminoácidos no se encuentran conservados pero pertenecen al mismo grupo de aminoácidos se realizó el modelado de la proteína homóloga hnRNP A1 de *Ustilago maydis* usando como templado el cristal de UP1 (2up1) para analizar la posición espacial de estos, así como de los aminoácidos que se encontraron que si se conservaban. Al analizar tridimensionalmente los aminoácidos correspondientes a estas secuencias es visible que no hay cambio alguno al contrario hay una gran relación entre ambas proteínas, y por lo ya descrito al igual en 1997, se sabe que la posición de los aminoácidos espacialmente es esencial para la interacción y la conformación de esta. La conformación de la proteína cambia al unirse al ADN y se forma un puente entre ambos dominios RRM en el cual intervienen aminoácidos cargados, y estos se encuentran conservados en el homólogo de *Ustilago maydis* por lo cual también sucede este cambio en la proteína homóloga. Se hizo el modelado de este puente y se observó que se encuentran en el espacio de manera similar, por lo que podrían tener la misma función y la misma actividad (Figura 29-33).

Con el análisis de todos los aminoácidos que intervienen en la interacción con ARN podemos deducir que el homólogo de hnRNP A1 de *Ustilago maydis* conserva todos los aminoácidos importantes para llevar a cabo su función y si no es este el caso son remplazados por aminoácidos similares que no afectarían la orientación espacial así como la capacidad de interacción de la proteína de *Ustilago maydis*.

Se realizaron los interactomas de la proteína hnRNP A1 de *Homo sapiens* y el de la proteína hnRNP A1 putativa de *Ustilago maydis*. con ayuda del programa STRING. En este estudio se analizaron las 10 primeras proteínas con las que tienen contacto cada una de estas proteínas (Figura 34).



En el interactoma para la proteína hnRNP A1 de *Homo sapiens* se encontró que interacciona con otras proteínas hnRNP'S como la C, K D, L y H1, esto se encuentra reportado que las hnRNPs pueden interactuar entre ellas, se observa también la interacción con la proteína SF3A2 la cual es una proteína que pertenece al grupo de las SR y estas compiten por la unión al sitio de empalme.

Ya esta reportado que la proteína hnRNP A1 de *Homo sapiens* sufre de modificaciones postraduccionales entre las que se encuentra la metilación de las argininas que se encuentran cerca del dominio RGG o en este mismo o la fosforilación de los residuos de serina en los dominios RRM y en el dominio rico en glicinas.

En el caso del interactoma de la proteína hnRNP A1 putativa de *Ustilago maydis* (UMAG\_02420) se observo que interacciona con dos homologo de una arginina metiltransferasa UMAG\_05900 con una identidad del 58% y con UMAG\_04375 con una identidad del 36% . En 1997 Kim y cols. analizaron los argininas que sufren de esta modificación y observaron que le metilación de las la Arg205, 2017 y 224 que se encuentran en el dominio rico en glicinas y la dimetilacion de la Arg193 pueden modular la unión a los ácidos nucleicos, cuando las argininas están metiladas disminuye el contacto con el DNA.

También se encontró un homologo para una serina/treonina fosfatasa UMAG\_03030 con una identidad del 86%. En 1995 Idris y cols analizaron los sitios de fosforilación de la proteína hnRNP A1 y se observo que la Ser95, 192 y 199 eran fosforiladas pero la fosforilacion mas abundante es la de la Ser192. En 1995 Municio y cols. demostraron que las serinas se pueden fosforilar tanto in vivo como invitro y que hay residuos en los dominio RRM que también pueden sufrir estas modificaciones. Allemand y cols en 2005 demuestra que si se fosforila una serie de residuos de serina puede reducir la capacidad de interacción de hnRNP A1 con secuencias de RNA así como para regular su localización

Además es importante mencionar que algunos de los aminoácidos que se sabe que sufren de modificaciones postraduccionales ya sea la fosforilación o metilación se encuentran conservados en nuestra proteína hnRNP A1 putativa de *Ustilago maydis*.

La hnRNP A1 putativa de *U. maydis* interacciona también con el homologo de UPF1 UMAG\_11428 con un porcentaje de identidad del 66%, se sabe que a partir del splicing alternativo se pueden generar codones de paro prematuros que son dirigidos hacia el sistema NMD , el cual es un sistema de vigilancia de los mensajeros. La UPF1 es una proteína que forma parte del EJC que interviene en este sistema. En el 2010 McGlincy y cols. estudiaron la isoforma de la proteeina hnRNP 2A/B1, en el cual en presencia de la hnRNP A1 produce la isoforma que contiene un codón de paro prematuro y se lleva al sistema de NMD.

También interacciona con varios homólogos de factores de incisión y poliadenilación tal es el caso de UMAG\_05419 con una identidad del 33%, UMAG\_04944 con una identidad del 32%, UMAG\_02055 con una identidad del 34% y con UMAG: 02281 con una identidad del 68%. Se sabe que para que el transcrito de pre-RNAM salga del núcleo hacia el citoplasma tiene que sufrir de modificaciones tales como la adición de un cap en el 5' y la adición de una cola de poli A en el extremo 3' y el proceso de *splicing*, estos pasos suceden de manera conjunta por lo que es evidente que la proteína hnRNP A1 interacciones con estas proteínas.

En 1997 Izaurre y cols. describen que la proteína hnRNP A1 tiene una señal de exportación denominada M9, la cual le sirve para ir del núcleo hacia el citoplasma y viceversa. Con los resultados arrojados por el STRING podemos observar que nuestra proteína putativa interactúa con la proteína UMAG\_04397 que es un homólogo de una proteína denominada Tranpostin 1 (TRN1) esta proteína es parte de la ruta de importación nuclear denominada no clásica. En conjunto con la hidrólisis de RanGTP, TRN actúa para importar algunas proteínas desde el núcleo hacia el citoplasma. Esta proteína interactúa o se une con las proteínas que tengan la señal de localización M9 (Fridell 1997)

Podemos observar que no solo la proteína hnRNP A1 putativa de *Ustilago maydis*, conserva los aminoácidos esenciales para la interacción con el RNA si no también interactúa con los homólogos de otras proteínas ya reportadas en *Homo sapiens*, las cuales son importantes, ya que tienen que ver con modificaciones traduccionales, la proteína que intervienen con su localización y con proteínas de procesos o sistemas que actúan en conjunto con el *splicing alternativo*

## **8.2 Buscar posibles sitios de regulación mediados por hnRNP A1 en el genoma de *Ustilago maydis*.**

Se realizó una búsqueda bibliográfica de sitios de pegado de hnRNP A1 ya reportados en humano, se usaron ocho secuencias diferentes y se buscaron en todo el genoma de *Ustilago maydis* con ayuda del programa GeneFinder. Mediante este análisis se definió con qué secuencia se trabajaría para realizar los ensayos tipo EMSA y se usará la secuencia TTAGGG.

La secuencia de pegado de la proteína hnRNP A1 con más abundancia en los genes de *Ustilago maydis* fue la AGGGA, esta secuencia se analizó en el 2011 por Talukdar y cols. en el gen para el receptor de insulina (INSR) el cual tiene dos isoformas mediante la retención del intrón 11. Se observó que entre más repetidos de esta secuencia se encontraban se llevaba a cabo la retención de este intrón, por lo que se buscó en los genes de *Ustilago maydis* y de los 2772 genes en los que se encontraba esta secuencia en el 63% de los genes se encontró repetida, En el gen UMAG\_00466 existe un total de 23 repetidos de esta secuencia mientras que hay genes con 2 repetidos o hasta 10.

Analizando las demás secuencias de pegado utilizados en este estudio, se pudo ver que la secuencia AGGGA tiene más genes en los cuales se repite más de una vez esta secuencia.

La secuencia de pegado TTAGGG es la que se usa en la mayoría de los ensayos para analizar la proteína hnRNP A1, por lo que se esperaba que fuera la más abundante, pero esto no fue el caso, ya que solo se encuentra en 182 genes de los cuales 32 genes contienen intrones y exones. Se analizó en donde se encontraba la secuencia de pegado TTAGGG en cada uno de estos 28 genes y en seis casos esta secuencia se encontraba en el extremo 3' del intrón y 5' del exón formando parte del dímero conservado AG, esto podría darnos una idea de que la proteína hnRNP A1 se une a

este sitio y no deja que la maquinaria del splicing se una a este sitio GU, haciendo que se lleve a cabo la retención tanto del intron como del exón.

Fazul y colaboradores en el 2002, analizaron en donde se encontraban estos sitios de pegado de la secuencia TTAGGG y observaron que la secuencia se encontraba en los intrones en el 5' haciendo que la proteína U1 no se pegue y llevando a cabo la retención del intron.

En el caso de los genes que encontramos con esta secuencia, 11 tienen la característica de encontrar esta secuencia en el extremo 5'.

Para la secuencia TAGAGT Bononi cols en el 2013 estudian la isoforma de  $\Delta$ Ron que no contiene el exón 11 que esta ligada a la activación de tumor por el proceso de transición eptelio.mesenquimal (EMT) en este caso el exón tiene la secuencia de pegado en el extremo 5' haciendo que las proteínas SR no se unan y por lo que se lleva a cabo la omisión de este exón. En los genes que obtuvimos con esta secuencia de pagado 42 tuvieron exones e intrones y de estas en 22 genes se encontraron que la secuencia de pegado estaba se encontraba en el extremo 5'.

En cuanto a las otras secuencias de pegado hay pocos estudios y solo se han descrito para genes específicos. Pero podemos observar que la secuencia CCATAA se encuentra en el 11% , CAGGGT en el 41%, TAGGT en el 48%, AATAG en el 40% y TAAGAAG en el 10% del genoma de *Ustilago maydis*

Para confirmar la relevancia de nuestro programa y reafirmar los resultados , se tomaron los genes de *Homo sapiens* a las que se une hnRNP A1 y que ya se tiene reportada a que secuencia se pegan, se buscaron sus homólogos en *Ustilago maydis*, y para posteriormente con ayuda del programa se buscó en cada uno de estos genes la secuencia de pegado ya reportadas, y nos arrojó varios casos en los que si se encontraban estas secuencias en los homólogos de *Ustilago maydis*

También se sabe que hnRNP A1 de *Homo sapiens* tiene una isoforma denominado hnRNP A1B, por lo cual esta se autorregula, ya esta reportada la secuencia a la que se une en este caso, pero en hnRNP A1 putativa de *Ustilago maydis* no se encontró esta secuencia, por lo que se buscaron las secuencias anteriores de la búsqueda que se realizo, en donde se encontraron tres secuencias en este gen, por lo que podríamos pensar que mediante alguna de estas secuencias es a la que se pega hnRNP A1 y se regula.

### **8.3 Generar la proteína recombinante para hnRNP A1 putativa en *Ustilago maydis*, así como para diferentes versiones truncas de la misma.**

Se crearon las diferentes versiones truncas de la proteína hnRNP A1 putativa de *Ustilago maydis* para verificar su funcionalidad con la secuencia de pegado ya reportada TTAGGG,

Se extrajo RNA de *Ustilago maydis* mediante diferentes métodos, obteniendo RNA con mayor concentración y mayor pureza mediante el protocolo de Fenol caliente. Posteriormente con una enzima Multi reverse se sintetizo cDNA para posteriormente llevar a cabo la PCR para cada una de estas versiones bajo las condiciones señaladas en materiales y métodos.

Para la síntesis del cDNA se uso como oligo reverso el mismo de la proteína hnRNP A1 y no el oligo dt debido a que con este ultimo no se obtuvieron amplificadas.

En el caso de la versión SNRRM no hubo problema alguno ya que esta se pudo obtener también de ADN y las condiciones eran muy estables, en el caso de la versión hnRNP A1 no se pudo obtener, ya que siempre salía que se amplificaba mediante PCR se obtenía un fragmento de menor tamaño, Se cambiaron las condiciones de PCR así como los oligos utilizados tanto el Fwd como el Rev, pero en todos los ensayos se obtuvo una banda de aproximadamente 1000 pb, por lo que se podría pensar que debido a que solo la parte funcional para la interacción con el RNA son los dominios RRM y no la parte rica en glicina, el inserto no se realiza completo,

También podría ser que en la extracción de RNA esté se degrada rápidamente y no permite obtener la versión completa.

Mediante PCR usando como templado el RNA se obtuvieron los insertos correspondientes a SNRRM, A1RMM1 Y A1RRM2, las cuales se clonaron en un vector de reservorio llamado JET1.2 blunt, para posteriormente llevar a cabo una subclonación en el vector pPROExHTa el cual es un vector de expresión que tiene el inductor lac y se usa IPTG para su sobreexpresión y una cola de poli histidinas que ayudaran para su posterior purificación.

La subclonación se obtuvo la versión SNRRM y A1RRM2, esta ultima es similar a lo que sería la UP1 por lo cual con esta se puede llevar a cabo los ensayos para ver la interacción con la secuencia TTAGGG.

Al realizar la inducción de estas proteínas debido a que la SNRRM es de 19 kDA aproximadamente es difícil ver la expresión, en el caso de la RRM2 también fue difícil llegar a las condiciones optimas para su inducción,

La sobreexpresión de la proteína se llevo a cabo y para corroborar que eran nuestras proteínas deseadas se llevo a cabo el Western-blot con el cual se observaron las bandas esperadas para cada una de nuestras proteínas. Con esto podemos decir que la sobreexpresión de nuestras proteínas se lleva de manera correcta.

## 9. Conclusiones

- Identificamos el homólogo para la proteína hnRNP A1 de *Homo sapiens* en nuestro modelo de estudio *Ustilago maydis* con el locus UMAG\_02420 y con una identidad del 34%.
- Se analizó mediante un alineamiento local la proteína hnRNP A1 putativa de *U. maydis* con la de *Homo sapiens*, en donde nos arrojó como resultado que se encontraban aminoácidos conservados en los dominios en ambos dominios así como glicina conservadas en el extremo carboxilo termina .
- Los aminoácidos esenciales de la secuencia para la exportación e importación nuclear denominada M9 se encuentran conservados en *Ustilago maydis*
- Se analizaron los dominios RRM1 y RRM2 de *Ustilago maydis* por separado con un alineamiento con los dominios RRM1 y RRM2 de *Homo sapiens*. El dominio RRM1 presenta una identidad global del 48% mientras que el dominio RRM2 tiene el 34% de identidad global. Obteniendo con esto que el dominio RRM1 se encuentra más conservado, y esto se relaciona con lo ya descubierto de que solo se necesita el dominio RRM1 para la interacción con la cadena de RNA
- Los aminoácidos correspondientes a las secuencias consenso RNP1 y RNP2 tanto del dominio RRM1 y RRM2 de *Ustilago maydis* se encuentran conservados y si no es así el caso se encuentran aminoácidos que tienen características similares o que corresponden al mismo grupo de aminoácidos.
- Los aminoácidos que interactúan con el cuerpo de los ácidos nucleicos así como con la columna vertebral de estos se encuentran conservados en *Ustilago maydis*.
- Con ayuda del programa STRING se analizaron las proteínas que interactúan con la proteína putativa de *Ustilago maydis* y se observó que interactúa con homólogos de arginina metiltransferasas, serina/treonina fosfatasa, así como el factor de NMD UPF1 y con la señal de Exportación Transportin1 (TNP01)
- Se obtuvieron las secuencias de pegado de la proteína hnRNP A1 reportadas para *Homo sapiens* en el genoma de *Ustilago maydis* obteniendo con una mayor cantidad de genes la secuencia AGGGA, mientras que la secuencia que se

maneja en los estudios ya reportados que es la secuencia TTAGGG solo se encuentra en 182 genes

- Se encontró la secuencia TTAGGG en los genes de *Ustilago maydis* y en seis casos se encontró que la posición de esta estaba en el extremo 5' como ya se ha reportado anteriormente.
- Se generaron dos proteínas recombinantes en el vector pPROExHTa y se llevó a cabo la inducción de estas así como el Western blot con el anticuerpo anti-His.

### **Perspectivas.**

- Analizar la funcionalidad de las secuencias de pegado de hnRNP A1 putativa de *Ustilago maydis* mediante un ensayo de retardamiento.
- Generar la proteína trunca A1RRM1, así como la proteína de la versión completa de hnRNP A1 putativa de *Ustilago maydis* y analizar su funcionalidad con las secuencias de pegado mediante un ensayo de retardamiento.
- Analizar la autorregulación de la proteína putativa hnRNP A1 de *Ustilago maydis*
- Analizar otras proteínas hnRNP's que son importantes y relevantes en enfermedades tales como el cáncer.

## **Bibliografía**

- Adam SA, Nakagawa TY, Swanson MS, Woodruff T, Dreyfuss G. (1986) mRNA polyadenylate-binding protein: gene isolation and sequencing and identification of a ribonucleoprotein consensus sequence." *Mol. Cell. Biol* 6: 2932-43.
- Aiba, H, Adhya S, Crombrugghe B (1981) Evidence for two *gal* promoters in intact *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 256:11905-11910.
- Allemand E, Guil S, Myers M, Moscat J, Caceres JF, Krainer AR. (2005) Regulation of heterogenous nuclear ribonucleoprotein A1 transport by phosphorylation in cells stressed by osmotic shock. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102: 3605–3610. [SEP]
- Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K. (1994) Current protocols in molecular biology, Current Protocols, p1938
- Banuett FY. (1995) Genetics of *Ustilago maydis* a fungal pathogen that induces tumors in maize. *Annu.Rev.Genetics* 29: 179-208.
- Banuett FY, Herskowitz I. (1996) Discrete developmental stages during teliospore formation in the corn smut fungus, *Ustilago maydis*. *Development* 122: 2965-2976.
- Bekenstein U, Soreq H. (2012) Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 in health and neurodegenerative disease: From structural insights to post-transcriptional regulatory roles. *Mol. Cell. Neurosci* 56: 436-446.
- Berget SM, Moore C, Sharp PA (1977) Splicing segments at the 5' terminus of adenovirus 2 late mRNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 74: 3171-3175.
- Berson A, Barbash S, Shaltiel G, Goll Y, Hanin G, Greenberg DS, Ketzef M, Becker AJ, Friedman A, Soreq H. (2012) Cholinergic-associated loss of hnRNP-A/B in Alzheimer's disease impairs cortical splicing and cognitive function in mice. *EMBO Mol. Med* 4: 730–742.
- Beyer AL, Christensen ME, Walker BW, Lestourgeon WM (1977) Identification and characterization of packaging proteins of core 40S hnRNP particles. *Cell* 11: 127–138.
- Black DL. (2003) Mechanisms of alternative pre-messenger RNA splicing." *Annu Rev Biochem* 72: 291-336.
- Birney E, Kumar S, Krainer AR (1993) Analysis of the RNA-recognition motif and RS and RGG domains - conservation in metazoan pre-messenger-RNA splicing factors. *Nucleic Acids Res* 21: 5803–5816.
- Black DL. (2003) Mechanisms of alternative pre-messenger RNA splicing. *Ann. Rev. Biochem* 72: 291–336.
- Bölker M. (2001) *Ustilago maydis*, a valuable model system for the study of fungal dimorphism and virulence. *Microbiology* 147: 1395-1401.
- Boon L, Grainger RJ, Ehsani P, Barrass JD, Auchynnikava T, Inglehearn CF, Beggs JD. (2007) Prp8 mutations that cause human retinitis pigmentosa lead to a U5 snRNP maturation defect in yeast. *Nat. Struct. Mol. Biol* 14: 1077–1083.
- Bonnal S, Vigevani L, Valcárcel J. (2012) The spliceosome as a target of novel antitumour drugs. *Nat Rev Drug Discov* 11: 847-859.

- Brody E, Abelson J. (1985) The "spliceosome": yeast pre-messenger RNA associates with a 40s complex in a splicing-dependent reaction. *Science* 228: 963-967.
- Caltrider PG, Gottlieb D. (1965) Effect of sugar on germination and metabolism of *Ustilago maydis*. *Phytopathology* 56: 479-484.
- Buxade M, Parra JL, Rousseau S, Shpiro N, Marquez R, Morrice N, Bain J, Espel E, Proud CG. (2005) The Mnks are novel components in the control of TNF alpha biosynthesis and phosphorylate and regulate hnRNP A1. *Immunity* 23: 177-189.
- Campillos M, Lamas JRN, Garcia MA, Bullido MJ, Valdivieso F, Vazquez J. (2003) Specific interaction of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 with the -219T allelic form modulates APOE promoter activity. *Nucleic Acids Res* 31: 3063-3070.
- Cartegni L, Krainer AR. (2002) Disruption of an SF2/ASF-dependent exonic splicing enhancer in causes spinal muscular atrophy in the absence of *SMN1*. *Nat. Genet* 30: 377-384.
- Chai Q, Zheng L, Zhou M, Turchi JJ, Shen BH. (2003) Interaction and stimulation of human FEN-1 nuclease activities by heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 in alpha-segment processing during Okazaki fragment maturation. *Biochemistry* 42: 15045-15052.
- Chen H, Hewison M, Hu B, Adams, JS. (2003) Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein (hnRNP) binding to hormone response elements: A cause of vitamin. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 6109-6114.
- Chow LT, Gelinas RE, Broker TR, Roberts RJ. (1977) An amazing sequence arrangement at the 5' ends of adenovirus 2 messenger RNA. *Cell* 12: 1-8.
- Christofk HR, Vander Heiden MG, Harris MH, Ramanathan A, Gerszten RE, Wei R, Fleming MD, Schreiber SL, Cantley LC. (2008) The M2 splice isoform of pyruvate kinase is important for cancer metabolism and tumour growth. *Nature* 452: 230-233.
- Darnell JE, Philipson L, Wall R, Adesnik M. (1971) Polyadenylic acid sequence: role in conversion of nuclear RNA into Messenger RNA. *Science* 174: 507-510.
- David CJ, Manley JL. (2010) Alternative pre-mRNA splicing regulation in cancer: pathways and programs unhinged. *Genes Dev* 24: 2343-2364.
- Ding J, Hayashi MK, Zhang Y, Manche L, Krainer AR, Xu RM. (1999) Crystal structure of the two-RRM domain of hnRNP A1 (UP1) complexed with single-stranded telomeric DNA. *Genes Dev* 12: 1102-1115.
- Ding W, Lin L, Ren F, Zou H, Duan Z, Dai J. (2009) Effects of splice sites on the intron retention in histamine H3 receptors from rats and mice. *J Genetics Genomics* 36: 475-482.
- Donev R, Newall A, Thome J, Sheer D. (2007) A role for SC35 and hnRNP A1 in the determination of amyloid precursor protein isoforms. *Mol. Psychiatr* 12: 681-690.



- Dreyfuss G, Swanson MS, Piñol-Roma S. (1988) Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein particles and the pathway of mRNA formation. *Trends Biochem. Sci* 13: 86-91.
- Dreyfuss, G, Matunis, MJ, Piñol-Roma S, Burd CG. (1993) hnRNP proteins and the biogenesis of messenger-RNA. *Annu. Rev. Biochem* 62: 289–321.
- Eran M, Misteli T. (2005) Splicing Misplaced.” *Cell* 122: 317-318.
- Fiset S, Chabot B. (2001) hnRNP A1 may interact simultaneously with telomeric DNA and the human telomerase RNA *in vitro* . *Nucleic Acids Res* 29: 2268-2275.
- Ford LP, Wright WE, Shay JW. (2002) A model for heterogeneous nuclear ribonucleoproteins in telomere and telomerase regulation. *Oncogene* 21: 580–583.
- Galante P, Sakabe N, Kirschbaum-Slager N, Souza S. (2004) Detection and evaluation of intron retention events in the human transcriptome. *RNA* 10: 757–765.
- Gonzalo MA, Ribes MA (2011) Dos especies del genero *Ustilago* de la provincia de Guadalajara (España). *Boletín Micológico de FAMCA* 6: 97-100.
- Goren A, Ram O, Amit M, Keren H, Lev-Maor G, Vig I, Pupko T, Ast G. (2006) Comparative Analysis Identifies Exonic Splicing Regulatory Sequences—The Complex Definition of Enhancers and Silencers. *Molecular Cell* 22: 769–781.
- Gorlach M, Burd CG, Portman DS, Dreyfuss G. (1993) The hnRNP proteins. *Mol. Biol. Rep* 18: 73–78.
- Green MR, Sambrook J (2012) *Molecular Cloning: a Laboratory Manual* . Fourth Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Guil S, Long JC, Caceres, JF. (2006) hnRNP A1 relocalization to the stress granules reflects a role in the stress response. *Mol. Cell. Biol* 26: 5744–5758.
- Guil S, Caceres JF. (2007) The multifunctional RNA-binding protein hnRNP A1 is required for processing of miR-18a. *Nat. Struct. Mol. Biol* 14: 591–596.
- Guo R, Li Y, Ning J, Sun D, Lin L, Liu X. (2013) HnRNP A1/A2 and SF2/ASF regulate alternative splicing of *interferon regulatory factor-3* and affect immunomodulatory functions in human non-small cell lung cancer cells. *PLoS One* 8: e62729.
- Hang SP, Tang YH, Smith R. (2010) Functional diversity of the hnRNPs: past, present and perspectives. *Biochem. J* 430: 379-392.
- Hastings ML, Krainer AR. (2001) Pre-mRNA splicing in the new millennium.” *Curr Opin Cell Biol* 13: 302-309.
- Hoffman DW, Query CC, Golden BL, White SW, Keene JD. (1991) RNA-binding domain of the A protein component of the U1 small nuclear ribonucleoprotein analyzed by NMR-spectroscopy is structurally similar to ribosomal-proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci* 88: 2495–2499.
- Holliday R. (2004) Early studies on recombination and DNA repair in *Ustilago maydis*. *DNA Repair (Amst.)* 3: 671-682.
- Jacques JP, Sean P, Massimo C. (2003) hnRNP A1: The swiss army knife of gene expression. *Int. J. Mol. Sci* 14: 18999-19042.

- Jean-Philippe J, Paz S, Lu ML, Caputi M. (2014) A truncated hnRNP A1 isoform, lacking the RGG-box RNA binding domain, can efficiently regulate HIV-1 splicing and replication. *Biochim Biophys Acta* 1939: 251-258.
- Jiménez-García LF, Lara-Martínez R, Gil-Chavarría I, Zamora-Cura AL, Salcedo-Álvarez M, Agredano-Moreno LT, Moncayo Sahagún JJ, Segura-Valdez ML. (2007) *Biología Celular del Splicing.* Mensaje Bioquímico XXXI: 141-156.
- Jurica MS, Licklider LJ, Gygi SR, Grigorieff N, Moore M.J. (2002) Purification and characterization of native spliceosomes suitable for three-dimensional structural analysis. *RNA* 8: 426-439.
- Kim HJ, Kim NC, Wang YD, Scarborough EA, Moore J, Diaz Z., MacLea KS, Freibaum B, Li S, Mollie A. (2013) Mutations in prion-like domains in *hnRNPA2B1* and *hnRNP A1* cause multisystem proteinopathy and ALS. *Nature* 495: 467-473.
- Kim S, Merrill BM, Rajpurohit R, Kumar A, Stone KL, Papov VV, Schneiders JM, Sizer W, Wilson SH, Paik WK. (1997) Identification of N(G)-methylarginine residues in human heterogeneous RNP protein A1: Phe/Gly-Gly-Gly-Arg-Gly-Gly-Gly/Phe is a preferred recognition motif. *Biochemistry* 36: 5185-5192.
- Klosterman SJ. (2007) Genetics of Morphogenesis and Pathogenic Development of *Ustilago maydis*. *Advances in Genetics* 57: 1-24.
- Koren E, Lev-Maor G, Ast G. (2007) The Emergence of Alternative 3' and 5' Splice Site Exons from Constitutive Exons. *PLoS Computational Biology* 3: e95.
- Kornblihtt AR, Schor IE, Alló M., Dujardin G., Petrillo E., Muñoz M.J. (2013) Alternative splicing: a pivotal step between eukaryotic transcription and translation. *Nature Rev Mol Cell Biol* 14: 153-165.
- Krecic AM, Swanson MS (1999) hnRNP complexes: Composition, structure, and function. *Curr. Opin. Cell Biol.* 11 :363-371
- LaBranche H., Dupuis S., Ben-David Y., Bani M. R., Wellinger R. J., Chabot B. "Telomere elongation by hnRNP A1 and a derivative that interacts with telomeric repeats and telomerase." *Nat. Gen.*, vol. 19, pp 199-202, 1998.
- Li S, Wang W., Ding H, Xu H, Zhao Q, Li J, Li H, Xia W, Su X, Chen Y. (2012) Aptamer BC15 against heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 has potential value in diagnosis and therapy of hepatocarcinoma. *Nucleic Acid Ther* 22: 391-398.
- Lodish H, Berk A, Matsudaira P, Kaiser CA, Krieger M, Scott MP, Zipusky SL, Darnell J. (2005) *Biología Celular y Molecular*. Editorial Medica Panamericana, 5ta Edit: 4
- Martínez-Contreras R, Cloutier P, Shkreta L, Fiset JF, Revil T, Chabot B. (2007) hnRNP proteins and splicing control. *Adv. Exp. Med. Biol* 623: 123-147.
- Martínez-Espinoza, AD, García-Pedrejas MD, Gold SE. (2002) The Ustilaginales as Plant pests and Model Systems. *Fungal Genetics and Biology* 35: 1-20.
- Martínez-Montiel N, Rosas-Murrieta N, Martínez-Contreras R. (2015) Regulación del splicing alternativo implicaciones en el diagnóstico del tratamiento del cáncer. *Medicina clínica* 144: 317-323.

- Mayeda A, Krainer AR. (1992) Regulation of alternative pre-mRNA splicing by hnRNP A1 and splicing factor SF2. *Cell* 68: 365–375.
- Michael WM, Choi M, Dreyfuss G. (1993) A nuclear export signal in hnRNP A1: A signal- mediates, temperature-dependent nuclear protein export pathway *Cell* 83: 415-422.
- Münsterkötter M, Steinberg, G. (2007) The fungus *Ustilago maydis* share disease-related proteins that are not found in *Saccharomyces cerevisiae*. *BMC Genomics*, 8: 1-10..
- Municio MM, Lozano J, Sanchez P, Moscat J, Diaz-Meco MT. (1995) Identification of heterogeneous ribonucleoprotein A1 as a novel substrate for protein kinase C zeta. *J. Biol. Chem.* 270: 15884–15891. [SEP]
- Nilsen TW, Graveley BR. (2010) Expansion of the eukaryotic proteome by alternative splicing. *Nature* 463: 457-463.
- Okunola HL, Krainer AR. (2009) Cooperative-Binding and splicing-repressive properties of hnRNP A1. *Mol. Cell. Biol* 29: 5620–5631.
- Ouyang P. (2009) SRrp37, a Novel Splicing Regulator Located in the Nuclear Speckles and Nucleoli, Interacts With SC35 and Modulates Alternative Pre-mRNA Splicing In Vivo. *J Cell Biochem* 108: 304–314.
- Pan Q, Saltzman AL, Kim YK, Misquitta C, Shai , Maquat LE, Frey BJ, Blencowe BJ. (2006) Quantitative microarray profiling provides evidence against widespread coupling of alternative splicing with nonsense-mediated mRNA decay to control gene expression. *Genes Dev* 20: 153–158.
- Piñol-Roma S, Choi Y.D., Matunis M.J. (1988) Immunopurification of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein particles reveals an assortment of RNA-binding proteins. *Genes Dev* 2: 215-227.
- Piñol-Roma S, Dreyfuss G. (1992) Shuttling of pre-mRNA binding proteins between nucleus and cytoplasm. *Nature* 355: 730–732.
- Reed R. (2000) Mechanisms of fidelity in pre-mRNA splicing. *Curr Opin Cell Biol* 12: 340-345. [SEP]
- Rooke N, Markovtsov V, Cagavi E, Black DL. (2003) Roles for SR proteins and hnRNP A1 in the regulation of *c-src* exon N1. *Mol.Celda. Biol* 23: 1874–1884.
- Ruíz-Herrera J, Martínez-Espinoza AD. (1998) The fungus *Ustilago maydis*, from the aztec cuisine to the research laboratory. *International Microbiology* 1: 149-158.
- Ruiz-Herrera J. (2008) *Ustilago maydis*: ascenso de un hongo mexicano de la gastronomía local al mundo científico. *Revista Electronica Nova Scientia*, 1: 118-135.
- Sambrook J, Russel DW. (1989) *Molecular Cloning: a Laboratory Manual* Second Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press
- Scherrer K, Darnell JE. (1962) Sedimentation characteristics of rapidly labeled RNA from HeLa cells. *Biochem Biophys Res Commun* 7: 486–490.
- Shamo Y, Krueger U, Rice LM, Williams KR, Steitz TA. (1997) Crystal structure of the two RNA binding domains of human hnRNP A1 at 1.75 Å resolution. *Nat Struct Biol* 4 : 215–222.
- Shatkin A. J. (1976) Capping of eucaryotic mRNAs. *Cell* 9: 645–653.

- Siomi H, Dreyfus G. (1995) A nuclear localization domain in the hnRNP A1 protein. *JBC* 129: 551-560..
- Sun Q, Hampson RK, Rottman FM. (1993) *In vitro* analysis of bovine growth hormone pre-messenger RNA alternative splicing-involvement of exon sequences and trans-acting factor(s). *J. Biol.Chem* 268: 15659–15666.
- Tavanez JP, Madl T, Kooshapur H, Sattler M, Valcarcel J. (2012) hnRNP A1 proofreads 3' splice site recognition by U2AF. *Mol. Cell* 45: 314–329.
- Tejedor JR, Papasaikas P, Valcárcel J. (2015) Genome-wide identification of Fas/CD95 alternative splicing regulators reveals links with iron homeostasis. *Molecular Cell* 57: 23-38.
- Van Eekelen, CA, Riemen, T, Van Venrooij, WJ. (1981) Specificity in the interaction of heterogeneous nuclear RNA and messenger RNA with proteins as revealed by in-vivo cross linking. *FEBS Lett*, 130: 223–226.
- Valpuesta JM. (2008) A la búsqueda del secreto de la vida. Una breve historia de la Biología Molecular . *Editorial Helice* 223.
- Varcárcel J. (2003) Splicing alternativo y enfermedad. Instituto Roche.
- Vithana EN, Abu-Safieh L, Allen MJ, Carey A, Papaioannou M, Chakarova C, Al-Magthteh M, Ebenezer ND, Willis C, Moore AT, Bird AC, Hunt DM, Bhattacharya SS. (2001) A human homolog of yeast pre-mRNA splicing gene, PRP31, underlies autosomal dominant retinitis pigmentosa on chromosome 19q13.4 (RP11). *Mol. Cell* 8: 375–381.
- Wang ET, Sandberg R, Luo S, Khrebtkova I, Zhang L, Mayr C, Kingsmore SF, Schroth GP, Burge CB. (2008) Alternative isoform regulation in human tissue transcriptomes. *Nature* 456: 470–476.
- Xu RM, Jokhan L, Cheng X, Mayeda A, Krainer AR. (1997) Crystal structure of human UP1, the domain of hnRNP A1 that contains two RNA-recognition motifs. *Structure* 5: 559–570.
- Zahler AM, Damgaard C.K, Kjems J, Caputi M. (2004) SC35 and heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A/B proteins bind to a juxtaposed exonic splicing enhancer/exonic splicing silencer element to regulate HIV-1 tat exon 2 splicing. *J. Biol. Chem* 279: 10077–10084.
- Zhou ZJ, Dai Z, Zhou SL, Fu XT, Zhao YM, Shi YH, Zhou J, Fan J. (2012) Overexpression of HnRNP A1 promotes tumor invasion through regulating CD44v6 and indicates poor prognosis for hepatocellular carcinoma. *Int. J. Cancer* 132: 1080–1089.
- Zhou Z, Licklider LJ, Gygi SP, Reed R. (2002) Comprehensive proteomic analysis of the human spliceosome. *Nature* 419: 182–185.

