



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

**Secretaría de Investigación y Posgrado
ESCUELA NACIONAL DE CIENCIAS
BIOLÓGICAS**

**Sección de Estudios de Posgrado e Investigación
Posgrado en Ciencias Quimicobiológicas**

Estudios bioquímicos y moleculares de las
proteasas vacuolares del hongo fitopatógeno
Ustilago maydis

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS
QUIMICOBIOLOGICAS

PRESENTA:

M. en C. MARGARITA JUÁREZ MONTIEL

DIRECTORES:

**DRA. Ma. DE LOURDES VILLA TANACA
DR. CÉSAR H. HERNÁNDEZ RODRÍGUEZ**



MÉXICO D.F. Enero, 2011

Manuscript Number: RIAM-D-10-00041R2

Title: Huitlacoche (corn smut), caused by the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis*, as a functional food. El huitlacoche (tizón del maíz), causado por el hongo fitopatógeno *Ustilago maydis*, como alimento funcional

Article Type: Revisión

Keywords: Keywords: *Ustilago maydis*; phytopathogenic fungus; huitlacoche; corn smut; functional food.

Palabras clave: *Ustilago maydis*; hongo fitopatógeno; huitlacoche; tizón del maíz; alimento funcional.

Corresponding Author: DR. Lourdes Villa-Tanaca, Ph.D.

Corresponding Author's Institution: Instituto Politecnico Nacional ENCB

First Author: Margarita Juárez-Montiel, MS

Order of Authors: Margarita Juárez-Montiel, MS; Sandra Ruiloba de León-Frescas, Ph.D.; Griselda Chávez-Camarillo, Ph. D.; César Hernández-Rodríguez, Ph.D.; Lourdes Villa-Tanaca, Ph.D.

Abstract: Abstract

Background: In recent years the need has arisen to study and develop (or re-discover) foods that have nutritional characteristics as well as specific functions, such as improving health and/or reducing the risk of disease. For this reason knowledge of the nutritional value of food is important to foment greater consumer acceptance. In Mexico huitlacoche (also, cuitlacoche) has traditionally been prized as a delicacy since the time of the Aztecs and is currently being studied as a potential functional food and as a producer of natural bioactive substances that are used in fortifying foods.

Aims: To present an updated review about the properties of the huitlacoche (corn smut) as functional food.

Methods: A bibliographic search was performed and data were discussed.

Results: The data of the works revised here show that huitlacoche contains many compounds that confer to it unique organoleptic and nutraceutical characteristics.

Conclusions: The content of bioactive substances in huitlacoche supports the proposal that this is a good functional food as well as producer of compounds to enrich other foods.

Resumen

Antecedentes: Durante los últimos años ha surgido la necesidad de elaborar, estudiar o redescubrir los alimentos que además de sus características nutricionales puedan cumplir una función específica como mejorar la salud y/o reducir el riesgo de contraer enfermedades. Por este motivo el conocimiento del valor nutrimental de los alimentos es importante para que estos tengan una mejor aceptación entre los consumidores. En México el huitlacoche o cuitlacoche ha sido tradicionalmente apreciado como una delicia culinaria desde la época de los aztecas y actualmente se está estudiando su potencial como alimento funcional y como productor de sustancias bioactivas naturales, que sean utilizadas en la producción de alimentos fortificados.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1 Running title: Dipeptidyl aminopeptidase IV from *Ustilago maydis*

2 Cloning, expression in *Pichia pastoris*, and characterization of X-Prolyl-dipeptidyl
3 aminopeptidase recombinant from basidiomycete *Ustilago maydis*

4 Juárez-Montiel Margarita, Hernández-Rodríguez César, and Villa-Tanaca Lourdes*

5 Departamento de Microbiología, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto

6 Politécnico Nacional, ¹ México, D. F.

7 * Corresponding author: Lourdes Villa-Tanaca. Departamento de Microbiología. Escuela
8 Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional. Plan de Ayala y Prol.
9 Carpio. Col. Casco de Santo Tomás. México D. F. CP 11340. Agencia de Correos 220.
10 Phone (+52 55) 57 29 62 09; Fax (+52 55) 57 29 62 07; E mail: lourdesvilla@hotmail.com

11
12
13
14
15
16
17
18

Este trabajo se realizó en los laboratorios de Genética Microbiana y de Microbiología General del Departamento de Microbiología de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, bajo la dirección de la Dra. Lourdes Villa Tanaca y del Dr. César Hernández Rodríguez.

La sustentante recibió apoyo del Programa para la Formación de Investigadores (PIFI) y del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT).

El trabajo recibió apoyo de los proyectos SIP-20082350 “Análisis bioquímico y molecular del papel de las proteasas en la virulencia, metabolismo nitrogenado y control post-traducciona l de hongos de interés médico, fitopatóg eno y biotecnológico”; SIP-20090402 “Las proteasas de hongos como factores de virulencia y mecanismos de sobrevivencia en condiciones de estrés, su uso como blancos terapéuticos”, SIP-20100514 “Bioquímica y biología molecular de enzimas de hongos y levaduras de interés médico, fitopatóg eno y biotecnológico”, CONACYT-84085 e ICyTDF-Cd. Sostenible-2010, PICO S 10-95.

ABREVIATURAS

Ala-Pro-pNA	L-alanil-L-prolil- <i>p</i> -nitroanilida.
α -Factor	Señal de secreción del factor sexual α de <i>S. cerevisiae</i> .
AOX1	Gen codificante de la alcohol oxidasa de <i>P. pastoris</i> .
<i>ape3</i>	Gen codificante de la APE3 de <i>U. maydis</i>
APE	Aminopeptidasa
<i>dap2</i>	Gen codificante de la DPP IV de <i>Ustilago maydis</i>
DPP IV	Dipeptidil aminopeptidasa tipo IV
<i>egfp</i>	Gen codificante de la proteína verde fluorescente (GFP)
<i>hph</i>	Gen codificante de la higromicina fosfotransferasa, confiere resistencia a higromicina (Hyg ^R)
Lys-pNA	L-lisin-- <i>p</i> -nitroanilida
<i>mRFP</i>	Gen codificante de la proteína roja fluorescente (RFP)
Pcrg1	Promotor del gen <i>crg1</i> , la cual induce y reprime la expresión de genes en presencia de arabinosa y glucosa, respectivamente.
Pro-pNA	L-prolil- <i>p</i> -nitroanilida.
pumAPE3i-rec	Aminopeptidasa recombinante intracelular recombinante de <i>U. maydis</i>
pumDAPI-rec	Dipeptidil aminopeptidasa intracelular recombinante de <i>U. maydis</i>
18SrRNA	Gen codificante de la subunidad ribosomal menor
26SrRNAm	Gen codificante de la subunidad ribosomal mayor mitocondrial

RESUMEN

La disponibilidad del genoma de *Ustilago maydis* nos ha permitido identificar genes hipotéticos codificantes de proteasas vacuolares y en este trabajo se aborda el estudio de algunos de estos genes bajo tres criterios:

1) Estudios bioquímicos de las proteínas recombinantes pumDAPI-rec y pumAPE3i-rec, codificadas por los genes *dap2* y *ape3* de *U. maydis*, respectivamente, y expresadas heterológamente en *P. pastoris*.

El gen *dap2* codifica para una dipeptidil aminopeptidasa (DPP) tipo IV membranal, con un peso molecular de 123 kDa y un pI 6.9; se encontró además que se trata de una serín-proteasa. Por otro lado, el gen *ape3* codifica para una aminopeptidasa (APE) soluble, pero sus características no pudieron ser determinadas debido a la baja expresión de esta proteína.

2) La generación de construcciones genéticas que permitan la obtención de mutantes carentes de estas actividades o bien la generación de proteínas de fusión con las proteínas verde o roja fluorescentes, por recombinación homóloga.

En este trabajo se generaron construcciones genéticas preliminares (por estrategias de clonación) que permitirán la posterior obtención de vectores para llevar a cabo la recombinación homóloga en *U. maydis*.

3) Estudio del perfil proteolítico de tumores de maíz que contienen teliosporas (huitlacoche) y maíz no infectado, así como de la expresión de los genes codificantes de proteasas vacuolares, con la finalidad de establecer la posible función de estas proteasas en la fase biotrófica del hongo y su efecto en las características organolépticas del huitlacoche.

Se encontró que la actividad de las diferentes proteasas tiende a favorecerse cuando el hongo infecta al maíz. Por otro lado se observó que varios de los genes analizados hasta ahora no se expresan en las muestras de huitlacoche, lo que podría sugerir que las actividades proteolíticas detectadas no son codificadas por estos genes. Por último, se realizó una revisión bibliográfica que apoya la idea de proponer al huitlacoche como alimento nutracéutico.

ABSTRACT

The availability of the *Ustilago maydis* genome allowed us to identify hypothetical genes encoding vacuolar proteases and in this paper we study some of these genes under three criteria:

1) Biochemical studies of the recombinant proteins pumAPE3i-rec and pumDAPI-rec, encoded by *dap2* and *ape3* genes of *U. maydis*, respectively and expressed heterologously in *P. pastoris*.

The *dap2* gene encodes a membranal type IV dipeptidyl aminopeptidase (DPP) with a molecular weight of 123 kDa and *pI* 6.9, was also found that it is a serine protease. On the other hand, *ape3* gene encodes a soluble aminopeptidase (APE), but its features could not be determined because of poor expression of this protein.

2) The generation of genetic constructs to obtain mutants lacking these activities or the generation of fusion proteins with the green or red fluorescent proteins, by homologous recombination.

In this work, preliminary genetic constructs were generated, by cloning strategies, which will allow the subsequent generation of vectors to carry out homologous recombination in *U. maydis*.

3) Proteolytic profile studies of tumors containing teliospores (huitlacoche) and uninfected maize, as well as the expression of genes encoding vacuolar protease, in order to establish the possible role of these proteases in the biotrophic phase of the fungus and its effect on the organoleptics characteristics of huitlacoche.

It was found that the activity of different proteases tend to be favored when the fungus infects corn. On the other hand, we observed that several of the genes analyzed until now are not expressed in samples of huitlacoche, which could suggest that the proteolytic activities detected are not encoded in these genes.

ÍNDICE	
Abreviaturas	i
Resumen	ii
Abstract	iii
Índice	iv
Índice de tablas	V-Vi
Índice de figuras	Vii-viii
Introducción	1-12
Antecedentes	13-15
Justificación	16
Objetivos	17
Materiales y Métodos	18-27
Resultados	28-48
Discusión	49-54
Conclusiones	55
Perspectivas	56
Bibliografía	57-62
Anexo	63-67

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Tabla 1. Proteasas vacuolares de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2
Tabla 2. Características bioquímicas de las proteasas de <i>Ustilago maydis</i>	13
Tabla 3. Características teóricas de los genes <i>dap2</i> y <i>ape3</i> de <i>Ustilago maydis</i> y de sus proteínas predichas.	14
Tabla 4. Actividad específica de las diferentes fracciones obtenidos después de pasar la fracción de membrana de <i>Pichia pastoris</i> C41 a través de una columna de níquel.	30
Tabla 5. Actividad relativa de la proteína recombinante pumDAPI-rec sobre diferentes sustratos específicos (p-nitroanilida derivados).	31
Tabla 6. Efecto de diferentes inhibidores de proteasas sobre la proteasa recombinante pumDAPI-rec	31
Tabla 7. Características de los iniciadores y sus amplificadores, para la generación de mutantes del gen <i>dap2</i> de <i>Ustilago maydis</i>	39
Tabla 8. Características de los iniciadores y sus amplificadores, para la generación de mutantes del gen <i>ape3</i> de <i>Ustilago maydis</i>	40
Tabla 9. Características de las construcciones obtenidas por la clonación de los amplificadores L y R en los vectores pJET1.2/blunt o PCR2.1-TOPO.	43

Tabla 10. Características de los iniciadores utilizados para el análisis de expresión de proteasas de *Ustilago maydis* en el huitlacoche y de las proteasas putativas codificadas en los genes blanco de éstos.

48

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1. Tránsito de proteínas desde diferentes localizaciones hacia la vacuola.	1
Fig. 2. Tumores característicos del carbón del maíz o huitlacoche formados en la mazorca.	5
Fig. 3. Ciclo de vida de <i>U. maydis</i> .	6
Fig. 4. Eventos moleculares durante la complementación sexual de <i>U. maydis</i> .	8
Fig. 5. Modelo de las vías de señalización del cAMP y de las MAP cinasas en <i>U. maydis</i> .	10
Fig.6. Representación esquemática de las construcciones genéticas y del evento de recombinación homóloga en <i>P. pastoris</i> , para la obtención de las proteasas recombinantes pumDAPI-rec y pumAPE3i-rec.	15
Fig. 7. Diseño de iniciadores para la generación de tres diferentes tipos de mutantes de <i>U. maydis</i> .	26
Fig. 8. Representación esquemática de los plásmidos usados, la estrategia de clonación y de los plásmidos obtenidos para la generación de mutantes de <i>U. maydis</i>	27
Figura 9. Amplificación del gen <i>dap2</i> a partir de DNA de <i>P. pastoris</i> C41 (transformada con la construcción genética pPICZBDPP).	28
Figura 10. Actividad de la pumDAPI-rec en extractos enzimáticos de <i>P. pastoris</i> C-41 y X-33.	29

Figura 11. Actividad específica pumDAPI-rec, en las membranas de <i>P. pastoris</i> tratada con tres diferentes detergentes, usando como sustrato Ala-Pro-pNA.	32
Figura 12. Análisis de la fracción soluble y de las membranas de <i>P. pastoris</i> X-33 y C41 por SDS-PAGE.	33
Figura 13. Identificación de el ELC de <i>P. pastoris</i> X-33 y C41 con el anticuerpo anti-His(C-term)-HRP.	34
Figura 14. Amplificación del gen <i>ape3</i> a partir de DNA de <i>P. pastoris</i> C6 (transformada con el plásmido pPICZAAPE).	35
Figura 15. Actividad específica pumAPE3i-rec en extractos enzimáticos de <i>P. pastoris</i> .	36
Figura 16. Análisis de las fracciones citoplásmicas y de membrana de <i>P. pastoris</i> X-33 y C6 por SDS-PAGE.	37
Figura 17. Identificación de el ELC de <i>P. pastoris</i> X-33 y C6 con el anticuerpo anti-His(C-term)-HRP.	38
Figura 18. Estrategia general para obtener por PCR las construcciones para generar mutantes de <i>U. maydis</i> .	42
Figura 19. Actividad específica de proteasas en tres diferentes muestras de maíz y huitlacoche.	45
Figura. 20. Análisis de expresión de genes codificantes de proteasas vacuolares putativas de <i>U. maydis</i> , en muestras de huitlacoche.	46

Introducción

La vacuola fúngica

La vacuola es un organelo dinámico, equivalente a los lisosomas en las células de mamífero. Es el organelo más ácido de la célula y sus funciones principales son: 1) homeostasis de iones del citosol y de pH 2) almacenamiento y transporte bidireccional de iones y metabolitos, 3) desintoxicación y 4) el recambio proteico (Jones, 1991; Klionsky y col., 1990; Li y Kane, 2009).

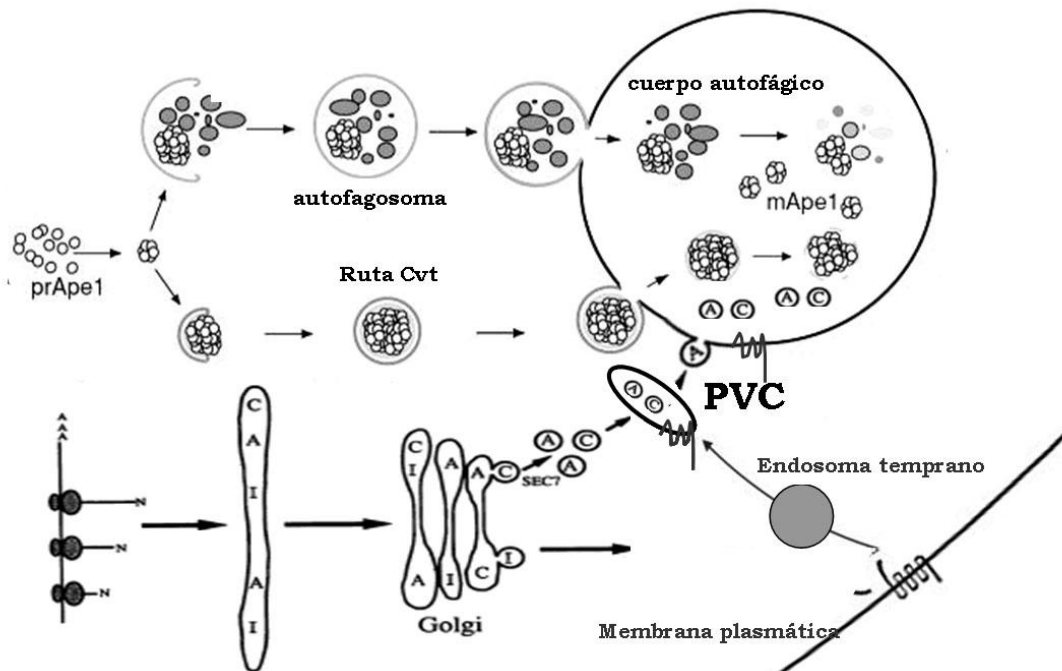


Figura 1. Tránsito de proteínas desde diferentes localizaciones hacia la vacuola. Los precursores de la carboxipeptidasa (C), la proteinasa ácida (A) y la invertasa (I), llegan a la vacuola, en donde son maduras, a través de la vía de secreción. El precursor de la aminopeptidasa I (prApe1) llega a la vacuola por la ruta directa citoplasma-vacuola CvT. Las proteínas que serán degradadas para el recambio proteico son enviadas a la vacuola en cuerpos de doble membrana (autofosomas) si son intracelulares o a través de endosomas, si son de membrana plasmática o extracelulares, estas últimas primero llegan al compartimiento pre-vacuolar (PVC), al igual que las proteína que transitan a través de la vía de secreción, de donde son enviadas a la vacuola (modificado de Wen y Klionsky, 2003).

La vacuola fúngica es el principal sitio para el recambio proteico en la célula, además en este organelo convergen diversas vías alternativas de transporte (Klionsky y col., 1990; Bryant y Stevens, 1998). Varias proteínas vacuolares canónicas, recién sintetizadas, son transportadas a través de la vía

de secreción hacia la vacuola, pasando por el retículo endoplásmico (RE) y el aparato de Golgi, en donde éstas se asocian a diferentes proteínas acarreadoras para ser transportadas en vesículas a la vacuola. Otra vía biosintética es la denominada vía CvT (cytoplasm to vacuole targeting), mediante la cual las proteínas inmaduras son transportadas a la vacuola y maduras en este organelo (Bryant y Stevens, 1998; Sarry y col., 2007) (Fig. 1).

Existen otros procesos de transporte de proteínas hacia la vacuola, como la vía endocítica, en la que proteínas de la membrana plasmática son enviadas a la vacuola en cuerpos multivesiculares y, la autofagia, en donde el contenido citoplásmico e incluso organelos completos son atrapados en cuerpos de doble membrana llamados autofagosomas (Fig. 1) (Wen y Klionsky, 2003; Bryant y Stevens, 1998; Sarry y col., 2007).

Una vez en la vacuola, y gracias a su alto contenido de hidrolasas (como glicosidasas, fosfatasa, nucleasas y proteasas) estas proteínas u organelos son liberados y degradados. Las proteasas han sido ampliamente estudiadas en *Saccharomyces cerevisiae* (Tabla 1) y en general se expresan en condiciones de estrés nutricional (limitación de glucosa o nitrógeno) y en las fases de crecimiento estacionario (Klionsky y col., 1990; Sarry y col., 2007).

Las proteasas vacuolares se han asociado con la degradación y reutilización de pequeños péptidos y de proteínas de vida larga cuando la célula se encuentra en condiciones de ayuno, mecanismo denominado autofagia (Achstetter y col., 1984; Wen y Klionsky, 2003). También participan en la degradación de proteínas durante la esporulación y en la maduración de proteínas residentes de este organelo (Achstetter y Wolf, 1985).

Además de las proteasas vacuolares, en *S. cerevisiae* se han descrito otras proteasas en la vía de secreción y el proteasoma citosólico. Las primeras se caracterizan por presentar regiones transmembranales y su principal función es la maduración de precursores: por ejemplo la señal de secreción del factor sexual α y la toxina "killer". El proteasoma citosólico, que es un complejo enzimático, participa en el control del ciclo celular, la degradación de proteínas incorrectamente plegadas y en el recambio proteico (Jones, 1991).

Tabla 1. Proteasas vacuolares de *Saccharomyces cerevisiae*

Enzima	Tipo	Gen	Función
PrA (proteínasa A) ^a	Proteasa-aspártica	<i>PEP4</i> , <i>PRA1</i>	*Autoprocesamiento, *Activación de PrA, CpY, RNasa, fosfatasa alcalina (Pho8), y exopolifosfatasa vacuolar. *Degradación de los receptores α y β . Importante en la rotación después del daño oxidativo.
PrB (proteínasa B) ^b	Serín-proteasa	<i>PRB1</i>	*Autoprocesamiento y procesamiento de CpY. Degradación de proteínas, requerida durante la esporulación.
CpY (carboxipeptidasa Y) ^c	Serín-proteasa	<i>PRC1</i>	Degradación de proteínas, Metabolismo nitrogenado
CpS (carboxipeptidasa S) ^d	Metaloproteasa (Zn)	<i>CPS1</i>	Degradación de proteínas, Metabolismo nitrogenado. Su expresión es inducida con poco oxígeno.
Apl, yscl (Amino-peptidasa I) ^e	Metaloproteasa (Zn)	<i>LAP4</i> (<i>APE1</i>)	Marcador de autofagia
APE3 (amino-peptidasa Y) ^f	Metaloproteasa (Zn)	<i>APE3</i> (<i>APY1</i>)	Desconocida
DAPB (dipeptidilamino-peptidasa B) ^g	Serín-proteasa	<i>DAP2</i> (<i>DPP2</i>)	Desconocida

^aJones y col., 1982, ^bZubenko y Jones, 1981, ^c, ^dBordallo y col., 1991, ^eCueva y col., 1989,

^fNishizawa y col., 1994, ^gRoberts y col., 1989

Clasificación de las proteasas

Las enzimas proteolíticas catalizan la ruptura de los enlaces peptídicos de las proteínas y dan como resultado la producción de péptidos más pequeños y aminoácidos (Rawn, 1989). Las proteasas se clasifican de acuerdo a la ubicación del enlace que rompen en: exopeptidasas y endopeptidasas, estas últimas catalizan la hidrólisis de enlaces peptídicos situados en el interior de la cadena polipeptídica y también se les llama proteinasas (EC 3.4.21-3.4.34) (Suárez y Wolf, 1988; Rao y col., 1998).

Las exopeptidasas hidrolizan enlaces peptídicos del extremo amino o carboxilo liberando aminoácidos terminales de la proteína y se dividen en:

- Amino-peptidasas (EC 3.4.11). Catalizan la liberación secuencial de aminoácidos del extremo amino-terminal.
- Carboxipeptidasas (EC 3.4.16-3.4.18). Catalizan la liberación secuencial de aminoácidos del extremo carboxilo-terminal.

- c) Dipeptidil aminopeptidasas (EC 3.4.14). Catalizan la liberación secuencial de dos aminoácidos a partir del extremo amino-terminal.
- d) Dipeptidil carboxipeptidasas (EC 3.4.15). Catalizan la liberación secuencial de dos aminoácidos a partir del extremo carboxilo-terminal.

Las proteasas se clasifican a su vez, con base en el grupo funcional presente en el sitio catalítico (Suárez y Wolf, 1988; Rao y col., 1998), en:

- a) Serín proteasas. Poseen un residuo de serina en su sitio activo y son inhibidas por diisopropil-fluorofósforo y otros organofosforados.
- b) Tíol proteasas. Son enzimas que presentan un grupo –SH intacto en su sitio activo y son inhibidas por iones de metales pesados, agentes alquilantes y agentes oxidantes.
- c) Metaloproteasas. Requieren de cationes divalentes; a veces la diálisis o los agentes quelantes las inactivan.
- d) Proteasas-aspárticas. Poseen uno o más grupos carboxilo en su sitio activo.

Generalidades de *Ustilago maydis*

Ustilago maydis es un hongo basidiomiceto que pertenece a los Ustilaginales, causa el carbón del maíz, una enfermedad de distribución mundial que ocasiona graves pérdidas económicas. Este hongo infecta al maíz dulce (*Zea mays*) y su progenitor el Teozinte (*Zea mexicana* subesp. *parviglumis* 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 más tarde se torna gris-plateada (Bölker, 2001) (Fig. 2).

Ciclo de vida de *Ustilago maydis*

Ustilago maydis presenta dos formas durante su ciclo de vida: una saprofitica en la que crece en forma de levaduras o basidiosporas haploides y otra en la que crece como micelio dicariótico infectivo. El ciclo inicia cuando dos basidiosporas haploides sexualmente compatibles se encuentran (Fig. 3a) y

comienza la formación del tubo germinativo (Fig. 3b), mediante el cual se fusionan y dan origen a la fase micelial dicariótica (Fig. 3c) (Banuett y Herskowitz, 1996; Snetselaar y col., 1996), que constituye el estado infectivo del hongo. La hifa entra a la pared celular del hospedero por medio de una estructura especializada llamada apresorio (Fig. 3d) y se desarrolla a través y entre las células de la planta (aunque no afecta a la membrana plasmática) induciendo poco daño a la célula del hospedero (Snetselaar y Mins, 1994).

Una vez que la hifa penetra al hospedero comienza la proliferación celular y la formación del tumor (Fig. 3e), el hongo se ramifica formando una densa red y posteriormente los núcleos se fusionan (cariogamia) y las hifas se fragmentan dando inicio a la fase diploide (Snetselaar y Mins, 1994; Banuett y Herskowitz, 1996). Las células diploides comienzan a redondearse, la pared celular se engruesa, se pigmenta y se forman espículas; finalmente se forman las teliosporas (Fig. 3f). Estas teliosporas son liberadas cuando el tumor se rompe y permanecen viables en el suelo; durante la primavera y en verano germinan para formar el promicelio (el núcleo se divide por meiosis, originando cuatro núcleos que se separan por medio de tabiques transversales). En las células del promicelio el núcleo se divide nuevamente poro ahora por mitosis, para formar a las basidiosporas haploides (Fig. 3a) y reiniciar el ciclo (Ruiz-Herrera y Martínez-Espinoza, 1998; Banuett, 2002).

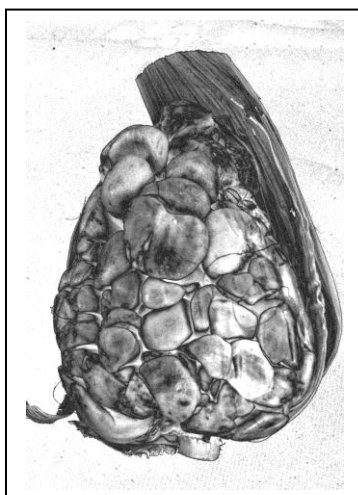


Figura 2. Tumores característicos del carbón del maíz o huilacoche formados en la mazorca. La infección del maíz por el hongo fitopatógeno *U. maydis*, induce la formación de tumores en los órganos aéreos de la planta, los cuales contienen teliosporas.

Control genético de la complementación sexual en *U. maydis*

La complementación sexual en *U. maydis* es quizá el evento que más atención ha recibido debido a que solamente las células dicarióticas son infectivas. La fusión de células haploides y el desarrollo del dicarion son controlados por dos loci independientes denominados *a* y *b*. Mientras que el locus *a* controla el reconocimiento y la fusión celular, el locus *b* es el responsable de la patogenicidad; ambos loci son requeridos para el mantenimiento de la fase micelial (Banuett y Herskowitz, 1989; Bölker y col., 1995). Sólo dos células haploides con diferentes loci *a* y *b* se conjugan sexualmente y originan la fase patógena del hongo (Ruiz-Herrera y Martínez-Espinoza, 1998) (Fig. 4).

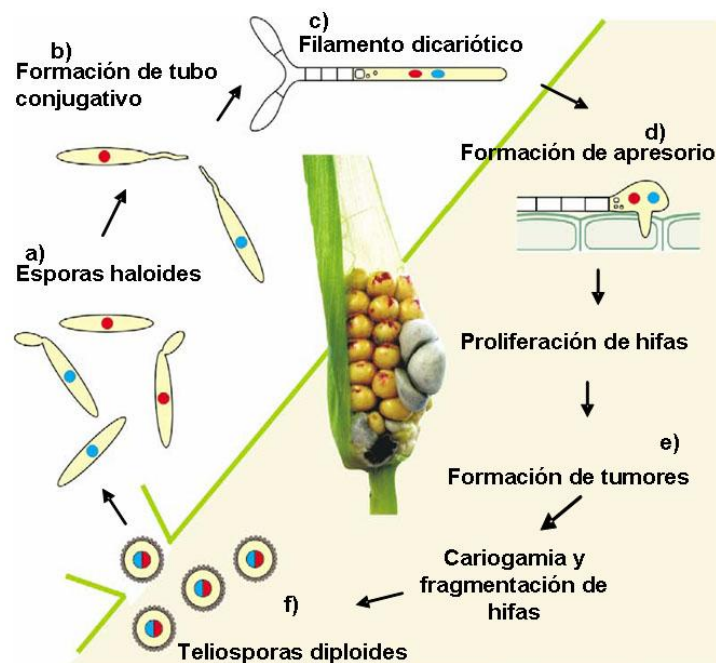


Figura 3. Ciclo de vida de *U. maydis*. El ciclo inicia con la fusión de las basidiosporas haploides sexualmente compatibles (a) para formar el filamento dicariótico infectivo (b), el cual infecta a la planta a través del apresorio (c). La penetración y proliferación del filamento conduce a la formación de tumores (e) que contienen teliosporas diploides (f), que al romperse el tumor son liberadas y para generar levaduras haploides nuevas y reiniciar el ciclo (Modificado de Feldbrügge y col., 2004).

Los loci a. Tienen dos alelos *a1* y *a2*, que contienen los genes que codifican al péptido precursor de una feromona (*mfa1* y *mfa2*) y al receptor de la misma (*pra1* y *pra2*) (Fig. 4a) (Urban y col., 1996). El hecho de que

solamente las células *a2* formaran tubos de complementación al adicionar la feromona Mfa1 purificada llevó a la conclusión de que cuando las células presentan loci *a* diferentes pueden formar tubos de conjugación y fusionarse (Spellig y col., 1994).

El locus *b*. El número de alelos *b* en la naturaleza ha sido calculado en más de 25. Este locus controla el crecimiento filamentoso y la patogenicidad independientemente del locus *a* y codifica para dos proteínas (*bE* y *bW*) que contienen un homeodominio (Kronstad y Leong, 1990).

Se ha demostrado que los productos de los genes *bE* y *bW* de diferentes alelos pueden formar heterodímeros mediante la interacción de sus regiones variables para producir dos diferentes heterodímeros, *bE1/bW2* y *bE2/bW1*, etc., mientras que los que provienen del mismo alelo son incapaces de interactuar (Fig. 4b) (Kämper y col., 1995). Estas proteínas son factores de transcripción que encienden los genes requeridos para la patogenicidad (Fig. 4c). Se ha observado que cepas haploides que producen el heterodímero activo *bE/bW*, son capaces de formar tumor en el maíz, a pesar de que *in vitro* crecen en forma de levadura, demostrando que el heterodímero codificado por *b* es suficiente para la patogenicidad (Bölker y col., 1995).

Se han identificado genes cuya expresión es *b*-dependiente, aunque ninguno ha mostrado ser esencial en la patogenicidad. Además en pocos de estos genes se han detectado sitios de unión para el heterodímero *bE/bW*, lo que sugiere que este factor desencadena una cascada transcripcional (Fig. 4d) (Brachmann y col., 2001).

Las vías de señalización en la morfología y virulencia de *U. maydis*

La patogénesis depende de cambios morfológicos para generar el tipo celular capaz de infectar al hospedero. Durante este proceso, *U. maydis* percibe señales específicas ambientales y de su hospedero, que son transmitidas intracelularmente mediante vías de señalización.

La señalización en respuesta a la feromona se inicia con la unión del lipopéptido Mfa 1/2 al receptor Pra 1/2 (Fig. 4a), dando como resultado la inducción de la transcripción de todos los componentes de los loci *a* y *b*, incrementándose la señal de la feromona y garantizándose la expresión de los genes *b* después de la fusión celular (Urban y col., 1996).

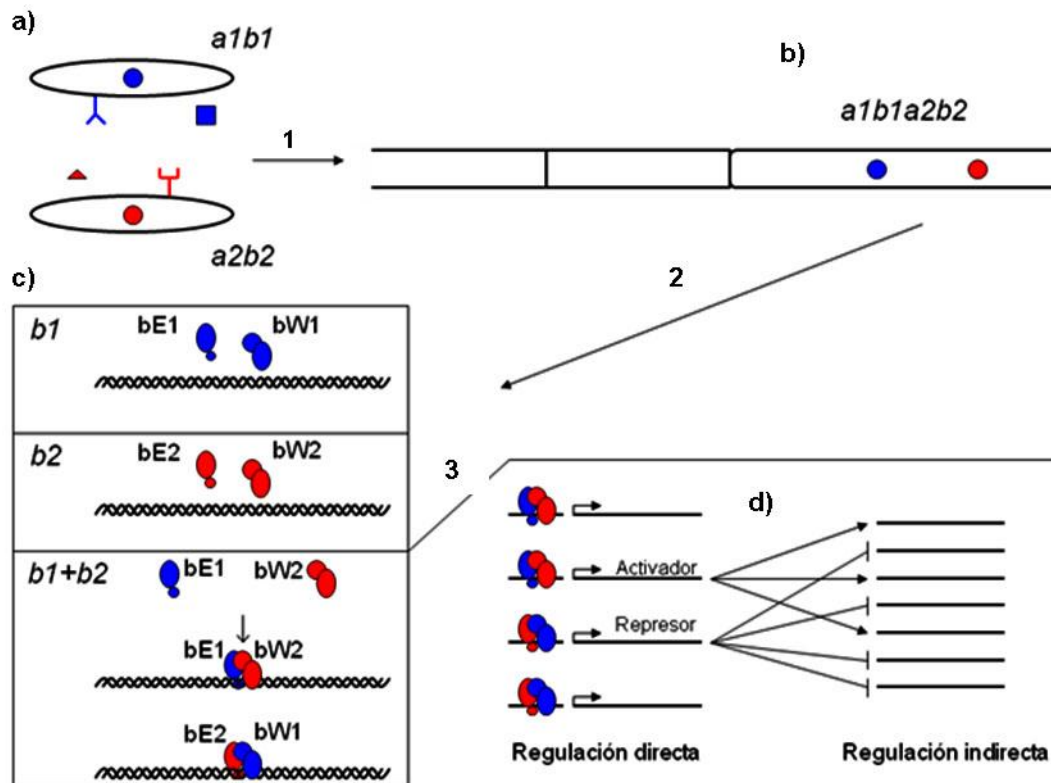


Figura 4. Eventos moleculares durante la complementación sexual de *U. maydis*. En el locus bialélico *a* se encuentran codificados el precursor y el receptor de la feromona (a), que permiten el reconocimiento de las células sexualmente compatibles y la posterior formación de filamento dicariótico (b), en donde las proteínas homeodominio bE y bW, codificadas en diferente alelos, forman el heterodímero bE/bW (c), un factor de transcripción que desencadena una cascada transcripcional (d) (Modificado de Feldbrügge y col., 2004).

El receptor de la feromona está acoplado a una proteína G heterotrimérica (Gpa) compuesta de las subunidades α , β y γ . De cuatro genes que codifican a la subunidad α (*gpa1*, *gpa2*, *gpa3* y *gpa4*) la mutación de *gpa3*, que codifica a una proteína estimuladora de la adenilato ciclasa, da como resultado un fenotipo incapaz de realizar la complementación sexual, afectándose la expresión basal e inducida de los genes *mfa* y el crecimiento filamentoso (Regenfelder y col. 1997; Kahmann y col., 1999; Bölker, 2001). Sin embargo la adición de cAMP (adenosín monofosfato cíclico) exógeno o la sobreexpresión de los genes *mfa* suprimen esta mutación (Krüger y col., 1998).

La ruta dependiente de cAMP (adenosín monofosfato cíclico) ha sido ampliamente estudiada. El aislamiento del gen *uac1*, codificante de una adenilato ciclasa, permitió el aislamiento de los genes *ubc1* y *adr1*, cuyos

productos son la subunidad reguladora y catalítica de una proteína cinasa dependiente de cAMP (PKA), respectivamente. La interrupción de *uac1* y de *adr1* ocasiona un fenotipo constitutivo filamentoso, sin embargo estas mutantes no son patógenas, lo que sugiere que el desarrollo filamentoso no es por sí mismo suficiente para inducir la enfermedad (Gold y col., 1994). En contraste, la eliminación de *ubc1* ocasiona la producción de altos niveles de cAMP y el fenotipo constitutivo resultante es de levadura (Gold y col., 1997; Dürrenberger y col., 1998).

La expresión constitutiva de Gpa3 ocasiona la inducción del tumor, pero interfiere con la proliferación del hongo y la producción de esporas, lo que sugiere que esta vía también se activa por las señales de la planta y es regulada diferencialmente durante la patogénesis (Kahmann y col., 1999; Krüger y col., 2000).

La observación de que la activación de la ruta del cAMP induce la expresión de feromonas, pero no la formación de tubos de conjugación y la búsqueda de mutantes que suprimieran el fenotipo filamentoso de las mutantes *uac1*, permitieron la identificación de la vía de señalización de las MAP cinasas (proteína cinasas activadas por mitógenos), que relacionada con la señalización en respuesta a la feromona y que presenta tres componentes principales la MAPKKK, MAPKK y MAPK, codificadas por los genes *ubc4/kpp4*, *ubc5/Fuz7* y *ubc3/Kpp2*, respectivamente, las cuales actúan en cascada durante la complementación sexual y la patogenicidad (Fig. 5) (Banuett y Herzowitz, 1994; Mayorga y Gold, 1999; Müller y col., 1999; Andrews y col., 2000; Müller y col., 2003). Además, otra cinasa MAPK codificada por *kpp6*, está involucrada en la formación de apresorios (Brachmann y col., 2003; Müller y col., 2003). En la búsqueda de las cinasas Ubc4, Ubc5 y Ubc3, se detectó el gen *ubc2*, codificante de una proteína adaptadora del tipo Ste50, que interactúa con Ubc4 mediante un dominio α -estéril (SAM) y con Ras2, una proteína G pequeña, mediante un dominio Ras (RA); todas ellas son esenciales para el crecimiento filamentoso (Mayorga y Gold, 2001; Klosterman y col., 2008). Ras2 es epistática para los miembros de la vía de las MAP cinasas, su mutación suprime el fenotipo filamentoso de las mutantes *adr1* y su sobreexpresión incrementa la expresión de *mfa*. Ras2 parece ser inducida por Sqi2, una proteína similar al factor de intercambio de nucleótidos de guanina CDC25, los

cuales actúan sobre proteínas tipo Ras. Al igual que las mutantes en *ras2*, la mutación *sql2* es epistática para los miembros de la vía de las MAP cinasas y las mutantes en este gen están afectadas en el desarrollo del patógeno pero no en la complementación sexual (Lee y Kronstand, 2002; Müller y col., 2003).

Las vías de cAMP y de las MAP cinasas (Protein cinasas activadas por mitógenos) parecen estar conectadas mediante el factor de respuesta a la feromona (Prf1), un factor de transcripción del tipo HMG. Esta proteína se une específicamente a elementos de respuesta a la feromona (PRE's) localizados en la región reguladora de los genes *a*, *b* y *prf1* (Hartmann y col., 1996; Urban y col., 1996). El tipo de fosforilación de Prf1 regula de manera diferencial y esencial la expresión de los genes *a* y *b*, mientras que la fosforilación por PKA y Kpp2 desencadena la expresión de *b*, sólo con la fosforilación por PKA se regula la expresión de *a* (Fig. 5) (Kaffarnik y col., 2003; Müller y col., 2003).

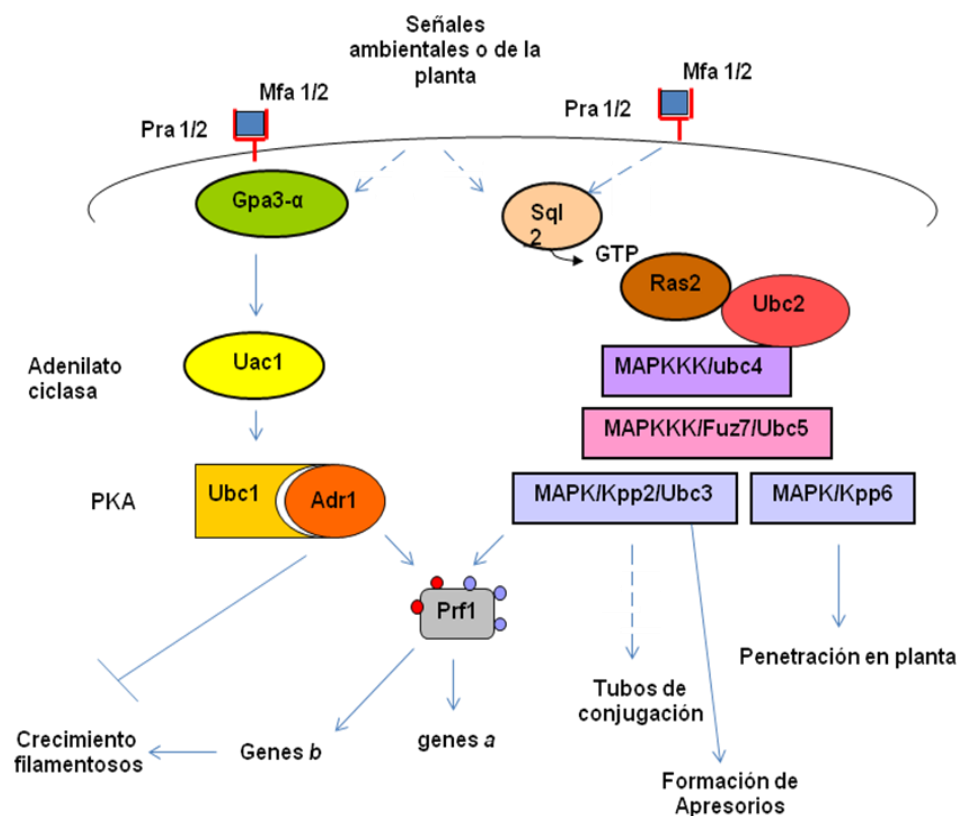


Figura 5. Modelo de las vías de señalización del cAMP y de las MAP cinasas en *U. maydis*. Estas dos vías de señalización están interconectadas y cooperan en la transducción de señales externas ambientales como son la presencia de feromonas o las producidas por la planta, durante la complementación sexual y la patogénesis (Feldbrügge y col., 2004).

Aunque se conoce la función de estas dos vías de señalización en la complementación sexual y la morfogénesis, poco se conoce acerca de las señales que las desencadenan, en particular después de que el apareamiento ha ocurrido, durante el desarrollo y el establecimiento del patógeno.

Dimorfismo

Además de la respuesta a la feromona existen varias condiciones ambientales que promueven la transición de levadura a micelio, como son: la carencia de nitrógeno, la exposición al aire (Gold y col., 1994), la presencia de lípidos en el medio de cultivo (Klose y col., 2004) y cambios de pH (Ruiz-Herrera y col., 1995; Martínez-Espinoza y col., 2004), los cuales son dependientes de la vía de señalización dependiente de cAMP y de la de las MAP cinasas. Esto hace pensar que una vez que el hongo percibe las señales ambientales se encienden mecanismos que facilitan la penetración e invasión del hospedero.

El huitlacoche como alimento funcional

Como se ha podido observar el hongo fitopatógeno *U. maydis* ha sido ampliamente estudiado para entender los procesos morfogénicos que controlan la patogenicidad. No obstante los tumores característicos de la enfermedad causada por este hongo (carbón del maíz o huitlacoche) han sido consumidos en la región central de México desde tiempos precolombinos (Ruiz-Herrera y Martínez-Espinoza, 1998) y actualmente se ha introducido como platillo gourmet en la alta cocina internacional, debido a sus características organolépticas y nutraceuticas únicas conferidas por la mezcla particular de compuestos como aminoácidos, carbohidratos, fibra y ácidos grasos, entre otros (Juárez-Montiel y col., en prensa).

En particular algunas características del huitlacoche como son el alto contenido de lisina en comparación con el maíz y el contenido de ácido aspártico y glutámico, que junto con el ácido tricolómico e iboténico que generan el sabor umami, podrían deberse a la acción de proteasas de *Ustilago maydis* (Juárez-Montiel y col., en prensa). Además aunque en el huitlacoche no se ha estudiado el contenido de péptidos bioactivos, toda fuente proteica es susceptible de contenerlos.

Por otro lado el uso de proteasas como la proteasa alcalina y la papaína que son adicionadas a los alimentos para mejorar su consistencia y textura (Ardö, 2006). El desarrollo de sabor es otra de las características sensoriales que puede ser favorecida por las proteasas y este fenómeno en los productos lácteos ha sido ampliamente estudiado. En este caso se ha observado que la degradación de proteínas como la caseína y la generación de aminoácidos como consecuencia son la clave en la generación de estos sabores (Smit y col., 2005).

Antecedentes

Las proteasas de *Ustilago maydis*.

En *Ustilago maydis* se han detectado con pruebas bioquímicas al menos cuatro actividades proteolíticas diferentes: dos proteinasas ácidas (pumAi y pumAe), dos proteinasas neutras (pumBi y pumBe), una aminopeptidasa (pumAPEi) y una dipeptidil aminopeptidasa (pumDAPI), cuando el hongo es cultivado en medio completo o mínimo suplementado con diferentes fuentes de nitrógeno y en diferentes fases de crecimiento (Tabla 2) (Mercado-Flores y col., 2003b). Las proteinasas pumAi, pumAe y una aminopeptidasa han sido purificadas y caracterizadas bioquímicamente (Mercado-Flores y col., 2003a, 2004 y 2005), sin embargo aún no se han relacionado con algún gen del genoma de *U. maydis* y se desconoce su función. En ninguna de las condiciones de cultivo probadas se detectó actividad de carboxipeptidasa (Mercado-Flores y col., 2003b).

Tabla 2. Características bioquímicas de las proteasas de *Ustilago maydis*

Actividad proteolítica	Tipo	PM (kDa)	pl	Sustrato	Condiciones de inducción
Proteinasa pumAe (extracelular)	No aspartil proteasa	72-74	5.5	Hemoglobina desnaturalizada	MM con sulfato de amonio Crecimiento estacionario
Proteinasa pumAi (intracelular)	Aspartil-proteasa	35.3-36.6	5.5	Hemoglobina desnaturalizada	Medio completo o mínimo Crecimiento logarítmico
Proteinasa pumBe extracelular				Tipo colágeno (HPA)	MM sulfato de amonio e infusión de maíz. Crecimiento estacionario
Proteinasa pumBi (intracelular)				Tipo colágeno (HPA)	MM sulfato de amonio e infusión de maíz. Crecimiento logarítmico
Aminopeptidasa pumAPEi (intracelular)	Metaloproteasa	114.4 y 58	5.1	Lys-pNA	Medio completo o mínimo Crecimiento logarítmico
Dipeptidil aminopeptidasa pumDAPI (intracelular)	Serín-proteasa		6.9	Ala-Pro-pNA	MM infusión de maíz o prolina. Crecimiento logarítmico y estacionario, respectivamente

Nota: el prefijo pum= proteasa *Ustilago maydis*, MM=medio mínimo; Mercado-Flores y col., 2003a, 2003b, 2004 y 2005

Posteriormente, con la liberación del proyecto de secuenciación genómica de *U. maydis* (Kämper y col., 2006) ha sido posible identificar por homología con los genes codificantes de proteasas de otros hongos, los genes codificantes de proteasas vacuolares putativas de *U. maydis*, lo que ha permitido abordar su estudio desde diferentes puntos de vista, mediante técnicas bioquímicas y moleculares.

Expresión heteróloga de la pumDAPI y una pumAPEi en *Pichia pastoris*

Por homología con los genes codificantes de las dipeptidil aminopeptidasas tipo IV (DPP IV) (*DAP2* y *STE13*) y de las aminopeptidasas (*APE3* y *LAP4*) vacuolares de *S. cerevisiae*, se detectó en el genoma de *U. maydis* el gen *dap2* (codificante de una DPP) y el gen *ape3* (codificante de una APE) (Tabla 3). Estos genes fueron clonados en el vector de expresión pPICZ para *P. pastoris* (Fig. 6), el cual contiene la secuencia del promotor (5'AOX1), del gen codificante de la alcohol oxidasa 1 (*AOX1*) de esta levadura. Este promotor induce la expresión de los genes de interés cuando *P. pastoris* es crecida en metanol, como fuente de carbono. Además contiene una secuencia codificante de seis histidinas (6xHis), las cuales pueden ser fusionadas a la proteína recombinante en el extremo carboxilo-terminal, de tal forma que las proteínas quiméricas pueden ser purificadas por afinidad, al pasar un extracto enzimático crudo por columnas cargadas con un catión metálico (Ni, Co, etc.) o bien ser un blanco antigénico para detectarlas por Western Blot.

Tabla 3. Características teóricas de los genes *dap2* y *ape3* de *Ustilago maydis* y de sus proteínas predichas.

Proteasa putativa	Gen (# de acceso)	Longitud Gen (nt) [Proteína (aa)]	PM (kDa)	Motivos
aminopeptidasa Y ^a	<i>ape3</i> (um06456)	1518 [505]	56	Metalo-proteasa (Zn)
Dipeptidil aminopeptidasa ^b	<i>dap2</i> (um05273)	2946 [981]	108	Soluble Serín-proteasa DPP IV Membranal

^aTamayo-Ordoñez, 2009 ^bJuárez-Montiel, 2007

Dado que las proteínas codificadas por los genes *dap2* y *ape3* actuaron sobre sustratos sintéticos específicos para proteasas se pudo comprobar que estos genes codifican para una DPP y una APE intracelulares, respectivamente (Juárez-Montiel, 2007; Tamayo-Ordoñez, 2009). La DPP recombinante (pumDAPI-rec) actuó preferencialmente sobre Ala-Pro-pNA seguido por Gly-Pro-pNA, lo cual confirma que se trata de una DPP IV (Juárez-Montiel, 2007). Respecto a la APE recombinante (pumAPE3i-rec) podría tratarse de una prolil aminopeptidasa, ya que actúa preferencialmente sobre Pro-pNA (Tamayo-Ordoñez, 2009). Además la pumDAPI-rec se encuentra preferentemente en la fracción membranal (la actividad específica en *P. pastoris* C41 es alrededor de 7 veces más que en la cepa silvestre) y es inhibida con PMSF y pefabloc, que son inhibidores de serín-proteasas. En el caso de la pumAPE3i-rec apenas se detectó 2 veces más actividad en el ELC de la cepa transformante *P. pastoris* C6 que en la cepa silvestre cuando se usó Pro-pNA como sustrato, mientras que con otros aminoacil-pNA como sustratos no se observó diferencia alguna entre estas dos cepas (Juárez-Montiel, 2007; Tamayo-Ordoñez, 2009).

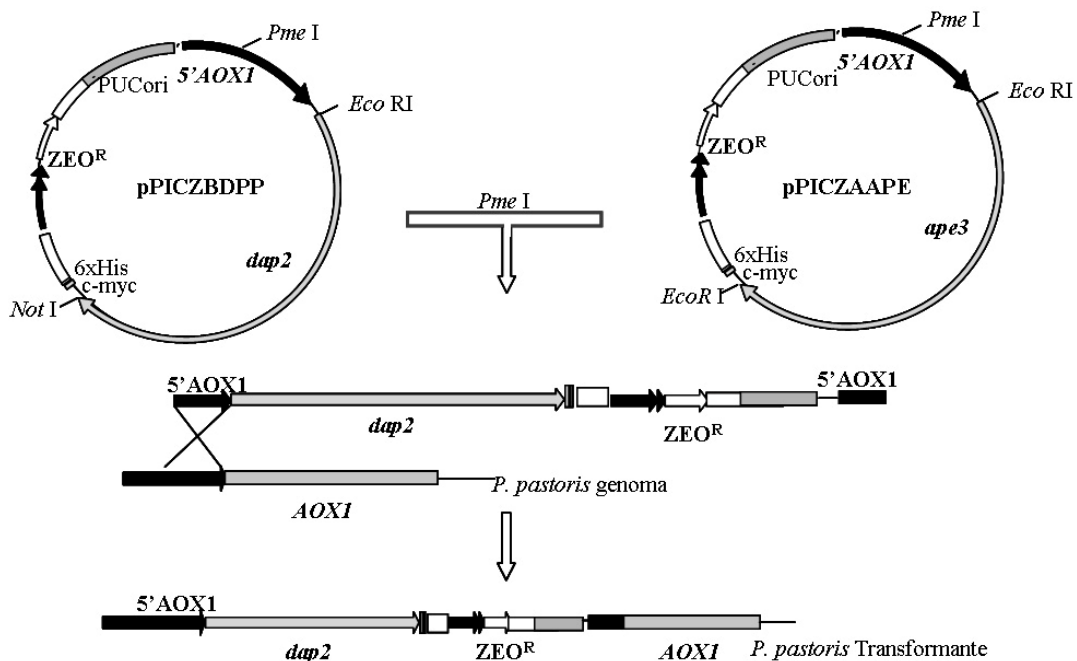


Figura 6. Representación esquemática de las construcciones genéticas y del evento de recombinación homóloga en *P. pastoris*, para la obtención de las proteasas recombinantes pumDAPI-rec y pumAPE3i-rec. *P. pastoris* es transformada con estas construcciones, previamente linealizadas con *Pme*I y las transformantes se seleccionan por su resistencia a zeocina (ZEO^R). El promotor 5'AOX1 permite la inducción de proteínas recombinantes, cuando la cepa es crecida en metanol, como fuente de carbono. La secuencia 6xHis genera la fusión de seis histidinas al extremo carboxilo-terminal de la proteína de interés.

Justificación

En el hongo fitopatógeno y productor del carbón del maíz *Ustilago maydis* ha sido ampliamente estudiados los eventos moleculares de la morfogénesis y la patogenicidad. Por otro lado, dado que el huitlacoche se consume en México desde tiempos precolombinos y actualmente se exporta a otros países, se han generado numerosos estudios acerca de sus bondades como alimento funcional o nutraceutico, varias de las cuales podrían deberse a la presencia del hongo en el maíz.

En otros modelos de estudio se ha descrito la importancia de las proteasas, tanto en la fisiología celular de los organismos como en la generación de compuestos que contribuyen a las características sensoriales y nutrimentales de los alimentos. En particular las proteasas vacuolares se han relacionado principalmente con el recambio proteico y con la maduración post traduccional de otras proteínas.

Debido a que existen evidencias que sugieren la participación de las proteasas vacuolares de *Ustilago maydis* en el ciclo de vida del hongo, el uso de diferentes estrategias para conocer los genes que las codifican, la naturaleza bioquímica de las enzimas codificadas por ellos, su localización y el efecto sobre las características fenotípicas en cepas carentes de proteasas, nos permitirá integrar la información y así conocer el papel o función que desempeñan estas enzimas en el hongo.

Objetivo general

Realizar estudios bioquímicos y moleculares de las proteasas vacuolares de *Ustilago maydis*

Objetivos particulares

- Purificar y caracterizar bioquímicamente las proteasas recombinantes pumDAPI-rec y pumAPE3i-rec, expresadas en *P. pastoris*.
- Generar construcciones genéticas que permitan obtener mutantes de los genes *ape3* y *dap2* en *U. maydis*, para conocer la función y localización de sus proteínas codificadas
- Determinar el perfil proteolítico del huitlacoche y del maíz.

Materiales y Métodos

MICROORGANISMOS

- Cepas haploides de *Ustilago maydis* FB1 (a1b1) y FB2 (a2b2), donadas por la Dra. Banuett de la Universidad de San Francisco, California, EUA.
- Cepa silvestre *P. pastoris* X-33 (Invitrogen, CA, USA)
- *P. pastoris* C41 productora de la pumDAPI-rec
- *P. pastoris* C6 productora de la pumAPE3i-rec
- Células quimiocompetentes de *Escherichia coli* DH10b

MEDIOS DE CULTIVO

Medio rico YEPD: Extracto de levadura al 1%, peptona de gelatina al 2% y dextrosa al 2%.

Medio papa dextrosa con carbón activado (PDA-ca): Extracto de papa al 0.5%, dextrosa al 2%, NaCl al 0.2%, carbón activado al 1.5%, agar al 1.5%.

Medio LB (Luria-Bertani): Bacto-triptona al 1%, extracto de levadura al 0.5% y NaCl al 0.5%.

BMG y BMM: Regulador de fosfato de potasio 100 Mm, pH 6; 1.34% YNB, 4x 10⁻⁵% biotina, 1 % de glicerol o 0.5% metanol.

Los medios de cultivo se esterilizaron a 120°C durante 15 min. Los suplementos nutricionales se esterilizaron por filtración. Los medios sólidos se prepararon adicionando agar a una concentración del 1.5%. Cuando fue necesario se adicionó Zeocina[®] (100 µg/mL) o ampicilina (60 µg/mL).

PLÁSMIDOS

- PCR2.1-TOPO (Invitrogen, CA, USA): Para amplificadores de PCR con adeninas protuberantes, confiere resistencia a ampicilina y kanamicina, además presenta un sistema de selección de colonias blancas (con inserto) y azules (sin inserto). Ligación con topoisomerasa.
- pJET1.2/blunt (Fermentas): Para amplificadores de PCR con extremos romos, confiere resistencia a ampicilina, contiene la secuencia del gen *eco471R* codificante de una enzima de restricción letal, dentro de la cual está el sitio de clonación múltiple, sólo sobreviven las portadoras de inserto. Ligación con T4 ligasa.

Los vectores descritos a continuación fueron donados por El Dr. Felbrügge, de la Universidad de Marburg, Alemania. Estos plásmidos presentan dos sitios de corte diferentes para la enzima *Sfi*I (GGCCNNNNNGGCC) (Fig. 8) y fueron clonados en *E. coli* DH10b incubada en medio LB con ampicilina y confirmados por perfil de restricción cada vez que fue necesario.

- pMF1-h (261): contiene en un cassette el gen *hph* (higromicina fosfotrasferasa) que confiere resistencia a higromicina (Hyg^R),
- pMF2-1h (315): además del cassette de resistencia a higromicina contiene la secuencia *crg1*Promoter, que es el promotor del gen *cgr1* (carbon-source regulated), inducible con L-arabinosa y reprimible con D-glucosa o D-Xilosa, cuando se utilizan como fuente de carbono.
- pMF5-1h (317): además del cassette de resistencia a higromicina contiene la secuencia del gen *egfp*, codificante de la proteína verde fluorescente.
- pMF5-2h (890): además del cassette de resistencia a higromicina contienen la secuencia del gen *mRFP*, codificante de la proteína roja fluorescente.

TÉCNICAS BIOQUÍMICAS

Inducción de las proteasas recombinantes pumDAPI-rec y pumAPE3i-rec

Las transformantes de *P. pastoris* se inocularon en el medio BMG y se incubaron a 28°C hasta alcanzar una OD₆₀₀=2; posteriormente se centrifugaron a 3 000 x g y se inocularon en medio BMM ajustando a una OD₆₀₀=1. Los cultivos de *P. pastoris* C41 (pumDAPI-rec) y C6 (pumAPE3i-rec) fueron cosechados a las 48 y 72 h, respectivamente.

Ensayos enzimáticos

En microtubos se mezclaron: 100 µL de extractos enzimáticos, 120 µl de agua destilada, 250 µl de Tris-HCl 10 mM pH 7.0 y 30 µl de sustrato Ala-Pro-pNA o bien Pro-pNA o Lys-pNA 10mM para evidenciar la actividad de la pumDAPI-rec y de la pumAPE3i-rec, respectivamente. La mezcla se incubó a 37°C durante 20 min y la reacción se paró adicionando 500 µL de sulfato de zinc al 0.5% y 100 µL de hidróxido de bario al 7.5%. Al término de la incubación

se centrifugó a 10 000 x *g* por 10 min, las lecturas se hicieron a 405 nm y se interpolaron en una curva tipo de p-nitroanilina (Hirsh y col., 1988).

Una unidad de actividad enzimática se define como la cantidad de enzima necesaria para liberar 1 μmol de p-nitroanilina por minuto, bajo las condiciones de ensayo.

La determinación de proteína se realizó según al método de Bradford (1976) o por el método modificado de Lowry (con SDS) (Lowry y col., 1951).

Fraccionamiento celular.

El paquete celular se lavó dos veces con agua destilada fría y por cada gramo de peso húmedo se adicionaron: 2.5 mL de regulador de rompimiento (NaH_2PO_4 50 mM, NaCl 300 mM e Imidazol 10 mM, pH 8) y 7g de perlas de vidrio (ballotini 0.45-0.05 mm). Las células se rompieron agitando vigorosamente durante 20 periodos de 1 min, con 1 min de descanso en hielo. A continuación el extracto crudo se centrifugó a 12 000 x *g* durante 10 min y se recuperó el sobrenadante (extracto libre de células-ELC), el cual fue posteriormente ultracentrifugado a 100 000 x *g* por 90 min, para recuperar en el sobrenadante (fracción soluble) mientras que la pastilla fue resuspendida en el regulador de rompimiento con detergente al 1% y centrifugada a 12 000 x *g* durante 30 min, para recuperar el sobrenadante (fracción membranal).

Extracción de proteínas de la fracción de membrana de *P. pastoris* con diferentes detergentes

La extracción de las membranas de *P. pastoris* se realizó como se describe en el apartado anterior, posteriormente se resuspendieron en el regulador de rompimiento añadiendo alguno de estos tres detergentes, a una concentración final del 1%: n-octil β -D-glucopiranosido (ICN Biomedicals Inc. CA, USA), IGEPAL CA-630 (SIGMA) o zwittergent 3-14 (BACHEM Bioscience Inc., USA) con asolectina al 0.1% (Sigma) como protector. Una vez resuspendida, la pastilla fue centrifugada a 12 000 x *g* durante 30 min, para recuperar el sobrenadante (fracción membranal).

Purificación de las proteasas recombinantes en columna de níquel

Las fracciones citoplásmicas y membranal de *P. pastoris* C6 y C41, respectivamente, fueron cargadas en una columna de níquel, ProBondTMNickel-Chelatin Resin (Invitrogen, CA, USA). La elución de las proteínas recombinantes se realizó de acuerdo a las instrucciones del proveedor, con imidazol 250 mM.

SDS-PAGE y PAGE nativo

Las muestras fueron analizadas por SDS-PAGE según lo descrito por Laemmli (1970). El caso de la pumDAPI-rec, en PAGE nativo (García-Alvarez y col., 1985), el cual fue revelado con Ala-Pro β NA y Fast Garnet (Bachem and Sigma).

Dot-Blot

Usando un Hibridot Manifold (BRL) se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa de 0.45 μ m diferentes cantidades de proteína de las fracciones citoplásmica y membranal de *P. pastoris* C6 y C41 y X-33. Además se utilizó como testigo positivo el ELC de una cepa de *Saccharomyces cerevisiae* que expresa una proteína de choque térmico fusionada con la secuencia 6xHis en el extremo carboxilo-terminal. Una vez transferidas las muestras, la membrana se secó y posteriormente se bloqueó en regulador TTBS pH 7.5 (Tris-base 20 mM, NaCl 150 mM y Tween 20 al 0.05%) con albúmina al 2%, durante 90 min a temperatura ambiente y en agitación. Posteriormente se realizaron cinco lavados con TTBS durante 10 min en agitación, se retiró el TTBS del último lavado y se añadió el anticuerpo anti-His(C-term)-HRP (Invitrogen CA, USA) diluido 1:1000 en TTBS. La hibridación se realizó a 37°C durante 14h. Finalmente, el anticuerpo se retiró, se realizaron lavados como se mencionó anteriormente y se añadió TTBS conteniendo 0.5 mg/mL de diaminobenzidina (Sigma) y 3 μ L de peróxido de hidrógeno al 30%. La membrana se incubó hasta la aparición de manchas rojas y la reacción se paró con agua destilada.

TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR

Extracción y cuantificación ácidos nucleicos.

Para obtener el DNA genómico de *U. maydis* y de *P. pastoris*, se utilizó el método descrito por Ausbel y col. 1989, la concentración se determinó espectrofotométricamente. Una unidad de A_{260} equivale a 50 $\mu\text{g/mL}$ de DNA de doble cadena. Una preparación pura de ácidos nucleicos deberá tener una relación A_{260}/A_{280} mínima de 1.8.

Clonación de los amplificados en el vector pCR2.1-TOPO ó pJET1.2./blunt

Diseño de iniciadores

Los oligonucleótidos se diseñaron a partir de la secuencia de los ORF's y de las regiones corriente arriba (5' región) y abajo (3' región) de los genes *dap2* y *ape3* para obtener amplificados de aproximadamente 1000 pb, que presentaran la secuencia de reconocimiento de la enzima de restricción *Sfi* I (GGCCNNNNNGGCC), cuya secuencia depende del cassette del tipo de vector pMF utilizado y es necesaria para la integración de los extremos al cassette (Fig. 7).

Condiciones de amplificación

Los amplificados de aproximadamente 1000 pb se obtuvieron según las siguientes condiciones: Regulador de PCR 1X, MgCl_2 2 mM, desoxiribonucleósidos trifosfatados a concentración de 400 μM cada uno, cada primer a concentración de 0.4 μM , 3 μL de DNA, y 2 U de *Taq* polymerasa. Todas las reacciones se llevaron a un volumen final de 25 μL . La condiciones de amplificación incluyeron: desnaturalización inicial por 4 min a 94°C, 35 ciclos de amplificación que consistieron en: 45 s a 94°C, 45 s a 59°C, 1:30 min a 72°C, y una extensión final por 5 min a 72°.

Purificación de los productos de PCR.

La purificación de los productos de PCR se realizó utilizando el equipo de reactivos comerciales Zymoclean Gel DNA Recovery Kit (ZymoResearch, CA. USA).

Ligación de los amplificadores en el vector pCR2.1-TOPO o pJET1.2.

La ligación de los amplificadores con estos vectores se realizó de acuerdo a las instrucciones de los proveedores. El producto de ligación se mezcló con 100 μ L de células competentes de *E. coli* DH10b, la mezcla se incubó en hielo 45 minutos y posteriormente se sometió a choque térmico por 90 segundos a 42°C. Las células se dejaron en hielo 5 minutos, se recuperaron con 500 μ L de caldo LB frío y se incubaron a 37°C por 45 minutos. Después se sembraron en agar LB con ampicilina y se dejaron crecer por 24 h a 37°C. Las transformantes obtenidas se cultivaron en 2 mL de caldo LB con ampicilina. Las construcciones obtenidas fueron denominadas pJET-amplificadorL/R o Topo-amplificadorL/R (Fig. 8).

Clonación de los cassettes de interés, de los vectores pMF, en los vectores pJET-amplificadorL/R o Topo-amplificadorL/R

Aquellas construcciones pJET-amplificadorL/R o Topo-amplificadorL/R en las que los sitios de corte *Sfi*I L y R fueran opuestos se seleccionaron y se buscaron sitios de corte que en combinación con *Sfi*I permitieran liberar los amplificadores L y R, para posteriormente ser ligados con sus respectivos cassettes, previamente liberados de los plásmidos pMF con la enzima *Sfi*I, y regenerar casi por completo al vector pCR2.1-TOPO o pJET1.2 (Fig. 8)

Extracción de DNA plasmídico de *E. coli*.

La extracción de DNA plasmídico se llevó a cabo por el método de lisis alcalina de Birnboim y Doly (1979).

ANÁLISIS COMPARATIVO DE EXPRESIÓN DE PROTEASAS EN HUITLACOQUE Y MAÍZ

Material biológico

Tres diferentes muestras de maíz y huitlacoche fueron compradas en dos mercados locales de México, en el mes de agosto. Dos de las muestras de maíz, (M1 y M2) son de maíz dulce, mientras que la muestra M3 es de maíz cacahuazintle. Las muestras de huitlacoche, H1, H2 y H3, fueron producidas en las respectivas variedades de maíz, antes mencionadas. Las muestras fueron cortadas con bisturí, lavadas tres veces con agua destilada estéril y fría y

usadas inmediatamente para la extracción de RNA y para la obtención de los extractos enzimáticos.

Búsqueda y análisis *in silico* de secuencias aminoacídicas de proteasas vacuolares putativas

Se buscaron las secuencias de genes que codificaran para proteasas vacuolares en otros hongos, depositadas en la base de datos del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) y con éstas se realizó un análisis tipo BLAST en el genoma de *U. maydis* depositado en la base de datos del proyecto de secuenciación genómica del Broad Institute Fungal Genome Initiative (FGI) (http://www.genome.wi.mit.edu/annotation/ustilago_maydis/). Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos así obtenidas fueron analizadas posteriormente para determinar: secuencias motivo (secuencias consenso que representan una actividad, sitio activo, sitio de modificación post-traducciona, etc) con la base de datos Scan (http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_prosite.html). El perfil de hidrofobicidad, regiones transmembranales y punto isoeléctrico (pI) se determinaron con AntheProt 2000 v. 5.2. La probable localización subcelular se predijo utilizando el servidor PSORT (Prediction of protein sorting signal and localization sites in amino acid sequences) disponible en la dirección electrónica <http://www.psort.org/>.

Para los análisis de similitud se llevó a cabo un alineamiento múltiple de las secuencias a analizar con el programa CLUSTAL X v. 1.8 y para construir un árbol de similitud se usó el programa MEGA v. 2.1 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) utilizando el método de agrupamiento de Neighbour-joining y el índice de corrección de Poisson. Para valorarlo estadísticamente se hicieron 1000 aleatorizaciones tipo "bootstrap".

Fraccionamiento celular y ensayos enzimáticos de proteasas

Las muestras de de huitlacoche y maíz fueron lavadas tres veces en agua destilada estéril y fría, resuspendidas en regulador Tris-HCl 0.1 M, pH 7.0 y sometidas a rompimiento mecánico con perlas de vidrio. Las muestras fueron centrifugadas a 12 000 x g durante 10 min para obtener el extracto libre de

células (CFE) y posteriormente éste fue ultracentrifugado a 100 000 x *g* por 90 min, para recuperar en el sobrenadante la fracción soluble y en la pastilla la fracción membranal. Esta última fue resuspendida en el regulador Tris-HCl 0.1 M, pH 7.0 y centrifugada a 12 000 x *g* durante 30 min, para recuperar el sobrenadante, que es la fracción de trabajo.

Las actividades enzimáticas se determinaron según Hirsch y col. (1989), usando diferentes sustratos en función del tipo de proteasa a determinar: hemoglobina ácida desnaturalizada para la actividad de proteinasa ácida (PrA), Hide Powder Azure (HPA) para la proteinasa básica (PrB), Lys-Pro-pNA y Pro-pNA para la aminopeptidasa (APE), Ala-Pro-pNA para la dipeptidil aminopeptidasa (DPP) y N-benzoyl-L-tyrosine-4-nitroanilide (N-Bz-Tyr-4-pNA) para la carboxipeptidasa (CP).

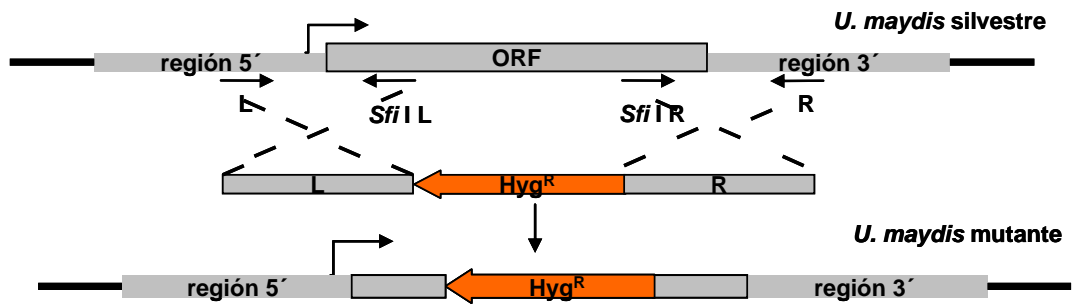
Expresión de genes de proteasas por RT-PCR

La extracción de RNA total de huitlacoche y maíz se realizó por el método descrito por Farrell (Farrell, 1998). El RNA fue tratado con DNAsa I (Invitrogen). La reacción RT para síntesis de cDNA se llevó a cabo con los iniciadores reversos (oligonucleótido dT₁₇, RevintLDAP, um18Sr y 26S2) usando el kit comercial SuperScript RT-PCR System (Invitrogen CA, USA)

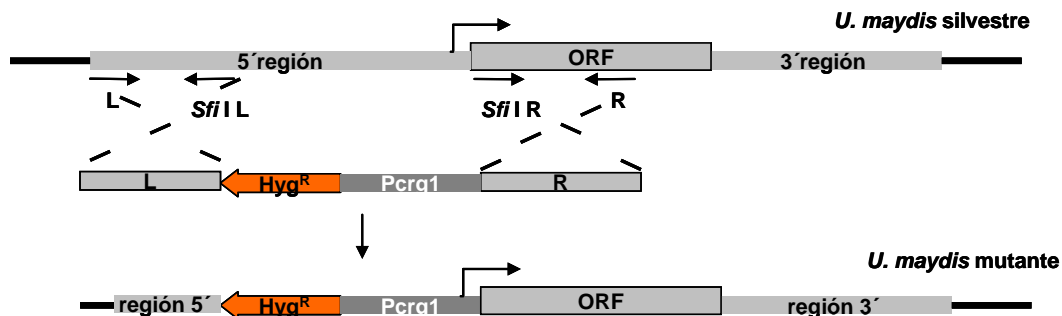
Las determinaciones se hicieron por duplicado. La expresión de los genes de proteasas se normalizó con los niveles del cDNA de 18S rRNA. La intensidad de cada banda amplificada fue medida con SigmaGel v.1 (Jandel Scientific Software USA) para obtener la relación proteasa/18SrRNA. Se calculó el error estándar de la media.

Los DNAs de huitlacoche y maíz se obtuvieron como se indica en el apartado de extracción y cuantificación de ácidos nucleicos.

a) Interrupción de genes



b) Reemplazamiento de la secuencia reguladora de genes por una inducible/reprimible



c) Fusión de proteínas con la proteína verde o roja fluorescente, en el extremo carboxilo-terminal

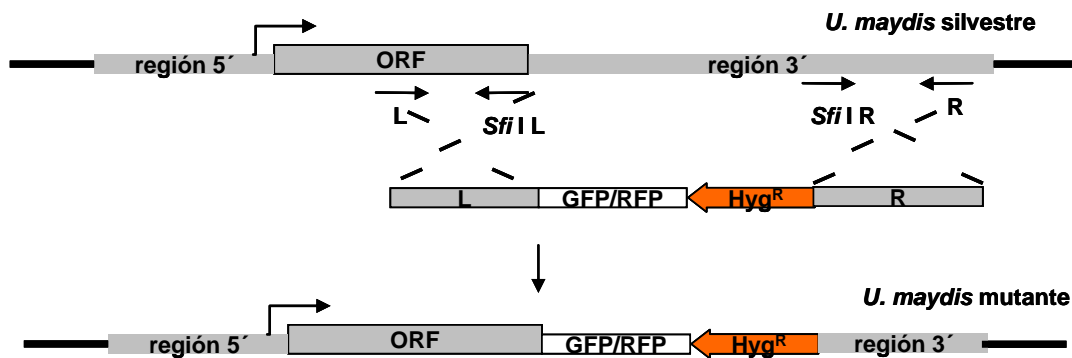


Figura 7. Diseño de iniciadores para la generación de tres diferentes tipos de mutantes de *U. maydis*. Las flechas negras indican la localización de los iniciadores sobre el genoma de *U. maydis* y se indica cual lleva el sitio de corte *SfiI*. Los amplificadores obtenidos con estos oligonucleótidos están representados por los rectángulos grises L y R, izquierdo y derecho, respectivamente, los cuales son los extremos flanqueantes de a) el cassette de resistencia a higromicina-Hyg^R (flecha roja), b) el cassette de Hyg^R más el promotor Pcrg1 (rectángulo gris con flecha negra) y c) el cassette de Hyg^R más las proteínas verde o rojas fluorescentes, GFP y RFP, respectivamente (rectángulo blanco), los cuales se integran al genoma de *U. maydis* por recombinación homóloga.

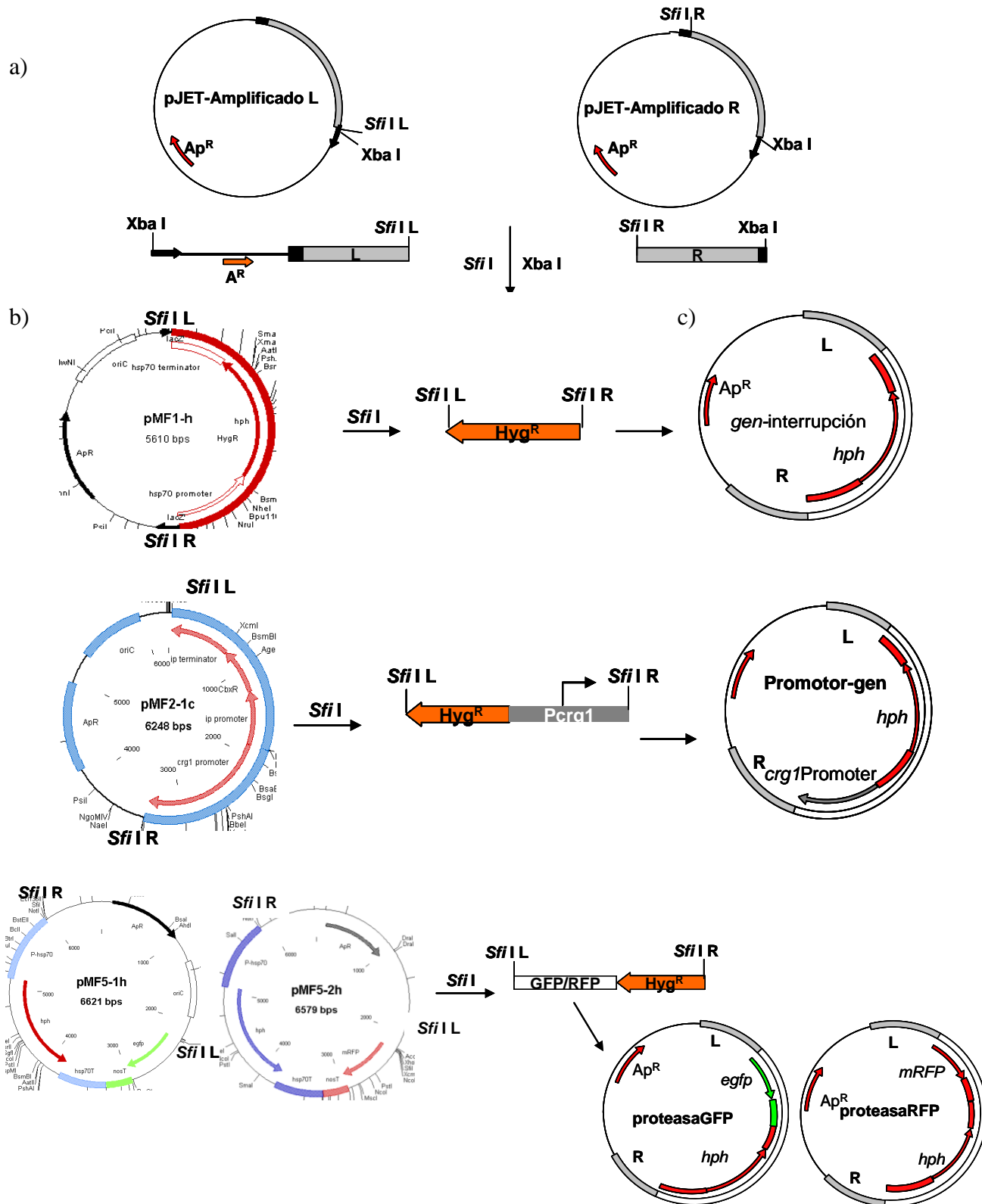


Figura 8. Representación esquemática de los plásmidos usados, la estrategia de clonación y de los plásmidos obtenidos, para la generación de mutantes de *U. maydis*. a) amplificados clonados en el vector pJET1.2/blunt (o PCR2.1-TOPO) los cuales son cortados con *Sfi*I y otra enzima de restricción. b) plásmidos pMF los cuales contienen un cassette de resistencia a higromicina más la secuencia del promotor *Pcrg1* o la secuencia de la GFP o RFP. Estas secuencias que son liberadas del vector con la enzima de restricción *Sfi*I y ligadas con los vectores pJET-amplificado L y R y c) plásmidos obtenidos de la ligación antes descrita y que servirán para generar las mutantes de *U. maydis*.

Resultados

I. CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA PARCIAL DE LAS PROTEASAS RECOMBINANTES

a) pumDA_{Pi}-rec (Dipeptidil aminopeptidasa intracelular recombinante de *U. maydis*).

Para obtener los extractos enzimáticos de la cepa de *P. pastoris* C41, la inducción con metanol se mantuvo durante 48 h, además un cultivo de *P. pastoris* X-33 fue mantenido en esta misma condición y se utilizó como testigo negativo (Juárez-Montiel, 2007). Por un lado se obtuvo el DNA geonómico de ambas cepas y fueron confirmadas por PCR, utilizando los oligonucleótidos para amplificar el ORF del gen *dap2* de 2946 pb (Fig. 9). En el caso de *P. pastoris* X-33 no se obtuvo amplificado, mientras que en la cepa transformante C41 se obtuvo un amplificado del tamaño esperado para el gen *dap2* y del mismo tamaño que el obtenido con *U. maydis*.

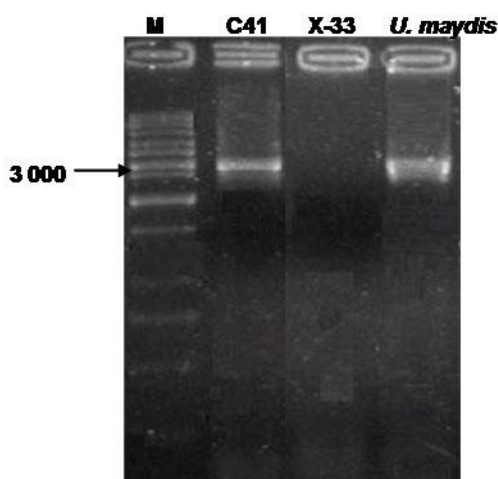


Figura 9. Amplificación del gen *dap2* a partir de DNA de *P. pastoris* C41 (transformada con la construcción genética pPICZBDPP). DNA geonómico de *P. pastoris* X-33 y de *U. maydis* FB1 fueron usados como testigo negativo y positivo, respectivamente.

Una vez confirmada la cepa, se obtuvieron los extractos enzimáticos en la forma indica en la sección de materiales y métodos. El ELC es el sobrenadante después de centrifugar a las células rotas a 12 000 x g; la fracción soluble es el sobrenadante obtenido después de ultra centrifugar el ELC a 100 000 x g y mientras que las membranas se obtienen después de resuspender en regulador a la pastilla obtenida en la ultra centrifugación.

Se determinó la actividad específica de los extractos enzimáticos del ELC, la fracción soluble y en las membranas de las cepas C41 y X-33, usando como sustrato Ala-Pro-pNA, que previamente fue reportado como el sustrato preferencial para esta enzima (Juárez-Montiel, 2007). En el ELC de la cepa recombinante C41 se observó un aumento en esta actividad de alrededor de tres veces en comparación con el ELC de la cepa silvestre X-33, mientras que en la fracción de membrana el aumento fue de ocho veces con respecto a la cepa silvestre (Fig. 10a). El análisis teórico de la proteína deducida del gen *dap2* presenta una α -hélice transmembranal en los primeros 30 aminoácidos del extremo amino-terminal (Juárez-Montiel, 2007), lo que sugeriría que se trata de una proteína de membrana.

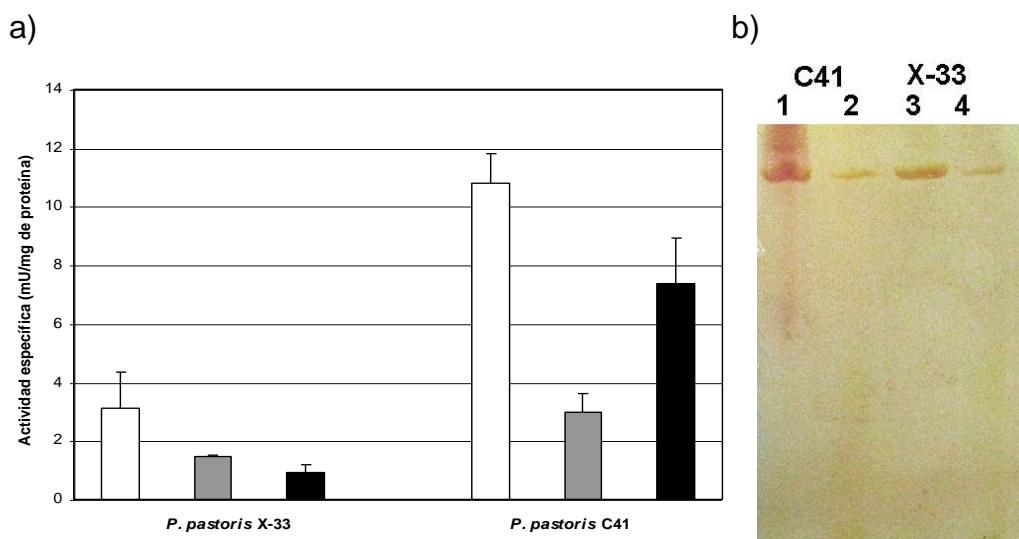


Figura 10. Actividad de la pumDAPI-rec en extractos enzimáticos de *P. pastoris* C-41 y X-33. a) Actividad específica en: el ELC (barras blancas), la fracción soluble (barras grises) y las membranas (barras negras), usando como sustrato Ala-Pro-pNA. Barras de error indican DE (n=6). b) PAGE nativo al 7.5%, de las membranas (1 y 3) y la fracción soluble (2 y 4) revelado con Fast-Garnet y Ala-Pro- β NA. Se cargaron 65 μ g de proteína.

Las fracciones soluble y de membrana de las cepas C41 y X-33 fueron sometidas a electroforesis nativa tipo PAGE, los cuales fueron revelados como se indica en materiales y métodos. De esta manera se puso de manifiesto la actividad de DPP en la fracción soluble de las dos cepas. Además la cepa recombinante presenta una banda con más actividad en las membranas en comparación con la silvestre y en ambas cepas se detectó actividad en la

fracción soluble (Fig. 10b). Sin embargo en todos los casos las bandas migraron a la misma distancia.

Para purificar la pumDAPI-rec las membranas de la cepa C41 de *P. pastoris*, fueron pasadas a través de la columna de níquel como se describe en materiales y métodos. Las fracciones eluidas mostraron un aumento de actividad específica de alrededor de tres veces con respecto al extracto libre de células (Tabla 4). Estas fracciones se colectaron y se determinó la afinidad por sustrato, el efecto de inhibidores y el punto isoeléctrico (pI) de la proteína.

Tabla 4. Actividad específica de las diferentes fracciones obtenidos después de pasar la fracción de membrana de *Pichia pastoris* C41 a través de una columna de níquel.

Fracción	Actividad específica (mU/mg de proteína)
Membrana	54.17±5.25
FT	28.64±10.17
L5	23.78±7.29
E1	70.46±4.89
E3	118.04±18.35
E5	173.53±7.16
E7	126.86±17.6

FT-No absorbida a la columna, L5-5^o lavado, imidazol 40 mM, E- Elución con imidazol 250 mM

El pI de esta proteína fue de 6.9 y presentó actividad preferencial sobre Ala-Pro-PNA, seguido de Gly-Pro y Ala-Ala-pNA (Tabla 5), lo cual sugiere que esta proteína es una DPP tipo IV, enzimas que tienen preferencia por sustratos X-Pro, donde X-puede ser cualquier aminoácido (Cunningham y O'Connor, 1997). Además fue inhibida específicamente por PMSF y pefabloc, inhibidores de serín-proteasas (Tabla 6)

Por otro lado, estas mismas fracciones fueron analizadas por SDS-PAGE, sin embargo no se pudo observar una banda de 113 kDa (la banda diferencial), que correspondería al PM teórico para esta proteína, si se considera únicamente la secuencia de aminoácidos.

Con el fin de mejorar los rendimientos de la purificación de esta proteína recombinante, las fracciones de membrana de la cepa C41 fueron

resuspendidas en regulador con alguno de los tres detergentes a una concentración final del 1% y se determinó la actividad específica de la pumDAPI-rec.

Tabla 5. Actividad relativa de la proteína recombinante pumDAPI-rec sobre diferentes sustratos específicos (p-nitroanilida derivados).

Sustrato	Actividad Relativa ^a
Ala-Pro-pNA	100.0
Gly-Pro-pNA	16.0
Gly-Arg-pNA	12.6
Gly-Phen-pNA	8.0
Ala-Ala-pNA	15.6
Pro-pNA	0.0

^a Expresado en porcentaje de actividad. Hidrólisis con Ala-Pro-pNA se le se asignó un valor del 100%. Nota: La dipeptidil aminopeptidasa de *P. pastoris* X-33 (WT) actúa preferentemente sobre Gly-Arg-pNA.

Tabla 6. Efecto de diferentes inhibidores de proteasas sobre la proteasa recombinante pumDAPI-rec

Inhibidor	Concentración	Actividad Relativa ^a
Bestatina	100 µM	93.0
	250 µM	68.0
Pepstatina A	5 µM	101.0
	25 µM	131.0
Leupeptina	1 µM	98.0
	10 µM	86.0
E64	10 µM	101.0
	50 µM	84.0
EDTA-Na ₂	1 mM	94.0
	10 mM	74.0
PMSF	1 mM	8.4
	5 mM	0.0
Pefabloc	1 mM	35.0
	5 mM	16.4

^a Expresado en porcentaje de actividad. Hidrólisis con Ala-Pro-pNA se le se asignó un valor del 100%. Nota: La dipeptidil aminopeptidasa de *P. pastoris* X-33 (WT) actúa preferentemente sobre Gly-Arg-pNA.

La actividad específica de las membranas disueltas con swittergent 3-14 más asolectina aumentó 10 veces, mientras que con n-octyl-β-D-

glucopiranósido el aumento fue de 4.5 veces mayor que cuando fueron disueltas únicamente con el regulador (sin detergente). Además utilizando swittergent 3-14 y n-octyl- β -D-glucopiranósido se consiguieron valores de purificación de alrededor de 7 y 3 veces, respectivamente, en comparación con el ELC (Fig. 11).

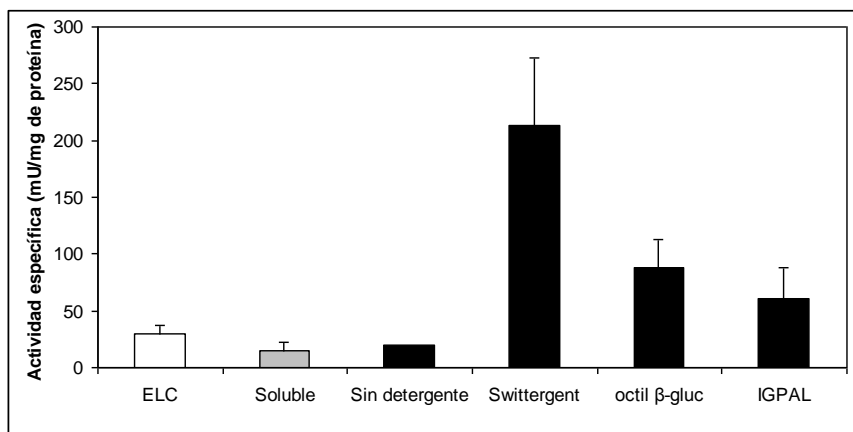


Figura 11. Actividad específica pumDAPI-rec, en las membranas de *P. pastoris* tratada con tres diferentes detergentes, usando como sustrato Ala-Pro-pNA. ELC (barras blancas), fracción soluble (barras grises) y membranas (barras negras). Barras de error indican DE (n=3).

Los extractos de la fracción soluble y de las membranas de las cepas C41 y X-33, tratadas como previamente se indicó, fueron analizados por SDS-PAGE (Fig. 12). En la fracción membranal de *P. pastoris* C41 se observó una banda de 123 kDa, que podría corresponder a la pumDAPI-rec, si se considera que esta banda no se observa en la misma fracción en la cepa silvestre y que el PM teórico de esta proteína es de 113 kDa, sin considerar posibles mecanismos de maduración post-traducciona. Además en la fracción de membrana de ambas cepas también se favorece una banda de 80 kDa que podría ser la AOX1, que es de 73 kDa y se encuentra en peroxisomas(Koutz y col., 1989), que sedimentan con la ultra centrifugación.

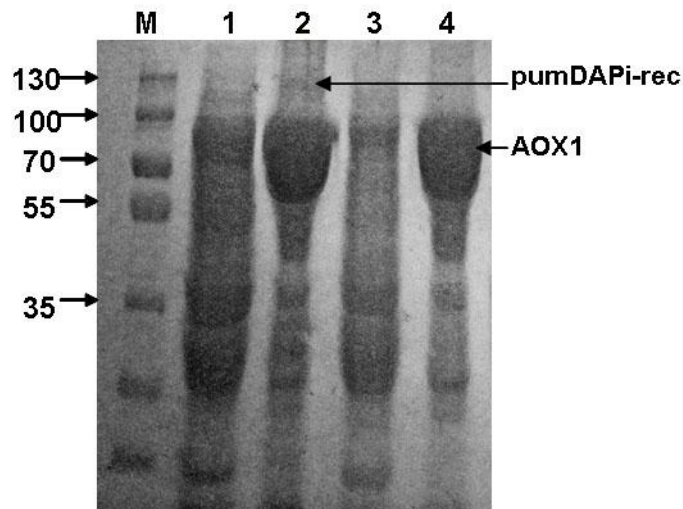


Figura 12. Análisis de la fracción soluble y de las membranas de *P. pastoris* X-33 y C41 por SDS-PAGE. 1, 3) fracciones solubles de *P. pastoris* C41 y X-33; 2, 4) membranas de *P. pastoris* C41, X-33, respectivamente.

Por otro lado el vector recombinante pPICZBDPP (Fig. 6) fue secuenciado y se pudo comprobar que la secuencia del gen *dap2* está en pauta con las secuencia 6xHis. Por otro lado, se realizaron ensayos de identificación con el anticuerpo anti-His(C-term)-HRP, que reconoce las 6xHis del extremo carboxilo-terminal de proteínas de fusión y resultó ser positiva con el ELC y las membranas de la cepa transformante C41. El ELC de *P. pastoris* X-33 no fue reconocido con el anticuerpo (Fig. 13). En esta prueba se incluyeron dos testigos más, el ELC de una cepa de *S. cerevisiae* que expresa una proteína de choque térmico y que también contiene una secuencia 6xHis en el extremo carboxilo-terminal (como testigo positivo) y el ELC de la misma cepa C41, pero obtenido usando inhibidores de proteasas, ya que existe la posibilidad de auto procesamiento.

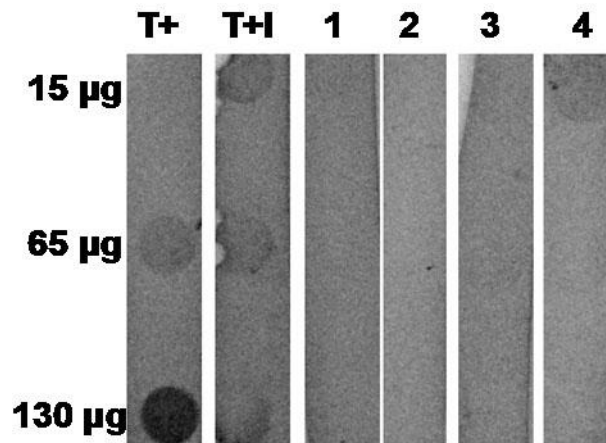


Figura 13. Identificación de el ELC de *P. pastoris* X-33 y C41 con el anticuerpo anti-His(C-term)-HRP. Como control positivo se usó un ELC, de una cepa de *S. cerevisiae* que expresa una proteína fusionada a seis histidinas en el extremo carboxilo-terminal con y sin inhibidores (T+ y T+I, respectivamente), 1 y 2) *P. pastoris* X-33, con y sin inhibidores 3 y 4) *P. pastoris* C41 con y sin inhibidores, respectivamente.

b) pumAPE3i-rec (Aminopeptidasa recombinante intracelular recombinante de *U. maydis*).

Las cepas de *P. pastoris* C6 y X-33 fueron cosechadas después de haber sido inducidas en metanol durante 72 h, tiempo en el que se alcanzó la máxima acumulación de la proteína recombinante (Tamayo-Ordoñez, 2007). Se obtuvo el DNA geonómico de ambas cepas y la presencia del gen *ape3* de 1 500 pb fue confirmada por PCR, usando iniciadores específicos. En la cepa transformante C6 y *U. maydis* FB1, se obtuvo amplificado, mientras que en la cepa silvestre de *P. pastoris* no (Fig. 14).

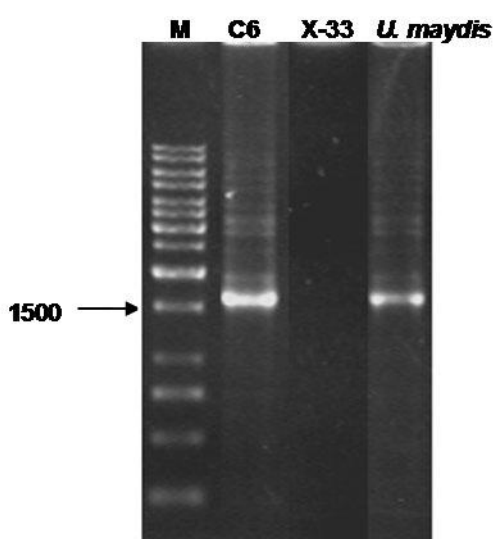


Figura 14. Amplificación del gen *ape3* a partir de DNA de *P. pastoris* C6 (transformada con el plásmido pPICZAPE). Se usó el DNA geonómico de *P. pastoris* X-33 y de *U. maydis* FB1 como testigos negativo y positivo, respectivamente.

Posteriormente se obtuvieron los extractos enzimáticos (ELC, la fracción soluble y las membranas) de ambas cepas y se determinó la actividad específica utilizando dos sustratos Lys-pNA y Pro-PNA (Fig. 15a y b). La cepa transformante sólo presentó el doble de actividad en comparación con la cepa silvestre X-33 en las tres fracciones. La mayor actividad detectada en la fracción soluble y la predicción teórica de la proteína por el gen *ape3*, de que no presenta regiones transmembranales, (Tamayo-Ordoñez, 2009) sugieren que la proteína recombinante pumAPE3i-rec es soluble.

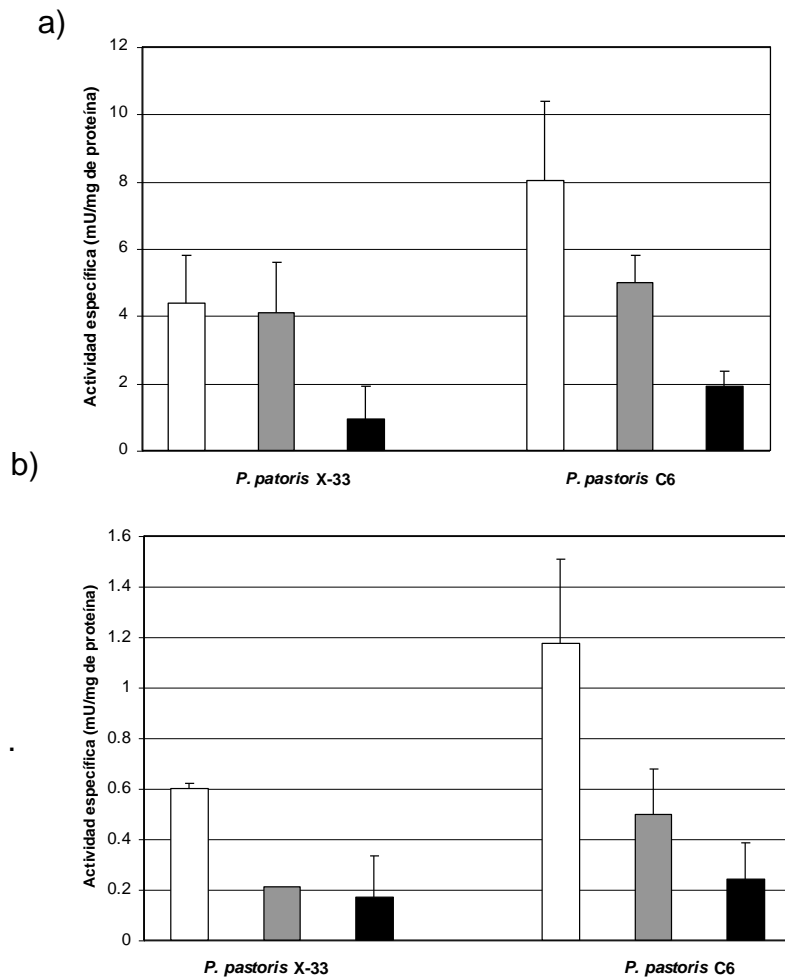


Figura 15. Actividad específica pumAPE3i-rec en extractos enzimáticos de *P. pastoris*. a) actividad de la pumAPE3i-rec contra Lys-pNA y b) contra Pro-pNA en: ELC (barras blancas), fracción soluble (barras grises) y membranal (barras negras). Barras de error indican DE (n=6).

Por otro lado el corrimiento de los extractos enzimáticos en geles desnaturizantes no mostró una banda del tamaño esperado (60 kDa, considerando sólo la secuencia primaria de aminoácidos) en el caso de la cepa recombinante, en ninguna de las tres fracciones (Fig. 16), lo cual parece concordar con la pobre actividad específica de los diferentes extractos de esta misma cepa en comparación con la cepa silvestre.

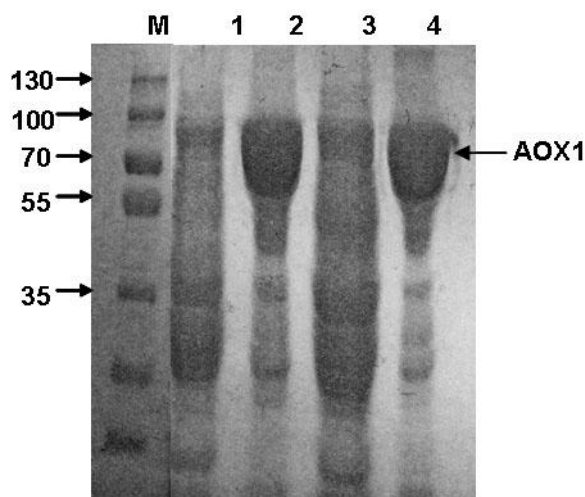


Figura 16. Análisis de las fracciones citoplásmicas y de membrana de *P. pastoris* X-33 y C6 por SDS-PAGE. 1, 3) fracciones citoplásmicas de *P. pastoris* X-33 y C6; 2, 4) fracciones de membrana de *P. pastoris* X-33 y C6, respectivamente.

Posteriormente, el ELC de la cepa recombinante fue pasado a través de la columna de níquel como se describe en materiales y métodos. A pesar de que la actividad específica de las fracciones eluidas de la cepa transformante aumentaba alrededor de 1.5 veces con respecto al ELC, al ser analizadas por SDS-PAGE no se observaban bandas en los pesos moleculares esperados (datos no mostrados).

Con el fin de descartar que el sistema de purificación no funcionara debido a que la proteína recombinante y las seis histidinas (6xHis) no estuvieran en pauta, el vector pPICZAAPE (Fig. 6) fue secuenciado y no se encontraron errores en la pauta de lectura. Además los ensayos de identificación con el anticuerpo anti-His(C-term)-HRP, que reconoce las 6xHis del extremo carboxilo-terminal de proteínas de fusión resultó ser positivo cuando se probó con el ELC de la cepa transformante C6 y negativo con el ELC de *P. pastoris* X-33 no hibridó (Fig. 17). En esta prueba, y de igual manera que se hizo con la proteína mencionada anteriormente, se incluyeron dos testigos más, el ELC de una cepa de *S. cerevisiae* que expresa una proteína de choque térmico y que también contiene una secuencia 6xHis en el extremo carboxilo-terminal (como testigo positivo) y el ELC obtenido usando inhibidor de proteasas de la cepa C6.

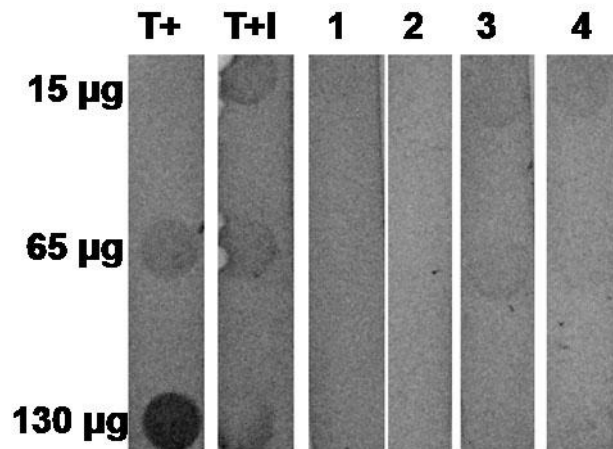


Figura 17. Identificación de el ELC de *P. pastoris* X-33 y C6 con el anticuerpo anti-His(C-term)-HRP. Como control positivo se usó un ELC, de una cepa de *S. cerevisiae* que expresa una proteína con seis histidinas en el extremo carboxilo-terminal con y sin inhibidores (T+ y T+I, respectivamente), 1 y 2) *P. pastoris* X-33, con y sin inhibidores 3 y 4) *P. pastoris* C6 con y sin inhibidores, respectivamente.

II. OBTENCIÓN DE CONSTRUCCIONES PARA GENERAR CEPAS MUTANTES DE *Ustilago maydis*

Clonación de los amplificados en el vector pCR2.1-TOPO o pJET1.2/blunt

Se diseñaron iniciadores, de acuerdo a lo indicado en materiales y métodos para obtener mutantes de *U. maydis* de los genes *dap2* y *ape3*, de tal forma que: 1) sean interrumpidos 2) estén bajo la regulación del promotor del gen *crg1* (Pcrg1), que es regulado por la fuente de carbono y 3) sean fusionados en su extremo carboxilo-terminal a las proteínas verde o roja fluorescentes (Tablas 7 y 8) .

Tabla 7. Características de los iniciadores y sus amplificados, para la generación de mutantes del gen *dap2* de *Ustilago maydis*

Iniciador	Secuencia	Tm (°C)	Amplificado	Nombre	Tamaño (pb)
DapderintL ^a	GTGAGTCGTGAGTCGTGAATCAC	59.5	DIL		1079
RevintLDAP ^a	<u>TTCGGCCATCTAGGCC</u> CTTGGGCGAAAGTG TTCCAGC	59.5			
FwdIntRDAP ^a	<u>TTCGGCCACTCAGGCC</u> GGGACAGAAGTGCG TGGTTC	59.5	DIR		1024
DaprevintR ^a	GGGACAGAAGTGCCTGGTTC	59.5			
DapderproL ^b	CTAGCGGGCAAAGTACGCC	59.5	DPL		984
DAPPROREVL ^b	<u>TTCGGCCATCTAGGCC</u> CGCGTTCGATATCGT CAAGGC	59.5			
FwdProRDAP1 ^b	<u>TGAGGCCTGAGTGGCC</u> ATGGCGGACACATG CCGAG	59.5	DPR		1312
DaprevproR ^b	GTCCGGTACAGCGTTGAAGATTG				
DapderfusL ^c	CGATCACCGACGTCTCGAAAC	59.5	DFL		1072
DaprevFusL ^c	<u>ATTTGGCCCGCGTTGGCC</u> CTCTCTACGGAA TTATGCAGCGC				
FwdFusRDAP ^c	<u>TGAGGCCTGAGTGGCC</u> CGCACTGACCCCGCA AAGATC	59.5	DFR		1079
DaprevFusR ^c	CGCCAAGGAGACCACGAAAAAG	59.5			

Nota: El sitio de corte *Sfi* I está subrayado

^aoligonucleótidos usados para amplificar los extremos derecho (R) e izquierdo (L) para interrupción, ^b para reemplazar la región reguladora endógena por el promotor Pcrg1 y ^c para

generar proteínas de fusión con las proteínas verde o roja fluorescente' Un nucleótido del codón de paro fue eliminado para mantener la pauta de lectura.

Tabla 8. Características de los iniciadores y sus amplificados, para la generación de mutantes del gen *ape3* de *Ustilago maydis*

Iniciador	Secuencia	T _m (°C)	Amplificado (pb)	
			Nombre	Tamaño (pb)
ApederintL ^a	GGCGAGGTCGCCGTAAG	59.5	AIL	
RevintLAPE3 ^a	<u>TTCGGCCATCTAGGCCCTCGGAAGAGTGT</u> TGAGCGTAG	59.5		798
FwdintRAPE3 ^a	<u>TGAGGCCTGAGTGGCCCGCTTCGCCCAAC</u> TACGTAC	59.5	AIR	1041
ApeRevIntR ^a	GACGATCTCGCATTGGTGAGG	59.5		
ApederFusL ^c	CAAAGCGGCAGCGGTGCTG	59.5	AFL	
AperevFusL ^c	<u>ATTCGGCCGCGTTGGCCTTGATGAGCGC</u> CAGGTCCG	59.5		1005
FwdFusRAPE3 ^c	<u>TGAGGCCTGAGTGGCCGACGACGATCCG</u> CGTTTCTC	59.5	AFL	947
AperevFusR ^c	CAAGACGCGGTGGAGCTATC	59.5		

Nota: El sitio de corte *Sfi*I está subrayado

^aoligonucleótidos usados para amplificar los extremos derecho (R) e izquierdo (L) para interrupción, ^b para reemplazar la región reguladora endógena por el promotor *Pcrg1* y ^c para generar proteínas de fusión con las proteínas verde o roja fluorescente' Un nucleótido del codón de paro fue eliminado para mantener la pauta de lectura.

Con los iniciadores diseñados se obtuvieron amplificados por PCR de los tamaños esperados para los genes *dap2* y *ape3*. Estos amplificados fueron purificados y clonados en los vectores pCR2.1-TOPO o pJET1.2/blunt, como se indica en materiales y métodos, para generar las construcciones pJET o TOPO-amplificado L/R (Fig. 8). Las construcciones fueron confirmadas por su perfil de restricción (Tabla 9) y por secuenciación (Anexo).

Utilizando estas construcciones genéticas se siguieron dos estrategias para obtener la construcción final que será utilizada para la integración por recombinar homológamente en el genoma de *U. maydis*:

1. Los extremos L y R previamente clonados son liberados con *Sfi*I y otra enzima de restricción que sólo corte en el vector de clonación y el cassette de los vectores pMF es liberado con *Sfi*I. Posteriormente todo es ligado y posteriormente la mezcla de ligación es amplificada por PCR y el producto de

amplificación, es usado directamente para la recombinación homóloga (Kämper, 2004).

Con base en esto los extremos L y R fueron liberados con *SfiI* y *BamHI* de las construcciones TOPO-amplificado y con *SfiI* y *XbaI* para las construcciones pJET-amplificado y los cassettes de los vectores pMF fueron liberados con *SfiI*. Posteriormente cada par L y R fue ligado con su respectivo cassette y la reacción de ligación sometida a PCR con los iniciadores específicos Lderecho y Rreverso (Fig. 18a y b). Con esta estrategia no fue posible obtener amplificadas de los tamaños esperados. Por otro lado se diseñaron iniciadores que permitieran amplificar una parte de los extremos L o R con una parte del cassette, llamados pMFder2 5´GAGGCTCAACGTAGATCACAGG´3 y PMFrev2 5´CAGGCTCTCGCTGAGTTCC´3 (Fig. 18). Sin embargo en todos los casos solo amplificó el extremo más pequeño, aún cuando se probaron polimerasas de alta fidelidad, para obtener amplificadas de más de 12 kpb.

2. En una segunda estrategia, que fue llamada “por clonación”, los extremo flanqueantes L y R son cortados con *SfiI* y con otra enzima, la cual debe permitir que el cassette, previamente liberado con *SfiI*, se inserte entre los extremos L y R y que el resto del vector de clonación de cualquiera de los dos extremos se regenere (Fig. 8) (Brachmann y col., 2004).

En la tabla 8 se indican las enzimas de restricción usadas en combinación con *SfiI* con las que fueron cortados estos plásmidos para insertar el cassette deseado entre los extremos L y R (Fig. 8) y obtener la construcción final para generar las mutantes en *U. maydis*. A pesar de que esta última estrategia parece más larga, en el grupo de trabajo ya se han obtenido algunas construcciones genéticas de esta manera.

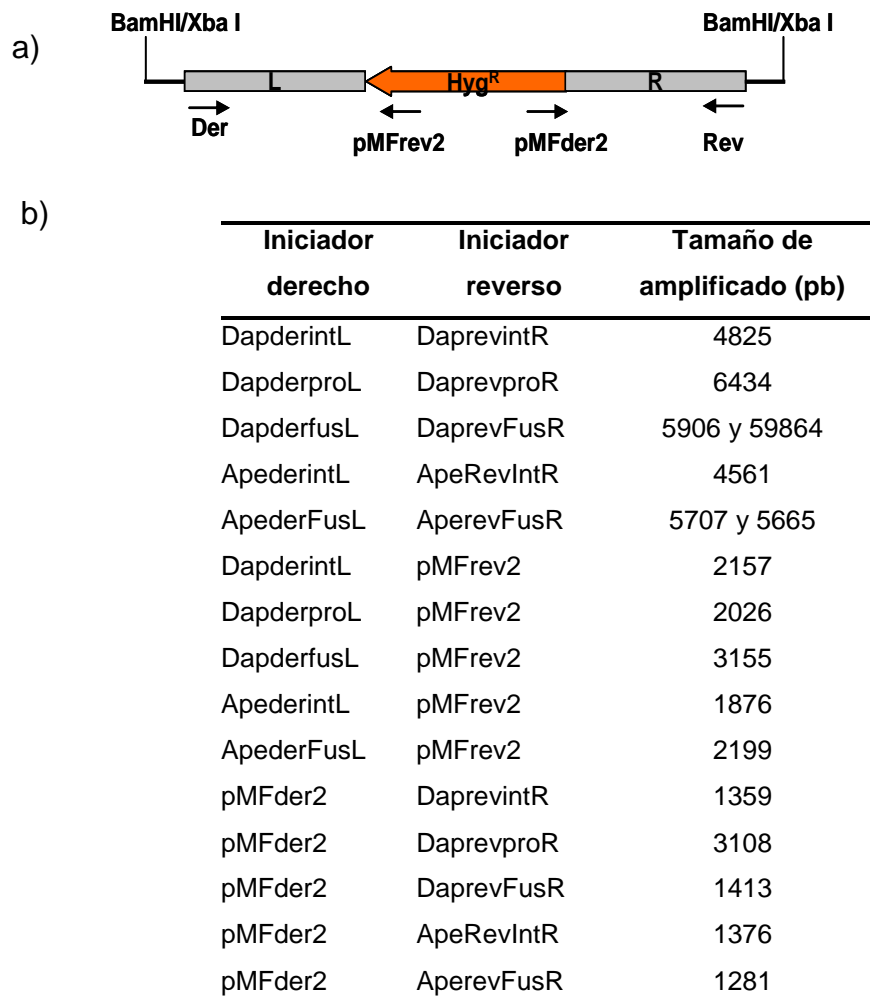


Figura 18. Estrategia general para obtener por PCR las construcciones para generar mutantes de *U. maydis*. a) Localización de los iniciadores utilizados en esta estrategia, b) Tamaños de amplificados esperados para cada par de iniciador utilizado.

Tabla 9. Características de las construcciones obtenidas por la clonación de los amplificados L y R en los vectores pJET1.2/blunt o PCR2.1-TOPO

Construcción	Tamaño (pb)	Enzima	sitios de corte	Fragmentos (pb)	Enzimas para liberar
pJET-AIL	3772	<i>HindIII</i>	777 1422	645, 3127	<i>SfiI-PmeI</i> <i>SfiI-XmnI</i>
		<i>PstI</i>	9 1116	1107, 2665	
		<i>SfiI</i>	1161	3772	
		<i>XbaI</i>	643 1175	532, 3240	
		<i>XhoI</i>	352 537 620	83, 185, 3504	
Topo-AIR	4972	<i>EcoRI</i>	283, 1342	3913, 1059	<i>SfiI-EcoRV</i>
		<i>BglI</i>	299, 1571, 3835	2264, 1436, 1272	
		<i>HindIII</i>	234, 880	4326, 646	
		<i>SfiI</i>	298	4972	
Topo-AFL	4936	<i>EcoRI</i>	283, 1306	3913, 1023	<i>SfiI-EcoRV</i>
		<i>BglI</i>	1238, 1535, 3799	2420, 2264, 252	
		<i>PvuI</i>	615, 1509, 3551	2042, 2000, 894	
		<i>SfiI</i>	1282	4936	
pJET-AFR	3921	<i>Clal</i>	1228, 1356	128, 3793	<i>SfiI-PvuII</i> <i>SfiI-PmeI</i>
		<i>HindIII</i>	803, 1571	768, 3153	
		<i>PstI</i>	9, 1265	1256, 2665	
		<i>SfiI</i>	382	3921	
		<i>XbaI</i>	769, 1324	555, 3366	
pJET-DIL	4048	<i>BglI</i>	337 1457	1120, 2928	<i>SfiI-XbaI</i>
		<i>EcoRV</i>	789	4048	
		<i>HindIII</i>	1278 1698	420, 3628	
		<i>PvuI</i>	718 3439	2721, 1327	
		<i>SfiI</i>	1437	4048	
		<i>XhoI</i>	352 883	531, 3517	
		<i>BglI</i>	376, 3133	2757, 1241	
pJET-DIR	3998	<i>PstI</i>	5, 866	3117, 881	<i>SfiI-XbaI</i>
		<i>SfiI</i>	375	3398	
		<i>BglI</i>	337, 368, 1367	2928, 999, 31	
		<i>EcoRI</i>	870, 867	3951, 7	
pJET-DPL	3958	<i>PvuI</i>	1257, 3346	2089, 1869	<i>SfiI-XbaI</i>
		<i>SacI</i>	789	3958	
		<i>SfiI</i>	1340	3958	
		<i>XhoI</i>	352, 581	3729, 229	
		<i>BglI</i>	381, 3426	1240, 3045	
pJET-DPR1	4285	<i>HindIII</i>	866, 1935	1069, 3216	<i>SfiI-XbaI</i>
		<i>SfiI</i>	381	4285	
		<i>XhoI</i>	351, 471	120, 4165	
		<i>Apal</i>	1281, 1424	4860, 143	
Topo-DFL	5003	<i>BglI</i>	301, 1602, 3866	2264, 1438, 1301	<i>SfiI-BamHI</i>
		<i>BglI</i>	1196, 2355	3844, 1159	
		<i>EcoRI</i>	283, 1373	3913, 1090	
		<i>EcoRV</i>	773, 1383	4393, 610	
		<i>SfiI</i>	300	5003	
		<i>XbaI</i>	871, 1418	4456, 547	
		<i>XhoI</i>	1192, 1406	4789, 214	
DFR-pJET	5010	<i>EcoRI</i>	283 1380	<i>SfiI-BamHI</i>	
		<i>HindIII</i>	234 949		
		<i>SacI</i>	250 901		
		<i>SfiI</i>	1365		

III) ANÁLISIS COMPARATIVO DE EXPRESIÓN DE PROTEASAS EN HUITLACOCHES Y MAÍZ

Actividad de proteasas en fracciones celulares de huitlacoche y maíz

Se determinó la actividad de diferentes proteasas en el ELC, la fracción soluble y en la de membrana de huitlacoche y maíz, como se indicó en la sección de materiales y métodos. Los datos se reportan de manera independiente para cada muestra, ya que son de variedades diferentes. Las muestras uno y dos de maíz (M1 y M2) corresponden a maíz dulce y la muestra tres (M3) es de la variedad cacahuazintle; los huitlacoques uno y dos (H1 y H2) fueron obtenidas de la infección de maíz dulce y la muestra 3 (H3) de la infección de maíz cacahuazintle.

Las actividades probadas fueron: aminopeptidasa (APE) sobre dos sustratos diferentes, dipeptidilaminopeptidasa (DPP), carboxipeptidasa (CP), proteinasa ácida (PrA) y proteinasa neutra (PrB).

En general la actividad de proteasas de las fracciones solubles del huitlacoche que actúan sobre los sustratos probados fueron mayores en el huitlacoche que en el maíz, excepto para la APE con Lys-pNA en la muestra de maíz cacahuazintle (Fig. 19). Por otro lado, las actividades DPP (Fig. 19c), y PrB (Fig. 19f) se detectaron también en la fracción membranal, aunque sólo la primera mostró más actividad en huitlacoche que en maíz: la actividad de proteinasa neutra (PrB) detectada en huitlacoche podría ser la del maíz. La alta actividad de aminopeptidasa que actúa sobre Lys-pNA (Fig. 19e) en el maíz, tanto en el ELC como en la fracción soluble, podría explicar por qué algunas características organolépticas y nutrimentales del huitlacoche cambian dependiendo de la variedad del maíz. Además, las fracciones de membrana tanto de maíz como de huitlacoche presentan niveles de esta actividad muy parecidos, lo que aunado al hecho de que en el genoma del maíz se encontraron genes codificantes de aminopeptidasas de membrana, podría indicar que se trata de una proteasa endógena del maíz.

En general, la actividad de las proteasas en los ELC fue menor que en las fracciones solubles, excepto para la actividad de PrA en el caso de maíz (Fig. 19e), quizá porque los extractos enzimáticos fueron tratados para evitar el efecto de inhibidores endógenos, según lo reportado para determinar la

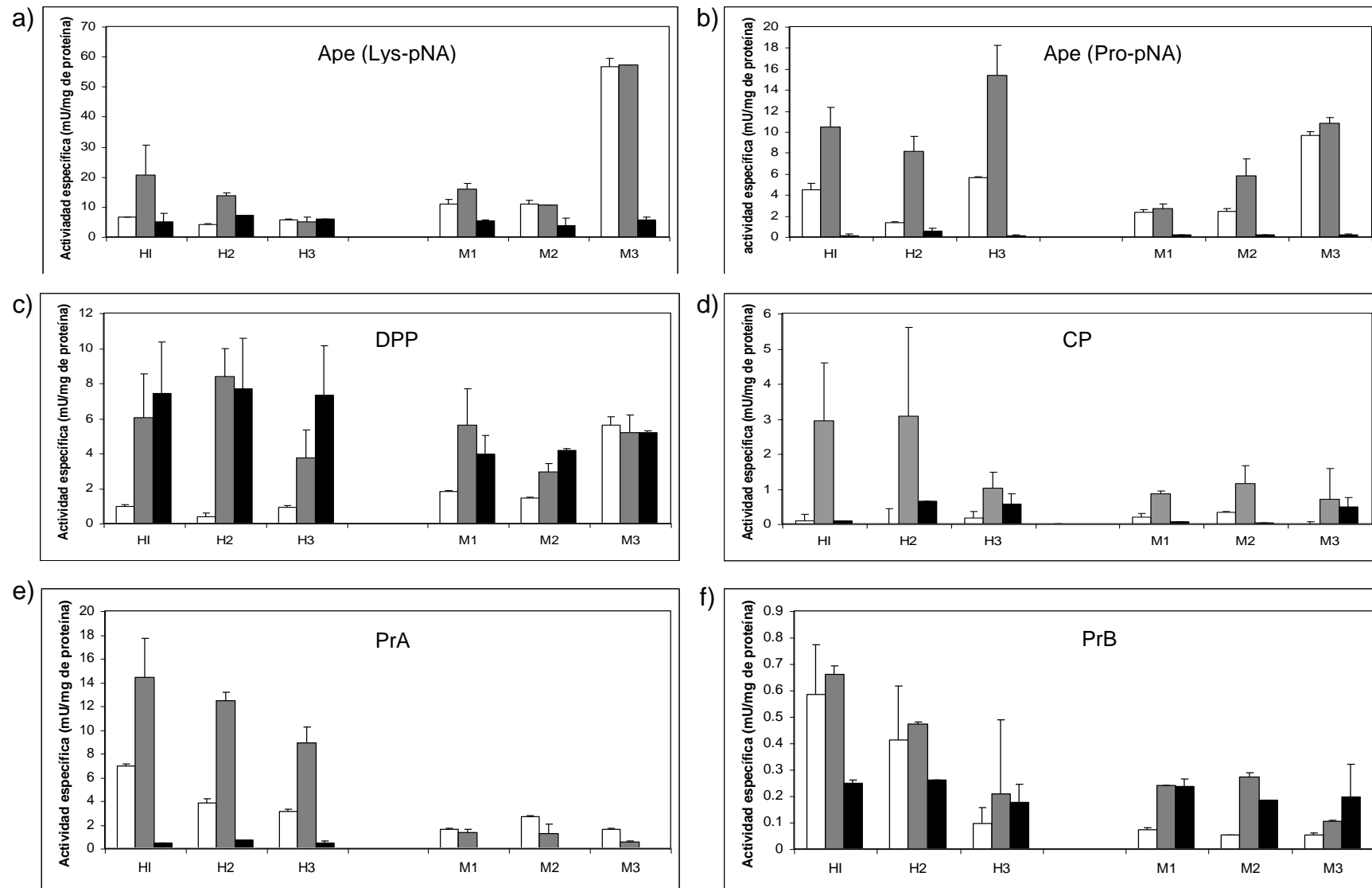


Figura 19. Actividad específica de proteasas en tres diferentes muestras de maíz y huitlacoche. Las muestras de maíz M1 y M2 son de maíz dulce y la muestra M3 es de maíz cacahuazintle; las muestras de huitlacoche H1 y H2 fueron obtenidas de infección de maíz dulce y la muestra H3 de infección en maíz cacahuazintle. a) actividad de aminopeptidasa (APE) contra Lys-pNA, b) actividad de aminopeptidasa (APE) contra Pro-pNA, c) actividad de dipeptidil aminopeptidasa (DPP) contra Ala-Pro-pNA, d) actividad de carboxipeptidasa (CP) contra N-Bz-Tyr-4-pNA, e) actividad de proteinasa ácida (PrA) contra hemoglobina desnaturalizada y f) actividad de proteinasa neutra (PrB) contra colágeno (HPA). ELC (barras blancas), fracción soluble (barras grises) y membranal (barras negras). Barras de error indican DE (n=6),

actividad en cepas haploides de *U. maydis* (Mercado-Flores y col., 2003b) y probablemente este tratamiento no es efectivo en el caso de la PrB del maíz ya que la actividad en la fracción soluble es significativamente mayor que en el ELC (Fig. 19f).

Estudio de la expresión de proteasas en huitlacoche, por RT-PCR

Con el fin de relacionar las actividades enzimáticas detectadas previamente, con los genes codificantes de proteasas vacuolares putativas se determinó la expresión de estos genes (Tabla 10) por RT-PCR. Para ello, primeramente se buscaron en el genoma de *U. maydis* secuencias homólogas a los genes codificantes de este tipo de proteasas en *S. cerevisiae*. Sin embargo el gene ortólogo a el gene *PRC1*, que codifican a la corboxipeptidasa Y, no pudo ser identificado (de entre tres posibles opciones) con herramientas bioinformáticas, por lo que se diseñaron oligonucleótidos para amplificar el extremo 3´terminal de los tres genes (Tabla 10).

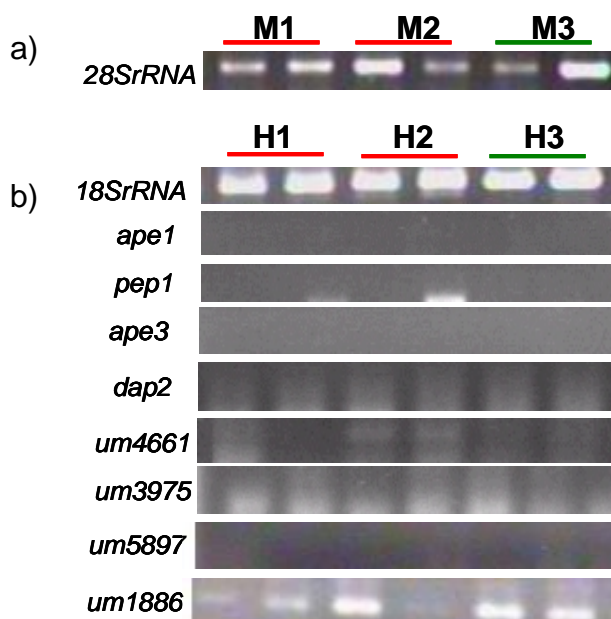


Figura. 20. Análisis de expresión de genes codificantes de proteasas vacuolares putativas de *U. maydis*, en muestras de huitlacoche. Se obtuvo el cDNA de tres muestras independientes de huitlacoche (H1, H2 y H3) y maíz (M1, M2 y M3). Los genes a) *28SrRNA* y b) *18SrRNA* fueron amplificados de maíz y huitlacoche, respectivamente. b) Los genes codificantes de proteasas vacuolares fueron amplificados en maíz y huitlacoche, pero para maíz no se obtuvo amplificado alguno, dada la especificidad de los iniciadores.

De los genes analizados hasta el momento sólo el gen *um1886* parece expresarse en este estadio del ciclo de vida del hongo (Fig. 20), y

probablemente algo de la actividad de carboxipeptidasa detectada en el huitlacoche se deba a la proteína codificada por este gen. Las otras actividades proteolíticas detectadas en el huitlacoche parecen no estar relacionadas con los genes codificantes de proteasas vacuolares (al menos con los analizados hasta ahora). Esto, sin embargo, no quiere decir que estas enzimas no sean del hongo, ya que en el genoma de *U. maydis* se han detectado genes codificantes de otras probables proteasas intracelulares.

Tabla 10. Características de los iniciadores utilizados para el análisis de expresión de proteasas de *U. maydis* en el huitlacoche y de las proteasas putativas codificadas en los genes blanco de éstos.

Gen (no. de acceso)	iniciador	secuencia	Tm	Amplificado (pb)	Proteasa codificada
18SrRNA	um18SiF	TTAAAGAAATTGACGGAAGGGC	53.9	916	
	um18Sr	GTACAAAGGGCAGGGACGTAGT	59.7		
26SrRNAmt	26S1 ^a	GAGTAGAGGTCGCGAGAGAGCAG	63.1	756	
	26S2 ^a	GATTGGTCGTTGTGTGTCACC	57.6		
<i>pep1</i> (um02043)	PUMAI-2	TCAGAGAGCGATGAGAACAG	55.4	506	Aspartil-proteasa
	PUMAI-II-S	GCGCTGTTTCGAGATCGACC	59.5		
<i>pep4</i> (um04926)	PEPRevFusL	TTCGGCCGCGTTGGCCCTTGGCAGTCGCGAGACC	59.5		Aspartil-proteasa
<i>ape1</i> (um00818)	PUMAPE-II-S	CGACTGGTGGCGCTTCCGG	63.8	494	Metalo-peptidasa
			59.5		
<i>ape3</i> (um06456)	FwdintRAPE3	TGAGGCCTGAGTGGCCCGCTTCGCCCAACTACGTAC	59.5	489	Metalo-peptidasa
	RevFusLAPE3	TTCGGCCGCGTTGGCCGATGAGCGCCAGGTCGCC	59.5		
<i>dpa2</i> (um05273)	FwdProRDAP1	TGAGGCCTGAGTGGCCATGGCGGACACATGCCGAG	59.5	631	Dipeptidil amipeptidasa IV
	RevintLDAP	TTCGGCCATCTAGGCCCTTGGGCGAAAGTGTTCAGC	59.5		
<i>um04661</i>	4661DerIntR	tgaggcctgagtggccGGTCAAGACGTTGGACTGGAG	59.5	186	Carboxipeptidasa Y
	CARBO4661REVL	TTCGGCCGCGTTGGCCCAAAGATCCTGGCCGTCGATCCAG	59.5		
<i>um03975</i>	3975DerIntR	tgaggcctgagtggccGACGAGTACAACAAGGTGCAGTTG	59.5	181	Carboxipeptidasa Y
	CARBO3975REVL	TTCGGCCGCGTTGGCC CAAAGGTGGCCGGGATGTTGGC	59.5		
<i>um05897</i>	5897DerIntR	tgaggcctgagtggccGTTCCGACAAACCCTTCCCG	59.5	117	Carboxipeptidasa S
	CARBO5897REVL	TTCGGCCGCGTTGGCCAGAAATCTGTCTGCGACCCAACCG	59.5		
<i>um01886</i>	1886DerIntR	tgaggcctgagtggccGACCGTCAACGGCAAGAAGG	59.5	122	Carboxipeptidasa Y
	CARBO1886REVL	TTCGGCCGCGTTGGCCAGGCAAGCGGCTTGTTCGCGAG	59.5		

^a Basse y col., 2000.

Discusión

La vacuola fúngica es un organelo cuya principal función es el mantenimiento de la homeostasis y el recambio proteico (Wen y Klionsky, 2003; Sarry y col., 2007). Este último proceso es controlado por la disponibilidad de los nutrientes con los que cuenta la célula, ya que en condiciones de estrés nutricional aumenta (Wen y Klionsky, 2003).

A pesar de que muchos de los mecanismos que regulan el recambio proteico y las proteínas que participan en él han sido descritos en la levadura *S. cerevisiae* (Wen y Klionsky, 2003), éste es un campo de estudio poco explorado, incluso en otros modelos. Por ejemplo en el caso del hongo fitopatógeno *U. maydis* (organismo modelo para describir los eventos moleculares que regulan la morfogénesis y la patogenicidad) se desconoce el papel de la proteólisis vacuolar en su ciclo de vida. Sin embargo algunas evidencias indirectas sugieren la importancia de este proceso en el hongo. Mercado-Flores y col. reportaron (2003b) que la transición dimórfica en el hongo de levadura a micelio, inducida por cambio de pH, es inhibida al tratar el cultivo con pepstatina A, un inhibidor de aspartil-proteasas. Posteriormente Böhmer y col. en el 2007, reportaron que durante la transición dimórfica aumenta la proteína codificada por el gen *pep4*, que es una aspartil-proteasa vacuolar putativa. Por otro lado, la expresión de un gen codificante de una carboxipeptidasa vacuolar putativa aumenta cuando se induce la geminación de las teliosporas dicarióticas para formar esporas haploides (Sacadura y Saville, 2003).

Por ello en este trabajo se abordó el estudio de los genes codificantes de proteasas vacuolares putativas, utilizando diversas estrategias.

1. En principio se está demostrando la naturaleza aminopeptidásica de los productos de los genes codificantes de este tipo de proteasas, mediante la generación de proteínas de fusión con la secuencia 6xHis en su extremo carboxilo-terminal y la expresión heteróloga en *P. pastoris*, un sistema que ha sido utilizado para expresar una amplia variedad de proteínas, entre ellas proteasas (Doumas y col., 1998; Daly y Hearn, 2005). La expresión heteróloga de dos genes, *dap2* (um05273) y *ape3* (um06456), permitió confirmar que codifican para una dipeptidil aminopeptidasa (pumDAPI-rec) y una aminopeptidasa (pumAPE3i-rec), respectivamente (Juárez-Montiel, 2007;

Tamayo-Ordoñez, 2009). El estudio de las características bioquímicas de estas proteasas recombinantes se está llevado a cabo.

En el caso de la pumDAPI-rec, el análisis *in silico* indicó que se trata de una proteína de 881 aminoácidos, cuyo PM teórico es de 110 kDa y presenta tres dominios, uno transmembranal en el extremo amino-terminal (primeros 30 aminoácidos), uno de dipeptidil aminopeptidasa tipo IV y uno de serín-proteasa en el extremo carboxilo-terminal, el cual fue confirmado haciendo ensayos de inhibición, ya que la actividad recombinante se inhibió con PMSF y pefabloc (inhibidores específicos de este tipo de proteasas). Con base en estas características y en el funcionamiento del sistema de expresión heteróloga, se inició el protocolo de purificación y caracterización de esta proteína. Por un lado, el fraccionamiento celular mostró que la mayor actividad de la proteína recombinante se encontraba en la fracción de membrana, sin embargo en la fracción soluble también se encontró esta actividad, lo que podría sugerir que esta proteína se libera de la membrana por fuerza mecánica ya que sólo presenta un dominio transmembranal al inicio del extremo amino-terminal, tal y como ocurre en el caso de una de las DPP IV humana (Durinx y col., 2000). Para la purificación de esta enzima, la fracción de membrana previamente solubilizada se pasó a través de una columna de níquel (Ni^{2+}), y las diferentes fracciones colectadas fueron analizadas, determinado la actividad específica y su movilidad en por SDS-PAGE. La actividad aumentó apenas tres veces y no se pudo observar una banda del tamaño esperado en los geles, a pesar de que la secuenciación de la construcción genética utilizada para obtener a la cepa transformante C41 y los ensayos de Dot Blot sugieren que la proteína de fusión es correcta. Para otras proteínas de fusión diseñadas para este sistema ya ha sido reportada la ineficacia de esta forma de purificación y han tenido que ser sometidas a protocolos tradicionales de purificación (Yuk y col., 2008). En *P. pastoris* se ha identificado al menos un gen codificante de una DPP IV de membrana (Prabha y col., 2009) y existe la posibilidad de que cuente con una segunda enzima de este tipo, al igual que la levadura *S. cerevisiae* que contiene las codificadas por *DAP2* y *STE13* (Julius y col., 1983, Bordallo y col., 1984). En este caso los métodos tradicionales de purificación serían una opción, ya que en análisis Dot Blot es posible diferenciar a la pumDAPI-rec de las nativas con actividad de DPP IV. Por otro lado, utilizando las fracciones

recuperadas de la columna de Ni^{2+} fue posible determinar que la pumDAPI-rec actúa preferentemente sobre Ala-Pro-pNA, y menos sobre Gly-Pro, Gly-Arg y Ala-Ala-pNA, lo que indica que es una DPP tipo IV, las cuales se caracterizan por actuar sobre sustratos X-Pro, X-Ala, en donde X es generalmente Ala (Cunningham y O'connor 1997). La DPP nativa de *P. pastoris* no presentó la misma afinidad por los diferentes sustratos. Por otro lado, se pudo determinar que el pI es de 6.9, lo que concuerda con el pI calculado.

Otras características de la pumDAPI-rec como efecto del pH y la temperatura fueron ensayadas utilizando la fracción de membrana de la cepa recombinante y se encontró que se trata de una proteína termosensible, ya que se inactiva a 45°C y que el pH óptimo es de 7.0. Sin embargo, para evaluar el efecto del pH se requeriría de una proteína con mayor pureza.

Con base en lo anterior se evaluó el efecto de tres detergentes para solubilizar la fracción de membrana de la cepa C41 y mejorar los rendimientos de purificación de la proteína recombinante. Los mejores resultados se obtuvieron con un detergente zwitteriónico (zwittergent 3-14) y con uno no iónico (n-octyl- β -D-glucopiranosido) con los que se obtuvieron actividades específicas 10 y 5 superiores, respectivamente, que cuando las membranas se solubilizaron sólo con regulador, pero a pesar de que no se realizaron ensayos de estabilidad, al parecer la actividad recombinante se mantiene por más tiempo con el segundo detergente, que ya ha sido utilizado para liberar a la DAP B, la DPP IV vacuolar de *S. cerevisiae* (García-Alvarez y col., 1985). Al correr en SDS-PAGE a las membranas solubilizadas con n-octyl- β -D-glucopiranosido fue posible observar una banda diferencial de 123 kDa, solamente en el caso de la cepa recombinante, que podría corresponder a la pumDAPI-rec. De esta manera la purificación de la proteína recombinante podría facilitarse (aún cuando se tuviera que seguir un protocolo tradicional) ya que la mayor parte de las proteínas solubilizadas de esta manera son de tamaño menor a la recombinante, sobre todo la de 80 kDa que está sobreexpresada y que parece ser la AOX1. Además, como ya se mencionó antes, el análisis de los diferentes extractos o fracciones de la cepa recombinante por Western Blot permitiría confirmar si la banda de 123 kDa corresponde a la pumDAPI-rec.

Respecto a la aminopeptidasa pumAPE3i-rec, codificada por el gen *ape3*, el análisis bioinformático indicó que se trata de una aminopeptidasa soluble de 505 aminoácidos con un PM de 56 kDa y con un sitio característico de las metaloproteasas de la familia M28 (Tamayo-Ordoñez, 2009). En este caso los extractos enzimáticos de la cepa recombinante apenas mostraron el doble de actividad que los de la cepa silvestre, usando como sustratos Lys-pNA y Pro-pNA. La poca actividad de esta proteasa contra el primer sustrato sugiere que el gen *ape3* no está relacionado con la aminopeptidasa intracelular de *U. maydis* ya purificada y caracterizada bioquímicamente, la cual fue muy activa contra este sustrato (Mercado-Flores y col., 2004). Además la mayor actividad del extracto soluble de la cepa recombinante, contra los dos sustratos probados sugiere que la pumAPE3i-rec es soluble. Al purificar a la proteína recombinante en la columna de Ni²⁺ no se observó una banda del tamaño esperado, además la actividad específica sólo aumentó 1.5 veces con respecto a la fracción soluble. Sin embargo, la secuenciación nucleotídica y el Dot Blot indicaron que la secuencia 6xHis está en pauta con la pumAPEi-rec. La poca actividad obtenida para la pumAPE3i-rec podría deberse a diversos factores: a que, por algún motivo, el gen recombinante no se está sobreexpresando en el sistema de *P. pastoris*, a la poca efectividad de las columnas de Ni²⁺ en la purificación de estas proteínas, a un proceso de autohidrólisis al tratarse de proteasas, también a que los sustratos utilizados hasta el momento no son los específicos para esta aminopeptidasa.

2. En cuanto a la obtención de construcciones genéticas que permitan obtener mutantes de genes en *U. maydis* por doble recombinación homóloga, se consideraron las estrategias reportadas por Brachmann y col. en el 2004 y Kämper en el 2004. Ambas estrategias se basan en la recombinación homóloga en el genoma de *U. maydis*, sin embargo difieren en que en la primera se utilizan plásmidos linearizados y en la segunda se usan amplificadores de PCR. En este trabajo los amplificadores L y R de los genes *ape3* y *dap2* fueron clonados de manera independiente en dos diferentes vectores, PCR2.1-TOPO y pJET1.2/blunt, cuidando que para cada par L y R, los sitios *Sfi*I se encontraran en sentido contrario en el sitio de clonación múltiple de los vectores. Además de que la técnica de PCR podría generar mutaciones no deseadas en los cassettes, en nuestro caso resultó ser menos efectiva, ya que

usando la otra estrategia ya han sido obtenidos construcciones para el gen *pep4* de *U. maydis* en nuestro grupo de trabajo.

3. Desde un punto de vista totalmente diferente, en nuestro grupo de trabajo se han realizado estudios de expresión de algunos de los genes codificantes de proteasas vacuolares putativas en diferentes condiciones de cultivo y se ha encontrado que son diferencialmente regulados por la fuente de nitrógeno y carbono, durante la transición dimórfica o durante la complementación sexual (Noriega-Reyes, 2005; Miramón-Martínez, 2008; Tamayo-Ordoñez, 2009). Aunque estos resultados parecen sugerir la importancia de estos genes, aún no se han podido asociar con la fase biotrófica del hongo, que comprende su desarrollo dentro de la planta y que es indispensable para que éste complete su ciclo de vida (formación de teliosporas) (Banuett y Herzkowitz, 1996). Considerando los resultados de diversos estudios que se han enfocado en esta fase desde dos puntos de vista, por un lado el efecto de la planta sobre la expresión diferencial de los genes de *U. maydis* (Horst y col., 2010; Sacadura y Saville, 2003) y por otro lado las propiedades de la enfermedad como alimento nutracéutico (Juárez-Montiel y col., en prensa), en ambos aspectos parece haber evidencias de la posible participación de las proteasas del hongo en esta fase.

En este trabajo se reporta el perfil proteolítico diferencial del huitlacoche (maíz infectado) y del maíz no infectado. Con excepción de la actividad de aminopeptidasa (APE) sobre el sustrato Lys-pNA en la muestra de maíz cachuazintle, el resto de las actividades proteolíticas que actúan sobre los sustratos Pro-pNA (APE), Ala-Pro-pNA (DPP), N-Bz-Tyr-4-pNA (CPY), hemoglobina desnaturalizada (prA) y un sustrato tipo colágeno (prB) fueron mayores en la fracciones solubles de la muestras de huitlacoche que en las de maíz, a pesar de que al menos en tumores inducidos en hojas de maíz sólo el 3% aproximadamente son células del hongo (Horst y col., 2010). Aunque en este punto no es posible saber si dichas actividades son del hongo o éste induce la expresión de las proteasas del maíz, existen evidencias que sugieren la participación del recambio proteico en el metabolismo nitrogenado del tumor. Por un lado, se ha reportado la disminución o represión de genes y enzimas del maíz implicados en la asimilación de nitrógeno inorgánico, y la pobre síntesis de *novo* de aminoácidos en tumores inducidos en hojas, en comparación con

hojas no infectadas. Además, existe una mayor incorporación de los aminoácidos producto del recambio a las proteínas del tumor (Horst y col., 2010). Aunado a esto, el contenido de aminoácidos libres, ya sea en este tipo de tumores o en tumores del maíz (huitlacoche), es mayor que en los respectivos órganos no infectados (Lizarraga-Guerra y López, 1996; Horts y col., 2010 Juárez Montiel y col., en prensa). Por otro lado se ha reportado que las plantas de maíz producen una variedad de proteasas como mecanismos de defensa contra ataques de insectos y como mecanismos de sobrevivencia en condiciones de estrés por contaminación del suelo con cadmio (Pena y col., 2007, Moha y col., 2008).

En cuanto a la expresión de los genes codificantes de proteasas vacuolares putativas, en *U. maydis*, sólo el gen *um01886* que codifica para una probable carboxipeptidasa se expresa en esta fase. En otros estudios se ha reportado que en las teliosporas en estado de latencia (en los tumores) se expresan genes relacionados con la degradación de proteínas, entre ellos los del proteasoma citosólico, y los de dos de las probables carboxipeptidasas vacuolares (Sacadura y Saville, 2003), lo cual concuerda con nuestros hallazgos. En este mismo sentido se ha reportado que genes codificantes de proteasas que actúan sobre el extremo N-terminal de proteínas se expresan más en teliosporas en estado de latencia que en las que se encuentran en germinación. Por el contrario, la expresión de genes codificantes de proteínas que intervienen en el ensamble de proteínas y factores de iniciación de la traducción es mayor en las teliosporas en germinación, lo que sugiere que el recambio proteico ayuda a la rápida germinación de la teliospora (Zahiri y col., 2005). Sin embargo, en este trabajo no se pudo demostrar la expresión de ninguna de las amino-peptidasas probadas. Un análisis de esta misma naturaleza, pero aislando a las teliosporas del resto de tumor sería una buena opción para comparar y validar los resultados ya obtenidos.

Conclusiones

- El gen *dap2* de *U. maydis* codifica a una dipeptidil aminopeptidasa del tipo IV, con un pI de 6.9, PM de 123 kDa y con una serina en su sitio catalítico.
- La aminopeptidasa de *U. maydis* codificada por el gen *ape3*, es una proteasa soluble.
- Las actividades proteolíticas de APE (Pro-pNA), DPP, CP, PrA y PrB de las fracciones solubles del huitlacoche fueron mayores que en las del maíz.
- El gen *um01886* codificante de una probable carboxipeptidasa proteasa vacuolare putativa fue el único que se expresó en la fase bitrófica del hongo.

Perspectivas

Purificar la proteína recombinante pumDAPI-rec y determinar las características bioquímicas que aún no se han descrito.

Purificar y determinar características de la pumAPE3i-rec como PM, pI, efecto de inhibidores y cationes divalentes, pH y temperatura óptima y afinidad por sustrato, por ejemplo.

Confirmar las proteínas purificadas por Western Blot y/o secuenciación.

Interrumpir los genes *dap2* y *ape3* de *U. maydis* con las construcciones genéticas obtenidas para este propósito.

Generar proteínas de fusión de estas proteasas con las proteínas verde y/o roja fluorescentes con las construcciones obtenidas.

Caracterizar el fenotipo de las cepas de *U. maydis* en sus diferentes estadios de vida.

Realizar el perfil proteolítico de teliosporas aisladas de maíz y comparar los resultados con los reportados en este trabajo.

Realizar los ensayos de expresión, en muestras de huitlacoche y maíz, de los genes *pep4* y *prb*, codificantes de proteinasas ácida y neutra vacuolares putativas, respectivamente.

Bibliografía

- Achstetter T y Wolf DH. 1985.** Proteinases, proteolysis and biological control in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*.1: 139-157.
- Achstetter T, Ehmann C, Osaki A y Wolf DH. 1984.** Proteolysis in eukaryotic cells. Proteinase yscE, a new yeast peptidase. *J Biol Chem*. 259: 13344-13348.
- Andrews DL, Egan JD, Mayorga ME y Gold SE. 2000.** The *Ustilago maydis* *ubc4* and *ubc5* genes encode members of a MAP-kinase cascade required for filamentous grow. *Mol Plant Microbe Interact*. 13: 781-786.
- Ausbel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA y Struhl K. 1989.** Current protocols in molecular biology. Green publishing associates and Wiley-Interscience.
- Ardö Y. 2006.** Flavour formation by amino acid catabolism. *Biotechnol Adv*. 24: 238-242.
- Banuett F y Herskowitz I. 1989.** Different *a* alleles of *Ustilago maydis* are necessary for maintenance of filamentous growth but no for meiosis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 86: 5878-5882.
- Banuett F y Herskowitz I. 1994.** Identification of *fuz7*, an *Ustilago maydis* MEK/MAPK homolog required for *a*-locus-dependent and -independent steps in the fungal life cycle. *Genes Dev*. 8: 1367-1378.
- Banuett F y Herskowitz I. 1996.** Discrete Developmental stages during teliospore formation in the corn smut *Ustilago maydis*. *Development*. 122: 2965-2976.
- Banuett F. 2002.** Pathogenic Development in *Ustilago maydis*. A progression of morphological transitions that result in tumor formation and teliospore production, in *Molecular Biology of Fungal Development*. Editado por Heinz, D. O. Dekker, New York. pp 349-398.
- Basse CW, Stumpferl S y Kahmann R. 2000.** Characterization of a *Ustilago maydis* gene specifically induced during the biotrophic phase: evidence for negative as well as positive regulation. *Mol Cell Biol*. 20: 329-339.
- Birnboim HC y Dolly J. 1979.** A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid. *DNA Nucleic Acids Res*. 7: 1513-1523.
- Böhmer M, Colby T, Böhmer C, Bräutigam A, Schmidt J y Bölker M. 2007.** Proteomic analysis of dimorphic transition in the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis*. *PROTEOMICS*. 7: 675–685. doi: 10.1002/pmic.200600900.
- Bölker M, Genin S, Lehmler C, y Kahmann R. 1995.** Genetic regulation of mating and dimorphism in *Ustilago maydis*. *Can J Bot*. 73: 320-325.
- Bölker M. 2001.** *Ustilago maydis*, a valuable model system for the study of fungal dimorphism and virulence. *Microbiology*. 147: 1395-1401.
- Bordallo C, Schwencke J y Suárez-Rendueles MP. 1984.** Localization of the thermosensitive X-prolyl dipeptidyl aminopeptidase in the vacuolar membrane of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett*.173: 199-203.
- Bordallo J, Bordallo C, Gascón S y Suárez-Rendueles P. 1991.** Molecular cloning and sequencing of genomic DNA encoding yeast vacuolar carboxypeptidase yscS. *FEBS Lett*. 283: 27-32.

- Brachmann A, Köning J, Julius C y Feldbrügge M.** 2004. A reverse genetic approach for generating gene replacement mutants in *Ustilago maydis*. *Mol Gen Genom.* 272: 216-226.
- Brachmann A, Schirawski J, Müller P y Kahmann R.** 2003. An unusual MAP kinase is required for efficient penetration of the plant surface by *Ustilago maydis*. *EMBO J.* 22: 2199-2210.
- Brachmann A, Weinzierl G, Kämper J y Kahmann R.** 2001. Identification of genes in the bW/bE regulatory cascade in *Ustilago maydis*. *Mol Microbiol.* 42: 1047-1063.
- Bradford M.** 1976. A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-Dye binding. *Anal Biochem.* 7: 248-254.
- Bryant NJ y Stevens TH.** 1998. Vacuole biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*: protein transport pathways to the yeast vacuole. *Microbiol Mol Biol Rev.* 62: 230-247.
- Cueva R, García-Alvarez N y Suárez-Rendueles P.** 1989. Yeast vacuolar aminopeptidase yscI. Isolation and regulation of the APE1 (*LAP4*) structural gene. *FEBS Lett* 259: 125-129.
- Cunningham DF y O'Connor B.** 1997. Proline specific peptidases. *Biochim Biophys Acta.* 1343: 160-186.
- Daly R y Hearn MT.** 2005. Expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris*: a useful experimental tool in protein engineering and production. *J Mol Recognit.* 18: 119-138.
- Doumas A, van den Broek P, Affolter M y Monod M.** 1998. Characterization of the prolyl dipeptidyl peptidase gene (dppIV) from the Koji mold *Aspergillus oryzae*. *Appl Environ Microbiol.* 64: 4809-4815.
- Dürrenberger F, Wong K y Kronstad JW.** 1998. Identification of a cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit required for virulence and morphogenesis in *Ustilago maydis*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 95: 5684-5689.
- Durinx C, Lambeir AM, Bosmans E, Falmagne JB, Berghmans R, Haemers H, Scharpé S y De Meester I.** 2000. Molecular characterization of dipeptidyl peptidase activity in serum Soluble CD26/dipeptidyl peptidase IV is responsible for the release of X-Pro dipeptides. *Eur J Biochem* 267: 5608-5613.
- Farrell RE.** 1998. RNA methodologies. A laboratory guide for isolation and characterization. 2a ed. Ed. Academic Press. USA.
- Feldbrügge M, Kämper J, Steinberg G y Kahmann R.** 2004. Regulation of mating and pathogenic development in *Ustilago maydis*. *Curr Opin Microbiol.* 7: 666-672.
- García-Alvarez N, Bordallo C, Gascón S y Suárez-Rendueles P.** 1985. Purification and characterization of the thermosensitive X-prolyl dipeptidyl aminopeptidase (dipeptidyl aminopeptidase yscV) from *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem Biophys Acta.* 832: 119-125.
- Gold SE, Bakkeren G, Davies JE y Kronstad JW.** 1994. Three selectable markers for transformation of *Ustilago maydis*. *Gene.* 142: 225-230.
- Gold SE, Brogdon MS, Mayorga EM y Kronstad WJ.** 1997. The *Ustilago maydis* regulatory subunit of cAMP-dependent protein kinase is required for gall formation in maize. *Plant cell* 9:1585-1594.

Hartmann HA, Kahmann R y Bölker M. 1996. The pheromone response factor coordinates filamentous growth pathogenicity in *Ustilago maydis*. EMBO J. 15: 1632-1641.

Hirsch HH, Suárez-Rendueles P, Aschtetter T y Wolf DH. 1988. Aminopeptidase yscII of yeast. Isolation of mutants and their biochemical and genetic analysis. Eur J Biochem. 1973: 589-598.

Horst RJ, Doehlemann H, Wahl R, Hofmann J, Schmiedl A, Kahmann R, Kämper J, Sonnewald U y Voll L. 2010. *Ustilago maydis* infection strongly alters organic nitrogen allocation in maize and stimulates productivity of systemic source leaves. Plant Physiology. 152: 293-308.

Jones EW, Zubenko GS y Parker RR. 1982. PEP4 gene function is required for expression of several vacuolar hydrolases in *Saccharomyces cerevisiae*. Genetics. 102: 665-677.

Jones EW. 1991. Three proteolytic system in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. J Biol Chem. 266: 7963-7966.

Juárez-Montiel M, Ruiloba de León S, Chávez-Camarillo G, Hernández-Rodríguez C, Villa-Tanaca L. Huitlacoche (corn smut), cused by the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis*, as a functional food. *En prensa*

Juárez-Montiel. 2007. Expresión heteróloga del gen *dap1um*, codificante de la dipeptidil aminopeptidasa de *U. maydis*. Tesis de maestría. IPN. México.

Julius DB, Brake L, Sprague G y Thorner J. 1983. Yeast α Factor is processed for a larger precursor polypeptide: the essential role of membrane-bound dipeptidyl aminopeptidase. Cell 32: 839-852.

Kaffarnik F, Müller P, Leibundgut M, Kahmann R y Feldbrügge M. 2003. PKA and MAPK phosphorylation of Prf1 allows promoter discrimination in *Ustilago maydis*. EMBO J. 22: 5817-5826.

Kahmann R, Basse C y Feldbrügge M. 1999. Fungal-plant signaling in the *Ustilago maydis*-maize pathosystem. Curr Opin Microbiol. 2: 647-650.

Kämper J y col. 2006. Insights from the genome of the biotrophic fungal plant pathogen *Ustilago maydis*. Nature. 444: 97-101.

Kämper J, Reicmann M, Romeis T, Bölker M, Khamann R. 1995. Multiallele recognition: non-self dependent dimerization of the bE and bW homeodomain proteins in *Ustilago maydis*. Cell. 81: 73-83.

Kämper J. 2004. A PCR-based system for highly efficient generation of gene replacement mutants in *Ustilago maydis*. Mol Gen Genomics. 271: 103-110.

Kaur R, Ma B y Cormack BP. 2007. A family of glycosylphosphatidylinositol-linked aspartyl proteases is required for virulence of *Candida glabrata*. Proc Natl Acad Sci USA. 104(18): 7628-7633.

Klionsky DJ, Herman PK y Emr SD. 1990. The fungal vacuole: Composition, function and biogenesis. Microbiol Rev. 54: 266-292.

Klose J, De Sá MM y Kronstad W. 2004. Lipid-induced filamentous growth in *Ustilago maydis*. Mol Microbiol. 52: 823-835.

- Klosterman SJ, Martinez-Espinoza AD, Andrews DL, Seay JR y Gold SE.** 2008. Ubc2, an ortholog of the yeast Ste50p adaptor, possesses a basidiomycete-specific carboxy terminal extension essential for pathogenicity independent of pheromone response. *Mol Plant Microbe Interact.* 21: 110-121.
- Koutz P, Davis GR, Stillman C, Barringer K, Cregg J y Thill G.** 1989. Structural comparison of the *Pichia pastoris* alcohol oxidase genes. *Yeast.* 5: 167-177.
- Kronstad JW y Leong SA.** 1990. The *b* mating-type locus of *Ustilago maydis* contain variables and constant regions. *Genes Dev.* 4: 1384-1395.
- Krüger J, Loubradou G, Regenfelder E, Hartmann A y Kahmann R.** 1998. Crosstalk between cAMP and pheromone signalling pathways in *Ustilago maydis*. *Mol Gen Genet.* 260: 193-198.
- Krüger J, Loubradou G, Wanner G, Regenfelder E, Feldbrugge M y Kahmann R.** 2000. Activation of the cAMP pathway in *Ustilago maydis* reduces fungal proliferation and the teliospore formation in plant tumors. *Mol Plant Microbe Interact.* 13: 1034-1040.
- Laemmli UK.** 1970. Cleavage of structural proteins during assembly of head bacteriophage T4. *Nature* 227:351-355
- Lee N y Kronstad JW.** 2002. ras2 Controls morphogenesis, pheromone response, and pathogenicity in the fungal pathogen *Ustilago maydis*. *Eukaryot Cell.* 1: 954-966
- Li SC y Kane PM.** 2009. The yeast lysosome-like vacuole: endpoint and crossroads. *Biochim Biophys Acta.* 1793: 650-663.
- Lizárraga-Guerra R y López GM.** 1996. Content of free amino acids in huitlacoche *Ustilago maydis*. *J Agric Food Chem.* 44: 2556-2559.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL y Randall RJ.** 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265-275.
- Martínez-Espinoza AD, Ruiz-Herrera J, León-Ramírez CG y Gold SE.** 2004. MAP kinase and cAMP signaling pathways modulate the pH-induced yeast-to-mycelium dimorphic transition in the corn smut fungus *Ustilago maydis*. *Curr Microbiol.* 49: 274-281.
- Mayorga ME y Gold SE.** 1999. A MAP kinase encoded by the *ubc3* gene of *Ustilago maydis* is required for filamentous growth and full virulence. *Mol Microbiol.* 3:485-497.
- Mayorga ME y Gold SE.** 2001. The *ubc2* gene of *Ustilago maydis* encodes a putative novel adaptor protein required for filamentous growth, pheromone response and virulence. *Mol Microbiol.* 41: 1365-1379.
- Mercado-Flores Y, Guerra-Sánchez G, Villa-Tanaca L, Hernández-Rodríguez C.** 2003a. Purification and characterization of an extracellular non-aspartyl acidic protease (pumAe) from *Ustilago maydis*. *Curr Microbiol.* 47: 408-411.
- Mercado-Flores Y, Hernández-Rodríguez C, Ruíz-Herrera J, Villa-Tanaca L.** 2003b. Proteinases and exopeptidases from the pathogenic fungus *Ustilago maydis*. *Mycologia.* 95: 327-339.
- Mercado-Flores Y, Noriega-Reyes Y, Ramírez-Zavala B, Hernández-Rodríguez C, Villa-Tanaca L.** 2004. Purification and characterization of aminopeptidase (pumAPE) from *Ustilago maydis*. *FEMS Microbiol Lett.* 234: 247-253.

Mercado-Flores Y, Trejo-Aguilar A, Ramírez-Zavala B, Villa-Tanaca L, Hernández-Rodríguez C. 2005. Purification and characterization of an intracellular aspartyl acid proteinase (pumAi) from *Ustilago maydis*. *Can J Microbiol.* 51: 171-175.

Miramón-Martínez P. 2008, Expresión de tres proteasas de *Ustilago maydis*. Tesis de Maestría. Instituto Politécnico Nacional, México, DF.

Mohan S, Ma PWK, Williams WP y Luthe DS. 2008. A naturally occurring plant cysteine protease possesses remarkable toxicity against insect pests and synergizes *Bacillus thuringiensis* toxin. *PLoS One.* PLoS ONE 3: e1786. doi:10.1371/journal.pone.

Müller P, Aichinger C, Feldbrügge M y Kahmann R. 1999. The MAP kinase *kpp2*, regulates mating and pathogenic development in *Ustilago maydis*. *Mol Microbiol.* 34: 1007-1017.

Müller P, Weinzierl G, Brachmann A, Feldbrügge M y Kahmann R. 2003. Mating and pathogenic development of the Smut fungus *Ustilago maydis* are regulated by one mitogen-activated protein kinase cascade. *Eukaryot Cell.* 2:1187-1199.

Nishizawa M, Yusuhara T, Nakai T, Fujiki Y y Ohashi A. 1994 Molecular cloning of the aminopeptidase Y gene of *Saccharomyces cerevisiae*. Sequence analysis and gene disruption of a new aminopeptidase. *J Biol Chem.* 269: 13651-1365

Noriega-Reyes MY. 2005. Estudio Molecular de la proteinasa ácida intracelular pumAi (*PRAum*) y la aminopeptidasa pumAPEum (*APEum*) de *Ustilago maydis*. Tesis de Maestría. Instituto Politécnico Nacional, México, DF.

Pena LB, Pasquini LA, Tomaro ML y Gallego SM. 2007. 20S proteasome and accumulation of oxidized and ubiquitinated proteins in maize leaves subjected to cadmium stress. *Photochemistry.* 68: 1139-1146.

Prabha L, Govindappa N, Adhikari L, Melarkode R y Sastry K. 2009. Identification of the dipeptidyl aminopeptidase responsible for N-terminal clipping of recombinant Exendin-4 precursor expressed in *Pichia pastoris*. *Protein Express Purif.* 64: 155-161.

Rao MB, Tanksale AM, Ghatge MS y Deshpande VV. 1998. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiol Mol Biol Rev.* 62: 597-635.

Rawn JD. 1989. Bioquímica. vol. 1. Editorial Interamericana McGraw-Hill. España.

Regenfelder E, Spelling T, Hartmann A, Lauenstein S, Bölker M y Kahmann R. 1997. G. proteins in *Ustilago maydis*: transmission of multiple signals?. *EMBO J.* 16: 1934-1942.

Roberts CJ, Pholig JH, Rothman JH y Stevens TH. 1989. Structure, Biosynthesis and localization of dipeptidyl aminopeptidase B, an integral membrane glycoprotein of the yeast vacuole. *J Cell Biol.* 108: 1363-1373.

Ruiz-Herrera J y Martínez-Espinoza AD. 1998. The fungus *Ustilago maydis*, from the aztec cuisine to the research laboratory. *Int Microbiol.* 1: 149-158.

Ruiz-Herrera J, León CG, Guevara-Olvera L y Cárovez-Trejo A. 1995. Yeast-micelial dimorphisms of haploid and diploid strains of *Ustilago maydis* in liquid culture. *Microbiology.* 141: 695-703.

Sacadura NT y Saviile BJ. 2003. Gene expression and EST analyses of *Ustilago maydis* germinating teliospores. *Fungal Genet Biol.* 40: 47-64.

- Smit G, Smit BA y Engels WJ.** 2005. Flavour formation by lactic acid bacteria and biochemical flavour profiling of cheese products. *FEMS Microbiol Rev.* 29: 591-610
- Sarry JE, Chen S, Collum RP, Liang S, Peng M, Lang A, Naumann B, Dzierszinski F, Yuan CX, Hippler M y Rea PA.** 2007. Analysis of the vacuolar luminal proteome of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Journal.* 274: 4287-4305.
- Snetselaar KM y Mins CW.** 1994. Light and electron microscopy of *Ustilago maydis* hyphae in maize. *Micol Res.* 98: 347-355.
- Snetselaar KM, Bölker M, y Kahmann R.** 1996. *Ustilago maydis* mating hyphae orient their growth toward pheromone source. *Fungal Genet Biol.* 20: 299-312.
- Spelling T, Bölker M, Lottspeich F, Frank RW y Kahmann R.** 1994. Pheromones trigger filamentous growth in *Ustilago maydis*. *EMBO J.* 13: 1620-1627.
- Suárez-Rendueles P y Wolf DH.** 1988. Proteinase function in yeast: Biochemical and genetic approaches to a central mechanism of post-translational control in the eukaryotic cell. *FEMS Microbiol Lett.* 54: 17-46.
- Tamayo-Ordoñez M.** 2009. Caracterización del gen *ape3* codificante de una aminopeptidasa de *Ustilago maydis*. Tesis de Maestría. Instituto Politécnico Nacional, México, DF.
- Urban M, Kahmann R y Bölker M.** 1996. Identification of the pheromone response element in *Ustilago maydis*. *Mol. Gen. Genet.* 25: 31-37.
- Wen CW y Klionsky J.** 2003. The molecular mechanism of autophagy. *Mol Med.* 9: 65-76.
- Yuk BJ, Choi SH, Lee TH, Jang MU, Park JM, Yi AR, Svensson B y Kim TJ.** 2008. Effects of Calcium Ion Concentration on Starch Hydrolysis of Barley α -Amylase Isozymes. *J Microbiol Biotechnol.* 18: 730-734.
- Zahiri AL, Babu MR y Saville BJ.** 2005. Differential gene expression during teliospore germination in *Ustilago maydis*. *Mol Gen Genomics.* 273: 394-403.
- Zubenko GS y Jones EW.** 1981. Protein degradation, meiosis and sporulation in proteinase-deficient mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 97:45-64

Anexo

a)

```

*
200
AIRC : AAATCCATCCGGCGTAATAAGCACTCACTAATAGG--GGCGAGGTC--CCGTAAGCGAGCACCCTGGTTTGCATCGGTGCAGCTTGATCCGTACTGGCGCAT : 199
AIL  : AGATCTTCCGGATGGCTCGAGTTTTTCAGCAAGATGGCGAGGTCGCCGTAAGCGAGCACCCTGGTTTGCATCGGTGCAGCTTGATCCGTACTAGCGTCAT : 128

*
300
AIRC : GACAACCATCGCGTATCGCTCGCCAGATTTTG-TATTCGAGCAGTCGTGAGTGTAGCGC-AAGCCAACCTTGTCTTCCGATCCCAGCAAATCAACCACT : 298
AIL  : GACAACCATCGCGTATCGCTCGCCAGATTTTGGIATTCGAGCAGTCGTGAGTGTAGCGCAAGCCAACCTTGTCTTCCGATCCCAGCAAATCAACCACT : 229

*
400
AIRC : CGAGCTAGCATACAAGCAGCTTGCTCGACAAGCAGACAAGCAGCCAAACAGATGCATATAAGCACCAGCGTCGGTGGTTCTCGAGATCGATTTCATCATC : 399
AIL  : CGAGCTAGCATACAAGCAGCTTGCTCGACAAGCAGACAAGCAGCCAAACAGATGCATATAAGCACCAGCGTCGGTGGTTCTCGAGATCGATTTCATCATC : 330

*
500
AIRC : GTCTCIAGATGCTTCGGACTCGCTCAACCGCTTTCCTCTTTTCGTCAAACACCATGCTCAGTCTGAGGCTGGTTTCAGCTCACCACACTGGCACTTGTGCTG : 500
AIL  : GTCTCIAGATGCTTCGGACTCGCTCAACCGCTTTCCTCTTTTCGTCAAACACCATGCTCAGTCTGAGGCTGGTTTCAGCTCACCACACTGGCACTTGTGCTG : 431

*
600
AIRC : CTCAGCGGTGCTCAGCAGGCTCGGCTCGGCCGCCAAAGCTTCGACCTGTTGATTGGIATGTTTTTGTIATAGCGTCGACATGATGATGCCGATCGTG : 601
AIL  : CTCAGCGGTGCTCAGCAGGCTCGGCTCGGCCGCCAAAGCTTCGACCTGTTGATTGGIATGTTTTTGTIATAGCGTCGACATGATGATGCCGATCGTG : 532

*
700
AIRC : CGIACGTCTCACCTCAGATGCAAACTAGACGCTGACATCCACATTCACCCGCTTGGATTCTGCTGCTCGCCCTCGATAACACGCTCAGAAACGCTTCGAAA : 702
AIL  : CGIACGTCTCACCTCAGATGCAAACTAGACGCTGACATCCACATTCACCCGCTTGGATTCTGCTGCTCGCCCTCGATAACACGCTCAGAAACGCTTCGAAA : 633

*
800
AIRC : CGACATCAAGCGTAAAGATCTCCTTGTGTCGCGCAAGCTCCAAATCGCTCGCATACGCTACGCAAGAACGCAACCGAGTGTTCGCCTCTCCCGGCCACA : 803
AIL  : CGACATCAAGCGTAAAGATCTCCTTGTGTCGCGCAAGCTCCAAATCGCTCGCATACGCTACGCAAGAACGCAACCGAGTGTTCGCCTCTCCCGGCCACA : 734

*
900
AIRC : AGGCCACCGTTTCTACATCCAGGACGAGCTCCGCAAGCGCGGACGCGGCGATTACTTTGACGTCTACCTGCAGCCGTTACCGCTACCTACGCTCAAAC : 904
AIL  : AGGCCACCGTTTCTACATCCAGGACGAGCTCCGCAAGCGCGGACGCGGCGATTACTTTGACGTCTACCTGCAGCCGTTACCGCTACCTACGCTCAAAC : 835

*
AIRC : TCTTCCGAGGGCTAGATGGCCGAAATCGTTCTIAGAAGATCTCCTCAATATTCTTCAGCC----- : 965
AIL  : TCTTCCGAGGGCTAGATGGCCGAAATCTTTCTIAGAAGATCTCCTCAATATTCT-CAGCTGCCATGGAAATCGATGTTCT : 917

```

b)

```

*
100
AIRsecRC : -----ACGGAAT--CGCCAAGCTTGGTACCGAGCTCGGATCCACTACCCTAACCGGCCCGCAGTGTGCTGGAATTCGCCCTTTGAGCCCTAGTGGCCGCTT : 96
AIR      : ACAGGTATGACCATTGATTACGCCAAGCTTGGTACCGAGCTCGGATCCACTAG--TAACGGCCGCCAGTGTGCTGGAATTCGCCCTTTGAGCCCTAGTGGCCGCTT : 105

*
200
AIRsecRC : CGCCCACTACGTACTTAGCGTCCACGACGGCGATGGAAGCAGCTTCAACCAGCCTGGACCCGCCGGCTCTGCTCAGGCCAGGCAATGTTCTTTGACTACTTCAAC : 203
AIR      : CGCCCACTACGTACTTAGCGTCCACGACGGCGATGGAAGCAGCTTCAACCAGCCTGGACCCGCCGGCTCTGCTCAGGCCAGGCAATGTTCTTTGACTACTTCAAC : 212

*
300
AIRsecRC : AATGTAGCCAAGAAACCAATTGATCGAGGTCGGTTTGTGAGCAGCAGGATTAACGGTCCGTTCTTGGATGCCGGCATTGCCGCTGGTGGTCTCGACTGGTGGCCA : 310
AIR      : AATGTAGCCAAGAAACCAATTGATCGAGGTCGGTTTGTGAGCAGCAGGATTAACGGTCCGTTCTTGGATGCCGGCATTGCCGCTGGTGGTCTCGACTGGTGGCCA : 319

*
400
AIRsecRC : AGGAATCAAGACCGAACAAGGCCAAGCTGTTTGGTGAAGTGGCGTATGTCATATGATGCCAACTACCACCAAGCCGGGACACGGTTGACAACCTGGCCATGG : 417
AIR      : AGGAATCAAGACCGAACAAGGCCAAGCTGTTTGGTGAAGTGGCGTATGTCATATGATGCCAACTACCACCAAGCCGGGACACGGTTGACAACCTGGCCATGG : 426

*
500
AIRsecRC : ACGCATTCGAGATCAACGCAAGGCCATCGCTCAGCCGTAGCCACCTACTCGACCAGCCTTGAAGTCTCGGACCCCAAGTCAACCAACACCAAGCGAAACCTAGCC : 524
AIR      : ACGCATTCGAGATCAACGCAAGGCCATCGCTCAGCCGTAGCCACCTACTCGACCAGCCTTGAAGTCTCGGACCCCAAGTCAACCAACACCAAGCGAAACCTAGCC : 533

*
600
AIRsecRC : GCGCCCAACCAATTCGGTCAAACACGCATCGCTGCGGTGGCGACCTGGCGCTCATCTAATCGCGCAAGACCCATGAGACTCAAAAATAGATAACATACAGCGCTCT : 631
AIR      : GCGCCCAACCAATTCGGTCAAACACGCATCGCTGCGGTGGCGACCTGGCGCTCATCTAATCGCGCAAGACCCATGAGACTCAAAAATAGATAACATACAGCGCTCT : 640

*
700
AIRsecRC : TGGCCCAATTTGAACAGTGTGTACAAAGCGAAGCTTGGCAGTGTGAGCAGGTCGACGGCGTGAATGGTGTGTAACCTGGCGAGCATGCGCGAGCAGGAATCGAC : 738
AIR      : TGGCCCAATTTGAACAGTGTGTACAAAGCGAAGCTTGGCAGTGTGAGCAGGTCGACGGCGTGAATGGTGTGTAACCTGGCGAGCATGCGCGAGCAGGAATCGAC : 747

*
800
AIRsecRC : ATGTTGGGTTCCCGAGATCACAGTGTGTGCA-GCTGAGACGAGCAAGCAGCAATCACTTTIACGACTGCACGAGAACGAGCAGCGTTGTGATCACGGTGA : 844
AIR      : ATGTTGGGTTCCCGAGATCACAGTGTGTGCA-GCTGAGACGAGCAAGCAGCAATCACTTTIACGACTGCACGAGAACGAGCAGCGTTGTGATCACGGTGA : 853

```

Anexo. Alineamiento de la secuencia teórica de las construcciones genéticas a) pJET-AIL y b) Topo-AIR, con la obtenida por secuenciación. En rojo se indica el sitio de corte *Sfi* I.

a)

```

*
600
AFIpJet-pJ : ATCGCTTCGCCCA---TGTACTIAGCGTCCACGACGGCGATGGAAGCACGTTCA-CCAGCCTGGACCC--CGGCTCTGCTCAGGCCGAGGCAATGTTCTTTGAC : 160
AFL       : ATCGCTTCGCCCAACTACGTACTIAGCGTCCACGACGGCGATGGAAGCACGTTCAACCAGCCTGGACCCGCGCGCTCTGCTCAGGCCGAGGCAATGTTCTTTGAC : 630

*
700
AFIpJet-pJ : TACTTCAACAATGTAGCCAAGAAACCATTGATCGAGGGTCCGTTTGATGGACGCAGCGATTACGGTCCGTTCTTGGATGCCGGCATTGCCGGTGGTGGTCTCGAC : 265
AFL       : TACTTCAACAATGTAGCCAAGAAACCATTGATCGAGGGTCCGTTTGATGGACGCAGCGATTACGGTCCGTTCTTGGATGCCGGCATTGCCGGTGGTGGTCTCGAC : 735

*
800
AFIpJet-pJ : ACTGGTGCCGAAGGAATCAAGACCGAACAAGAGGCCAACGTTTGGTGGAACTGCCGGTATTGCATATGATGCCAACTACCACCAAGCCGGCGACACGGTTGAC : 370
AFL       : ACTGGTGCCGAAGGAATCAAGACCGAACAAGAGGCCAACGTTTGGTGGAACTGCCGGTATTGCATATGATGCCAACTACCACCAAGCCGGCGACACGGTTGAC : 840

*
900
AFIpJet-pJ : AACTTGGCCATGGACGCATTTCGAGATCAACGCAAGGCCATCGCTCAGCGGTAGCCACCTACTCGACACGCTTGAAAGTCTCGGACCCAAGTCAACCAACACC : 475
AFL       : AACTTGGCCATGGACGCATTTCGAGATCAACGCAAGGCCATCGCTCAGCGGTAGCCACCTACTCGACACGCTTGAAAGTCTCGGACCCAAGTCAACCAACACC : 945

*
1000
AFIpJet-pJ : AAGCGAAACCTAGCCGCGCCCAACCAAGTCGGTCAAACACGCAATCGCTGCGGTGGCGACCTGGCGCTCATCAAAGCCACGCGCCGAAAGATCTT---TCTA : 576
AFL       : AAGCGAAACCTAGCCGCGCCCAACCAATTCGGTCAAACACGCAATCGCTGCGGTGGCGACCTGGCGCTCATCAAAGCCACGCGCCGAAATTCCTTTATTTCTCTC : 1050

```

Anexo. Alineamiento de la secuencia teórica de la construcción genética Topo-AFL con la obtenida por secuenciación. En rojo se indica el sitio de corte *Sfi* I.

a)

```

*
400
DILRC : AAAGCCGCACACAGCAGCAGCACCACACCCATCACCCGCTACAGATTACAGATCCGTCGACTTTTCAACTCAATGCGATCGTAGCTATTGTCTCATATCCCACCCATCA : 263
DIL : AAAGCCGCACACAGCAGCAGCACCACACCCATCACCCGCTACAGATTACAGATCCGTCGACTTTTCAACTCAATGCGATCGTAGCTATTGTCTCATATCCCACCCATCA : 440

*
500
DILRC : CAGCCCCAGGACTGGACGTATTTCTGTTCGCTTGACGATATCGACGCGATGGCGGACACATGCCGAGTGCCACGCGCATCGIACGATTTCGAAGCCACCGCTCCGATG : 373
DIL : CAGCCCCAGGACTGGACGTATTTCTGTTCGCTTGACGATATCGACGCGATGGCGGACACATGCCGAGTGCCACGCGCATCGIACGATTTCGAAGCCACCGCTCCGATG : 550

600
DILRC : CAACCATGGATCAAGACGAAAAGCTCGAGCGTTACAGAGATACCTATCCTGAAAGCTCGCCATCTATCCACCCAAACAAATCTTCACCATATACTCCTCGTCTCAGG : 483
DIL : CAACCATGGATCAAGACGAAAAGCTCGAGCGTTACAGAGATACCTATCCTGAAAGCTCGCCATCTATCCACCCAAACAAATCTTCACCATATACTCCTCGTCTCAGG : 660

700
DILRC : GACGATCTGGAAGATGGTCTTGGTACACAGTTGGACGATGACGACACAGTTGGATTGATGACAGGCTGATAGACGCGCAGGCGCACGAGCGCACGCTCGAGGGCACCCTGTG : 593
DIL : GACGATCTGGAAGATGGTCTTGGTACACAGTTGGACGATGACGACACAGTTGGATTGATGACAGGCTGATAGACGCGCAGGCGCACGAGCGCACGCTCGAGGGCACCCTGTG : 770

800
DILRC : GTCCATGATGGCTCCAAGAAACCTGCGAGIATGATGACAGGCTGCTTGCATCTGCACCTGGCGTCGTGATCGGGTTTGTGCTCGGATTGCCGTTGTTGCAATGGCTGCTG : 703
DIL : GTCCATGATGGCTCCAAGAAACCTGCGAGIATGATGACAGGCTGCTTGCATCTGCACCTGGCGTCGTGATCGGGTTTGTGCTCGGATTGCCGTTGTTGCAATGGCTGCTG : 880

900
DILRC : CGAACACGAGCACATCGACAAGCGCCTCAGCAACACCTGCACCATCGCTTCCGACTCTTTCAGGCGGACAGACAGATGCTCTTTCAAGCTTGCACGCTTCATCGACA : 813
DIL : CGAACACGAGCACATCGACAAGCGCCTCAGCAACACCTGCACCATCGCTTCCGACTCTTTCAGGCGGACAGACAGATGCTCTTTCAAGCTTGCACGCTTCATCGACA : 990

1000
DILRC : GCGTCGACAGCGCTGGCGAATGGAAGCAATCGGCTTCCCGAGATACCGCGCTGGCCACTACGCGTTTCCAAACACCTCGGTGTTTCAAGTGCAGTTCACAGACGAGG : 923
DIL : GCGTCGACAGCGCTGGCGAATGGAAGCAATCGGCTTCCCGAGATACCGCGCTGGCCACTACGCGTTTCCAAACACCTCGGTGTTTCAAGTGCAGTTCACAGACGAGG : 1100

*
DILRC : CTGGAACACTTTCGCCCAAGGGCCTAGATGGCGAATCGATTCTAGAAGATCTCCIAACAATATTCTTCAGCA----- : 995
DIL : CTGGAACACTTTCGCCCAAGGGCCTAGATGGCGAATCTTTCTAGAAGATCTCCIAACAATATTCT-CAGTGCATGGAATAATCGATGTTCTT : 1193

```

b)

```

*
100
DIRsec : CCGCCAGACTTCCGGATGGCTCGAGTTTTTCAGCAAGATTGAGGCCTAGTGGCGGTACCACCACTGGCTCTTCTACGACTCGGTCTACACGGAACGATACCTGAA : 108
DIRpjet : -----AGTTTTTCAGCAAGATTGAGGCCTAGTGGCGGTACCACCACTGGCTCTTCTACGACTCGGTCTACACGGAACGATACCTGAA : 83

*
200
DIRsec : ATCGCCATAAATAACAAACCGGTTACGACACAGCGGCTGACACGCTCAATACCGGTTTGCAAAGACAAGATATCTGCTCATGCAAGGATCGGCGGATGACAATGT : 216
DIRpjet : ATCGCCATAAATAACAAACCGGTTACGACACAGCGGCTGACACGCTCAATACCGGTTTGCAAAGACAAGATATCTGCTCATGCAAGGATCGGCGGATGACAATGT : 191

*
300
DIRsec : TCACCTTIAGCAATTCGGCGCACATGCTGGATCTGCTGACCAAGGCGAAAGTGCAGAGGATTCAGGTTIAGGATGTTACGCAATTCAGCCATAGTGTGAGTACAAGGG : 324
DIRpjet : TCACCTTIAGCAATTCGGCGCACATGCTGGATCTGCTGACCAAGGCGAAAGTGCAGAGGATTCAGGTTIAGGATGTTACGCAATTCAGCCATAGTGTGAGTACAAGGG : 299

*
400
DIRsec : GCGGTATCGAGAACTGTTTGGAGATGACGGCATTCTTACCAGACGCTGGGTGCAGGTGGAAGACAGAGGACAAGAACCATCTGACCGGCAAAAGGGTCGCCC : 432
DIRpjet : GCGGTATCGAGAACTGTTTGGAGATGACGGCATTCTTACCAGACGCTGGGTGCAGGTGGAAGACAGAGGACAAGAACCATCTGACCGGCAAAAGGGTCGCCC : 407

*
500
DIRsec : GCGGCTGCATAATTCCTAGAGTAGA----TCACCGATGTAGACAGACGAGCATCACAGAATGGIATAAAGTTATTCGTGGTTGCGGGCTGTCAGTACAGCAACT : 535
DIRpjet : GCGGCTGCATAATTCCTAGAGTAGATACCGATGTAGACAGACGAGCATCACAGAATGGIATAAAGTTATTCGTGGTTGCGGGCTGTCAGTACAGCAACT : 515

*
600
DIRsec : CAGCGTCGGTGTGCTGACAGCGGACGTCACATTCGTCATCCGCTGATTCACGATTCATGATTCAGGATTTGTGATTCAGGATTTGTGATTTGACCGGCTCTCGAA : 643
DIRpjet : CAGCGTCGGTGTGCTGACAGCGGACGTCACATTCGTCATCCGCTGATTCACGATTCATGATTCAGGATTTGTGATTCAGGATTTGTGATTTGACCGGCTCTCGAA : 623

*
700
DIRsec : ATCGCCGAAAACAGCAACGCGCACCCTCCTAAGTGGTACAGTAACTTTCGCTCGGTTTCGACAGGCTIATAGTCGGAGCGGACTCGTCCACGCGGTTTCTAGC : 751
DIRpjet : ATCGCCGAAAACAGCAACGCGCACCCTCCTAAGTGGTACAGTAACTTTCGCTCGGTTTCGACAGGCTIATAGTCGGAGCGGACTCGTCCACGCGGTTTCTAGC : 730

800
DIRsec : TCTCACGGCTACAGTAAGTGGCGGCTATCGGTGAATTTCTGTGTGCCA-GAGCGAACC-CGAACGCTTGCA-CCGAGCTAAGCTG-TCATTCGTGATTGCA-TCCA : 854
DIRpjet : TCTCACGGCTACAGTAAGTGGCGGCTATCGGTGAATTTCTGTGTGCCAAGAGCGCAACCACGACGCTTGCAAGCCGAGCTAAGCTGCTCATTCGTGATTGCAATCCA : 838

```

Anexo. Alineamiento de la secuencia teórica de las construcciones genéticas a) pJET-DIL y b) pJET-DIR con la obtenida por secuenciación. En rojo se indica el sitio de corte *Sfi* I.

a)

```

*
DPLRC : CCGGGCTCTGGCGCCTTGAAGCTGTTGACAGCTTTGGCAGGCCCATTTGGTCGAGGGCTTGAACCGTCAAGCTCTCACACGCTCGTTTGATTCCC-TCCTACCAACTG : 233
DPL  : CCGGGCTCTGGCGCCTTGAAGCTGTTGACAGCTTTGGCAGGCCCATTTGGTCGAGGGCTTGAACCGTCAAGCTCTCACACGCTCGTTTGATTCCCCTACCAACTG : 330

*
DPLRC : AAGACCTGTTTCCACCAGCGGTGCAACAGACAGATCCATCCAGCTCTTTTGAATTCGCTTGATCGACCCAGCTGTTACAGAGTGTGCTAGTGTATGATCGAGCC : 343
DPL  : AAGACCTGTTTCCACCAGCGGTGCAACAGACAGATCCATCCAGCTCTTTTGAATTCGCTTGATCGACCCAGCTGTTACAGAGTGTGCTAGTGTATGATCGAGCC : 440

*
DPLRC : AGACATGCGCACATGCGCATTGCTACAGTACTGTATGTCGAGCTCGAAGTGTGAATCTAGCCAGTGAAGTCTGAAATCTCGGATGGCCGTTGGTTCGCGACGAGAGGGTA : 453
DPL  : AGACATGCGCACATGCGCATTGCTACAGTACTGTATGTCGAGCTCGAAGTGTGAATCTAGCCAGTGAAGTCTGAAATCTCGGATGGCCGTTGGTTCGCGACGAGAGGGTA : 550

*
DPLRC : GAAGAACCCTGAATTCGAAATTCACGATTCGTAGCTGGTGGCCAGTGGTGTGCTGAGTGTGCTGAGTGTGCTGAAATCAGCAATACACAGTACAGTACAGTACTGAGTACTGAGT : 563
DPL  : GAAGAACCCTGAATTCGAAATTCACGATTCGTAGCTGGTGGCCAGTGGTGTGCTGAGTGTGCTGAGTGTGCTGAAATCAGCAATACACAGTACAGTACTGAGTACTGAGT : 660

*
DPLRC : ATTTTGGGTTGGAATTTGACATGGCAGCGCACGCGCACAGCACCCTGCAGATTTTCAAGCTTGCCTGCTGCTGCTTGGATTGGACGTTATGAGGTTATGAGGTTGGGTTGGTGG : 673
DPL  : ATTTTGGGTTGGAATTTGACATGGCAGCGCACGCGCACAGCACCCTGCAGATTTTCAAGCTTGCCTGCTGCTGCTTGGATTGGACGTTATGAGGTTATGAGGTTGGGTTGGTGG : 770

*
DPLRC : TTCATGATTCGTGATTTGTCGCGAGGTGAATCAGAGACCCCTGGAAGCGAGCGCGTCTTGAACCTCGAAGTTCACACTCAGACTCGATCAGCTGATGAGCCAAAGCCGC : 783
DPL  : TTCATGATTCGTGATTTGTCGCGAGGTGAATCAGAGACCCCTGGAAGCGAGCGCGTCTTGAACCTCGAAGTTCACACTCAGACTCGATCAGCTGATGAGCCAAAGCCGC : 880

*
DPLRC : ACACACGACGAGCACCACCCATCACCCTACAGATTCAGCATCCGTCGACTTTTCAACTCAATGCGATCGTAGCTATGTCATATCCACCCTATCACAGCCCCA : 893
DPL  : ACACACGACGAGCACCACCCATCACCCTACAGATTCAGCATCCGTCGACTTTTCAACTCAATGCGATCGTAGCTATGTCATATCCACCCTATCACAGCCCCA : 990

*
DPLRC : GGAGACTGGACGATTTCTGTTGCCCTGACGATATCGACGCGGCCAGCAGGCTGAAATCGATTCTAGAGATCTCCTACAATATTTACAGC----- : 985
DPL  : GGAGACTGGACGATTTCTGTTGCCCTGACGATATCGACGCGGCCAGCAGGCTGAAATCGATTCTAGAGATCTCCTACAATATTTCT-CAGTGCCATGGAATTCGATG : 1098

```

b)

```

*
DPRsecRC : AGGCTTCGGATCCCTATTCTCAGGCCGAAAATGTGCTGGAATTCCTTTCCC---TTGAGGCTCAGTGGC-----ATGG-GGACACATGCCAGTGGCCAGCGCATCGTA : 103
DPR  : -----GGCTCGAGTTTTTCAGCAAGATTGAGGCTCAGTGGC-----ATGGCGGACACATGCCAGTGGCCAGCGCATCGTA : 73

*
DPRsecRC : CGATTTCCCAAGCCACCGCTTCGATGCAACCATGGATCAAGACGAAAAGCTCGAGCGTTACAGAGATACCTATCCTGAAAGCTCTGCCATCTATCCACCCAAACCCAAA : 210
DPR  : CGATTTCCCAAGCCACCGCTTCGATGCAACCATGGATCAAGACGAAAAGCTCGAGCGTTACAGAGATACCTATCCTGAAAGCTCTGCCATCTATCCACCCAAACCCAAA : 180

*
DPRsecRC : CATCTTACCAIATACTCCTCGTCTCAGGACGATCTGGAAGATGGTCTTGACACAGTGGACGATGACGAAACAGGTTGGATTGATGACAGGCTGATAGACAGCGCA : 317
DPR  : CATCTTACCAIATACTCCTCGTCTCAGGACGATCTGGAAGATGGTCTTGACACAGTGGACGATGACGAAACAGGTTGGATTGATGACAGGCTGATAGACAGCGCA : 287

*
DPRsecRC : CGAAGCGCAGCAGTCT-AGGCGCACCCGTGTGGTCCATGATGGCTCCAAAGAACCTGCGAGTATGATGACAGGCTGCTGATGCACTGGCCTGCTGATCGGGTT : 423
DPR  : CGAAGCGCAGCAGTCTGAGGCGCACCCGTGTGGTCCATGATGGCTCCAAAGAACCTGCGAGTATGATGACAGGCTGCTGATGCACTGGCCTGCTGATCGGGTT : 394

*
DPRsecRC : TGTGCTCGGATTTGCCGT-GTTGCAATGGCTCTGTC-BACACA--CACATCGACAAGCGCCTCA-CAACACCTGCACCATCGCTTGGCCACTCTTTC-CGGC-GACA : 523
DPR  : TGTGCTCGGATTTGCCGTGTTGCAATGGCTCTGTCGACACAGCAGCATCGACAAGCGCCTCAGCAACACCTGCACCATCGCTTGGCCACTCTTTCACGGCGGACA : 501

*
DPRsecRC : AGACA-ATGCTCTTTCAGCTTGC-CGCTTCCTC-ACAGCGTCCACAGCGCTTGGCCACTGGAAC--ATCGGCTTCCCAGATACCGCGCTGGCCACTACGCGTTT : 625
DPR  : AGACAGATGCTCTTTCAGCTTGCACGCTTTCATCGACAGCGTCCACAGCGCTTGGCCACTGGAAC--ATCGGCTTCCCAGATACCGCGCTGGCCACTACGCGTTT : 608

*
DPRsecRC : TCCAACACCTCGGTTTTCGGGTCGACTTCCA-CAGCAGCTTGAACACTTTTCCGCCAAGCTGCCGTTGGAACCGGCTGACATCGCAATTCATCTCCTCAA : 731
DPR  : TCCAACACCTCGGTTTTCAGGTCGACTTCCAAGACGAGGCTGGAACACTTTTCCGCCAAGCTGCCGTTGGAACCGGCTGACATCGCAATTCATCTCCTCAA : 715

```

Anexo. Alineamiento de la secuencia teórica de las construcciones genéticas a) pJET-DPL y b) pJET-DPR1 con la obtenida por secuenciación. En rojo se indica el sitio de corte *Sfi* I.

a)

```

*
400
DFLRC : GCGCGACG-TCGTGAGCGTCAAGGAGAT-CGTCCGCACGACTT-GACGCGTCGG-AGCGACCAAATATCCCGTACTGGTACGCGGTGATGGAGACCGGATTCGCAGCTC : 145
DFL  : GCGCGACGTCGTGAGCGTCAAGGAGATTCGTCCGCACGACTTTGACGCGTCGGGAGCGACCAAATATCCCGTACTGGTACGCGGTGATGGAGACCGGATTCGCAGCTC : 440

*
500
DFLRC : GTCGATGCGCGATGGAACCGTGCTGACTGGCATCAGTACGTAGCCTCTACGCTCGGTTACATTGTGGTTGTCGTCGATGGACGCGGGACTGGATTCAAAGGTCAATTGTA : 255
DFL  : GTCGATGCGCGATGGAACCGTGCTGACTGGCATCAGTACGTAGCCTCTACGCTCGGTTACATTGTGGTTGTCGTCGATGGACGCGGGACTGGATTCAAAGGTCAATTGTA : 550

600
DFLRC : CCGCTCGTCGCTGGCTGGCAACTTGGGCCATCTAGAAGCGCAGGACGTCGCGGAAGCCGCTCGCTCGTCTCGACGCTGGGCTACGTGGATTCCAGACGCATCGGTCTGT : 365
DFL  : CCGCTCGTCGCTGGCTGGCAACTTGGGCCATCTAGAAGCGCAGGACGTCGCGGAAGCCGCTCGCTCGTCTCGACGCTGGGCTACGTGGATTCCAGACGCATCGGTCTGT : 660

700
DFLRC : GGGGCTGGTCGTACGGCGGATATCTGACCGCCAGACGATCGAGCTCGCGTCCAACGTTIAGCCTGGCGGCTCAGTAGCTCCGGTCAACAAGTGGCTTCTTACGAC : 475
DFL  : GGGGCTGGTCGTACGGCGGATATCTGACCGCCAGACGATCGAGCTCGCGTCCAACGTTIAGCCTGGCGGCTCAGTAGCTCCGGTCAACAAGTGGCTTCTTACGAC : 770

800
DFLRC : TCGGTCTACACGGAACGATACTGAAATCGCCATAAATAACAAACACGCGTTACGACACTCGGGTGTACACGTCATACGCGGTTTGCAAAGACAAAGTATCTGCTCAT : 585
DFL  : TCGGTCTACACGGAACGATACTGAAATCGCCATAAATAACAAACACGCGTTACGACACTCGGGTGTACACGTCATACGCGGTTTGCAAAGACAAAGTATCTGCTCAT : 880

900
DFLRC : GCAAGGATCGCGGATGACAATGTTCACTTIIAGCAATTTCGGCGCACATGCTGGATCTGCTGACCAAGGCGAAAGTGAGAGGATTCAGGTTTAGGATGTTACCGGATTCAA : 695
DFL  : GCAAGGATCGCGGATGACAATGTTCACTTIIAGCAATTTCGGCGCACATGCTGGATCTGCTGACCAAGGCGAAAGTGAGAGGATTCAGGTTTAGGATGTTACCGGATTCAA : 990

1000
DFLRC : GCCATAGTGTGAGTACAAGGGGGCGTATCGAGAAGTCTTTCAGGAGATGACGGCATTTCTTGACCGAGACGTTGGGTCAGGTCGAAAGAGAGAGGACAAGAACCATCTG : 805
DFL  : GCCATAGTGTGAGTACAAGGGGGCGTATCGAGAAGTCTTTCAGGAGATGACGGCATTTCTTGACCGAGACGTTGGGTCAGGTCGAAAGAGAGAGGACAAGAACCATCTG : 1100

*
1200
DFLRC : ACCGGCAAAAAGGTCGCCCCGGCTGCATAAATCCGTAGAGAGGGCCACCGCGCGCAAAATAAGGGCGAATTCGACAGATATCCATCACACTGGCGCGCGCTCGAGCAT : 915
DFL  : ACCGGCAAAAAGGTCGCCCCGGCTGCATAAATCCGTAGAGAGGGCCACCGCGCGCGCAAAATAAGGGCGAATTCGACAGATATCCATCACACTGGCGCGCGCTCGAGCAT : 1210

```

b)

```

*
100
DFRsec : -----CGCCAGAACTTCCGGAATGGCTCGAGTTTTCTGCAAGATTGAGGCTCAGTGGCGGCAC : 62
DFR    : AACACCAATCCATCCGGCGTAATACGACTCACTATAGGGAGAGCGCCGCCAGA-TCTTCCGGA-TGGCTCGAGTTTTTCAGCAAGATTGAGGCTCAGTGGCGGCAC : 107

*
200
DFRsec : TGACCCCGCAAAGATCCCCATTCATATGTCGGCGATACGAACACGCACTTCTGTCCCGCCACGAGGCACGTCGAGCATTCACAATCGTGAATCGTGAATTTGTGAT : 171
DFR    : TGACCCCGCAAAGATCCCCATTCATATGTCGGCGATACGAACACGCACTTCTGTCCCGCCACGAGGCACGTCGAGCATTCACAATCGTGAATCGTGAATTTGTGAT : 216

*
300
DFRsec : TTCGATGGCACTTGGATTCAATTTAAGAAAATTCACGATTCGTAGTCTGAGTTGATAAAGAAAAGTCAGAGTGGCCGAACTGAGCAGAGAAGCAGAGGCTATCCA : 280
DFR    : TTCGATGGCACTTGGATTCAATTTAAGAAAATTCACGATTCGTAGTCTGAGTTGATAAAGAAAAGTCAGAGTGGCCGAACTGAGCAGAGAAGCAGAGGCTATCCA : 325

*
400
DFRsec : GGGCATATCAGAGAGCCGATAGCGTGGATCGAGGATATTTCTCAAAATCGTATCGTGTATATATGGAGACGCGTGTGGATAGCGTTTTGCCGACGCACTCCTGCCAAC : 389
DFR    : GGGCATATCAGAGAGCCGATAGCGTGGATCGAGGATATTTCTCAAAATCGTATCGTGTATATATGGAGACGCGTGTGGATAGCGTTTTGCCGACGCACTCCTGCCAAC : 434

*
500
DFRsec : CTCACGACCTTCTCGACCAAGTGCCTTGCTCGTTTTATCCACCCAGTTTTATCGGGATAGCGTCCCGTAAAGCTTGATTCGACCATGTCGTTTCGAGAGCCCTCGT : 498
DFR    : CTCACGACCTTCTCGACCAAGTGCCTTGCTCGTTTTATCCACCCAGTTTTATCGGGATAGCGTCCCGTAAAGCTTGATTCGACCATGTCGTTTCGAGAGCCCTCGT : 543

*
600
DFRsec : CTACAACCGCGCTCCGAGCTCGCCATCCAACCCATTCGGACATGGTCAAGAGCTTGTGCGGTTIACCGCTCGCGCTCCACCACCACCGCCGCGCCAAATGCCGA : 607
DFR    : CTACAACCGCGCTCCGAGCTCGCCATCCAACCCATTCGGACATGGTCAAGAGCTTGTGCGGTTIACCGCTCGCGCTCCACCACCACCGCCGCGCCAAATGCCGA : 652

700
DFRsec : CGCCGCTAGCCGTACGATGCTTTTGAAGAATGCTCGCTCTACACCGTTTTCTCTCGCGGCTGGGTGGACGCTACGCGGGTGCACACTTCCGGCTATCCGCGCG : 716
DFR    : CGCCGCTAGCCGTACGATGCTTTTGAAGAATGCTCGCTCTACACCGTTTTCTCTCGCGGCTGGGTGGACGCTACGCGGGTGCACACTTCCGGCTATCCGCGCG : 761

800
DFRsec : CACTGGGATCTCAGCTTCGCTACGCTCTCGATGCTCTTTGCGG-ACATTCAGTGGGCTTCAATTCGCCCGCTCTCGTCTCGCCATATGATGGATCGGTTTTGGTCT : 824
DFR    : CACTGGGATCTCAGCTTCGCTACGCTCTCGATGCTCTTTGCGGACATTCAGTGGGCTTCAATTCGCCCGCTCTCGTCTCGCCATATGATGGATCGGTTTTGGTCT : 869

```

Anexo. Alineamiento de la secuencia teórica de las construcciones genéticas a) Topo-DFL y b) pJET-DFR con la obtenida por secuenciación. En rojo se indica el sitio de corte *Sfi* I.