



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

Secretaría de Investigación y Posgrado
ESCUELA NACIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
Sección de Estudios de Posgrado e Investigación
Posgrado en Ciencias Quimicobiológicas

CARACTERIZACIÓN DEL GEN *ape3*,
CODIFICANTE DE UNA AMINOPEPTIDASA DE
***Ustilago maydis*.**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS
QUIMICOBIOLOGICAS

PRESENTA:

I.B.Q. MARÍA CONCEPCIÓN TAMAYO
ORDONEZ

DIRECTORES:

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

MÉXICO D.F., julio 2009.



El presente trabajo se desarrolló en los Laboratorios de Genética Microbiana y Microbiología General del Departamento de Microbiología de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional, bajo la dirección de la Dra. Ma. de Lourdes Villa Tanaca y el Dr. César Hugo Hernández Rodríguez.

El presente trabajo recibió apoyo de los proyectos:

CONACyT-84085 “El papel de las proteasas vacuolares de *Ustilago maydis* en el recambio proteico y control post-traducciona

SIP2009 “Las proteasas de hongos como factores de virulencia y mecanismos de sobrevivencia en condiciones de estrés, su uso como blancos terapéuticos”

SIP20082350 “Análisis bioquímico y molecular del papel de las proteasas en la virulencia, metabolismo nitrogenado y control post-traducciona de hongos de interés médico, fitopatogéno y biotecnológico”

SIP20070248 “Diversidad de genes codificantes de proteasas de hongos patógenos y de interés biotecnológico”

La sustentante **María Concepción Tamayo Ordoñez** fue becaria PIFI durante los períodos Enero-Junio 2008 y Agosto-Diciembre 2008, así como becaria CONACyT durante el período Enero 2007- Diciembre 2008, con el registro CVU 217463/208136.

“La ciencia, a pesar de sus progresos increíbles, no puede ni podrá nunca explicarlo todo. Cada vez ganará nuevas zonas a lo que hoy parece inexplicable. Pero las rayas fronterizas del saber, por muy lejos que se eleven, tendrán siempre delante un infinito mundo de misterio.”

GREGORIO MARAÑÓN

DEDICATORIAS:

A MIS PADRES:

Por estar siempre a mi lado, por confiar en mí, por nunca dejarme caer, simplemente por el hecho de amarme.

A MIS HERMANOS:

Yahaira, Francisco y Diana, por su apoyo incondicional.

A MI NOVIO:

Por su comprensión en todo momento y por el amor brindado.

AGRADECIMIENTOS:

A MIS DIRECTORES DE TESIS, LA DRA. LOURDES VILLA TANACA Y AL DR. CÉSAR H. HERNÁNDEZ RODRÍGUEZ:

Por su apoyo y por las enseñanzas que contribuyeron a mi formación académica pero sobre todo por su paciencia. Gracias.

A MIS SINODALES:

Dra. Janet Jan Roblero

Dra. Aracely Contreras Rodríguez

Dr. Juan Carlos Cancino Díaz

Dr. En Tao Wang Hu

Por la revisión de este trabajo y sus valiosos comentarios.

A LA MTRA. MARGARITA JUAREZ MONTIEL Y AL DR. EVERARDO CURIEL:

Por su apoyo y comprensión, por su amistad incondicional y mas que nada por ceer en mi. Gracias.

A MIS COMPAÑEROS:

Chucho, Javier, Zahuiti, Emma, Berenice, Yuliana, Camilo, Arturo, Yendi, Maru, Víctor, Aurea, Erick, Fabiola, Catherin, Eduardo, Eneida, Liliana y Pablo.

En especial a: Omar, Martha, Mariela, Pablo y Anita

Por hacer ameno el ambiente de trabajo

A MIS AMIGOS:

Lenny, Giovanni, Juan Manuel, Gisel, Raymundo, Eyner, Fátima, Candy y Beatriz.

Por todas las travesuras y responsabilidades compartidas.

CONTENIDO

ÍNDICE GENERAL	<i>i</i>
ÍNDICE DE FIGURAS	<i>ii</i>
ÍNDICE DE TABLAS	<i>iii</i>
RESUMEN	<i>iv</i>
ABSTRACT	<i>v</i>
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	14
III. JUSTIFICACIÓN	20
IV. OBJETIVOS	21
V. DIAGRAMA GENERAL DE TRABAJO	22
VI. MATERIALES Y MÉTODOS	23
VII. RESULTADOS	37
VIII. DISCUSIÓN	55
IX. CONCLUSIONES	63
X. PERSPECTIVAS	64
XI. BIBLIOGRAFÍA	65
XII. ANEXOS	69

Índice de figuras.

Fig. 1. Tumor característico del carbón del maíz en la mazorca.	2
Fig. 2. Ciclo de vida de <i>U. maydis</i> .	4
Fig. 3. Interacción de los loci <i>a</i> y <i>b</i> durante el desarrollo de <i>U. maydis</i> .	6
Fig. 4. La vía de la ubiquitina-proteasoma.	10
Fig. 5. Diagrama general de trabajo.	22
Fig. 6. Representación esquemática de la posición de los oligonucleótidos diseñados.	26
Fig. 7. Representación esquemática de la posición de los oligos ape3Dc y ape3Rintrón.	27
Fig.8. Representación esquemática del pCR ^R 2.1-TOPO, vector de clonación.	31
Fig. 9. Mapa de los vectores de expresión pPICZ α A y pPICZA.	32
Fig. 10. Representación esquemática de la posición del intrón en el gen <i>ape3</i> .	36
Fig. 11. Esquema de la región corriente arriba del gen <i>ape3</i> de <i>U. maydis</i> y localización relativa de algunos sitios de unión a factores de transcripción potenciales detectados por el programa MatInspector.	38
Fig. 12. Perfil de hidrofobicidad y predicción de regiones transmembranales de la proteína deducida del gen <i>ape3</i> de <i>U. maydis</i> .	39
Fig. 13. Mapa de restricción del gen <i>ape3</i> de <i>U. maydis</i> .	41
Fig. 14. Amplificación de <i>ape3a</i> y <i>ape3b</i> por PCR.	43
Fig. 15. Análisis de restricción de la construcción pCR2.1-TOPO- <i>ape3a</i> .	44
Fig. 16. Análisis de restricción de la construcción pPICZ α A- <i>ape3a</i> .	45
Fig. 17. Análisis de restricción de la construcción pPICZA- <i>ape3b</i> .	46
Fig. 18. Análisis electroforético del amplificado del gen <i>ape3</i> obtenido por PCR a partir del DNA genómico de transformantes <i>P. pastoris</i> .	47
Fig. 19. Determinación de la expresión por RT-PCR del gen <i>ape3</i> en transformantes de <i>P. pastoris</i> .	48
Fig. 20. Amplificado del intrón del gen <i>ape3</i> por PCR a partir de cDNA de transformantes de <i>P. pastoris</i> .	49

Índice de figuras

Fig. 21. Cinética de actividad específica de la proteína recombinante APE3bi- rec sobre diferentes sustratos, en <i>P. pastoris</i> .	51
Fig. 22. Determinación de la expresión del gen <i>ape3</i> en diferentes fuentes de nitrógeno.	53
Fig. 23. Determinación de la expresión del gen <i>ape3</i> durante transición dimórfica.	53
Fig. 24. Determinación de la expresión del gen <i>ape3</i> en diferentes fuentes de carbono.	54
Fig. 25. Determinación de la expresión del gen <i>ape3</i> durante inanición.	54

Índice de tablas.

Tabla 1. Ustilaginales que causan carbón en las plantas.	1
Tabla 2. Proteasas vacuolares de <i>Sacharomyces cerevisiae</i> .	12
Tabla 3. Genes y características de aminopeptidasas hipotéticas de <i>U. maydis</i> .	18
Tabla 4. Principales factores de transcripción que se unen potencialmente a la región reguladora del gen <i>ape3</i> .	37
Tabla 5. Secuencias motifs encontradas en la secuencia de la proteína predicha codificada por el gen <i>ape3</i> de <i>U. maydis</i> .	40
Tabla 6. Oligonucleótidos diseñados para el estudio del gen <i>ape3</i> .	42
Tabla 7. Actividad específica de la proteína recombinante APE3bi-rec en la fracción extracto libre de células de <i>P. pastoris</i> .	50

Resumen

En este trabajo se caracterizó el gen *ape3* de *Ustilago maydis*. La proteína recombinante presentó actividad aminopeptidásica.

El análisis bioinformático del genoma de *U. maydis* indicó la presencia de un ORF de 1 649 pb, homólogo al gen *ape3* de *Saccharomyces cerevisiae*, la proteína predicha es de 506 aminoácidos, con un peso molecular 53.6 kDa. La proteína deducida presenta un motivo característico de las metalopeptidasas pertenecientes a la familia de las aminopeptidasas Y (M28), así como sitios de fosforilación, N-meristilación y N-glicosilación. En el extremo 5' del gen se reporta un intrón de 131 pb. Mediante pruebas de RT-PCR se encontró que este intrón no es procesado en transformantes de *P. pastoris*. El intrón debe de ser procesado para poder detectar la actividad de aminopeptidasa.

Los fragmentos *ape3a* (con intrón) y *ape3b* (sin intrón) del gen *ape3*, codificante de una aminopeptidasa fueron clonados en los vectores de expresión pPICZ α A y pPICZA. La expresión heteróloga del gen *ape3* en *Pichia pastoris* se indujo cuando las transformantes se crecieron en un medio mínimo con metanol. La actividad bioquímica confirmó que el gen *ape3* codifica una enzima con actividad aminopeptidásica. La actividad bioquímica fue detectada en un extracto libre de células de un cultivo de *P. pastoris* de 72 h. La enzima hidrolizó preferencialmente substratos como pro-pNA y arg-pNA.

El análisis de expresión por RT-PCR cultivando a *Ustilago maydis* en diferentes fuentes de nitrógeno, carbono e inaniciones, sugiere que el gen *ape3* está regulado por la fuente de nitrógeno disponible y condiciones de estrés nutricional.

Abstract

In this work *Ustilago maydis* *ape3* gene was characterized. The recombinant protein presented aminopeptidase activity.

The bioinformatic analysis of the genome of *U. maydis* indicated the presence of an ORF of 1 649 bp, homologous to *ape3* gene of *Saccharomyces cerevisiae*, the predicted protein was 506 amino acids with a molecular weight of 53.6 kDa. The deduced protein presents characteristics of metallopeptidase belonging to the family of the aminopeptidase Y (M28), and phosphorylation, N- and N-glycosylation myristilation sites. In the 5' region of the gene is reported an intrón of 131 bp. By RT-PCR tests it was found that this intron is not processed in transformants *Pichia pastoris*. This intron must be processing to detect aminopeptidase activity.

ape3a (with intron) and *ape3b* (without intron) fragments from the *ape3* gene, were cloned in pPICZαA and pPICZA vectors. *ape3* gene heterologous expression in *P. pastoris* was induced when the transformants were grow in a minimal medium with methanol. Biochemical activity confirmed that *ape3* gene encodes aminopeptidase activity. Enzymatic activity was determined in cell-free extract from *P. pastoris* culture of 72 h. The enzyme hydrolyses on the substrate pro-pNA and arg-pNA.

The analysis of expression by RT-PCR *U. maydis* grown on different nitrogen and carbon sources and starvation conditions indicates that the *ape3* gene is regulated by the nitrogen source available and stress conditions.

I. INTRODUCCIÓN.

I.1. LOS USTILAGINALES

Los Ustilaginales son hongos fitopatógenos de importancia económica, debido a que ocasionan enfermedades en monocotiledóneas de todo el mundo, se consideran la primera causa potencial del carbón en las plantas (Ruiz y Martínez, 1998). Los ustilaginales capaces de causar enfermedad se muestran en la tabla 1.

Tabla. 1. Ustilaginales que causan carbón en las plantas

Hongo	Enfermedad
<i>Ustilago hordei</i>	Carbón cubierto de la cebada y avena
<i>Ustilago avenae</i>	Carbón volador de la avena
<i>Ustilago nuda</i>	Carbón volador de la cebada
<i>Ustilago tritici</i>	Carbón volador del trigo
<i>Ustilago nigra</i>	Carbón semivolador de la cebada
<i>Ustilago sctamineae</i>	Carbón de la caña de azúcar
<i>Ustilago maydis</i>	Carbón del maíz

Agrios, 1999

I.2. *Ustilago maydis*

U. maydis infecta a dos tipos de plantas. El maíz (*Zea mays*) y su progenitor el Teozinte (*Zea mexicana* subesp. *Parviglumis*). El desarrollo de la enfermedad se caracteriza por clorosis, disminución del crecimiento y formación de tumores que pueden desarrollarse en hojas, espigas, tallos y mazorcas, debido a la proliferación celular del meristemo de los tejidos. En el tumor el tejido de la planta es reemplazado por esporas (teliosporas) cubiertas por una membrana blanca y verdosa que más tarde se oscurece y forma una masa polvorienta color café-olivo. La membrana gris-plateada se rompe liberando teliosporas, principal mecanismo de diseminación de los carbonos (Agrios, 1999; Bölker, 2001; Banuett, 2002).



Fig. 1. Tumor característico del carbón del maíz en la mazorca.

I.3. EL CICLO DE VIDA DE *Ustilago maydis*

El hongo fitopatógeno *U. maydis* se considera un hongo dimórfico, por presentar dos formas durante su ciclo de vida: una saprofítica en la que crece en forma de levadura o basidiospora haploide que se reproduce por gemación bipolar, y otra en la que dos basidiosporas compatibles son capaces de fusionarse y dar origen a la fase micelial diploide, que constituye el estado infectivo y en la que se forman las teliosporas (Agrios, 1999; Bölker, 2001; Banuett, 2002).

Las teliosporas del hongo permanecen viables durante mucho tiempo, en los restos de cultivo y en el suelo, durante la primavera y verano éstas germinan produciendo un tubo germinal denominado promicelio, en donde el núcleo se divide por medio de meiosis y los cuatro núcleos se separan por medio de tabiques transversales dando origen a las células del promicelio, en las cuales el núcleo se divide por medio de mitosis. Después se forma una yema lateral a la cual pasa uno de los núcleos formándose una basidiospora o levadura, las cuales se esparcen por corrientes de aire o lluvia hasta los tejidos jóvenes de la planta de maíz, en donde producen una hifa fina que eventualmente muere, a menos que se fusione con una basidiospora sexualmente compatible, formando la fase micelial dicariótica del hongo, que prolifera en los tejidos. El crecimiento filamentoso del hongo induce la formación del tumor, el cual aporta el ambiente necesario para la formación de teliosporas, que son liberadas al romperse el tumor y se dispersan por el viento (Fig. 2) (Agrios, 1999; Banuett, 2002).

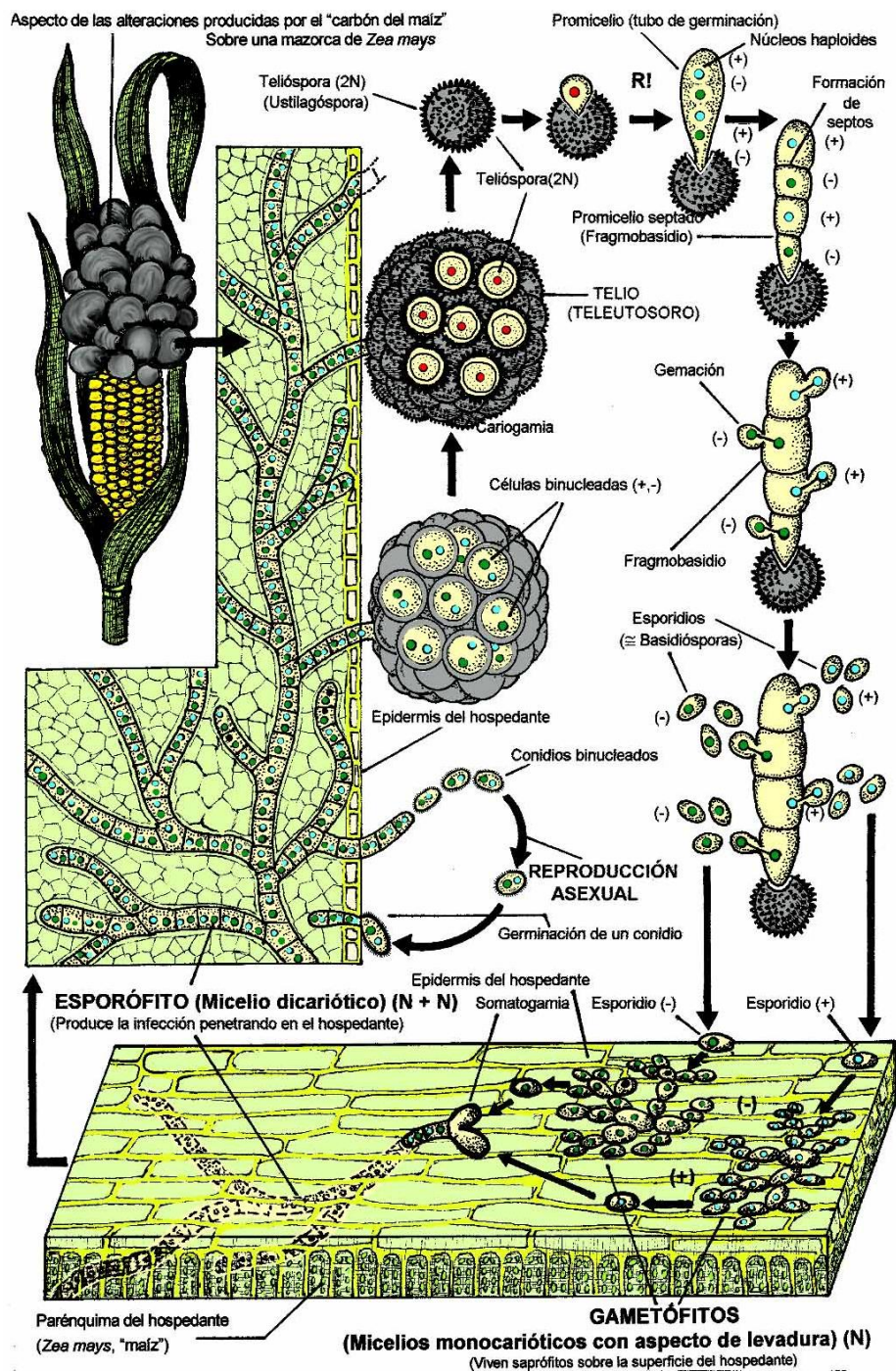


Fig. 2. Ciclo de vida de *U. maydis*. El ciclo inicia con la fusión de células haploides y la formación del dicarion patogénico. La penetración y proliferación del filamento dicariótico conduce a la formación de tumores y a la formación de teliosporas. Las teliosporas son esparcidas por el aire y el viento, germinan y forman el promicelio en el que por medio de meiosis se forman basidiosporas haploides y el ciclo inicia nuevamente (Agrios, 1999)

I.4. CONTROL GENÉTICO DE LA COMPLEMENTACIÓN SEXUAL Y LA PATOGÉNESIS DE *U. maydis*

La complementación sexual en *U. maydis* es quizá el evento que más atención ha recibido debido a que solamente el dicarion o células diploides son patogénicas. La fusión de células y el desarrollo del dicarion es controlada por dos loci genéticos independientes denominados *a* y *b*, mientras que el locus *a* solo controla la fusión celular y el locus *b* es responsable de la patogenicidad, ambos loci son requeridos para el mantenimiento de la fase micelial (Banuett y Herskowitz, 1989; Bölker y col., 1995). Solo la conjugación sexual de dos células haploides con diferentes loci *a* y *b*, pueden dar como resultado la formación de la fase patógena del hongo (Fig. 3) (Ruiz-Herrera y Martínez-Espinoza, 1998).

El locus *a*. Participa en la complementación sexual y la fusión de células haploides. Sólo las células que tienen locus *a* diferentes pueden formar tubos de complementación y fusionarse. El análisis de mutantes diploides que no pueden crecer en forma de micelio sugiere que la heterocigosidad de los alelos *a* es necesario para mantener el crecimiento filamentoso (Ruiz-Herrera y Martínez-Espinoza, 1998).

El locus *a* consiste de dos regiones en su secuencia de DNA de 4.5 y 8 kb para *a*₁ y *a*₂ respectivamente; ambos contienen los genes que codifican para el lipopéptido precursor de una feromona (*mfa1* y *mfa2*) y para el receptor de la misma (*pra1* y *pra2*) (Urban y col., 1996).

Las células haploides producen niveles base de la feromona y el receptor, la unión de la feromona producida por un tipo sexual al receptor localizado en la superficie de la célula compatible estimula la transcripción de los genes de los locus *a* en las dos células, este mecanismo permite la formación de tubos de complementación y el crecimiento micelial inicial del heterocarion (Banuett y Herskowitz, 1989). Esta hipótesis fue confirmada al adicionar la feromona Mfa1 purificada a cepas haploides *a*₂, las cuales, formaron tubos de complementación, no sucediendo lo mismo cuando se adicionó a células *a*₁ (Spellig y col., 1994).

I. Introducción

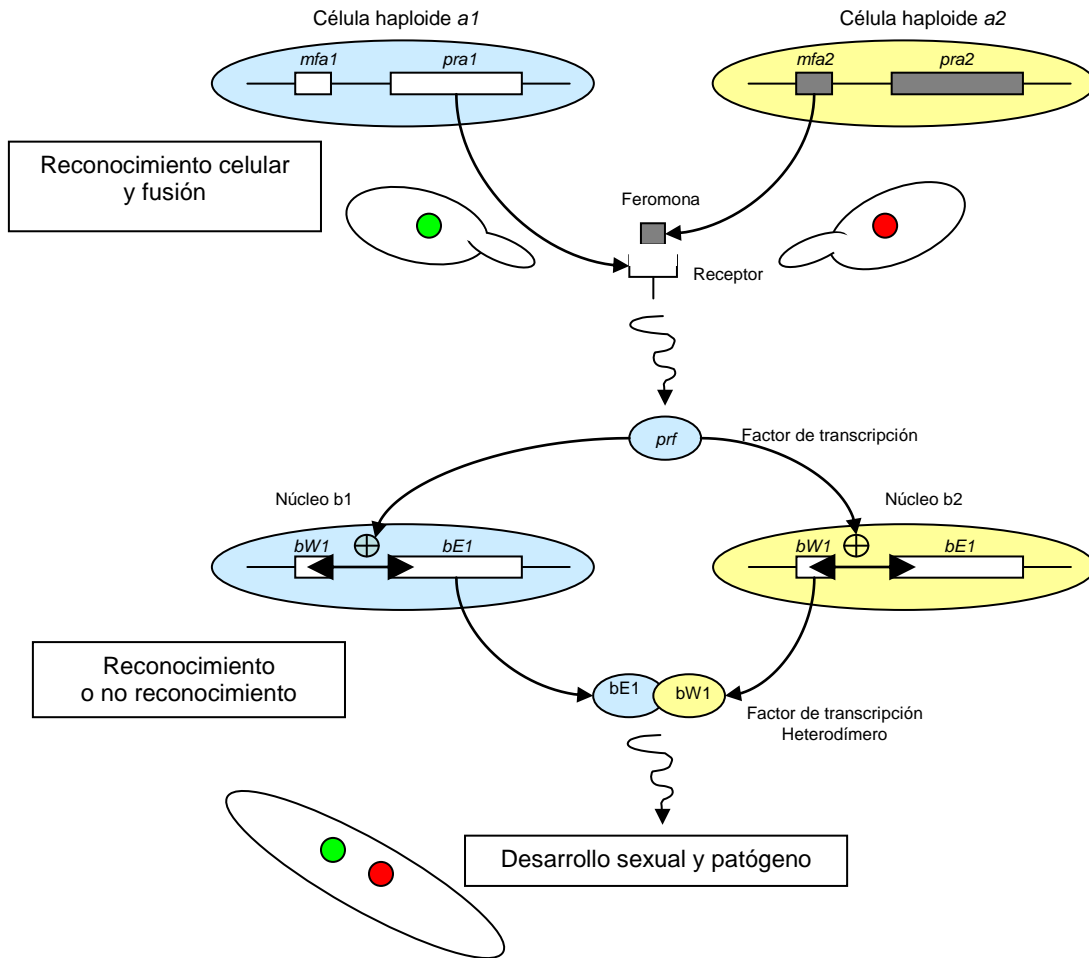


Fig. 3. Interacción de los loci *a* y *b* durante el desarrollo de *U. maydis*. El locus bialélico *a* codifica un sistema de reconocimiento feromona-receptor el cual desencadena la fusión de células compatibles. Después el locus multialélico *b* induce el desarrollo del dicarion patógeno mediante la formación de un factor de transcripción herodimérico (Bölker, 2001).

I. Introducción

El locus *b*. El número de loci *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 homeodominios de proteínas *bE* y *bW* involucradas en el reconocimiento intracelular (Kronstad y Leong, 1989).

Se ha demostrado que los productos de los genes *bE* y *bW* de diferentes alelos pueden formar heterodímeros, mientras que los que provienen del mismo alelo son incapaces de interactuar (Kämper y col., 1995). Estas proteínas son factores de transcripción que encienden los genes requeridos para la patogenicidad. Se ha observado que cepas haploides que producen el heterodímero activo *bE-bW*, son capaces de formar tumor en el maíz, pero *in vitro* crecen en forma de levadura demostrando que, el complejo activo, producto de los genes *b* es suficiente para la patogenicidad (Bölker y col., 1995).

I.4. LA PROTEÓLISIS Y CLASIFICACIÓN DE PROTEASAS.

La proteólisis se define como la hidrólisis de proteínas y polipéptidos generando péptidos más pequeños y aminoácidos. Estas reacciones, en los seres vivos, son catalizadas por enzimas conocidas como proteasas, éstas participan durante el recambio proteico, mantenimiento de los niveles proteicos intracelulares, maduración de pre-proteínas y remoción de péptidos señales (Rawn, 1989).

La proteólisis intracelular se puede clasificar en tres tipos tomando en cuenta su especificidad por el sustrato:

- a) Proteólisis altamente inespecífica. Las enzimas que participan en este tipo de proteólisis tienen baja especificidad por el sustrato y son capaces de degradar una gran diversidad de proteínas, por ello generalmente se encuentran en compartimentos celulares o dentro de organelos como los lisosomas o vacuolas.
- b) Proteólisis inespecífica. Las proteasas involucradas en este proceso reconocen proteínas blanco que presentan una señal de modificación por ubiquitinación, así la degradación ocurre en cualquier compartimento celular. Este mecanismo se relaciona con la degradación selectiva de proteínas citoplásmicas de vida media corta para el recambio proteico (Rawn, 1989).
- c) Proteólisis altamente específica. Solamente se ve afectado un tipo de proteínas, tiene lugar en cualquier compartimento celular. Es llevada a cabo por enzimas muy específicas que reconocen determinadas secuencias de aminoácidos, conformación estructural o actúan bajo ciertas condiciones de pH y fuerza iónica. La activación de zimógenos, eliminación de secuencias señal en proteínas extracelulares, la eliminación de metionina en el extremo N-terminal en proteínas nacientes y la activación selectiva de proteínas son algunos ejemplos (Suárez y Wolf, 1988)

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, las endopeptidasas tienden a llamarse proteinasas (EC 3.4.21-3.4.34). Las exopeptidasas hidrolizan enlaces peptídicos del extremo amino o carboxilo liberando aminoácidos terminales de la proteína y se dividen en:

I. Introducción

- a) Aminopeptidasas (EC 3.4.11). Catalizan la liberación secuencial de aminoácidos del extremo amino terminal.
- b) 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 (Suárez y Wolf, 1988; Rao y col., 1998).

Las proteasas se clasifican a su vez, con base a su grupo funcional en el sitio catalítico en:

- a) Serín proteasas. Poseen un residuo de serina en su sitio activo y son inhibidas por diisopropil-fluorofósforo y otros organofosforados.
- b) Tiol 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. Posee uno o más grupos carboxilo en su sitio activo (Suárez y Wolf, 1988; Rao y col., 1998).

I.5. SISTEMAS PROTEOLÍTICOS INTRACELULARES.

Existen dos sistemas proteolíticos intracelulares mejor descritos: el proteasoma y el vacuolar (Vierstra, 1996).

El proteasoma es un sistema multicatalítico grande, la forma más común de proteasoma es el 26S, presenta una masa molecular de alrededor de 2000 kDa, presenta un núcleo de 20S y dos zonas regulatorias, también llamadas pestañas, de 19S.

En este sistema las proteínas a ser degradadas son marcadas por una proteína llamada ubiquitina. Cuando ya están debidamente marcadas, los substratos las unen al componente regulador de los proteasomas 19S, que desmonta las cadenas de ubiquitina y las recicla. Entonces, en un proceso dependiente de ATP, las ATPasas de la partícula 19S despliegan el sustrato y lo desplazan a través de un estrecho canal ubicado en el proteasoma 20S para la degradación. Dentro de esta partícula cilíndrica hueca, la proteína marcada se une a pequeños péptidos, y entonces se libera del proteasoma y es rápidamente degradada por las peptidasas citosólicas (Fig. 4).

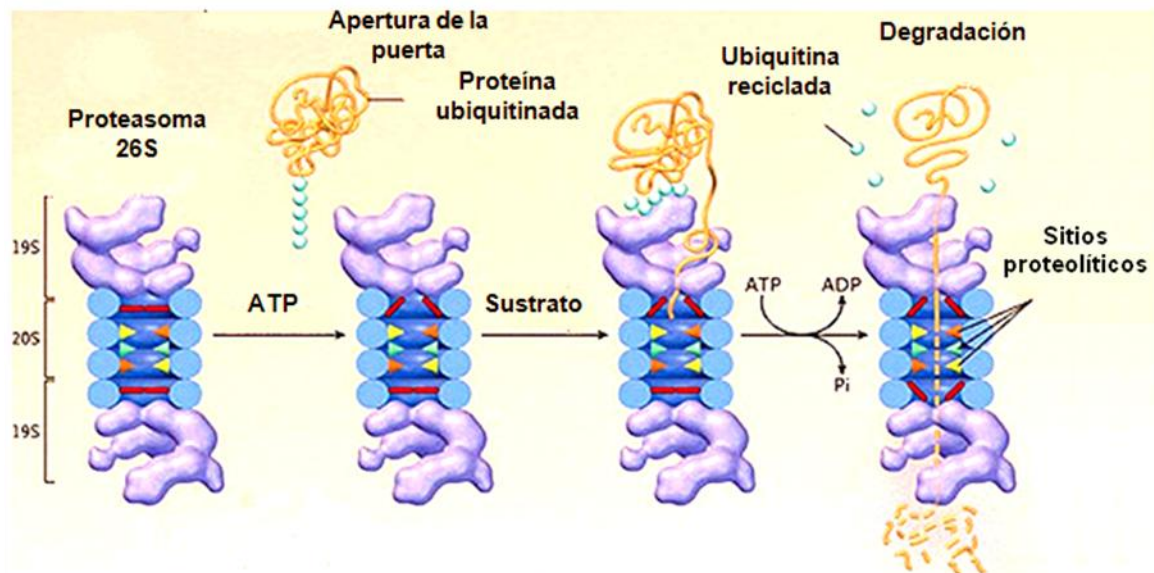


Fig. 4. La vía de la ubiquitina-proteasoma. La degradación de proteínas se inicia con el marcaje de éstas, la proteína ubiquitinada se une al proteasoma 19S iniciando el reciclaje de las moléculas de ubiquitina, posteriormente en un proceso dependiente de ATP las proteínas se desplazan a través del proteasoma 20S donde son degradadas (Modificado de Voges y col., 1999).

I. Introducción

El complejo proteasoma 26S está involucrado en la rápida degradación de muchas enzimas, reguladores transcripcionales, proteínas anormales y proteínas oxidativamente dañadas (Coux y col., 1996; Voges y col., 1999; Rivett, 1985).

La vacuola es un compartimiento ácido que contiene una gran variedad de enzimas hidrolíticas y sustratos en proceso de digestión. Existen dos tipos de vacuolas, las heterofágicas y las autofágicas. En el primer tipo, los sustratos son de origen externo y son capturados por endocitosis; una vez producida la digestión, ciertos productos pueden ser reutilizados y los no digeribles (llamados cuerpos residuales) son vertidos al exterior por exocitosis. En el caso de las vacuolas autofágicas, los que se digiere son constituyentes de la célula.

Se ha descrito que la vacuola está involucrada en una gran variedad de procesos celulares: proteólisis macromolecular, homeostasis, reserva y transporte de metabolitos, etc. (Anraku y col., 1989).

Uno de los sistemas proteolíticos vacuolares mejor estudiados es el de *S. cerevisiae*, en la tabla 2 se describe este sistema. Las proteínas de dicho sistema se han asociado con la reutilización de pequeños péptidos y de proteínas de vida larga, cuando la célula se encuentra en condiciones de estrés nutricional se han descritos mecanismos como la autofagia (Chao-Wen y Klionsky, 2003). También participan en la degradación de proteínas durante la esporulación.

Se sabe que las proteasas vacuolares catalizan la maduración de precursores y de proteínas, mismos que participan en el recambio proteico, en respuesta a estímulos de estrés nutricional. Estas proteasas tienen la facultad de catalizar la degradación masiva y facilitar así los procesos metabólicos celulares, particularmente durante el proceso de la esporulación (Jones, 1991). Colaboran en funciones tales como la acidificación del lumen vacuolar, el transporte y la eliminación de metabolitos, y en procesos de osmorregulación celular (Klionsky y col., 1990).

La vacuola ha sido estudiada principalmente como un organelo degradativo debido a la gran variedad de actividades hidrolíticas presentes en ella. Dichas actividades son llevadas a cabo por proteasas, ATPasas, RNasas, α -manosidasa, fosfatasa alcalina, etc. Dichas enzimas pueden estar implicadas en procesos relacionados con la adaptación a cambios de pH y de condiciones nutricionales entre otras. Sus niveles de actividad varían de acuerdo a la fase de crecimiento y

I. Introducción

a las condiciones nutricionales en las que se encuentre la célula. En condiciones limitadas de carbono y nitrógeno tienden a alcanzar sus niveles de actividad máximos.

Tabla 2. Proteasas vacuolares de *S. cerevisiae*

Abreviatura	Nombre de la proteína	Gen
^a PrA	Proteasa A, proteasa yscA	<i>PEP4, PRA1,</i>
^a PrB	Proteasa B, proteasa yscB	<i>PRB1</i>
^a API; ApCo	Aminopeptidasa I, Aminopeptidasa yscI, leucina aminopeptidasa IV, aminopeptidasa V, aminopeptidasa dependiente de cobalto	<i>LAP4, APEI</i>
APIII	Aminopeptidasa Y, aminopeptidasa III	<i>APE3</i>
^a CPY	Carboxipeptidasa Y, carboxipeptidasa yscY	<i>PRC1</i>
^b DPAP B	Dipeptidil aminopeptidasa B, dipeptil aminopeptidasa yscV, X-prolildipeptidil aminopeptidasa	<i>DAP2, DPP2</i>

^a Soluble

^b Asociado a membrana

I.6. LAS AMINOPEPTIDASAS Y SU FUNCIÓN

Las aminopeptidasas son enzimas que pueden remover un aminoácido a partir del extremo amino terminal de proteínas y péptidos. La mayoría de las aminopeptidasas son metaloenzimas, aunque se han descrito serín- y cisteín-(tiol) aminopeptidasas (Taylor, 1993). Participan en el metabolismo nitrogenado, activación e inactivación de péptidos (Hersh y col., 1987; Cadel y col., 1995) y en la progresión del ciclo celular. También incrementan la acumulación de glicógeno en la célula (Caprioglio y col., 1993) y participan en el suministro celular de aminoácidos (Hersh y col., 1987).

II. ANTECEDENTES.

II.1. AMINOPEPTIDASAS DESCRITAS EN LEVADURAS Y HONGOS

II.1.2 *Sacharomyces cerevisiae*

En *Sacharomyces cerevisiae* se han descrito diez aminopeptidasas.

Aminopeptidasa I, APE1. Es una aminopeptidasa vacuolar de 640 kDa compuesta de 12 subunidades, es una típica leucina aminopeptidasa (Metz y Rohm, 1976). Es sintetizada en el citoplasma como un precursor inactivo, a diferencia de muchas aminopeptidasas, esta enzima no sigue la ruta de secreción clásica, es transportada hacia la vacuola por la ruta directa citoplasma-vacuola Cvt (Hagai y col., 1999). En la vacuola APE1 es madurada por PEP4 (Klionsky y col., 1999). Actualmente APE1 es utilizada como marcador de la ruta Cvt.

Aminopeptidasa II, APE2. APE2 preferencialmente hidroliza enlaces lys-pNA y leu-pNa, es de localización periplásmica y citoplásmica (Frey y Rohm, 1979), está involucrada en el suministro de leucina externa. APE2, también es conocida como LAP1 y aminopeptidasa YSCII.

Aminopeptidasa III, APE3. Es una metaloproteasa de localización vacuolar, lo que la distingue de la APE2. Esta aminopeptidasa presenta una forma inmadura de 75 kDa y una forma madura de 70 kDa, actúa sobre substratos con lisina y arginina en el extremo amino. Probablemente sea madurada por Prb 1 (Yasuhara y col., 1994). APE2 también es conocida como APY.

Leucil aminopeptidasa LAP2. LAP2 tiene actividad epóxido hidrolasa, la fusión de LAP2-GFP indica que se encuentra en citoplasma y núcleo.

Cisteín aminopeptidasa, LAP3. La cisteín aminopeptidasa está codificada por el gen *lap3*, la transcripción de este gen está regulada por la galactosa a través de Gal4p. LAP3 tiene actividad homocisteína-tiolactonasa, protege a las células contra la toxicidad de homocisteína.

Alanina/arginine aminopeptidasa, AAP1. Esta aminopeptidasa está codificada por el gen *aap1*. AAP1 es localizada en núcleo y citoplasma, actúa como regulador positivo en la acumulación de glicógeno dentro de la célula, AAP1 es constitutivamente expresada bajo condiciones de crecimiento normales y es inducida en inanición de histidina.

Aspartil aminopeptidasa. Libera ácidos a partir del extremo amino terminal de péptidos. Forma un complejo oligomérico de 12 subunidades, puede interactuar con los ribosomas.

II. Antecedentes

X-Pro aminopeptidasa. Libera prolina a partir del extremo amino terminal de péptidos. Estudios de localización indican que se encuentra en citoplasma.

En *Saccharomyces cerevisiae* también se han descrito dos metionín aminopeptidasas MAP1 y MAP2, cada una de ellas cataliza la remoción de la metionina de polipeptidos nacientes, MAP1 actúa en función de MAP2 y viceversa. La delección de MAP1 resulta en un pobre crecimiento de la cepa mutada con respecto a la silvestre, una doble mutante de MAP1 y MAP2 es no viable, indicando que la función de MAP1 y MAP2 es esencial para la célula.

II.1.3 *Aspergillus niger*

En *aspergillus niger*, se han identificado tres aminopeptidasas: apsA, apsC y papA.

apsA es una aminopeptidasa citosólica, con un PM de 95 kDa por PAGE-SDS, actúa preferencialmente sobre el sustrato lys-pNA. Esta enzima fue inhibida por EGTA, EDTA y 1-10 fenantrolina, inhibidores típicos de metaloproteasas, presenta un pH óptimo entre 7 y 8, siendo estable entre pH 5 y 8 (Basten y col., 2001).

apsC es una serín proteasa con un PM de 72 kDa, pH óptimo de 8 y T óptima de 50°C, hidroliza enlaces Phe-pNA, Phe-BNA y péptidos con aminoácidos aromáticos en el extremo amino terminal (Basten y col., 2001).

papA es una cisteín proteasa, con un PM de 370 kDa, la actividad de la enzima fue optima a 45°C y pH de 7.5. Esta enzima escinde enlaces de oligopéptidos con prolina en el extremo amino terminal (Bolumar y col., 2002).

II.1.4 *Debaromyces hansenii*

El sistema proteolítico de *Debaromyces hansenii* está constituido, al menos, por dos aminopeptidasas: una prolín aminopeptidasa (PAP) y una arginín aminopeptidasa (AAP).

PAP es una cisteín peptidasa de 370 kDa, compuesta por subunidades de 53.5 kDa, es activa en un amplio intervalo de pH (5.0-9.5), con un óptimo de actividad a pH 7.5 y 45°C, libera exclusivamente prolina del extremo amino de péptidos (Bolumar y col., 2002).

II. Antecedentes

AAP es una metaloproteasa de 101 kDa y estructura dimérica, con pH de actuación neutro-básico (6.0-9.0) y óptimo de actividad a pH 7.0 y 37 °C, tiene preferencia por aminoácidos básicos.

II.1.5. *Schizosaccharomyces pombe*.

En *Schizosaccharomyces pombe* se han encontrado dos aminopeptidasas. La denominada yspl, que presentó un PM de 184 kDa en su forma dimérica, con preferencia sobre el sustrato con lys-pNA (Arbesú y col., 1993), esta parece estar implicada en el recambio proteico en condiciones de ayuno de la levadura (Arbesú y col., 1991). La segunda aminopeptidasa, presentó un PM de 84 kDa por PAGE-SDS y de 190 kDa por filtración en gel, esta enzima actúa preferencialmente sobre sustratos con residuos básicos, como lisina y arginina (Parra 2003).

II.1.6 *Candida albicans*

En *Candida albicans* ha sido caracterizada una metalo aminopeptidasa que actúa preferencialmente sobre sustratos con arginina en el extremo amino a pH de 7.5 y ha sido propuesta como blanco inmunogénico para el diagnóstico de la candidosis sistémica (El Moudni y col., 1998).

II.2. AMINOPEPTIDASAS EN *Ustilago maydis*.

U. maydis posee al menos dos aminopeptidasas solubles inhibidas por EDTA y 1-10 fenantrolina (Mercado y col., 2003). Una de estas aminopeptidasas tiene un PM de 58 kDa en su forma monomérica, y 110 kDa en su forma dimérica, se comportó como una metaloproteasa, presentó preferencia sobre el sustrato Lys-pNA, presentó un punto isoeléctrico de 5.1, con un pH óptimo cercano a la neutralidad. La enzima demostró ser estable a condiciones alcalinas, pero no en ácidas. Debido a la inestabilidad en condiciones ácidas probablemente pumAPE se encuentre en el citoplasma y no en vacuolas. La preferencia por sustratos con aminoácidos básicos en la posición N-terminal, tales como arginina y lisina, sugiere que pumAPE es una lisín aminopeptidasa (Mercado y col., 2004).

II.3. GENES CODIFICANTES DE AMINOPEPTIDASAS VACUOLARES EN *Ustilago maydis*

En el genoma de *U. maydis* se encuentran once genes que codifican aminopeptidasas hipotéticas, de todos estos genes, solo el gen *ape1* (um11633) y *ape3* (um06456) probablemente son de localización vacuolar (Tabla 2).

En el 2007 se inicio el estudio del gen *ape1*, este gen presenta sitios de unión hipotéticos a factores de trascrición en la región reguladora, relacionados con la activación de genes en respuesta a condiciones estresantes (Xbp1, STRE), y a la fuente de carbono disponible (Gal4, Gcr1). La expresión del éste gen está regulada por la fuente de nitrógeno y por compuestos derivados del huésped (Noriega 2005; Miramón 2008).

II. Antecedentes

Tabla 3. Genes y características de aminopeptidasas hipotéticas de *U. maydis*.

Nombre del gen ^a (# de acceso) [Nombre de la proteína] ^a	Longitud (pb) * # de intrones	PM (kDa) pI	Tipo de proteasa	Posible afinidad por sustrato	Probable función fisiológica ^b	Probable localización
<i>ape1</i> (um11633) [APE1, aspartil aminopeptidasa]	1518 *0	55.16 7.09	Metaloproteasa dependiente de zinc	Ac. aspartico	Libera ácidos a partir del extremo amino terminal de péptidos. Forma un complejo oligomérico de 12 subunidades	Vacuolar
<i>ape2</i> (um00688) [LAP1, Leucil aminopeptidasa]	1239 *0	45.32 6.24	Metaloproteasa dependiente de zinc	Leucina	Involucrada en la obtención de leucina a partir de dipéptidos.	Periplásmica
<i>ape3</i> (um05456) [APE3, aminopeptidasa Y]	1649 *1	53.69 6.52	Metaloproteasa dependiente de zinc	Lisina Arginina	Posiblemente es madurada por prb1	Vacuolar
<i>app</i> (um01270) [APP, aminopeptidasa P]	1971 *0	73.00 6.14	Metaloproteasa dependiente de zinc	x-prolina	Libera prolina a partir del extremo amino terminal de péptidos.	Citoplasma
um03308 [aminopeptidasa]	1635 *0	57 5.85	Metaloproteasa dependiente de zinc	n.d	n.d	Citoplasma
um04738 [X-pro aminopeptidase II]	1794 *0	65.95 7.1	Metaloproteasa dependiente de zinc	x-prolina	Libera prolina a partir del extremo amino terminal de péptidos.	Mitocondria
<i>map2</i> (um06034) [MAP2, Metionil aminopeptidasa]	1086 *0	40.37 6.58	Metaloproteasa dependiente de zinc	Metionina	Remueve la metionina de polipeptidos nacientes esta función es redundante con Map1p	Citoplasma
(um10502) [aminopeptisasa P]	1839 *1	67.96 5.99	Metaloproteasa dependiente de zinc	n.d	n.d	Mitocondria
(um10493) [aminopeptidasa]	1542 *0	55.35 6.51	Metaloproteasa dependiente de zinc	n.d	n.d	n.d.
<i>map1</i> (um10253.2) [MAP1, metionil aminopeptidasa]	1497 *0	31.54 8.16	Metaloproteasa dependiente de zinc	Metionina	Remueve la metionina de polipeptidos nacientes esta función es redundante con Map2p	Citoplasma

II. Antecedentes

<i>aap1</i> (um10788.2) [AAP1, alanin/arginin aminopeptidasa]	3308 *0	113.66 6.32	Metaloproteasa dependiente de zinc	Alanina Arginina	Acumulación de glicógeno en la célula	Mitocondria
---	------------	----------------	---------------------------------------	---------------------	---------------------------------------	-------------

^a Nombres de los genes y proteínas sugeridos para relacionarlos con *S. cerevisiae*.

^a inferido a partir de lo descrito en *Sacharomyces cereviseae*.

III. JUSTIFICACIÓN.

III. Justificación

La proteólisis es un mecanismo vital para la célula. Mediante este mecanismo y otros más, la célula puede mantenerse viable ante situaciones que pudieran comprometer su supervivencia.

Las enzimas proteolíticas encargadas de llevar a cabo esta función están implicadas en el control de diversos procesos fisiológicos como son: la digestión de proteínas, maduración de hormonas y diversas proteínas, respuesta inmune, inflamación, coagulación, fertilización, germinación y otros procesos morfogénicos (Holzer y Heinrich, 1988). Algunas proteasas tienen un papel importante en la esporulación, la germinación o la patogenicidad de diversos microorganismos y pueden participar en la regulación post-traducciona (Yuan y Cole, 1989; Vartivarian, 1992; White y Agabian 1995; Monod y col., 1998; Suárez-Rendueles y col., 1991).

El hongo dimórfico fitopatógeno *U. maydis*, se ha utilizado desde hace años para estudiar las bases moleculares de fenómenos tan diversos como el apareamiento, recombinación homóloga y vías de señalización, sin embargo el papel de la proteólisis en este hongo ha sido poco estudiado. Hasta ahora se conoce que las proteasas de *U. maydis* están implicadas en la proteólisis durante condiciones de estrés nutricional y cambios morfogénicos de la levadura durante su ciclo de vida: la fase saprofítica (levadura) y biotrófica (micelio) (Christenssen, 1963; Banuett, 1992; Banuett, 1995).

Este trabajo se enfoca en el estudio del gen *ape3* de *U. maydis* codificante de una aminopeptidasa vacuolar putativa, homóloga a la APE Y de *S. cerevisiae*. Hasta la fecha se desconoce el perfil de expresión de este gen y las características bioquímicas de la proteína que codifica. Motivo por el cual en este trabajo se analiza la expresión del gen a nivel transcripcional y se determinan algunas características bioquímicas de la proteína codificada.

La información obtenida podrá sugerir algunas de las funciones que tiene esta aminopeptidasa en la biología celular de *U. maydis*.

IV. OBJETIVOS.

IV.1. OBJETIVOS GENERALES

*Caracterizar el gen *ape3* de *U. maydis* y estudiar la regulación de su expresión bajo diferentes condiciones fisiológicas.

*Confirmar la naturaleza aminopeptidásica de la proteína codificada por el gen *ape3* utilizando el sistema heterólogo de *P. pastoris*.

IV.2. OBJETIVOS PARTICULARES

*Realizar el análisis bioinformático del gen *ape3* de *U. maydis*.

*Analizar los niveles de expresión del gen *ape3*, cuando *U. maydis* es cultivado en diferentes fuentes de nitrógeno, carbono, durante estrés nutricional y transición dimórfica.

*Clonar el gen *ape3* de *U. maydis* en dos vectores de expresión pPICZ α A y pPICZA.

*Expresar en *P. pastoris* la proteína recombinante APE3i-rec y confirmar su actividad proteolítica de aminopeptidasa.

V. DIAGRAMA GENERAL DE TRABAJO

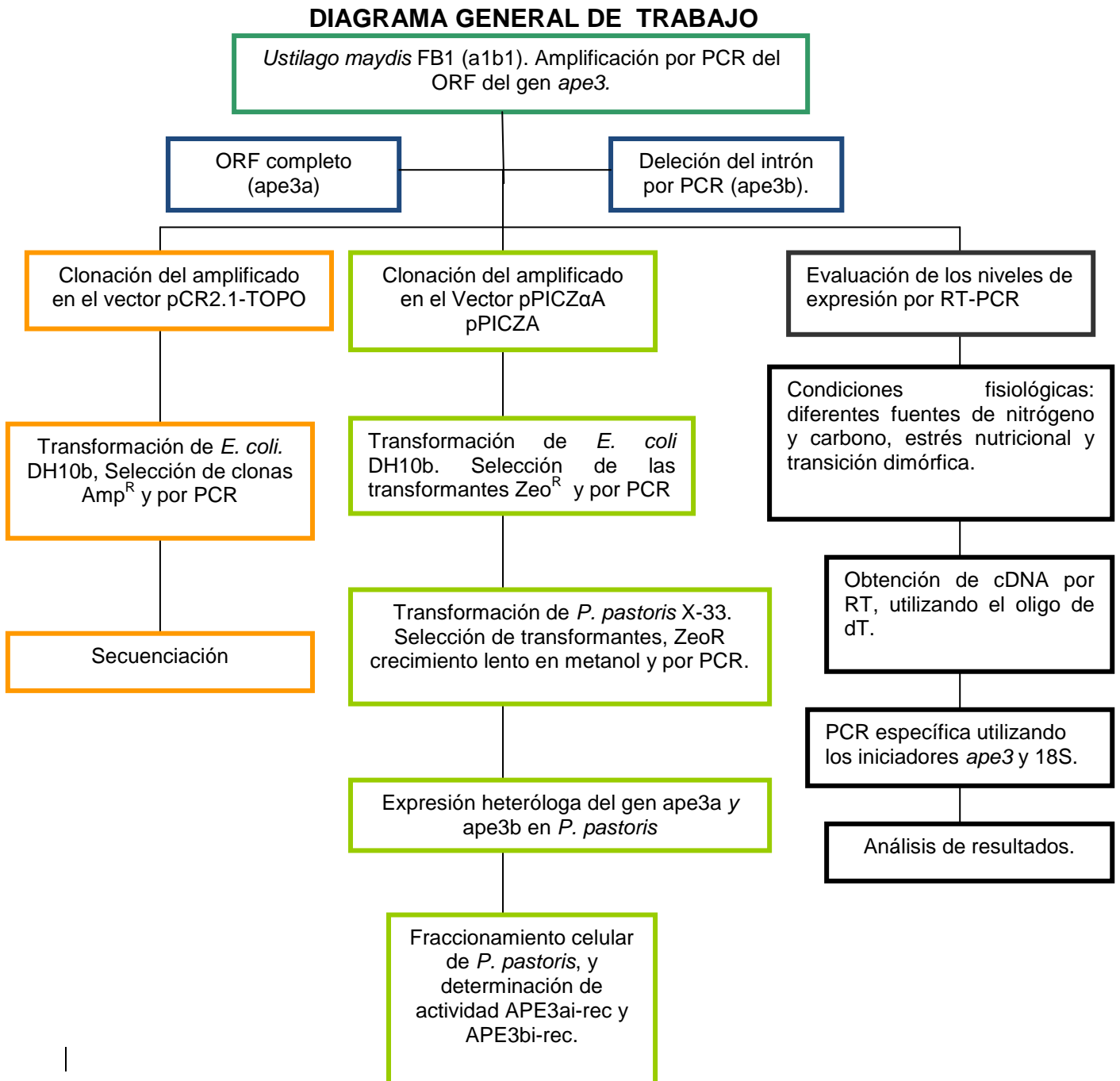


Fig.5. Diagrama general de trabajo.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS.

VI.1. MICROORGANISMOS

Cepa de haploide de *Ustilago maydis* FB1 (a1b1), donada por la Dra. Banuett de la Universidad de San Francisco, California, EUA.

Microorganismo para transformación:

- Células competentes de *Escherichia coli* DH10b.
- Células competentes de *Pichia pastoris* X-33.

Las cepas se conservaron en glicerol al 20% y se guardaron a -20°C y -70°C .

VI.2. MEDIOS DE CULTIVO

Medio YPDS: Extracto de levadura al 1%, dextrosa 2% y peptona 2%, 1M sorbitol.

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

Medio YNB con infusión de maíz: Base nitrogenada de levadura sin aminoácidos y sin sulfato de amonio 0.17%, dextrosa 2% e infusión de maíz con 4.0 mg/ml.

Medio YNB con peptona de gelatina: Base nitrogenada de levadura sin aminoácidos y sin sulfato de amonio 0.17%, dextrosa 2% y peptona 2%.

Medio YNB con prolina: Base nitrogenada de levadura sin aminoácidos y sin sulfato de amonio 0.17%, dextrosa 2% y prolina 0.5%.

Medio YNB con sulfato de amonio: Base nitrogenada de levadura sin aminoácidos 0.17%, dextrosa al 2% y sulfato de amonio al 0.5%.

Medio YNB con galactosa: Base nitrogenada de levadura sin aminoácidos 0.17%, galactosa al 2% y sulfato de amonio al 0.5%.

Medio YNB sin fuente de nitrógeno: Base nitrogenada de levadura sin aminoácidos 0.17%, dextrosa al 2% y sin sulfato de amonio.

Medio YNB sin fuente de carbono: Base nitrogenada de levadura sin aminoácidos 0.17%, sulfato de amonio al 0.5% y sin dextrosa.

Medio completo para *U. maydis*: Dextrosa 1%, nitrato de potasio 0.3%, peptona de caseína 0.25%, extracto de levadura 2% y solución de sales 62.5 ml/l.

Medio mínimo para *U. maydis* pH 7: Dextrosa 1%, nitrato de potasio 0.3%, y solución de sales 62.5 ml/l, con un pH final de 7.0.

Medio mínimo para *U. maydis* pH 3: Dextrosa 1%, nitrato de potasio 0.3%, y solución de sales 62.5 ml/l, con un pH final de 3.0.

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) bajo en NaCl: Bacto-triptona al 1%, extracto de levadura al 0.5% y NaCl al 0.5%

MGY Y MGYH: 1.34% YNB, 1% Glicerol, 4×10^{-5} % biotina, ± 0.004 % histidina.

MD Y MDH: 1.34% YNB, 4×10^{-5} % biotina, 2% dextrosa.

MM y MMH: 1.34% YNB, 4×10^{-5} % biotina, 0.5% metanol.

BMGH Y BMMH: 100Mm fosfato de potasio, pH 6; 1.34% YNB, 4×10^{-5} % biotina, 1 % de glicerol o 0.5% metanol.

BMGY y BMMY: 1% extracto de levadura, 2% peptona, 100Mm fosfato de potasio, pH 6; 1.34% YNB, 4×10^{-5} % biotina, 1 % de glicerol o 0.5% metanol.

Los medios de cultivo se esterilizaron a 120°C durante 15 minutos. Los suplementos nutricionales se esterilizaron por filtración. Los medios sólidos se prepararon adicionando agar a una concentración del 1.5%. En los casos en que sea necesario un crecimiento selectivo, se adicionará Zeocina[®] (25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para *E. coli*; 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para *P. pastoris*).

VI.3. ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO

VI.3.1. Análisis teórico de las secuencias nucleotídicas y aminoacídicas deducidas.

Se buscaron las secuencias de genes que codificaran para aminopeptidasas de 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 con 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/) y del MIPS *U. maydis* database (MUMDB: <http://mips.gsf.de/genre/projects/ustilago>).

La búsqueda de ORF, la obtención de las secuencias reverso complementarias, el mapa de restricción, la traducción para obtener la secuencia predicha de aminoácidos de la proteína, la composición de aminoácidos, y la frecuencia del uso de codones empleando el código genético alternativo para levaduras fue realizado empleando el programa DNAMAN versión v. 3.0

La determinación teórica del punto isoeléctrico, el tamaño molecular, la predicción de regiones de hidrofobicidad y de regiones transmembranales se realizó con el programa Antheprot 2000 versión 5.2

La localización de secuencias motif (perfiles y patrones de aminoácidos específicos dentro de una proteína) fue determinada con el programa Prosite, disponible en <http://www.expasy.org/prosite/>. Este programa ayuda a asociar rasgos y características de una proteína, que sugieren la función de proteínas no caracterizadas.

La predicción de la localización celular de las proteína hipotética codificada por el gen *ape3*, se efectuó en el servidor PSORT (Prediction of protein sorting signal and localization sites in amino acid sequences) disponible en la dirección electrónica <http://www.psort.org/>.

La predicción de regiones promotoras se realizó con el programa MatInspector versión 2.2 disponible en la dirección electrónica (<http://www.gsf.de/biodv/matinspector.html>).

VI.3.2. Diseño de iniciadores.

VI.3.2.1 Expresión heteróloga.

Para estos experimentos se diseñaron dos estrategias, una que utilizaba el gen completo (con intrón) esperando que *P. pastoris* procesara el mRNA inmaduro correspondiente y la otra estrategia consistió en eliminar el intrón.

A partir de la secuencia del gen *ape3*, se diseñaron cuatro oligonucleótidos específicos (Fig. 6). Los oligonucleótidos *ape3Dc* y *ape3Rc*, están diseñados para amplificar el ORF completo del gen de 1649 pb, el amplificado obtenido se denominó como *ape3a*.

Para la eliminación del intrón por PCR se siguió la estrategia de delección por PCR. En primer lugar se amplificaron dos fragmentos del ORF del gen *ape3*. El primer fragmento de 105 pb se amplificó utilizando los oligos *ape3Dc* y *ape3Rdele*, el segundo fragmento de 1413pb se amplifico con los oligos *ape3Ddele* y *ape3Rc*. Ambos fragmentos se purificaron, y diluyeron hasta obtener la concentración necesaria (ver condiciones PCR) para utilizarlos como DNA molde. La mezcla se utilizó para la amplificación del gen *ape3*, para esto se utilizaron los oligos *ape3Dc* y *ape3Rc*. El fragmento esperado de 1518 pb, se denominó *ape3b*. Esta estrategia, permitió la eliminación del intrón de 131 pb.

Los oligos *ape3Dc* y *ape3Rc* contienen un sitio de corte para la enzima *Eco* RI localizado en el extremo 5'. Al oligo *ape3Rc* se le eliminó el codón de terminación.

Los sitios *Eco* RI permitieron la clonación de los amplificados en los vectores de clonación.

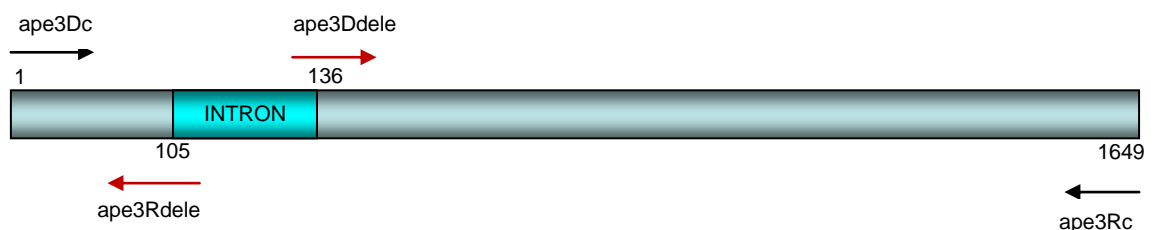


Fig. 6. Representación esquemática de la posición de los oligonucleótidos diseñados.

VI.3.2.2 Confirmación de la remoción del intrón del gen *ape3* de *U. maydis* por *P. pastoris*.

Para confirmar si *P. pastoris* había procesado el intrón del gen *ape3*, se diseñó un oligonucleótido al que se le denominó *ape3Rintrón*. Este oligo hibrida con una secuencia corriente abajo del intrón del gen (Fig. 7). Los oligos *ape3Dc* y *ape3Rintrón* (utilizando la técnica RT-PCR) generan un amplificado de 557 pb cuando el intrón no es removido y un tamaño de 426 pb si el intrón es procesado.

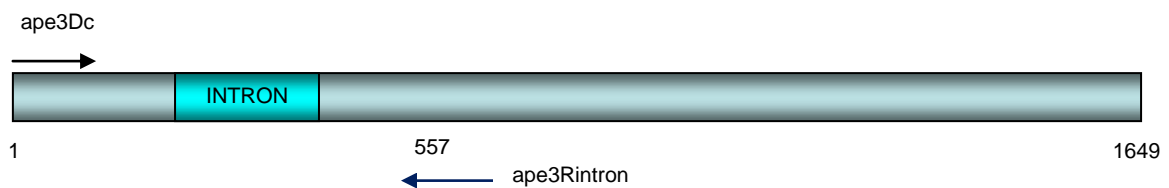


Fig. 7. Representación esquemática de la posición de los oligos *ape3Dc* y *ape3Rintrón*.

VI.3.2.3 Expresión por RT-PCR.

Para estudiar la expresión del gen en diferentes condiciones fisiológicas se diseñó un par de oligonucleótidos, se denominaron *ape3D* y *ape3R*. Estos oligos amplifican un fragmento de 500 pb del gen *ape3*. Se utilizó el gen 18S ribosomal de *U. maydis* para normalizar los resultados de expresión, los iniciadores utilizados generan un amplificado de 300 pb y estos se tomaron de la literatura (Miramón, 2008)

VI.4. CONDICIONES DE CULTIVO PARA EL ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DEL GEN *ape3* POR RT-PCR

La extracción de RNA total de *U. maydis* se obtuvo por el método de descrito por Sherman y col. 1986.

VI. Materiales y métodos

Se realizaron cinéticas de expresión a diferentes tiempos, en los diferentes medios y condiciones fisiológicas probadas. Los tiempos para la obtención del RNA fueron los siguientes: cortos (15-30 min), tiempos medios (3-6 h) y tiempos largos (12-24 h).

U. maydis FB1 se cultivó durante 24 h a 28°C en agitación (150-200 rpm) en medio líquido YEPD. Las células se colectaron por centrifugación. Matraces con medio YNB con diferentes fuentes de nitrógeno (infusión de maíz, sulfato de amonio, peptona de gelatina y prolina), diferentes fuentes de carbono (dextrosa y galactosa), así como condiciones de inanición por fuente de nitrógeno y carbono, se inocularon con 2×10^7 células/mL. El RNA total se obtuvo a los tiempos ya descritos anteriormente.

Para realizar la prueba de transición dimórfica, *U. maydis* FB1 se cultivó durante 24 h a 28°C en agitación en medio líquido YEPD. Las células se colectaron por centrifugación. Matraces con medio mínimo pH 7 y medio mínimo pH 3, se inocularon con 2×10^7 células/mL y se incubó durante 24 h a 28°C en agitación. Las células se colectaron por centrifugación. Matraces de medio mínimo pH 7 y pH 3 se inocularon con 2×10^7 células/mL provenientes del medio mínimo pH 3 y medio mínimo pH 7 respectivamente. Se obtuvo el RNA a los tiempos ya descritos.

VI.5. TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR

VI.5.1. Extracción y cuantificación de DNA genómico.

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 µg/mL de DNA de doble cadena. Una preparación pura de DNA deberá de tener una relación de A_{260}/A_{280} mínima de 1.8. Para determinar la concentración de DNA de doble cadena se aplicó la fórmula $A_{260} \times \text{inverso de la dilución} \times 50 \text{ µg/mL} = \text{µg/mL de DNA}$ (Sambrook y col., 1989).

VI.5.2. Electroforesis de DNA en geles de agarosa.

El DNA genómico y los productos de amplificación fueron evidenciados por electroforesis en gel de agarosa al 1%, teñidos con bromuro de etidio y observados con luz UV.

VI.5.3. RT-PCR y PCR

La determinación de la expresión del gen *ape3*, se realizó mediante RT-PCR semicuantitativo, usando el kit comercial SuperScript RT-PCR System (Invitrogen). Para sintetizar el cDNA (*complementary DNA*) se utilizaron: 2 µg de RNA total (tratado con DNasa I) obtenido de cada cultivo de interés (Ver apartado VI.4), los iniciadores y la enzima transcriptasa reversa. A partir del cDNA se realizaron dos reacciones de PCR, la primera para amplificar fragmentos de 500 pb del gen *ape3* y la segunda PCR se para amplificar el fragmento de 300 pb del gen 18S ribosomal.

La mezcla de reacción y las condiciones de PCR se describen a continuación:

Mezcla de reacción:

MgCl ₂ 50 mM	1.0 µL
Regulador para PCR 10X	2.5 µL
Mezcla de dNTP's 10 mM	0.5 µL
Iniciador-D 10 mM	1.0 µL
Iniciador-R 10 mM	1.0 µL
DNA 10 ng/ µl	1.0 µL
Agua	17.0 µL
Taq Polimerasa	1.0 µL

El volumen final de la reacción fue de 25 µL.

Condiciones de amplificación de 500 pb del gen *ape3*

Desnaturalización inicial:	2 min	94 °C	} 35 ciclos
Desnaturalización:	30s	94 °C	
Alineamiento:	45s	51 °C	
Extensión:	1.30 min	72 °C	

VI. Materiales y métodos

Extensión final: 5 min 72 °C

Condiciones de amplificación de 300 pb del gen 18S ribosomal.

Desnaturalización inicial:	5 min	94 °C	} 30 ciclos
Desnaturalización:	45s	94 °C	
Alineamiento:	45s	57 °C	
Extensión:	1 min	72 °C	
Extensión final:	7 min	72 °C	

VI.5.4. Amplificación de los fragmentos ape3a y ape3b, por PCR.

Con los iniciadores específicos (ver apartado VI.3.2.1) y DNA genómico de *U. maydis*, se amplificaron los fragmentos ape3a y ape3b. La mezcla de reacción se montó como se describe en el apartado VI.5.3.

Las condiciones de amplificación de los fragmentos ape3a y ape3b se describen a continuación:

Condiciones de amplificación de ape3a

Desnaturalización inicial:	3 min	95 °C	} 35 ciclos
Desnaturalización:	30s	95 °C	
Alineamiento:	45s	64 °C	
Extensión:	3 min	72 °C	
Extensión final:	6 min	72 °C	

Condiciones de amplificación de ape3b

a) Fragmento de 150pb (1)

Desnaturalización inicial:	2 min	94 °C	} 35 ciclos
Desnaturalización:	30s	94 °C	
Alineamiento:	45s	61 °C	
Extensión:	1 min	72 °C	
Extensión final:	5 min	72 °C	

b) Fragmento de 1413 pb (2).

Desnaturalización inicial:	3 min	95 °C	}
Desnaturalización:	30s	95 °C	

VI. Materiales y métodos

Alineamiento:	45s	62 °C	35 ciclos
Extensión:	3 min	72 °C	
Extensión final:	6 min	72 °C	

Los fragmentos 1 y 2 se diluyeron 1:20 y se utilizaron como molde para la amplificación del fragmento denominado ape3b. Las condiciones de amplificación fueron las mismas que las del fragmento ape3a.

VI.5.5. Purificación de los productos de PCR.

La purificación de los productos de PCR se realizó utilizando el equipo de reactivos comerciales Dna clean concentrator (FERMENTAS).

VI.5.6. Clonación del ORF completo del gen *ape3* en el vector pCR^R2.1-TOPO.

El vector PCR^R-TOPO se utilizó para clonar el amplificado ape3a obtenido de la PCR. La clonación se realizó de acuerdo al manual TOPO TA Cloning[®]

El sistema funciona de la siguiente manera: Cuando un amplificado de PCR es clonado, el gen LacZ α se interrumpe y el X-gal, no puede ser hidrolizado de tal manera que las colonias son de color blanco. Los plásmidos recombinantes y no recombinantes confieren resistencia a ampicilina y kanamicina (Fig. 8).

El fragmento ape3a ya clonado en el vector pCR^R2.1-TOPO se secuenció.

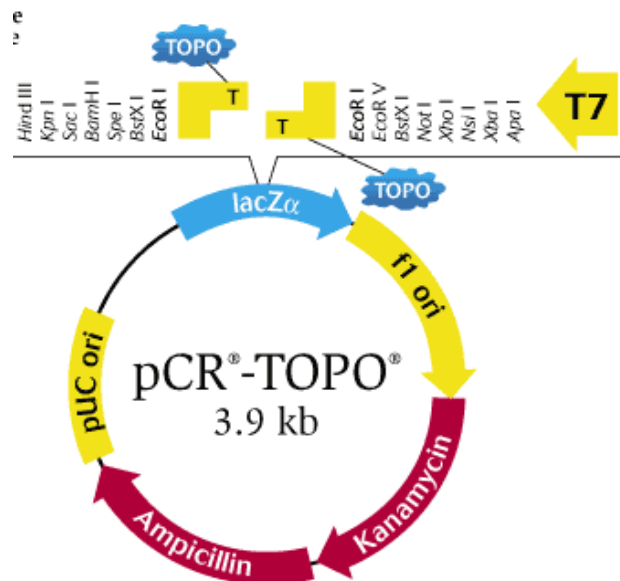


Fig.8. Representación esquemática del pCR^R 2.1-TOPO, vector de clonación.

VI.5.7. Clonación de los amplificadores de PCR en dos vectores de expresión.

VI.5.7.1. Características de los vectores de expresión: pPICZ α A y pPICZA.

Para la clonación y expresión del gen *ape3* se utilizaron dos vectores del kit de reactivos comerciales EasySelect Pichia Expresión Kit (Invitrogen): pPICZ α A y pPICZA (Fig. 9). Estos plásmidos se integran al genoma de *P. pastoris* por recombinación homóloga entre las secuencias del promotor 5'AOX1 del genoma de la levadura y del vector, de tal forma que el gen queda bajo la regulación de este promotor y su expresión se induce con metanol.

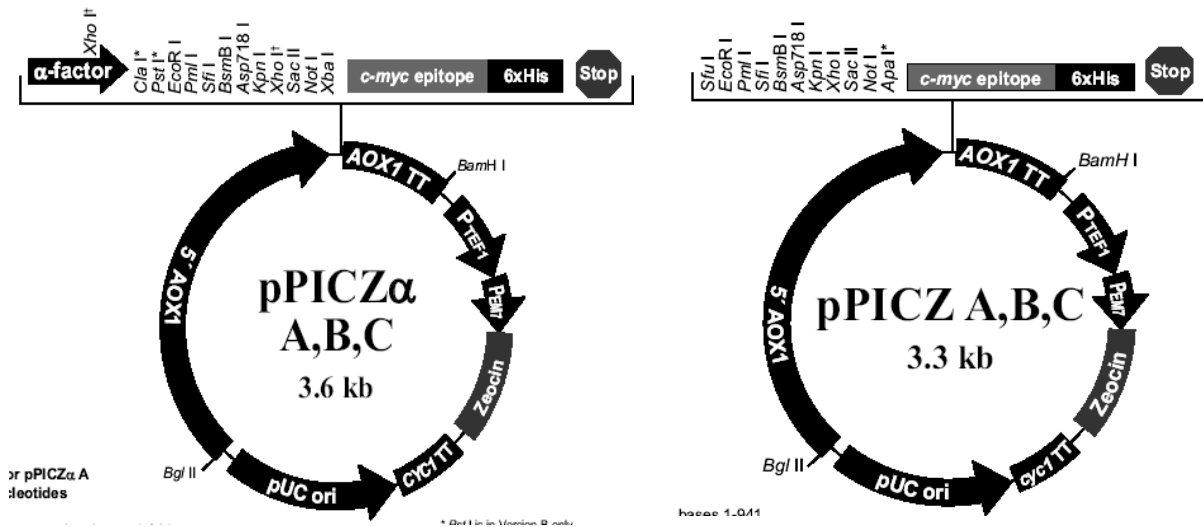


Fig. 9. Mapa de los vectores de expresión pPICZ α A y pPICZA. Los vectores contienen el gen *sh ble* codificante de la bleomicina que confiere resistencia a zeocina. El vector pPICZ α A contiene la secuencia de la señal de secreción del α -Factor de *S. cerevisiae* lo que permite obtener proteínas recombinantes extracelulares. Las 6 histidinas codificadas por la secuencia 6xHis ayudan en la purificación de la proteína recombinante por afinidad en columna de níquel.

VI.5.7.2. Digestión y ligación de los amplificadores de PCR y de los vectores.

El fragmento *ape3a* se clonó en el vector pPICZ α A y el fragmento *ape3b* se clonó en el vector pPICZA. Los vectores y los amplificadores de PCR se sometieron a digestión con la enzima de restricción *EcoRI* a 37°C durante 14 h.

Mezcla de reacción:

DNA (5-10µg)	X µL
Enzima <i>EcoR</i> I (10U/µL)	X µL
Regulador 10X	2.0 µL
Agua desionizada estéril	Aforar a 10.0 µL

Los productos de la digestión fueron sometidos a electroforesis en gel de agarosa y purificados como se indicó anteriormente. Posteriormente se llevó a cabo la reacción de ligación.

Mezcla de reacción:

DNA (500 ng/ µL)	X µL
DNA plasmídico (150 ng/ µL)	X µL
Ligasa (5U/µl)	X µL
Regulador 5X	4.0 µL
Agua desionizada estéril	Aforar a 15.0 µL

La reacción de ligación se incubó 14 h a 22°C, la ligasa fue inactivada a 65°C por 10 minutos.

VI.5.7.3. Transformación por quimiocompetentes.

El producto de ligación se mezcló con 100 µl de células competentes de *E. coli* DH10b, la mezcla se incubó en hielo 45 minutos y el choque térmico fue a 42°C por 90 segundos, las células se dejaron en hielo 5 minutos, se recuperaron en 500 µL de caldo LB bajo en sales y frío, se incubó a 37°C por 45 minutos. Las células se sembraron en LB agar bajo en sales con zeocina (25 µg/µL) se dejó crecer por 24 h a 37°C. Las transformantes obtenidas se crecieron en 5 mL de LB bajo en sal con zeocina (25 µg /uL).

VI.5.7.4. 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.

VI.5.7.5. Perfil de restricción de las construcciones pPICZ α A-ape3a y pPICZA-ape3b

La confirmación de la inserción de los productos de amplificación en los vectores de clonación se determinó por la digestión del DNA plasmídico con las enzimas de restricción *Eco* RI, *Bgl* II, *Hind* III, *Xho* I y *Pme* I.

VI.5.7.6. Transformación de *P. pastoris* X-33.

El DNA plasmídico de las construcciones pPICZ α A-ape3a y pPICZA-ape3b (10 μ g) se linearizó con *Pme* I, el producto se purificó. A una alícuota de 100 μ L de células competentes de *P. pastoris* X-33, se le adicionaron 10 μ L del plásmido linearizado. La mezcla se electroporó a 2.5 kV. Las células se recuperaron con 1 mL de sorbitol 1M y se incubaron a 30°C durante 2 h. Las células se sembraron en cajas de YPD agar con zeocina (100 μ g/mL) y se dejaron crecer a 30°C de 2 a 4 días.

VI.5.7.7. Confirmación de la integración del gen *ape3* en el genoma de *P. pastoris*.

Los fragmentos *ape3a* y *ape3b* se amplificaron por PCR a partir del DNA total aislado de las transformantes de *P. pastoris*. Como testigo negativo se utilizó DNA total de la cepa silvestre X-33 de *P. pastoris* y como testigo positivo DNA de *U. maydis*.

VI.5.7.8 Análisis de la remoción del intrón del gen *ape3* de *U. maydis* en transformantes de *P. pastoris*.

Se extrajo RNA de las transformantes de *P. pastoris* (pPICZ α A-ape3a y pPICZ α A-ape3b), se sintetizó el cDNA y se realizó una PCR utilizando los oligos *ape3Dc* y *ape3Rintrón* (ver apartado VI.3.2.3). Como testigo negativo se utilizó

cDNA total de la cepa silvestre X-33 de *P. pastoris* y como testigo positivo DNA de *U. maydis*.

VI.5.7.9 Análisis RT-PCR de las transformantes de *P. pastoris*.

La extracción de RNA total de las transformantes de *P. pastoris* se obtuvo por el método de descrito por Sherman y col. 1986. La inducción de la expresión del gen y la síntesis del cDNA se llevó a cabo como se menciona en el apartado VI.5.3 y VI.6.1. Utilizando este cDNA y los iniciadores ape3D y ape3R se amplificó un fragmento de 500 pb de el gen *ape3* de las transformantes de *P. pastoris*. Para normalizar se utilizo el gen 18S ribosomal de *P. pastoris*.

VI.6. TÉCNICAS BIOQUÍMICAS

VI.6.1. Inducción de las aminopeptidasas recombinantes APE3a-rec Y APE3b-rec codificada por el gen *ape3*.

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. Se tomaron alícuotas a las: 0, 24, 48 y 72 h para las pruebas bioquímicas.

VI.6.2. Fraccionamiento celular.

Los cultivos de BMM se centrifugaron a 3 000 x g y se reservó la fracción extracelular. El paquete celular se lavó dos veces con agua destilada fría y se adicionó por cada gramo de peso húmedo: 2.5 ml de regulador de rompimiento (Fosfato de sodio monobásico 50mM y glicerol al 5%) pH 7.4 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, se recuperó el sobrenadante (extracto libre de células).

VI.6.3. Actividad de la aminopeptidasa APE3-rec sobre diferentes sustratos.

En microtubos de 1.5 ml 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 10mM, la mezcla se incubó a 37°C durante 20 min y la reacción se paró

VI. Materiales y métodos

adicionando 500 μ l de sulfato de zinc al 0.5% y 100 μ l 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).

Los sustratos utilizados son: Pro-pNA, Arg-pNA, Leu-pNA y Lys-pNA. Una unidad de aminopeptidasa se define como la cantidad de enzima necesaria para liberar 1 μ mol de p-Nitroanilina por minuto, bajo las condiciones de ensayo.

La determinación de proteína se realizó según el método de Bradford 1976.

VII. RESULTADOS.

VII.1. ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO

VII.1.1. Características generales del gen *ape3* y de la proteína que codifica.

El análisis de las secuencias nucleotídicas depositadas en la base de datos del proyecto de secuenciación genómica de *U. maydis* indicó la presencia de once ORF's codificantes de aminopeptidasas, de estos solo dos son codificantes de aminopeptidasas vacuolares:

- a) *ape1* con número de acceso um11633 (se encuentra en estudio)
- b) *ape2* con número de acceso um06456.

El gen *ape3* de *U. maydis* es homólogo a la aminopeptidasa Y de *Sacharomyces cerevisiae*, se localiza en el cromosoma 23 y presenta un tamaño de 1649 pb, con un intrón hipotético de 131 pb (Fig. 10).

El intrón de 131 pb tiene que ser removido para no perder la pauta de lectura del ORF y por consiguiente generar una proteína madura, la proteína codificada es de 506 aa con un peso molecular 53.6 kDa.

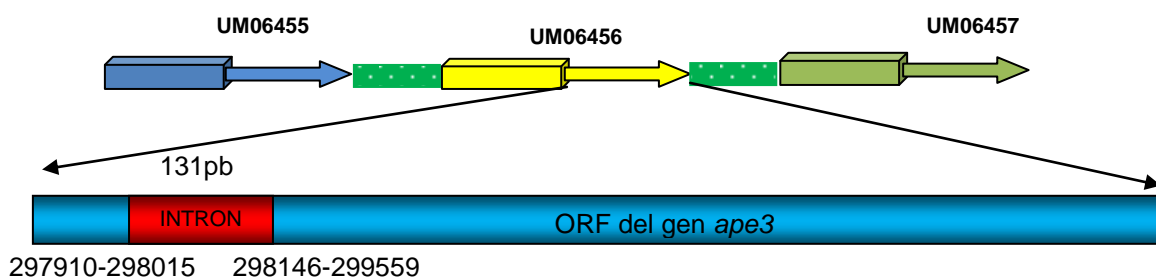


Fig. 10. Representación esquemática de la posición del intrón en el gen *ape3*

VII.1.2. Búsqueda de sitios de unión a factores de transcripción en la región reguladora del gen *ape3*.

Se analizó *in silico* una región de 2225 pb corriente arriba del codón de inicio (ATG) del gen *ape3*. La búsqueda de sitios de unión a factores de transcripción se llevó a cabo con el programa en línea MatInspector. La búsqueda de regiones promotoras se realizó comparando la secuencia del gen *ape3* de *U. maydis* con el blanco de regiones promotoras (matriz) previamente conocidas en hongos y aplicando un "core de similitud" de 1.0.

Se encontraron 53 posibles sitios de unión a factores de transcripción para la secuencia promotora del gen *ape3*. Los sitios hipotéticos de mayor interés que

VII. Resultados

se encontraron en la región corriente arriba del gen se describen en la tabla 4 y se representan esquemáticamente en la Fig. 11.

Tabla 4. Principales factores de transcripción que se unen potencialmente a la región reguladora del gen *ape3*, las secuencias que reconocen y sus características principales.

PROTEÍNA DE UNIÓN	SECUENCIA QUE RECONOCE (obtenida en MatInspector)	CARACTERÍSTICAS
XBP1	nnnTTCCaggannnnn	Respuesta a condiciones de estrés
PHO4	tatCACGtgatc	PHO4 involucrado en la regulación de fosfatasas, reprimidas en presencia de fosfato
STRE	acAGGGgcc	Elemento en respuesta al estrés
PACC	acaGCCAagcgcccc	Regulador del pH en <i>Aspergillus</i>
MATa2	acATGTcttc	Factor sexual a2 en <i>S. cerevisiae</i>
CSRE	nncntgngTCCGnnnnn	Regulación por fuente de carbono
NIT2	TATCnnn	Regulación por fuente de nitrógeno
GAL4	catcggtgcagcttgatCCGTacta	Activador transcripcional que se induce con galactosa

<http://www.gsf.de/biodv/matinspector.html>

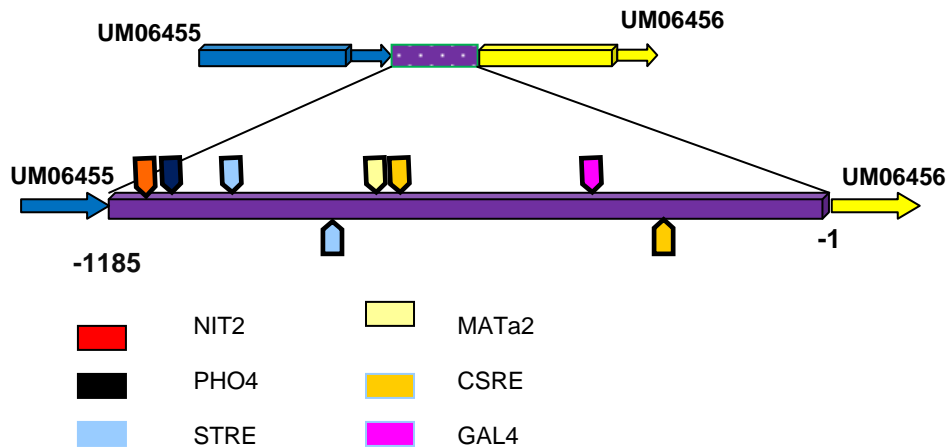


Fig. 11. Esquema de la región corriente arriba del gen *ape3* de *U. maydis* y localización relativa de algunos de los sitios de unión a factores de transcripción potenciales detectados por el programa MatInspector.

VII.1.3. Hidrofobicidad y regiones transmembranales de la proteína APE3.

El estudio de hidrofobicidad y la predicción de regiones transmembranales en la proteína deducida del gen *ape3*, indicó una zona fuertemente hidrofóbica en el inicio de la secuencia, la cual se localiza dentro de los primeros 100 aminoácidos, a partir del extremo amino terminal (Fig. 12a). La presencia de esta región hidrofóbica puede predecir un segmento transmembranal que pudiera corresponder al péptido señal. Lo anterior, es corroborado por la detección de una región transmembranal, localizada dentro de la misma región hidrofóbica (Fig. 12b).

VII. Resultados

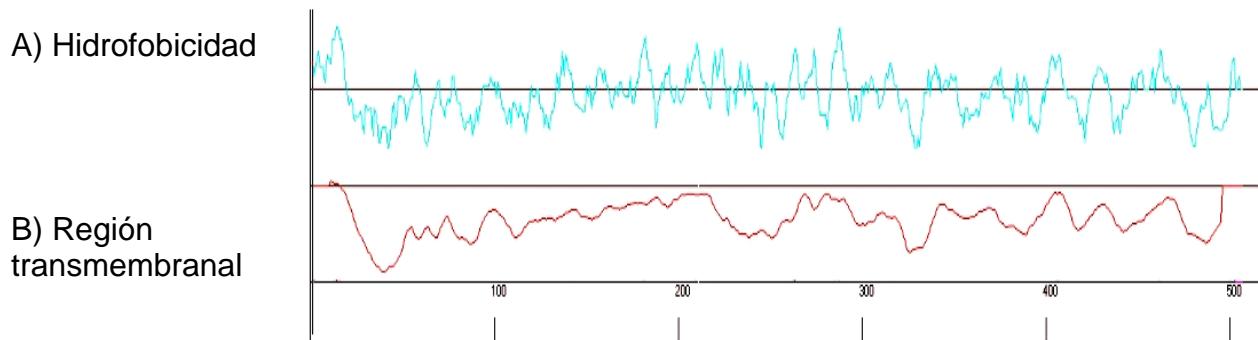


Fig. 12. Perfil de hidrofobicidad y predicción de regiones transmembranales de la proteína deducida del gen *ape3* de *U. maydis*. A) Perfil de hidrofobicidad. Los valores positivos sobre el eje de las ordenadas indican una mayor hidrofobicidad. B) Predicción de regiones transmembranales. Los valores ≥ 1 sobre el eje de las ordenadas indican una región transmembranal. Sobre el eje de las abscisas se representan las posiciones correspondientes a cada aminoácido

VII.1.4. Predicción de secuencias Motifs.

La predicción de secuencias “motifs” se realizó con un 100% de similitud (desapareamientos permitidos: 0), se encontró un motivo característico de las metalopeptidasas pertenecientes a la familia de las aminopeptidasas Y (M28), las cuales se caracterizan por ser dependientes de zinc. Además se encontraron un gran número de sitios potenciales de fosforilación, N-meristilación y N-glicosilación. Sin embargo el programa no puede reconocer si estos sitios son funcionales o no (Tabla 5).

El encontrar una secuencia consenso en una proteína dada, no es una garantía de significado biológico, sin embargo nos ayuda a la identificación de regiones potenciales de interés.

VII. Resultados

Tabla 5. Secuencias motifs encontradas en la secuencia de la proteína predicha codificada por el gen *ape3* de *U. maydis*.

Motif	Posición	Secuencia	Descripción
ASN_GLYCOSYLATION N-{P}-{ST}-{P}	280 - 283	NGSG	Sitio de N-glicosilación
CAMP_PHOSPHO_SITE [KR]-[RK]-x-[ST]	161 - 164	KRgT	Sitio de fosforilación por la proteína cinasa cAMP y cGMP dependiente
PKC_PHOSPHO_SITE [ST]-x-[RK]	3-5 24-26 35-37 168-170 176-178 481-483 495-497	SIR SaR SkR Stk TaK TkR ThR	Sitio de fosforilación por la proteína cinasa C
CK2_PHOSPHO_SITE [ST]-x-(2)-[DE]	109-112 309-312 350-353 412-415 419-422 469-472	Se1E SaeE SvhD TgaE TeqE TslE	Sitio de fosforilación por la caseína cinasa II
MYRISTYL G-[EDRKHPFYW]-x(2)- [STAGCN]	19-24 143-148 175-180 194-199 276-281 314-319 356-361 366-371 404-409 408-413 409-414 427-432 499-504	GAqqAS GCeqTD Gtaka GiNDnG GLndNG GLlgAk GStNQ GSaqAE GlaaGG GGldTG GGtaGI GGtaGI GGdIAL	Sitio de N-miristilación
[LIVMFGAC]- [LIVMTADN]- [LIVFSA]-D-[ST]-G-[STAV]- [STAPDENQ]-x-[LIVMFSTNC]- x-[LIVMFGTA]	190-434	VVLDTGSADFWL AAIDTGTTLIGG	Sitio característico de metaloproteasas dependiente de Zn

VII. Resultados

Sintaxis para la descripción de secuencias consenso:

- Separa las diferentes posiciones aminoacídicas.
- [] Aminoácidos permitidos en la posición dada.
- { } Permite todos los aminoácidos en la posición dada, menos los indicados.
- x Designa cualquier aminoácido.
- x(2) Indica 2 aminoácidos cualquiera consecutivos.

VII.1.5. Mapa de restricción teórico del gen *ape3*.

Los sitios de restricción teóricos del gen *ape3* se determinaron como se indica en materiales y métodos. Los sitios *Hind* III, *Bgl* II y *Xho* I, fueron confirmados cuando el gen se clonó en los vectores de expresión (Fig. 13).

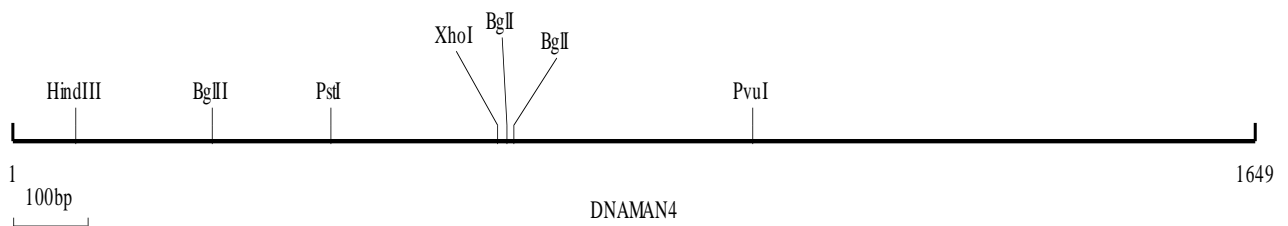


Fig. 13. Mapa de restricción del gen *ape3* de *U. maydis*.

VII.1.6. Diseño de iniciadores.

Se diseñaron cuatro iniciadores para la expresión heteróloga, dos iniciadores para estudios de RT-PCR y un iniciador para estudiar la remoción del intrón en transformantes de *P. pastoris* (Ver apartado VI.3.2)

Los iniciadores utilizados en este trabajo se describen en la tabla 5, cabe mencionar que los oligos 18SR y 18SD se tomaron de la bibliografía (Miramón, 2008).

VII. Resultados

Tabla 6. Oligonucleótidos diseñados para el estudio del gen *ape3*

Nombre del oligonucleótido	Tm (°C)	Secuencia (5' a 3')
Expresión heteróloga		
ape3Dc	83	CGCGCGAATTCATGCTCAGTCTGAGGCTGGTTCAG
ape3Rc	86	GTAGCGAATTCGATGAGCCCAGGTCGCCAC
ape3Ddele	86	CAAAGCTTCGACCTGTTGATTCGAAACGCCTTCGAAACGACATCAAGC
ape3Rdele	86	GCTTGATGTCGTTTCGAAGGCGTTTCGAATCAACAGGTCGAAGCTTTGG
RT-PCR		
ape3D	61	TCAACTTTGACATGATCGCTTC
ape3R	60	ATGCGTGTTTTGACCGAATT
18SD	60	TTAAAGAATTGACGGAAGGGC
18SF	60	GTACAAGGGCAGGGACGTAGT
Remoción del intrón		
ape3Rintrón	61	AAGTCGGTCTGCTCACAGCCC

*Los oligonucleótidos subrayados indican la secuencia de reconocimiento para la enzima *Eco RI*.

VII.2. CARACTERIZACIÓN DEL GEN *ape3*.

VII.2.1 Amplificación de los fragmentos *ape3a* y *ape3b* a partir de DNA genómico de *U. maydis*.

Utilizando las condiciones mencionadas en materiales y métodos, se amplificaron y purificaron los fragmentos del gen *ape3*: *ape3a* y *ape3b* (Fig. 14). Se obtuvo el tamaño esperado para cada uno de los amplificados.

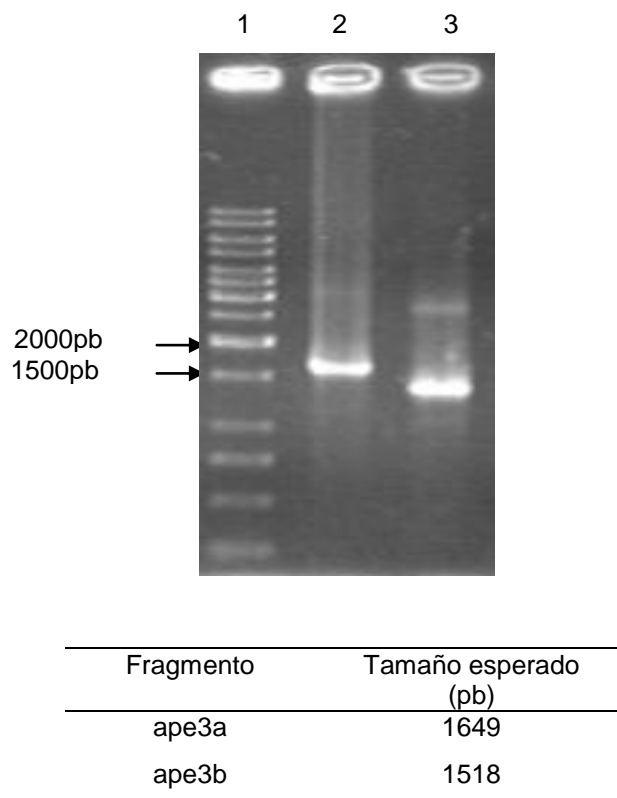


Fig. 14. Amplificación de *ape3a* y *ape3b* por PCR. Electroforesis en gel de agarosa al 1% 1) Marcador de 1Kb. Banda purificada: 2) *ape3a*, 3) *ape3b*.

VII. Resultados

VII.2.2 Clonación del gen *ape3a* en el vector pCR^R 2.1-TOPO.

La clonación se realizó como se describe en materiales y métodos. La construcción pCR^R2.1-TOPO-*ape3a*, se confirmó por perfil de restricción con la enzima *Eco* RI (Fig. 15).

Se determinó la secuencia nucleotídica del fragmento clonado. La secuencia obtenida alineó con el gen *ape3* de *U. maydis*.

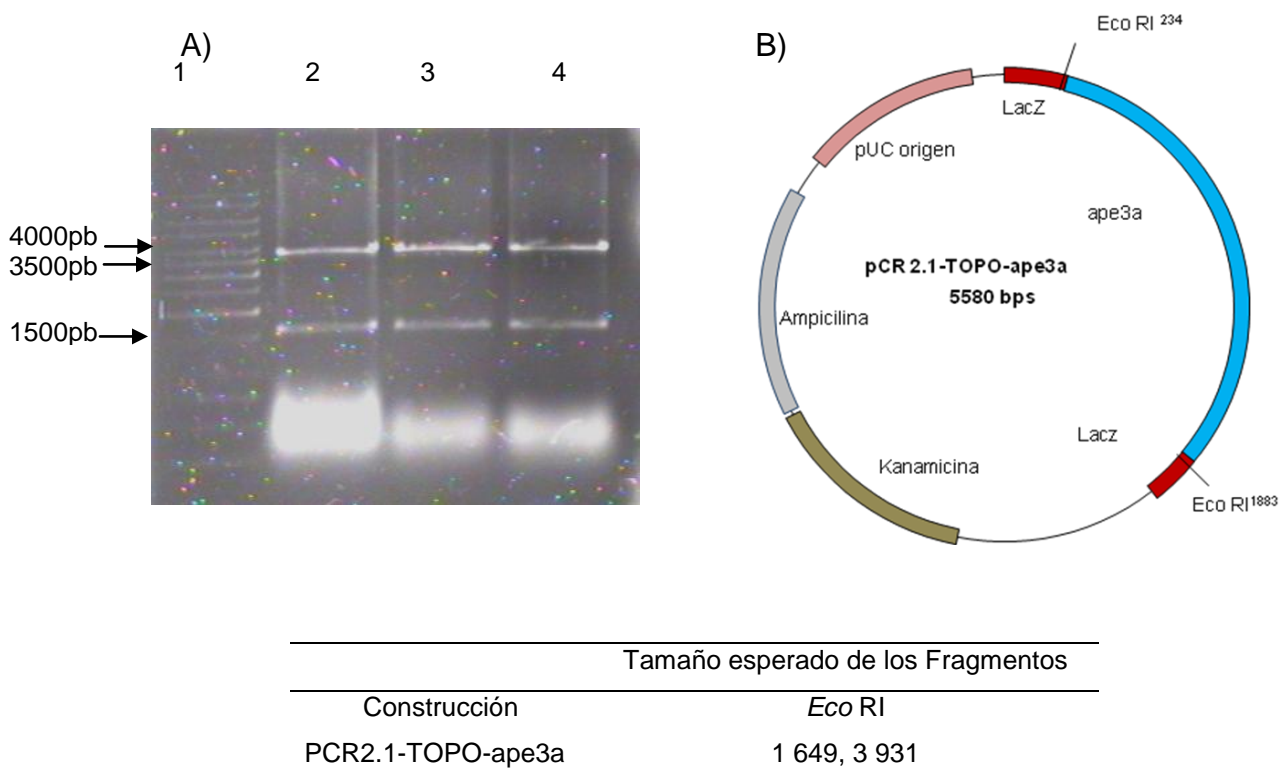


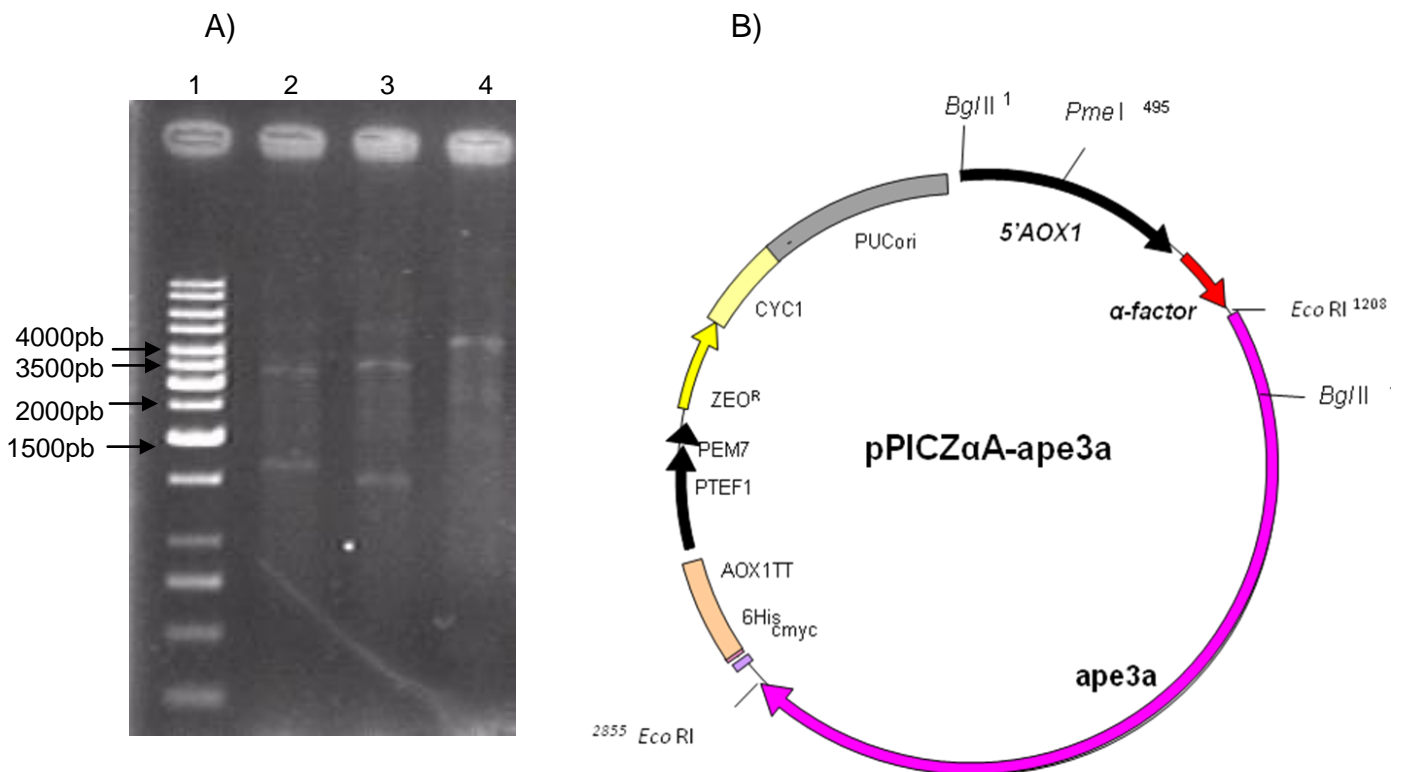
Fig. 15. Análisis de restricción de la construcción pCR2.1-TOPO-*ape3a*. A) Electroforesis en gel de agarosa al 1% (1) Marcador de 1Kb. (2,3 y 4) clonas digeridas con *Eco* RI. B) Representación esquemática de la construcción pCR2.1-TOPO-*ape3a*.

VII. Resultados

VII.2.3. Clonación del fragmento *ape3a* en el vector pPICZ α A y clonación del fragmento *ape3b* en el vector pPICZA.

El fragmento *ape3a* se clonó en el vector pPICZ α A y el fragmento *ape3b* en el vector pPICZA. La clonación se realizó digiriendo los insertos y vectores con la enzima *Eco* RI, estos fragmentos se ligaron en una proporción de 1:3 vector e inserto respectivamente. La mezcla de ligación se transformó en *E. coli* DH10b.

La construcción pPICZ α A-*ape3a*, se confirmó por perfil de restricción con las enzimas *Eco* RI, *Bgl* II y *Pme* I (Fig. 16)

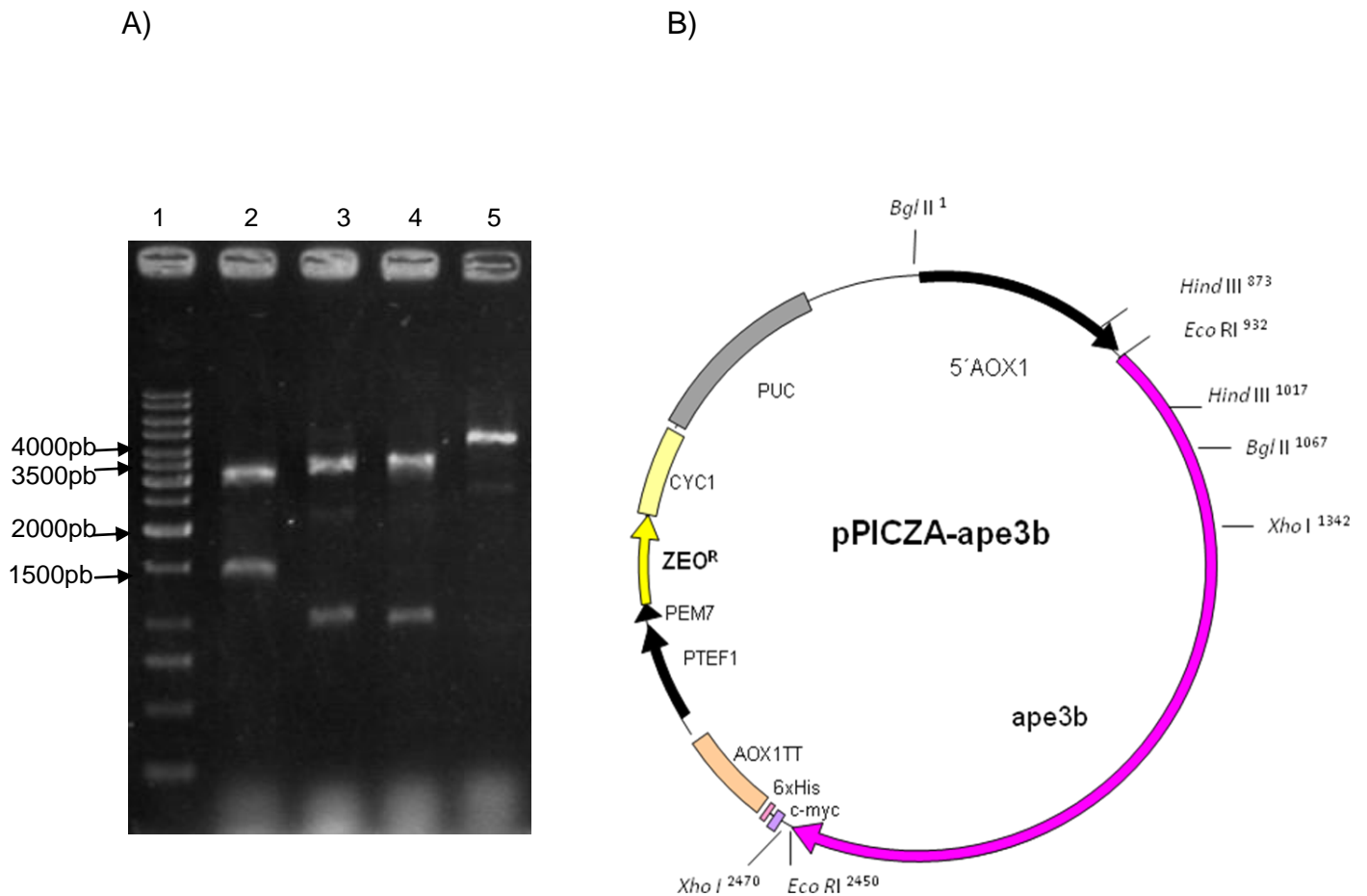


Construcción	Tamaño esperado de los Fragmentos		
	<i>Eco</i> R I	<i>Bgl</i> II	<i>Pme</i> I
pPICZ α A- <i>ape3um</i>	1 649, 3 600	1 343, 3 904	5,247

Fig. 16. Análisis de restricción de la construcción pPICZ α A-*ape3a*. **A)** Perfil de restricción esperado 1) Marcador de 1Kb, 2) Digerido con *Eco* RI, 3) Digerido con *Bgl* II, 4) Digerido *Pme* I. **B)** Representación esquemática de la construcción pPICZ α A-*ape3a*.

VII. Resultados

La construcción pPICZA-ape3b, se confirmó por perfil de restricción con las enzimas *Eco* RI, *Bgl* II, *Hind* III y *Xho* I (Fig. 17).

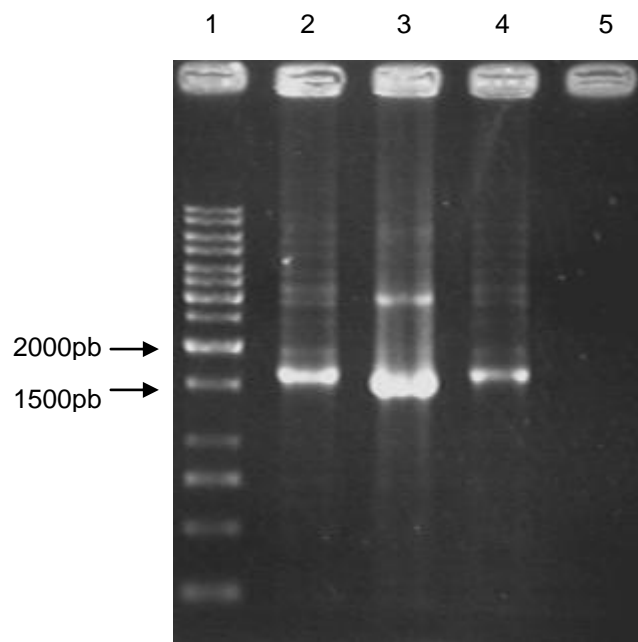


Construcción	Tamaño esperado de los Fragmentos			
	<i>Eco</i> RI	<i>Xho</i> I	<i>Bgl</i> II	<i>Hind</i> III
pPICZ α A-ape3um	1 518, 3 300	1067, 3751	1108, 3751	144, 4674

Fig. 17. Análisis de restricción de la construcción pPICZA-ape3b. **A)** Perfil de restricción esperado 1) Marcador de 1Kb, 2) Digerido con *Eco* RI, 3) Digerido con *Xho* I, 4) Digerido con *Bgl* II 5) Digerido con *Hind* III. **B)** Representación esquemática de la construcción pPICZA-ape3b.

VII.2.4 Transformación de *P. pastoris* y amplificación del gen *ape3a* y *ape3b* a partir de DNA genómico.

Las construcciones obtenidas en el punto anterior se linearizaron con la enzima *Pme* I, con los plásmidos linearizados se transformó por electroporación a *P. pastoris*. Las transformantes se seleccionaron en medio con zeocina. Las colonias resistentes a zeocina se resembraron en medio YPD-Zeocina. A las transformantes se les extrajo el DNA genómico y a partir de éste se amplificaron los fragmentos *ape3a* y *ape3b* confirmando que las construcciones pPICZ α A-*ape3a* y pPICZA-*ape3b* se integraron en el genoma de *P. pastoris* (Fig. 18).



Fragmento	Tamaño esperado (pb)
pPICZ α A- <i>ape3a</i>	1649
pPICZA- <i>ape3b</i>	1518
DNA de <i>U. maydis</i> .	1649
DNA de <i>P. pastoris</i> .	-

Fig. 18. Análisis electroforético del amplificado del gen *ape3* obtenido por PCR a partir del DNA genómico de transformantes de *P. pastoris*. 1) Marcador de 1Kb, 2) Clona 9 (pPICZ α A-*ape3a*), 3) Clona 2 (pPICZA-*ape3b*), 4) DNA de *U. maydis*, 5) *Pichia pastoris* X-33 (WT).

VII.2.5. Análisis de la expresión del gen *ape3* por RT-PCR en transformantes de *P. pastoris*.

Se realizaron pruebas de expresión del gen *ape3* mediante RT-PCR (ver materiales y métodos) para las transformantes pPICZ α A-*ape3a* (C9) y pPICZA-*ape3b* (C2). Como testigo negativo se utilizó la cepa de *P. pastoris* X-33 (WT).

En el caso de la transformante pPICZA-*ape3b* (C2) el gen *ape3* mostró una expresión basal a las 0 h, sin embargo a las 48 h aumentaron los niveles de expresión. Por el contrario la expresión del gen *ape3* de la transformante pPICZ α A-*ape3a* (C9) se mantiene constante (Fig. 19). *P. pastoris* X-33 (WT) no expresó el gen *ape3* en ninguno de los tiempos probados.

El aumento de la expresión del gen *ape3* en la transformante pPICZA-*ape3b* (C2) de *P. pastoris* sugiere que la expresión del gen *ape3* es regulado por el promotor 5'AOX1, ya que su expresión se incrementa con metanol confirmando que el gen *ape3* fue integrado en el genoma de *P. pastoris* en la localización correcta.

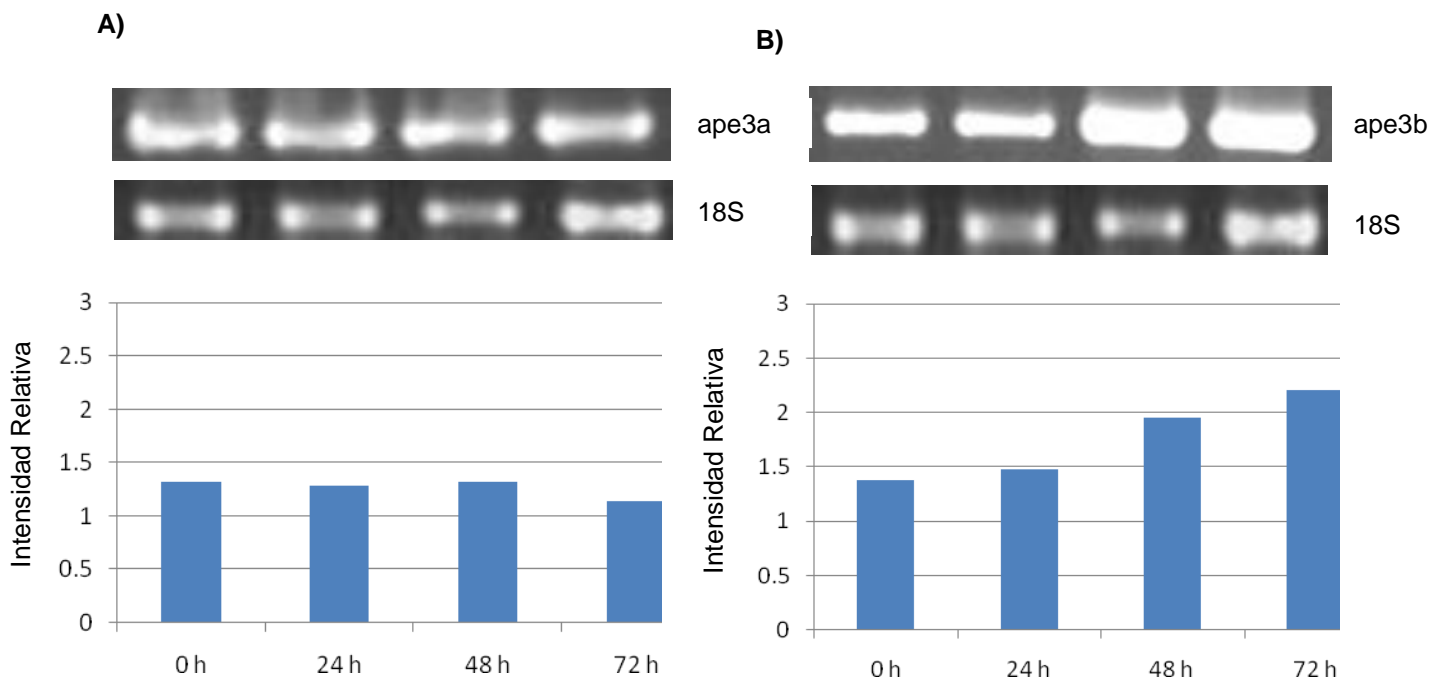


Fig. 19. Determinación de la expresión por RT-PCR del gen *ape3* en transformantes de *P. pastoris*. A) Expresión de pPICZ α A-*ape3a* a las 0, 24 48 y 72 h de inducción respectivamente. B) Expresión de pPICZA-*ape3b* a las 0, 24 48 y 72 h de inducción respectivamente

VII.2.6. Análisis de la remoción del intrón del gen *ape3* de *U. maydis* en transformantes de *P. pastoris*.

El análisis de la remoción del intrón en transformantes de *P. pastoris* se realizó como se describe en materiales y métodos. A partir del cDNA de la transformante pPICZ α A-*ape3a* (C9) de *P. pastoris* se amplificó un fragmento de 557pb, esto indica que *P. pastoris* no procesa el intrón del gen *ape3* de *U. maydis* (Fig. 20). Como testigo positivo de la remoción del intrón se utilizó cDNA de *U. maydis* y cDNA de la transformante pPICZA-*ape3b* (C2) de *P. pastoris* (426 pb).

Al parecer el mecanismo de remoción de intrones de *P. pastoris* es diferente al de *U. maydis*.

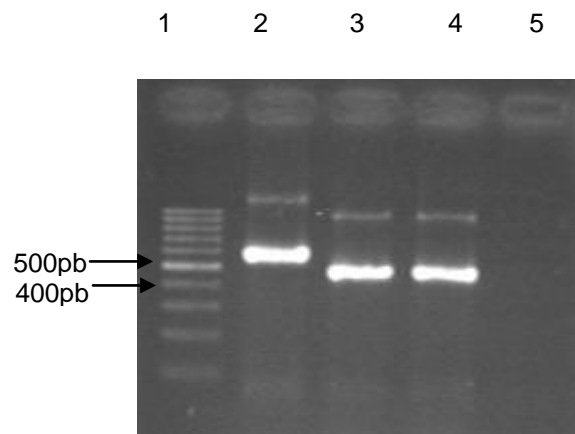


Fig. 20. Amplificado del intrón del gen *ape3* por PCR a partir de cDNA de transformantes de *P. pastoris*. 1) Marcador de 1Kb, 2) Clona 9 (pPICZ α A-*ape3a*), 3) Clona 2 (pPICZA-*ape3b*) y 4) *U. maydis*. 2) *Pichia pastoris* X-33 (WT).

VII.3. BIOQUÍMICA DE LA AMINOPEPTIDASA RECOMBINANTE APE3bi-rec.

VII.3.2 Determinación de la actividad APE3bi-rec en fracciones celulares.

La actividad determinada en la cepa silvestre X-33 de *P. pastoris*, siempre fue similar a la encontrada en la transformante pPICZA–ape3b (C2) (fig. 21), sin embargo la aminopeptidasa recombinante ape3bi-rec tiende a aumentar su actividad cuando se utiliza prolina-pNa como sustrato. A partir de las 72h se observó un aumento de actividad de dos veces más con respecto a la detectada en la cepa silvestre X-33 de *P. pastoris*.

Tabla 7. Actividad específica de la proteína recombinante APE3bi-rec en la fracción extracto libre de células de *P. pastoris*, utilizando diferentes sustratos. Las fracciones se obtuvieron a partir de un cultivo inducido con metanol incubado diferentes tiempos a 28°C.

Actividad específica mU/mg de proteína					
Tiempo de incubación (h)	0	24	48	72	96
C2 Lisina	45.67	48.13	28.35	26.73	25.62
X-33 Lisina	43.67	45.81	73.08	24.19	48.18
C2 Arginina	50.73	50.74	234.85	39.81	32.71
X-33 Arginina	46.97	48.86	168.36	37.66	55.48
C2 Leucina	54.32	63.62	38.99	39.81	20.77
X-33 Leucina	60.73	67.91	43.40	37.66	36.48
C2 Prolina	10.11	15.16	65.39	21.03	24.64
X-33 Prolina	13.24	14.93	106.00	8.51	13.67

VII. Resultados

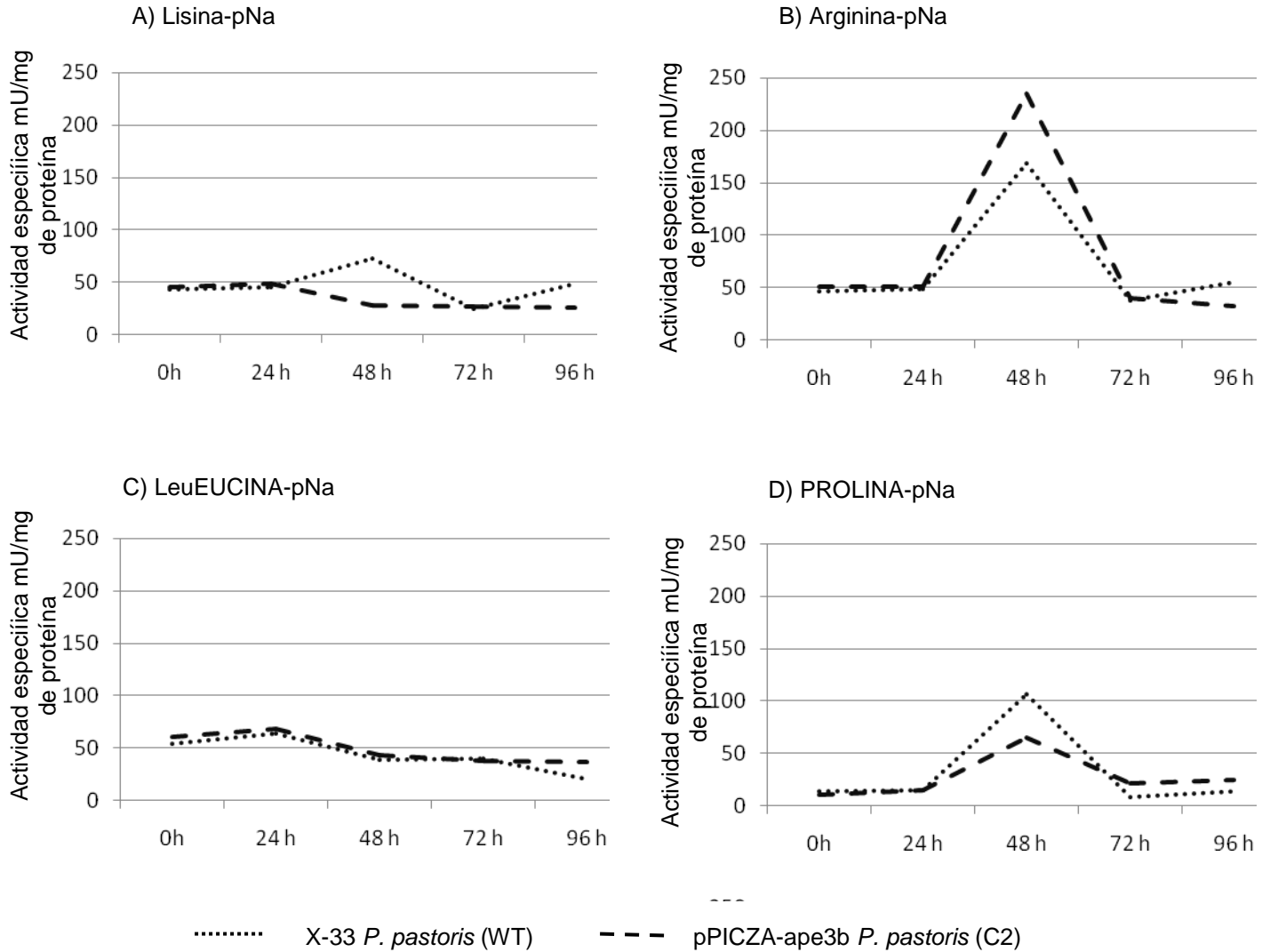


Fig. 21. Cinética de actividad específica de la proteína recombinante APE3bi- rec sobre diferentes sustratos, en *P. pastoris*. A) LISINA-pNa. B) ARGININA-pNa, C) LEUCINA-pNa, D) PROLINA-pNa. Las fracciones celulares se obtuvieron de cultivos de *P. pastoris* en metanol.

VII.3.3 Análisis de expresión del gen *ape3* en diferentes condiciones fisiológicas por el método de RT-PCR.

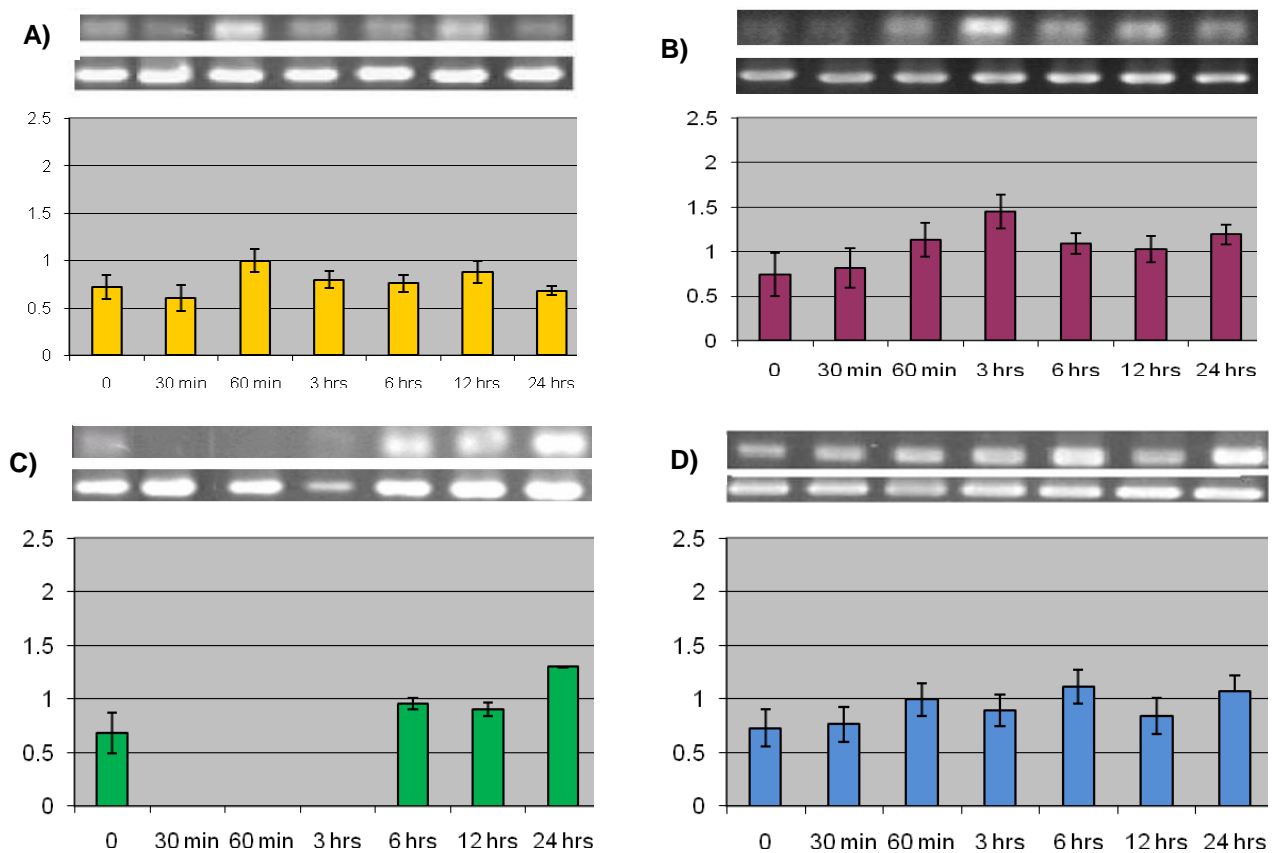
VII.3.3.1 Expresión en diferentes fuentes de nitrógeno.

Los niveles de expresión del gen *ape3* varían de forma evidente en función de la fuente de nitrógeno disponible. En presencia de sulfato de amonio o prolina como fuente de nitrógeno los niveles de expresión de este gen se mantienen constantes, en presencia de infusión de maíz o peptona como fuentes de nitrógeno se observa que este gen aumenta sus niveles de expresión de forma considerable (Fig. 22).

Cuando la peptona es la única fuente de nitrógeno se observa inducción de *ape3* a partir de los 60 min y alcanzando su máxima expresión a las 3h (Fig. 22B).

En presencia de infusión de maíz, el gen *ape3* reprime su expresión a partir de los 30 min hasta las 3 h de tratamiento. Al cabo de 6 h se induce la expresión de este gen alcanzando su máximo nivel a las 24 h (Fig. 22C).

El aumento de la expresión de *ape3* en infusión de maíz, es similar al reportado para otras proteasas: *ape1* y *apr1* (Noriega, 2005; Miramón, 2008).



VII. Resultados

Fig. 22. Determinación de la expresión del gen *ape3* en diferentes fuentes de nitrógeno. Las determinaciones se realizaron cultivando a las células en YNB adicionando: A) prolina B) peptona, C) infusión de maíz y D) sulfato de amonio.

VII.3.3.2. Expresión durante la transición dimórfica.

Los niveles de expresión de *ape3* durante la transición dimórfica se mantienen constantes, mostrando sólo una ligera inducción, no significativa, en función del tiempo (Fig. 23). Por lo tanto, este gen no se induce bajo esta condición.

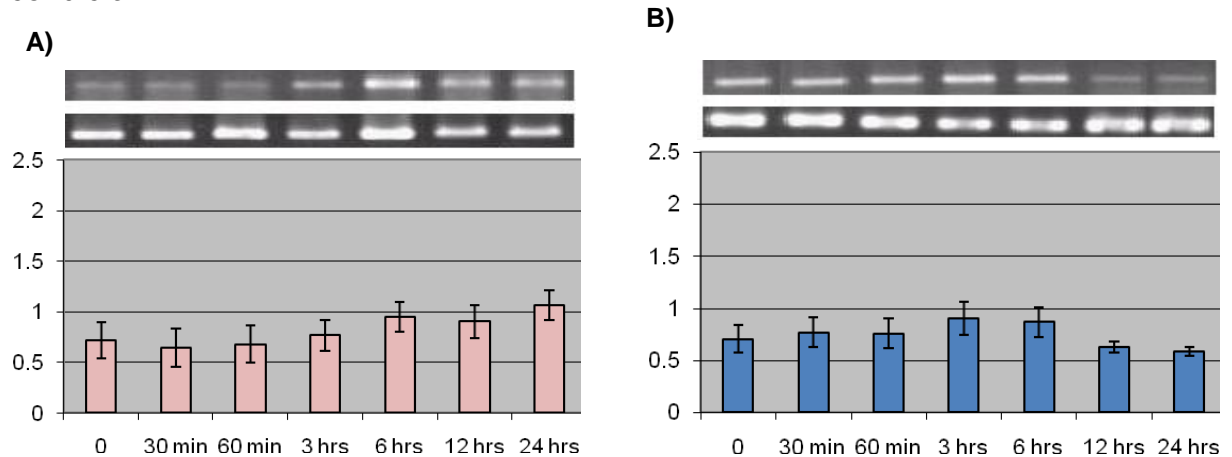


Fig. 23. Determinación de la expresión del gen *ape3* durante transición dimórfica. Las determinaciones se realizaron cultivando a las células medio mínimo pH 3 y pH 7: A) levadura-micelio B) micelio-levadura.

VII.3.3.3. Expresión con galactosa o glucosa como fuentes de carbono.

Los niveles de expresión de *ape3* aumentan cuando la célula tiene la galactosa como única fuente de carbono. Este aumento de expresión es evidente a partir de las 6 h, alcanzando su máximo nivel a las 24 h (Fig. 24). Esto indica que *ape3* se induce cuando la célula es cultivada en fuentes secundarias de carbono.

VII. Resultados

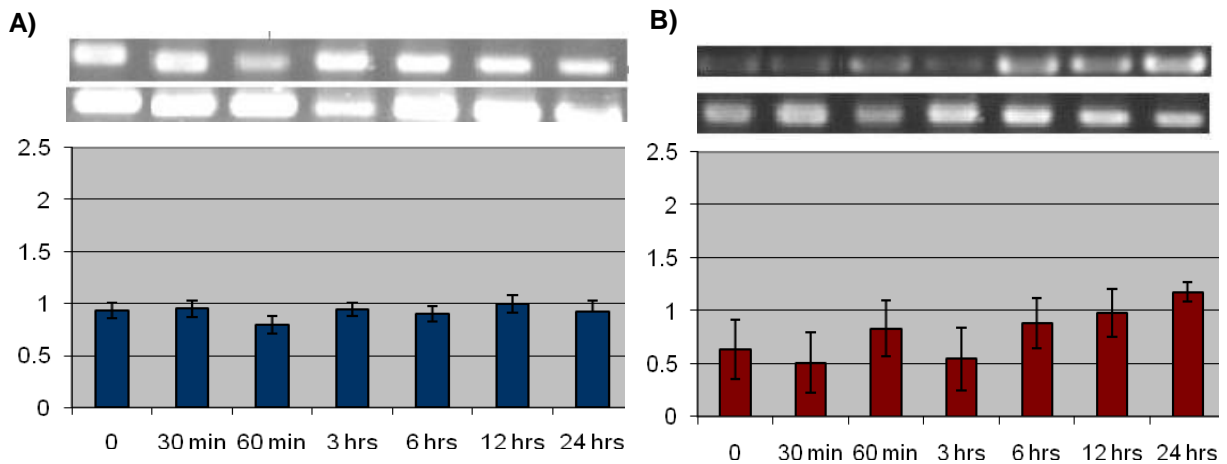


Fig. 24. Determinación de la expresión del gen *ape3* en diferentes fuentes de carbono. Las determinaciones se realizaron cultivando a las células en YNB adicionando: A) glucosa y B) galactosa.

VII.3.3.4. Expresión durante la inanición por fuentes de carbono/nitrógeno.

Estudiando los niveles de expresión del gen *ape3* durante inanición de nitrógeno, se observó que este tiende a elevar su expresión a partir de los 60 minutos (Fig. 25A), Por el contrario cuando la célula se cultivo en completa inanición de carbono, esta no se expresó (Fig. 25B). Esto demuestra que *ape3* se induce durante el estrés nutricional por fuente de nitrógeno y es reprimida durante el estrés nutricional por fuente de carbono.

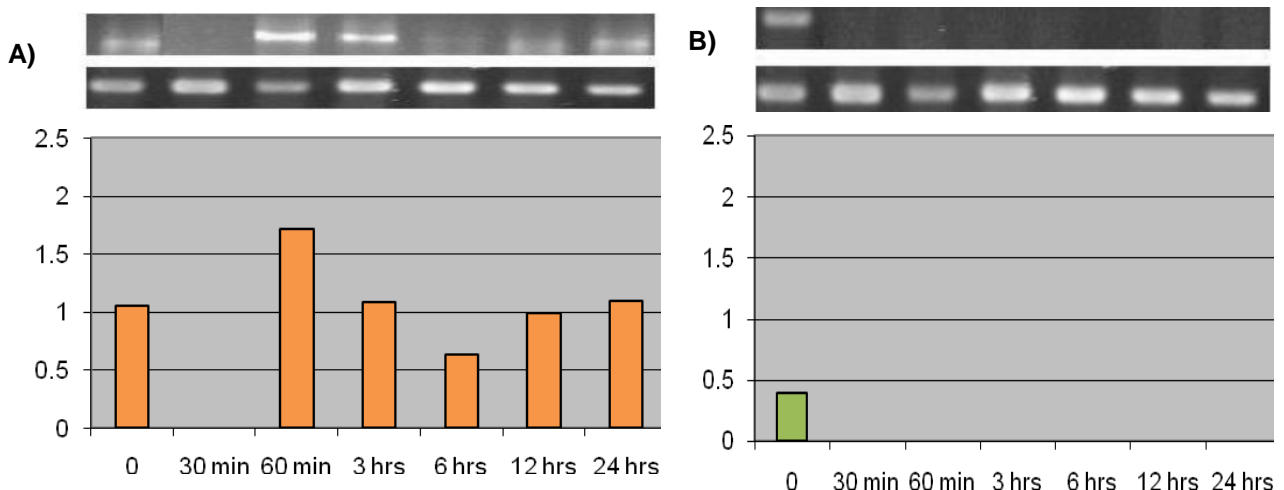


Fig. 25. Determinación de la expresión del gen *ape3* durante inanición. Las determinaciones se realizaron cultivando a las células en YNB adicionando: A) glucosa (Inanición por nitrógeno) y B) sulfato de amonio (Inanición por glucosa).

IX. CONCLUSIONES.

VIII. Discusión

La supervivencia de las células en su medio ambiente depende de la capacidad que tengan para adaptarse a los constantes cambios que ocurren en su entorno, como pueden ser, limitación de nutrientes y factores físicos y químicos. La proteólisis provee a la célula de aminoácidos para la síntesis de nuevas proteínas y para la generación de energía (Hilt y Wolf, 1992).

El hongo fitopatógeno, *U. maydis*, se ha utilizado como modelo de estudio de varios procesos biológicos como: la complementación sexual, la interacción planta-microorganismo, la morfogénesis, la recombinación y reparación del DNA, etc. (Ruíz y Martínez, 1998; Kämper y col., 2006). Sin embargo el papel de la proteólisis en *U. maydis* ha sido poco estudiado, a pesar de ser un mecanismo vital en la biología celular de este hongo.

Debido a la relevancia que tiene la proteólisis en *U. maydis*, nuestro grupo de trabajo se ha enfocado en el estudio de la proteólisis. Hasta ahora se han descrito cuatro actividades proteolíticas: una proteínasa ácida pumA, una proteínasa básica pumB, una aminopeptidasa pumAPEi y una dipeptidil aminopeptidasa pumDAPI (Mercado y col., 2003). También se ha abordado el estudio de diversos genes codificantes de proteasas: el gen *pep4* (proteínasa A), *apr1* (aspartil proteasa), *ape1* (aminopeptidasa I) y el gen *dap1* (dipeptidil aminopeptidasa). Hasta ahora no se ha podido corroborar si dichos genes codifican para proteasas, a excepción del gen *dap1* que codifica para una dipeptidil aminopeptidasa de *U. maydis* (Juárez, 2007).

Este trabajo se enfoca particularmente en el estudio del gen *ape3* de *U. maydis* codificante de una aminopeptidasa vacuolar putativa, homóloga a la APEY de *Sacharomyces cerevisiae*. Hasta la fecha se desconoce el perfil de expresión de este gen y las características bioquímicas de la proteína que codifica. Motivo por el cual este trabajo abarca el análisis de la expresión del gen *ape3* a nivel transcripcional durante diferentes condiciones fisiológicas y la determinación de algunas características bioquímicas de la proteína codificada, para ello se utilizó el sistema de expresión heterólogo de *P. pastoris*.

En las dos bases de datos de *U. maydis*, la base de datos del Instituto Broad y el MIPS, se indica la presencia de once ORF's codificantes de aminopeptidasas, de todos estos solo dos ORF's con número de acceso um11633

VIII. Discusión

(*ape1*) que se encuentra en estudio y um06456 (*ape3*) que se estudia en este trabajo, codifican para probables aminopeptidasas vacuolares (Tabla 4).

El gen *ape3* de *U. maydis*, número de acceso um06457, se localiza en el cromosoma 23 y presenta un tamaño de 1649pb, con un intrón hipotético de 131 pb (Fig. 9). Como se comprobó en este trabajo, el intrón tiene que ser removido para no perder la pauta de lectura del ORF y por consiguiente generar una proteína madura, el tamaño de la proteína madura es de 506 aminoácidos con un peso molecular 53.6 kDa. Los experimentos de expresión heteróloga en *P. pastoris* realizados en este trabajo, demostraron que es necesaria la remoción del intrón ya que a pesar de que existía expresión con la construcción genética del gen completo, la cual contenía el intrón (demostrado por RT-PCR) no se pudo detectar actividad bioquímica con los diferentes sustratos utilizados.

El estudio de la región reguladora del gen *ape3* indicó la presencia de 53 potenciales sitios de unión a factores de transcripción, entre los más relevantes se encuentran XBP1 y STRE factores de transcripción relacionados con el estrés, PACC, CSRE y NIT2 factores de regulación dependientes del pH y de la fuente de carbono y nitrógeno disponible. También se identificó un activador transcripcional en respuesta a galactosa GAL4, y un factor de transcripción relacionado con la complementación sexual en *Sacharomyces cerevisiae* MATa2.

El factor de transcripción Xbp1 (*XhoI* site-binding protein 1), participa en la regulación del ciclo celular en *S. cerevisiae* (Mai y Breeden, 1997). En *S. cerevisiae*, Xbp1 funciona como represor transcripcional y la expresión de los elementos regulados por este factor son inducidos por choque térmico, estrés osmótico y oxidativo, daño al DNA, e inanición por fuente de carbono. Se sugiere que la función de este represor es arrestar a la célula en la fase G1 del ciclo celular ante condiciones de estrés medioambiental (Mai y Breeden, 1997). Por otra parte se sabe que Xbp1 se encuentra involucrado en la biosíntesis de fosfolípidos y la biogénesis del retículo endoplásmico. Las células que sobreexpresan este factor de transcripción acumulan fosfatidilcolina en el ER y por consiguiente aumentan la actividad de la ruta de la citidina difosfocolina (Runtangwan y col., 2004). Los genes que regula este factor de transcripción generalmente codifican para proteínas que ejercen su función en ER (Lee y col.,

VIII. Discusión

2003; Yoshida y col., 2003). Por ejemplo ATF6 α /B que regula la transcripción de varias chaperonas y el despliegue de proteínas en el retículo endoplásmico.

El factor de transcripción STRE, es un elemento en respuesta a estrés, se ha demostrado que este factor de transcripción solo induce la transcripción de genes cuando la célula es sometida a shock térmico, inanición de nitrógeno y estrés oxidativo (Schüller y col., 1994).

El factor de transcripción pacC activa la transcripción de genes inducidos a pH alcalino y reprime genes inducidos a pH ácido. PacC también juega un rol importante en la meiosis, morfogénesis y tolerancia a estrés por NaCl. En *U. maydis* ha sido comprobado que este factor de transcripción es funcional, controla una serie de funciones celulares dependientes del pH, pero no se encuentra involucrado en el dimorfismo y la virulencia del hongo (Aréchiga y Ruiz, 2005).

El sitio NIT2 encontrado en la región reguladora del gen *ape3* está relacionado con activadores de genes regulados por nitrógeno, se ha propuesto como el principal regulador positivo de nitrógeno de *Neurospora crassa*. Este factor de transcripción enciende la expresión de genes que codifican para enzimas catabólicas de nitrógeno bajo condiciones de limitación de nitrógeno, es decir, codifican para enzimas requeridas en la utilización de varias fuentes de nitrógeno secundario cuando las fuentes de nitrógeno primarias no están disponibles (Fu y Marzluf, 1990).

CSRE es un elemento que activa la transcripción de genes gluconeogénicos. La activación de genes mediante CSRE requiere que la célula esté expuesta a condiciones de crecimiento estresante y represivo. Una alta concentración de un azúcar fácilmente fermentable inactiva este factor de transcripción (Scholer y Schuller, 1994).

El sitio de unión al factor de transcripción MATa2 se encuentra relacionado con el ciclo sexual de *Sacharomyces cerevisiae*. En este hongo la reproducción sexual ocurre cuando una célula tipo sexual **a** se encuentra con una del tipo α . Se conoce que MATa2 es una feromona sexual secretada por células MATa. Las células **a** transcriben los genes que producirán el factor **a**, además de un receptor de membrana que se conoce con el nombre de Ste2p. Dicho receptor es capaz de unirse al factor α y desencadenar una serie de señales intracelulares mediada por la proteína G. Las células **a** reprimen la expresión de los genes que formarán las

VIII. Discusión

proteínas necesarias para la síntesis del factor α y el receptor de membrana Ste3p. Mutantes de MATa2 indicaron que la célula sin esta feromona sexual tiende a arrestar el ciclo celular en la fase G1 inducida por el factor de alfa (Chan y Otte, 1982)

La localización de sitios de unión putativos a factores transcripcionales, principalmente relacionados con la regulación de estrés nutricional y ambiental, nos indica que muy probablemente el gen *ape3* y su producto codificante están involucrados con procesos biológicos en los cuales *U. maydis* se encuentra bajo condiciones de estrés. El análisis de la región reguladora sugirió abordar el estudio de la expresión del gen *ape3* bajo las siguientes condiciones:

- A) Diferentes fuentes de nitrógeno (prolina, peptona, infusión de maíz y sulfato de amonio)
- B) Diferentes fuentes de carbono (galactosa y glucosa)
- C) Durante estrés nutricional (Inanición de nitrógeno e inanición de carbono)
- D) Durante transición dimórfica.

Los resultados de la expresión del *ape3* cuando *U. maydis* se cultivó en medio YNB suplementado con diferentes fuentes de nitrógeno, indica que este gen se expresa en mayor proporción en presencia de infusión de maíz o peptona como únicas fuentes de nitrógeno (Fig. 20).

La peptona es un hidrolizado de gelatina que contiene distintos péptidos de diversa composición y tamaño, así como aminoácidos en proporciones no especificadas. La expresión del gen *ape3* se indujo en presencia de este sustrato; pudiéndose explicar porqué en la peptona se encuentran sustratos para los que la enzima codificada es específica, o tal vez la enzima sea necesaria para la maduración de otras proteínas que participan en la degradación de los compuestos de la peptona hasta generar una fuente de nitrógeno asimilable para la célula, la fuente de nitrógeno asimilable probablemente será destinada a la síntesis de proteínas y biomoléculas, a la generación de masa celular o para el mantenimiento de las pozas metabólicas.

El comportamiento de la expresión del gen *ape3* en infusión de maíz, es similar al reportado para otras proteasas: *ape1*, *apr1* y *dap1* (Miramón, 2007; Juárez 2007). Las proteasas de *U. maydis* se encuentran implicadas durante la

VIII. Discusión

proteólisis en condiciones de estrés nutricional, por lo que se esperaba que se aumentara la expresión de estos genes cuando la célula se cultivo en un medio con muy poco nitrógeno asimilable (Hernández -Montañez, 2007).

En medio YNB suplementado con galactosa, como única fuente de carbono, se observa que el gen *ape3* eleva su expresión. Al parecer la expresión de este gen es regulado por la fuente de nitrógeno y carbono disponible. Por otro lado se podría sugerir que el sitio de unión a factores de transcripción GAL4, encontrado mediante el análisis *in silico*, es funcional.

En la célula existen varios mecanismos de regulación que le permiten su sobrevivencia. A falta de nutrientes, la célula utiliza sus reservas de energía, conforme la energía disminuye, se expresan factores de transcripción que activan genes involucrados con la asimilación de nutrientes. Si recordamos el estudio de la región reguladora del gen *ape3* indica la presencia de NIT2, CSRE y STRE, estos factores de transcripción activan la expresión de genes relacionados con la asimilación de nitrógeno y carbono secundario cuando la fuente primaria no se encuentra disponible. Probablemente estos factores son funcionales en *U. maydis* y participan en la regulación transcripcional del gen *ape3*.

La expresión del gen *ape3* fue reprimida cuando *U. maydis* se cultivo durante inanición de carbono. Durante el estado de inanición de carbono, los genes involucrados en la división celular son reprimidos. Se tienen reportes de un posible represor transcripcional de aminopeptidasas llamado CodY, este represor transcripcional tiende a aumentar su expresión cuando las células se encuentran en inanición, reprimiendo la expresión de aminopeptidasas y por tanto evitando la división celular, de esta manera la célula utiliza toda su energía para su sobrevivencia en el estadio de inanición (Xiaoyi Hu y col., 2006).

Durante la inanición de nitrógeno el gen *ape3* aumenta su expresión, este comportamiento es similar a lo observado cuando la célula se cultivo en un medio con muy poco nitrógeno asimilable (infusión de maíz). Esto implica que la expresión del gen *ape3* es regulada positivamente cuando la célula se cultiva en completa inanición de nitrógeno o en un medio con muy poco nitrógeno asimilable.

Analizando la secuencia aminoacídica de la proteína codificada por el gen *ape3*, se encontró un motivo característico de las metalopeptidasas

VIII. Discusión

pertenecientes a la familia de las aminopeptidasas Y (M28), las cuales se caracterizan por ser dependientes de zinc. Además se encontraron un gran número de sitios potenciales de fosforilación, N-meristilación y N-glicosilación. Por otra parte se identificó un péptido señal dentro de los primeros 100 aminoácidos

En las levaduras las proteínas se mueven hacia el compartimiento vacuolar por la ruta de secreción clásica o por la ruta directa citoplasma vacuola Cvt. Las señales responsables del transporte de proteínas a vacuola, se encuentran en el dominio N-terminal (Klionsky y col., 1990; Nothwehr y col., 1993). La proteína posee una secuencia señal N-terminal rompible de 20 aminoácidos (péptido señal), que es necesaria para atravesar la ruta de secreción clásica. Mutaciones en la región adyacente entre los aminoácidos 21 y 31, hacen que la proteína se secrete en vez de dirigirse a la vacuola.

En el transporte a través de Golgi existen cambios conformacionales de las proteínas, la adquisición de una conformación madura puede depender de proteínas accesorias, cuya función sea reconocer formas proteicas y ayudarles a adquirir una conformación apropiada para poder ser transportadas al destino siguiente.

Probablemente la proteína codificada por el gen *ape3* atraviesa la ruta de secreción clásica, donde sufre algunas modificaciones postraduccionales y posteriormente es enviada hacia la vacuola.

Para propósitos de la expresión heteróloga del gen *ape3* de *U. maydis* en *P. pastoris* se plantearon dos estrategias:

- 1) Clonación del ORF completo del gen *ape3* (*ape3a*) en el vector, pPICZ α A.
- 2) Deleción del intrón por PCR (*ape3b*) y clonación en el vector pPICZA.

El vector pPICZ α A está recomendado para la expresión de proteínas recombinantes extracelulares pues presenta la señal de secreción del factor sexual alfa de *S. cerevisiae* de tal forma que las proteínas recombinantes son traducidas como preproteínas y maduras por la proteinasa KEX2 en el aparato de Golgi. Tener una proteína extracelular facilitaría la posterior purificación.

El vector pPICZA está indicado para la expresión de proteínas recombinantes citosólicas o que no sufren modificaciones postraduccionales, la proteína teórica codificada por el gen *ape3* presenta una probable maduración por

la proteína *prb1*, que se localiza en vacuola. La proteína recombinante expresada en el vector pPICZA probablemente se localizará en la vacuola de *P. pastoris*.

Las dos construcciones obtenidas pPICZ α A-ape3a y pPICZA-ape3b se utilizaron para la transformación de *P. pastoris*. Una vez que se confirmó que la integración del gen había sido en el lugar adecuado dentro del genoma de *P. pastoris* se realizó la inducción de las proteínas recombinantes y posteriormente se realizaron los ensayos enzimáticos y RT-PCR.

El análisis de expresión de las transformantes pPICZ α A-ape3a (C9) y pPICZA-ape3b (C2), indicó que mientras en la transformante pPICZ α A-ape3a (C9) los niveles de expresión del gen *ape3* se mantienen constantes, en la transformante pPICZA-ape3b (C2) aumentan a partir de las 48 horas (fig.18). También se puso de manifiesto que el intrón del gen *ape3* de *U. maydis* no es procesado en *P. pastoris*. Al parecer la remoción de intrones en *P. pastoris* es diferente al de *U. maydis*.

La determinación de la actividad APE3bi-rec en el extracto libre de células (sobrenadante de 12 000 x g) indicó que la proteína recombinante tiene preferencia por el sustrato prolina-pNa, seguido de arginina-pNA en segundo lugar. Con prolina-pNA se observa, partir de las 48 h un aumento de actividad de casi tres veces más con respecto a la detectada en la cepa silvestre X-33 de *P. pastoris* (Tabla 6). Sin embargo, será necesario purificar a la proteína recombinante para determinar sus características bioquímicas.

A pesar de que el RNA mensajero del gen *ape3b* aumenta en condiciones de inducción, la proteína recombinante APE3bi-rec al parecer no está sobreexpresada. Existen varios parámetros que pueden afectar la expresión de proteínas heterólogas bajo el control del PAOX1 en *P. pastoris*. Algunos de ellos son intrínsecos al sistema de expresión, por ejemplo: el fenotipo Mut de la cepa, el lugar de inserción del gen de interés dentro del genoma, el número de copias del gen foráneo, el tipo de expresión intra o extracelular, la naturaleza de la señal de secreción, etc.

Otros factores están más relacionados con la proteína en cuestión a expresar, por ejemplo: el contenido de GC/AT del gen a expresar o el grado de toxicidad de la proteína foránea para la célula hospedadora. Así como la estabilidad de su RNAm y las modificaciones post transcripcionales y/o

VIII. Discusión

traduccionales requeridas (Gellisen G., 2000). Tal vez por alguna de las razones mencionadas la proteína recombinante no se sobreexpresó, sin embargo ahora se pretende purificar la proteína recombinante, por afinidad a una columna de níquel y determinar si la proteína es madura.

Por otro lado, la construcción genética obtenida permitirá realizar experimentos de interrupción del gen *ape3* ya que el primer paso es precisamente la clonación del gen para su interrupción *in vitro*, seguido de una transformación y un proceso de recombinación homóloga.

El presente trabajo sienta un precedente para el estudio de las proteasas de *U. maydis*, utilizando la expresión heteróloga. En este sentido sólo se tiene un reporte de expresión heteróloga para la caracterización de proteasas, en el modelo de *A. fumigatus* (Reichard y col., 2006).

VIII. DISCUSIÓN.

VIII. Conclusiones

- El gen *ape3* de 1 649 pb, codifica para una aminopeptidasa intracelular, que corresponde a una proteína predicha de 506 aminoácidos.
- La expresión del gen *ape3* está regulada por la fuente de nitrógeno disponible y condiciones de estrés (inanición).
- El intrón putativo del gen *ape3* no es removido en transformantes de *P. pastoris* y su eliminación es necesaria para que la proteína presente actividad.
- La proteasa recombinante *ape3bi-rec*, del extracto libre de células de *P. pastoris*, actuó sobre el sustrato Pro-pNA principalmente. Esta enzima no está sobreexpresada, sin embargo la cepa transformante presentó niveles casi tres veces mayores que la cepa nativa.

X. PERSPECTIVAS.

IX. Perspectivas

Con base en los resultados obtenidos en este trabajo, se sugiere llevar a cabo las siguientes actividades:

- Purificar la proteína recombinante y determinar el peso molecular de la proteína, el punto isoelectrico (pI), los parámetros cinéticos como K_m y V_{max} y confirmar la especificidad por el sustrato pro-pNA o arg-pNA, determinar inhibidores, T y pH óptimo.
- Obtener anticuerpos marcados contra la proteína recombinante, para conocer la localización de ésta y/o llevar a cabo experimentos de fusión con el gen de la GFP (proteína verde fluorescente).
- Obtener mutantes nulas de las actividad *ape3*, caracterizarlas y establecer el papel que desempeña esta proteasa en el ciclo de *U. maydis*.

XI. BIBLIOGRAFÍA.

IX. Bibliografía

- Agrios G.N. 1999.** Fitopatología. Editorial Limusa, México. 3ª Edición.
- Anraku Y., Umemoto N., Hirata R., Wada Y. 1989.** Structure and function of the yeast vacuolar membrane proton ATPase. *J. Bioenerg. Biomembr.* 21:589-603.
- Arbesú M.J., Gascon S., Suarez-Rendueles P. 1991.** Isolation and characterization of *Schizosaccharomyces pombe* mutants lacking aminopeptidase activity. *Yeast.* 7:525-531.
- Arbesú M.J., Valle E., Suarez-Rendueles P. 1993.** Purification and characterization of aminopeptidase yspl from *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast.* 9:637-644.
- Aréchiga-Carvajal E.T., Ruíz-Herrera J. 2005.** The RIM101/pacC homologue from the basidiomycete *Ustilago maydis* is functional in multiple pH-sensitive phenomena. *Eukaryot. Cell.* 4:999-1008.
- Ausbel F.M., Brent R., Kingston R.E., Moore D.D., Seidman J.G., Smith J.A., Struhl K. 1989.** Current protocols in molecular biology. Greene publishing associates and Wiley-Interscience.
- Banuett F. 1992.** *Ustilago maydis*, the delightful blight. *Trends. Genet.* 8:174-180.
- Banuett F. 1995.** Genetics of *Ustilago maydis* a fungal pathogen that induces tumors in maize. *Annu Rev Genet* 29:179-208.
- 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.
- Banuett F., 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.
- Basten D.E., Visser J., Schaap P.J. 2001** Lysine aminopeptidase of *Aspergillus niger*. *Microbiology.* 147:2045-2050.
- Birnboim H.C., Dolly J. 1979.** A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid. *DNA. Nucleic. Acids. Res.* 7:1513-1523.
- Bölker M. 2001.** *Ustilago maydis*, a valuable model system for the study of fungal dimorphism and virulence. *Microbiology.* 147:1395-1401.
- Bölker M. Genin S. Lehmler C. Kahmann R. 1995.** Genetic regulation of mating and dimorphism in *Ustilago maydis*. *Can. J. Bot.* 73:320-325.
- Bolumar T., Sanz Y., Aristoy M.C., Toldrá F. 2002.** Purification and characterization of a prolyl aminopeptidase from *Debaryomyces hansenii*. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:227-232.
- 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.
- Cadel S., Pierotti A.R., Foulon T., Creminon C., Barre N., Segretain D., Cohen P. 1995.** Aminopeptidase-B in the rat testes: isolation, functional properties and cellular localization in the seminiferous tubules. *Mol. Cell. Endocrinol.* 110:149-160.
- Caprioglio D.R., Padilla C., Werner-Washburne M. 1993.** Isolation and characterization of AAP1; a gene encoding an alaline/arginine aminopeptidase in yeast. *J. Biol. Chem.* 268:14310-14315.
- Coux O., Tanaka K., Goldberg A.L. 1996.** Structure and functions of the 20S and 26S proteasomes. *Annu. Rev. Biochem.* 65: 801-847

IX. Bibliografía

Chan R. K., Otte C. A. 1982. Physiological Characterization of *Saccharomyces cerevisiae* mutants supersensitive to G1 arrest by a factor and α factor pheromones. *Mol. Cell. Biol.* 2:21-29.

Chao-Wen W., Klionsky D.J. 2003. The molecular mechanism of autophagy. *Mol. Med.*9:65-76.

Christensen J.J. 1963. Corn smut caused by *Ustilago maydis*. *Am. Phytopathol. Soc. Monogr.* No.2.

El Moudni B., Rodier M.H., Babin P., Jacquemin J.L. 1997. Metallopeptidase in *Candida albicans*: immunolocalization in yeast. *J. Mycol. Med.* 7:5-9.

Frey J., Röhm K.H. 1978. Subcellular localization and levels of aminopeptidases and dipeptidase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta.* 527:31-41.

Fu Y.H., Marzluf G.A. 1990. nit-2, the major nitrogen regulatory gene of *Neurospora crassa*, encodes a protein with a putative zinc finger DNA-binding domain. *Mol. Cell. Biol.*10:1056-1065.

Gellisen G. 2000. Heterologous protein production in methylotrophic yeast. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 54:741-750.

Hagai A., Darsow T., Scott D. 1999. Cytoplasm to vacuole trafficking of aminopeptidase I requires a t-SNARE-Sec1p complex composed of Tlg2p and Vps45p. *EMBO J.* 18:6005-6016.

Hernández-Montañez Z.F. 2007. Expresión del gen *dap1* (que codifica para una dipeptidil aminopeptidasa) del hongo fitopatógeno *Ustilago maydis*. Tesis de Maestría. Instituto Politécnico Nacional, México, DF.

Hersh L.B., Aboukhair N., Watson S. 1987. Immunohistochemical localization of aminopeptidase M in rat brain and periphery: relationship of enzyme localization and ankephalin metabolism. *Peptides* 8:523-532.

Hilt W., Wolf D.H. 1992. Stress-induced proteolysis in yeast. *Mol. Microbiol.* 6:2437-2442.

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

Holzer H., Heinrich P.C. 1988. Control of proteolysis. *Annu. Rev. Biochem.* 49: 63-91.

Jones E.W. 1991. Three proteolytic systems in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol Chem.* 266:7963-7966.

Juarez-Montiel M. 2007. Expresión heteróloga del gen *dap1um*, codificante de la dipeptidil aminopeptidasa de *U. maydis*. Tesis de Maestría. Instituto Politécnico Nacional, México, DF.

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

Kämper J., Kahmann R., Bolker M., Ma L.J., Brefort T., Saville B.J., Banuett F., Kronstad J.W., Gold S.E., Muller O., Perlin M.H., Wosten H.A., Vries R., Ruiz-Herrera J., Reynaga-Pena C.G., Snetselaar K., McCann M., Perez-Martin J., Feldbrugge M., Basse C.W., Steinberg G., Ibeas J.I., Holloman W., Guzman P., Farman M., Stajich J.E., Sentandreu R., Gonzalez-Prieto J.M., Kennell J.C., Molina L., Schirawski J., Mendoza-Mendoza A., Greilinger D., Munch K., Rossel N., Scherer M., Vranes M., Ladendorf O., Vincon V., Fuchs U., Sandrock B., Meng S., Ho E.C., Cahill M.J., Boyce K.J., Klose J., Klosterman S.J., Deelstra H.J., Ortiz-Castellanos L., Li W., Sanchez-Alonso P., Schreier P.H., Hauser-Hahn I., Vaupel M., Koopmann E., Friedrich G., Voss H., Schluter T., Margolis J., Platt D., Swimmer C., Gnrke A., Chen F., Vysotskaia V., Mannhaupt G., Guldener U., Munsterkotter M., Haase D., Oesterheld M.,

IX. Bibliografía

Mewes H.W., Mauceli E.W., Caprio D., Wade C.M., Butler J., Young S., Jaffe D.B., Calvo S., Nusbaum C., Galagan J., Birren B.W. 2006. Insights from the genome of the biotrophic fungal plant pathogen *Ustilago maydis*. *Nature*. 444: 97-101.

Karl T., Hoffmann T., Pabst R., Horsten S. 2003. Extreme reduction of dipeptidyl peptidase IV activity in F344 rat sub strains is associated with various behavioral differences. *Physiol. Behav.* 80:123-134.

Klionsky D.J., Herman P.K., Emr S.D. 1990. The fungal vacuole: Composition, function and biogenesis. *Microbiol. Rev.* 54:266-292.

Kronstad J.W., Leong S.A. 1989. Isolation of the two alleles of the b locus of *Ustilago maydis*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86:978-982.

Lee A.H., Iwakoshi N.N., Glimcher L.H. 2003. XBP-1 regulates a subset of endoplasmic reticulum resident chaperone genes in the unfolded protein response. *Mol. Cell. Biol.* 23:7448–7459.

Mai B., Breeden L. 1997. Xbp1, a stress-induced transcriptional repressor of the *Saccharomyces cerevisiae* Swi/Mbp1 family. *Mol. Cell. Biol.* 17:6491-6501.

Mercado-Flores Y., Hernández-Rodríguez C., Ruíz-Herrera J., Villa-Tanaca L. 2003. 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.

Metz G., Rohm K.H. 1976. Yeast aminopeptidase I. Chemical composition and catalytic properties. *Biochim. Biophys. Acta.* 429:933-949.

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

Monod M., Hube B., Hess D., Sanglard D. 1998. Differential regulation of *SAP8* and *SAP9*, which encode two new members of the secreted aspartic proteinases family in *Candida albicans*. *Microbiology* 144:2731-2737.

Nothwehr F.S., Roberts C.J., Stevens T.H. 1993. Membrane protein retention in the yeast Golgi Apparatus: Dipeptidyl aminopeptidase A is retained by a cytoplasmic signal containing aromatic residues. *J. Cell Biol.* 121:1197-1209.

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

Parra-Ortega B. 2003. Purificación y caracterización de la aminopeptidase de *Schizosaccharomyces pombe*. Tesis de Maestría. Instituto Politécnico Nacional, México, DF.

Rao M., Tanksale A.M., Ghatge M.S., Deshpande V.V. 1998. Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62:597-635.

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

Reichard U., Léchenne B., Asif A.R., Streit F., Grouzmann E., Jousson O., Monod M. 2006. Sedolisins, a new class of secreted proteases from *Aspergillus fumigatus* with endoprotease or tripeptidyl-peptidase activity at acid pH. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 1739-1748.

IX. Bibliografía

- Rivett J.A. 1985.** Preferential degradation of the oxidatively modified form of glutamine synthetase by intracellular mammalian proteases. *J. Biol. Chem.* 260:300–305.
- Roberts C.J., Pholig J.H., Rothman J.H., Stevens T.H. 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., Martínez-Espinoza A.D. 1998.** The fungus *Ustilago maydis*, from the Aztec cuisine to the research laboratory. *Internat. Microbiol.* 1:149-158.
- Rungtawan S., Jackowski S., Mori K., Brewer J.W. 2004.** XBP1: a link between the unfolded protein response, lipid biosynthesis, and biogenesis of the endoplasmic reticulum *The J. Cell. Biol.* 167:35–41
- Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. 1989.** A molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor laboratory press. 2a Edición. Nueva York, N. Y.
- Scholer A., Schuller H.J. 1994.** A Carbon Source-Responsive Promoter Element Necessary for Activation of the Isocitrate Lyase Gene ICL1 Is Common to Genes of the Gluconeogenic Pathway in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. and Cell. Biol.* 14:3613-3622
- Schuller C., Brewster J.L., Alexander M.R., Gustin M.C., Ruiz H. 1994.** The HOG pathway controls osmotic regulation of transcription via the stress response element (STRE) of the *Saccharomyces cerevisiae* CTT1 gene. *EMBO J.* 18:4382-4389.
- Sherman F., Fink G.R., Hicks B. 1986.** Methods in yeast genetics. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York, United States.
- Spelling T., Bölker M., Lottspeich F., Frank R.W., Kahmann R. 1994.** Pheromones trigger filamentous growth in *Ustilago maydis*. *EMBO J.* 13:1620-1627.
- Suárez-Rendueles P., Wolf D.H. 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.
- Suárez-Rendueles P., Villa L., Arbesu M.J., Escudero B. 1991.** The proteolytic system of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *FEMS Microbiol. Lett.* 81:215-220.
- Taylor A. 1993.** Aminopeptidases: structure and functions. *FASEB J.* 7:290-298.
- Urban M., Kahmann R., Bölker M. 1996.** Identification of the pheromone response element in *Ustilago maydis*. *Mol. Gen. Genet.* 25:31-37.
- Vartivarian S.E. 1992.** Virulence properties and nonimmune pathogenic mechanism. *Clin. Infect. Dis.* 14:30-36.
- Vierstra R.D. 1996.** Proteolysis in plants: mechanisms and functions. *Plant. Mol. Biol.* 32:275–302.
- Voges D., Zwickl P., Baumeister W. 1999.** The 26S proteasome: a molecular machine designed for controlled proteolysis. *Annu. Rev. Biochem.* 68:1015–1068.
- White C., Agabian N. 1995.** *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases: isoenzyme pattern is determined by environmental factors. *J. Bacteriol.* 177:5215-5221.
- Xiaoyi H., Adlagatta A., Lu J., Matthews B.W., Liu J.O. 2006.** Elucidation of the function of type 1 human methionine aminopeptidase during cell cycle progression. *Proct. Natl. Acad. Sci. USA* .103:18148–18153.

IX. Bibliografía

Yasuhara T., Nakai T., Ohashi A. 1994. Aminopeptidase Y, a new aminopeptidase from *Saccharomyces cerevisiae*. Purification, properties, localization and processing by protease B. J. Biol. Chem. 269:1344-13650.

Yoshida H., Matsui T., Hosokawa N., Kaufman R.J., Nagata K., Mori K. 2003. A time-dependent phase shift in the mammalian unfolded protein response. Dev. Cell. 4:265–271.

Yuan L., Cole G.T. 1989. Characterization of proteinase inhibitors isolated from fungal pathogen *Coccidioides immitis*. J. Biochem. 257:729-736.

XII. ANEXOS.

ATG CTC AGT CTG AGG CTG GTT CAG CTC ACC ACA CTG GCA CTT GTG CTG CTC
ape3Dc ape3Rdele
 AGC GGT GCT CAG CAG GCC TCG GCT CGG CCG CCA AAG CTT CGA CCT GTT GAT

 TCG GTA TGT TTT TGT TAT AGC GTC GAC ATG ATG TAT GCC GCA TCG TGC GTA
 CGT CTC ACC TCA GAT GCA AAC TAG ACG CTG ACA TCC ACA TTC ACC CGC TTG
ape3Ddele
 GAT TCG TGT CTG CGC CTC GAT AAC ACG CTC AG AAA CGC CTT CGA AAC GAC ATC
 AAG CGT AAA GAT CTC CTT GAT GGT GCG CGC AAG CTC CAA TCG CTC GCA TAC
 GCT ACG CAA GAA CGC AAC CGA GTG TTC GCC TCT CCC GGC CAC AAG GCC ACC
 GTT TCC TAC ATC CAG GAC GAG CTC CGC AAA GCC GGA CGC GGC GAT TAC TTT
 GAC GTC TAC CTG CAG CCG TTC ACG GCT ACC TAC GCT CAA CAC TCT TCC GAG
 CTC GAA ATC GAC AAC CAA GCT ACT GAA TCC GCC ACT TTC ACC TAC TCT CCC
 AAC GGC GAG TTC AAC AAC GTC CAA GTG GTC AAT GTC GCC AAT ~~CTC GCC TCT~~
ape3Rintron
 GAG CAG ACC GAC TTT GGT GCT GAT GTA CAA GGC AAA ATC GCG CTC ATC AAG
 CGC GGT ACC TGT CCC TTT TCC ACA AAG GTG GCT CGA GCC GGT ACG GCC AAA
 GCG GCA GCG GTG CTG ATC TAC AAC AAT GCG CCC GGT GAT GTG GCT GGT ACG
 TTG GGC AGC AAG GGT CCC GTA GCC GAG GGC TCA TTT GTT CCT GTG GCT GGT
 GTA ACG CAA CAA GTG GGA GAC GCC CTG GTA GCG CGT TTG GCG GCA GAT GAC
 AAG GTG TTT GCC AAG CTG AAA TTG GAC GGA GTC GTT CAG GAC CGC ACG ACG
 CAC AAT GTG ATC GCC GAG ACC AAA GGT GGT AGT AAA GAG CAA GTC ATC ATG
 GTG GGC GCA CAC TCG GAC AGT GTT ATC GCA GGC CCC GGT ATC AAC GAT AAC
 GGT TCC GGC TCG ATC GCT CTG CTC ACC ATT GCC AAG CAA CTC TCG AAA TAC



Anexo 1. Secuencia de nucleótidos del gen *ape3Um*. Se indican el codón de inicio (■), codón de terminación (■) e intrón (■). Las flechas indican las secuencias utilizadas en el diseño de oligonucleótidos y la dirección de éstos.

Nombre: ape3Dc
Oligo: 5'-CGCGCGAATTCATGCTCAGTCTGAGGCTGGTTCAG-3'
Primer1: 35 bases
Composition 6 A; 9 C; 11 G; 9 T; 0 OTHER
Percentage: 17% A; 25% C; 31% G; 25% T; 0%OTHER
MW=10.83 kDa
Hybridization: D:D
Salt: 50 mM
Formamide: 0%
Mismatch: 0 bp
Thermo Tm = 82.7 °C %GC Tm = 69.0 °C GC+AT Tm = 110.0°C

Nombre: ape3Rc
Oligo: 5'-GTAGCGAATTCGATGAGCCCAGGTCGCCAC-3'
Primer1: 30 bases
Composition 7 A; 9 C; 9 G; 5 T; 0 OTHER
Percentage: 23% A; 30% C; 30% G; 16% T; 0%OTHER
MW=9.27 kDa
Hybridization: D:D
Salt: 50 mM
Formamide: 0%
Mismatch: 0 bp
Thermo Tm = 78.6 °C %GC Tm = 67.8 °C GC+AT Tm = 96.0 °C

Nombre: ape3Ddele
Oligo: 5'-CCAAAGCTTCGACCTGTTGATTCGAAACGCCTTCGAAACGACATCAAGC-3'
Primer1: 49 bases
Composition 15 A; 15 C; 9 G; 10 T; 0 OTHER
Percentage: 30% A; 30% C; 18% G; 20% T; 0%OTHER
MW=15.03 kDa
Hybridization: D:D
Salt: 50 mM
Formamide: 0%
Mismatch: 0 bp
Thermo Tm = 86.2 °C %GC Tm = 69.8 °C GC+AT Tm = 146.0°C

Nombre: ape3Rdele
Oligo: 5'-GCTTGATGTCGTTTCGAAGGCGTTTCGAATCAACAGGTCGAAGCTTTGG-3'
Primer1: 49 bases
Composition 10 A; 9 C; 15 G; 15 T; 0 OTHER
Percentage: 20% A; 18% C; 30% G; 30% T; 0%OTHER
MW=15.23 kDa
Hybridization: D:D
Salt: 50 mM
Formamide: 0%
Mismatch: 0 bp
Thermo Tm = 86.2 °C %GC Tm = 69.8 °C GC+AT Tm = 146.0°C

Nombre: ape3D
Oligo: 5'-TCAACTTTGACATGATCGCTTC-3'
Primer1: 22 bases
Composition 5 A; 6 C; 3 G; 8 T; 0 OTHER
Percentage: 22% A; 27% C; 13% G; 36% T; 0%OTHER
MW=6.72 kDa
Hybridization: D:D
Salt: 50 mM
Formamide: 0%
Mismatch: 0 bp
Thermo Tm = 60.3 °C %GC Tm = 53.9 °C GC+AT Tm = 62.0 °C

Nombre: ape3R
Oligo: 5'-ATGCGTGTTTTGACCGAATT-3'
Primer1: 20 bases
Composition 4 A; 3 C; 5 G; 8 T; 0 OTHER
Percentage: 20% A; 15% C; 25% G; 40% T; 0%OTHER
MW=6.20 kDa
Hybridization: D:D
Salt: 50 mM
Formamide: 0%
Mismatch: 0 bp
Thermo Tm = 60.4 °C %GC Tm = 51.3 °C GC+AT Tm = 56.0 °C

Nombre: ape3Rintron
Oligo: 5'-AAGTCGGTCTGCTCACAGCCC-3'
Primer1: 21 bases
Composition 4 A; 8 C; 5 G; 4 T; 0 OTHER
Percentage: 19% A; 38% C; 23% G; 19% T; 0%OTHER
MW=6.42 kDa
Hybridization: D:D
Salt: 50 mM
Formamide: 0%
Mismatch: 0 bp
Thermo Tm = 66.3 °C %GC Tm = 61.5 °C GC+AT Tm = 68.0 °C

Anexo 2. Caracterización de los oligonucleotidos utilizados en este trabajo, segun el programa DNAMAN.