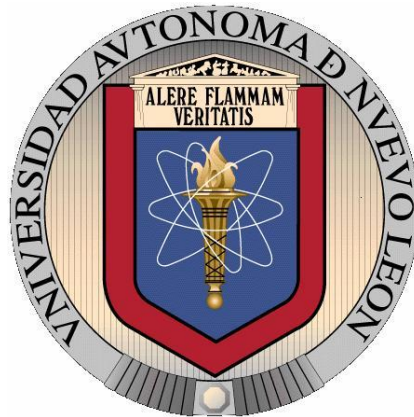


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



Análisis de expresión del gen homólogo GPI1 de *Saccharomyces cerevisiae* en *Ustilago maydis*

Por:

Diego Josimar Hernández Silva

Como requisito para obtener el grado de
MAESTRO EN CIENCIAS CON ACENTUACIÓN EN MICROBIOLOGÍA

Enero, 2014

Dedicatoria

Con todo el cariño dedico este trabajo a mi familia.

Julio Hernández y Elizabeth Silva, mis padres. El ejemplo de amor filial, cariño y apoyo los conozco gracias a ustedes. Sin ustedes este proyecto de vida no pudiera haber sido realidad.

A mis hermanos Julio, Carlos y Leslie, por cuidarme y respetarme siempre.

A Jacob y Lucila, por su sentido de pertenencia en esta familia y a Karla, Owen y Regina por hacernos esta vida más Feliz.

Agradecimientos

A mis padres por su apoyo y ejemplo, cada día están presentes en mi mente y corazón, toda la vida no me alcanzará para pagarles todo lo que hacen por mí.

Julio, Carlos y Leslie ustedes siempre serán un ejemplo muy importante para mí, gracias por siempre creer en mí.

Agradezco a la Universidad Autónoma de Nuevo León por permitir el uso de sus instalaciones y darme la oportunidad de crecer personalmente y de manera profesional.

Al consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por dar oportunidad de superación y crecimiento a miles de becarios en beneficio de nuestro país.

A la Dra. Elva Aréchiga Carvajal porque a pesar de no conocerme me abrió las puertas de su espacio para compartir su conocimiento conmigo.

A todos mis compañeros de la Unidad de Manipulación Genética y del Laboratorio de Micología y Fitopatología, Yolanda Canónico, Eduardo Franco, Héctor Calderón, Liliana Montelongo, Rosa Isela, Emmanuel Zaragoza, Adriana Martha, por ayudarme, enseñarme y compartir parte de su tiempo y vida conmigo.

Yadira Pérez, Edna Uribe y Pedro Anwar gracias por hacerme sentir en casa, estoy en deuda con ustedes.

Quiero agradecer enormemente a Selene Jacobo, que sin tener motivos siempre me cuida y procura mi bienestar, de todo corazón mil gracias por acompañarme en esta aventura.

Nora Naranjos, Omar Tovar, Alejandro Ledesma, Eurídice Muñiz, Carmen Cantú, Madory Monsiváis, Rolando Garza, Marcela Martínez, por siempre alentarme a superar los obstáculos, sin ustedes esto no hubiera sido posible.

A todos ustedes infinitamente ¡GRACIAS!

Contenido

Dedicatoria	ii
Agradecimientos	iii
Lista de tablas.....	vi
Lista de Figuras	vii
Nomenclatura	ix
Resumen	xi
Abstract	xii
Introducción	1
Definición del problema y justificación.....	3
Antecedentes	4
Infección y ciclo de vida de <i>Ustilago maydis</i>	4
La pared celular de los hongos	5
Estructura de las anclas de GPI	6
Biosíntesis de las anclas de GPI	10
Función de las anclas de GPI	11
Fenotipos de cepas mutantes en genes involucrados en la síntesis de GPI en hongos.	12
Hipótesis.....	16
Objetivos	17
OBJETIVO GENERAL	17
OBJETIVOS PARTICULARES	17
Material y métodos.....	18
Soluciones, reactivos, procedimientos y protocolos	20
Cepas de microorganismos	20
Medios de cultivo.....	20
Soluciones y reactivos	21
Extracción de DNA genómico.....	24
Extracción de DNA plásmidico (miniprep) por medio del método de lisis alcalina	25
Extracción de RNA.....	26
Electroforesis de RNA a través de geles de agarosa con formaldehido	28
Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	28

Síntesis de cDNA por medio de reacción de retro-transcripción (RT-PCR).....	30
Preparación de células calcio competentes	31
Preparación de protoplastos de <i>U. maydis</i>	32
Transformación bacteriana	34
Transformación de <i>Ustilago maydis</i>	34
Clonación con topoisomerasa I, por medio de la tecnología TOPO® TA Cloning®	35
Clonación por medio de recombinación usando la tecnología Gateway	36
Resultados	38
Análisis bioinformático	38
Validación de oligonucleótidos	40
Influencia de la fuente de carbono y pH en la morfología celular	44
Análisis de expresión.....	45
Construcción de cassette de interrupción del gen GPI	48
Discusión.....	53
Conclusiones	56
Perspectivas.....	57
Bibliografía	58

Lista de tablas

Tabla	Página
Tabla 1. Ejemplos de proteínas ancladas a GPI.....	9
Tabla 2. Ejemplo de mix de reacción de PCR.....	29
Tabla 3. Ejemplo de un programa estándar para la amplificación de DNA.....	29
Tabla 4. Mezcla de reacción para una reacción de RT-PCR.....	30
Tabla 5. Ejemplo de programa para reacción de RT-PCR de un paso.....	31
Tabla 6. Mix de reacción para clonación utilizando TOPO® TA Cloning® Kit.....	36
Tabla 7. Mezcla de reacción para recombinación Utilizando BP Clonase™ IIenzyme mix.....	37
Tabla 8. Oligonucleótidos para la amplificación de los genes GPII.....	39
Tabla 9. Oligonucleótidos utilizados para la reacción de RT-PCR para el análisis de restricción del gen GPII en <i>U. maydis</i>	46
Tabla 10. Resultados del análisis estadístico de la expresión del gen GPII.....	48
Tabla 11. Oligonucleótidos para la amplificación de fragmentos de mil pares de base que flanquean el gen GPII de <i>U. maydis</i>	48

Lista de Figuras

Figura	Página
Figura 1. Esquema representativo del ciclo de vida de <i>Ustilago maydis</i>	5
Figura 2. Estructura general de las anclas de GPI.....	8
Figura 3. Esquema general de la biosíntesis de GPI en el retículo endoplasmático de levaduras y mamíferos.	11
Figura 4. Efectos morfológicos de la mutación de <i>gpi1</i> en células vegetativas de <i>S. cerevisiae</i>	13
Figura 5. Micrografía de transmisión de electrones de célula silvestres y células mutantes <i>cwh6</i> de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	13
Figura 6. Micrografía electrónica de <i>N. crassa</i> mostrando morfología inusual de “célula dentro de célula”.....	14
Figura 7. Crecimiento filamentosos de mutantes <i>afpig-a</i> de <i>A. fumigatus</i>	15
Figura 8. Resultados de los alineamientos realizados con la secuencia de aminoácidos del gen <i>um00213</i> y las secuencias homologas de GPII en diversas especies de hongos incluyendo <i>S. cerevisiae</i>	39
Figura 9. Mapa de amplificación para los oligonucleótidos diseñados para el análisis del gen GPII.....	39
Figura 10. Gel de electroforesis mostrando bandas de alto peso molecular correspondientes a la extracción de DNA genómico de <i>U. maydis</i>	40
Figura 11. Amplificación por medio de PCR del gen GPII de <i>U. maydis</i>	41
Figura 12. Análisis de restricción con <i>EcoRI</i> de la clonación del gen GPII.....	42
Figura 13. Mapa del gen GPI y de los oligonucleótidos utilizados para su secuenciación.....	42

Figura 14. La imagen muestra el alineamiento y ensamblaje de los fragmentos obtenidos de la secuenciación del gen GPI1.....	43
Figura 15. Influencia de la fuente de carbono en el crecimiento de <i>U. maydis</i>	44
Figura 16. Electroforesis de RNA de <i>U. maydis</i> a través de gel de agarosa con formaldehido.....	45
Figura 17. Mapa del gen GPI1 de <i>Ustilago maydis</i>	46
Figura 18. Electroforesis que muestra los resultados de las reacciones de RT-PCR del gen GPI1 y del gen de actina de células de las cepas FB2 y BMA de <i>U. maydis</i>	47
Figura 19. Mapa de la amplificación de los fragmentos correspondientes al promotor y terminador del gen GPI1 necesarios para la estrategia de mutación.....	49
Figura 20. Esquematación del proceso de clonación por medio de recombinación utilizando la tecnología Gateway.....	49
Figura 21. Mapa genético del plásmido pDONR después de haber sido añadidos los fragmentos del promotor y el terminador del gen GPI1 de <i>U. maydis</i>	50
Figura 22. Análisis de restricción de la clonación para la producción de la mutante del gen GPI1 en <i>U. maydis</i>	51
Figura 23. Gel de electroforesis donde se muestra el corte del plásmido pDONR ya con los fragmentos recombinados del promotor y terminador del gen GPI1 de <i>U. maydis</i>	51
Figura 24. Proceso de transformación de <i>U. maydis</i> por medio recombinación homóloga.....	52

Nomenclatura

°C:	Grados Celsius
μl:	Microlitos
Abs:	Absorbancia
ADN:	Ácido Desoxirribonucleico
ARN:	Ácido Ribonucleico
attB:	Attachment binding site Bacteria (Sitio de recombinación en bacterias)
attP:	Attachment binding site Plasmid (Sitio de recombinación en plásmido)
BLAST:	Basic Local Alignment Search Tool (Herramienta de Búsqueda de Alineaciones Locales Básicas)
cDNA	Ácido Desoxirribonucleico cadena complementaria
DEPC:	Dietilpicrocarbonato
DH5α	Cepa mutante de <i>E. coli</i> usada comúnmente para clonación
DMSO:	Dimetilsulfóxido
EDTA:	Ácido etilendiaminotetraacético
g:	Gramos
GPI:	Glicosilfosfatidilinositol
hr:	Horas
Kb:	Kilobases
L:	Litro
LB:	Luria-Bertani, medio de cultivo
lb:	Libras
M:	Concentración molar
MACH 1	Cepa mutante de <i>E. coli</i> usada comúnmente para clonación
MC:	Medio completo
mg:	Miligramos
min:	Minutos
ml:	Mililitros
mM:	Concentración milimolar
MOPS:	Ácido mofolinopropanesulfónico
N:	Concentración normal
NCBI:	National Center of Biotechnology Information (Centro Nacional de Información Biotecnológica)
ng	Nanogramos
P/V:	Porcentaje masa/volumen
pb:	Pares de bases
PCR:	Reacción en Cadena de la Polimerasa
rpm:	Revoluciones por minuto
RT-PCR:	Reacción en Cadena de la Polimerasa-Retrotranscriptasa
SDS:	Lauril Sulfato de Sodio
SOC	Medio enriquecido para bacterias calcio competentes
Tm°:	Temperatura de alineamiento

U Concentración de unidadesenzimáticas
V/V: Porcentaje volumen/volumen

Resumen

Ustilago maydis es un Basidiomiceto con características dimórficas causante de la enfermedad conocida como carbón del maíz, de fácil manejo para análisis genético clásico y molecular, además de ser de los pocos basidiomicetos con el genoma secuenciado en su totalidad. Una de las características distintivas de este y otros hongos es su compleja pared celular. Se sabe que *S. cerevisiae* ocupa una gran cantidad de su energía en la construcción de la pared celular la cual representa cerca del 10 al 25% en peso seco del total de la masa celular. El conocimiento al respecto se basa en estudios realizados en hongos de la clase de los ascomicetos. Dentro de la complejidad de la pared celular de los hongos se encuentran estructuras conservadas entre varios microorganismos formadas de glicosilfosfatidilinositol que funcionan de anclaje para proteínas periféricas y estructurales. Defectos en la síntesis de las anclas de Glicosilfosfatidilinositol provocan una marcada diferencia morfológica y fisiológica, que se ve reflejada en una morfología aberrante y susceptibilidad ante ciertos estímulos ambientales. El objetivo de este trabajo fue la clonación y secuenciación del gen homólogo GPI1 de *S. cerevisiae* en *U. maydis* el cual interviene en la síntesis del glicosilfosfatidilinositol, así como un análisis de expresión del mismo y la generación de herramientas moleculares para la mutagénesis de este basidiomiceto y la generación de células mutantes de *U. maydis*. Se logró identificar que la secuencia del gen GPI1 obtenida experimentalmente en este trabajo posee un 99% de identidad con las reportadas en las bases de datos del Centro Nacional de Información Biotecnología (NCBI), además de la existencia del efecto directo en la expresión del gen GPI1 por la disponibilidad de diversas fuentes de carbono y el pH del medio. Como perspectivas de este trabajo las mutantes generadas serán utilizadas para observar el comportamiento de la síntesis de glicosilfosfatidilinositol en hongos basidiomicetos.

Abstract

Ustilago maydis is a basidiomycete with dimorphic characteristics that causes the corn smut disease, with easy handling in classic and molecular genetics is one of the few basidiomycete fungus with its genome totally sequenced. One of the distinctive features of this and other fungus is their complex cell wall. It is known that *S. cerevisiae* spends a great amount of energy in the building of the cell wall which represents about 10 to 25% in dry weight of the totally cellular mass. The knowledge in this respect is based in studies carried out in fungus of the ascomycete class. Within the complexity of the fungal cell wall there are conserved structures among different organisms formed of glycosilphosphatidylinositol that works as an anchor for peripheral and structural proteins. A defect in the synthesis of the Glycosilphosphatidylinositol anchors drives a strong morphology and physiology difference that is exhibited as an aberrant morphology and susceptibility to certain environmental stimulus. The aim of this work was the cloning and sequencing of the homologue gen GPI1 of *S. cerevisiae* in *U. maydis* which is involved in the synthesis of glycosilphosphatidylinositol as well as the expression analysis of it, the generation of molecular strategies for the mutagenesis of this basidiomycete and the generation of mutant cells of *U. maydis*. We achieved identify that the sequence of gene GPI1 obtained experimentally in this work has a 99% of identity with the sequences reported in the databases of the National Center of Biotechnology Information, besides the existence of an direct effects in the gene expression of GPI1 related with the availability of a carbon source and the environmental pH. As perspectives of this study the mutants generated will be used to analyze the behavior of the synthesis of glycosilphosphatidylinositol in basidiomycete fungus.

Introducción

Los hongos se han clasificado en cinco clases principales en base a sus características morfológicas y fisiológicas, dentro de la clase de los basidiomicetos se encuentra *Ustilago maydis*, el cual es un hongo fitopatógeno que ataca al maíz causando una enfermedad económicamente importante y la cual genera grandes pérdidas de cultivos en todo el mundo (Herrera y Ulloa, 1990).

Algunos de los ustilaginales son conocidos como carbones debido a la formación de tumores de color oscuro similar al hollín en las plantas infectadas, son importantes patógenos biotrofos de plantas con flor. Existen más de 1000 especies conocidas de esta clase de hongos. En el caso del *Ustilago maydis* causante del carbón del maíz, forma agallas que reemplazan la semilla como resultado de la hipertrofia del tejido de la planta al contener dentro el micelio (Carlie *et al.*, 2001).

Actualmente se encuentra en bases de datos la secuencia completa del genoma de *Ustilago maydis*, el cual es de un tamaño de aproximadamente 20.5Mb, organizado en 23 cromosomas, conteniendo alrededor de 6 671 genes (Kämper *et al.*, 2006). Este hongo presenta una fase haploide con morfología tipo levadura, de fácil cultivo y manipulación genética. Debido a esto es un modelo valioso para el estudio de mecanismos fundamentales de procesos biológicos de gran importancia tales como apareamiento, morfogénesis, patogenicidad, transducción de señales, recombinación de DNA y otras áreas de la genómica, además de otros procesos bioquímicos (Martínez-Espinoza *et al.*, 2002, Bölker, 2001).

Una de las principales características de los hongos es la compleja estructura de la pared celular la cual contiene componentes que solo están presentes en este tipo de organismos. Se sabe que hongos como *Saccharomyces cerevisiae* gastan una gran cantidad de energía en la síntesis de este organelo el cual representa aproximadamente un tercio del peso seco de la célula (Klis *et al.*, 2009).

Embebido en la pared celular se encuentra el glicosilfosfatidilinositol el cual funciona como anclaje para una gran cantidad de proteínas con funciones diversas tanto estructurales como catalíticas (Orlean, 2012), estas estructuras se encuentran conservadas en una gran cantidad de organismos, sin embargo los conocimientos que se tienen de la topología, síntesis y función de estas moléculas en los organismos fúngicos esta limitada a los estudios que se han realizado en hongos de la clase de los ascomicetos (Hoessli, 1999, Coronado *et al.*, 2007)

Se han realizado estudios en diversas levaduras y hongos ascomicetos donde se involucra la mutación de algunos de los genes que intervienen en la síntesis del glicosilfosfatilinositol, a través de estas células mutantes se ha evidenciado la importancia de esta estructura para mantener la morfología y la correcta fisiología de la célula. Este trabajo se centra en el estudio de un gen involucrado en la síntesis de glicosilfosfatidilinositol en *Ustilago maydis* con la finalidad de contribuir al conocimiento de esta ruta de biosíntesis en los hongos basidiomicetos. Ya que hasta nuestro saber son los primeros esfuerzos por conocer dicho proceso en este hongo modelo.

Definición del problema y justificación

Ustilago maydis es un hongo fitopatógeno muy estudiado debido a las grandes pérdidas económicas que ocasiona en cultivos que llega a infectar. Gracias a su fácil manipulación biológica y genética es un modelo de estudio para las interacciones parasitarias que éste tiene con su hospedero. A través de los últimos años se han diseñado variedad de estudios experimentales para conocer a fondo los procesos biológicos que este lleva a cabo durante su ciclo de vida, tanto fuera como en asociación con su hospedero. Por otro lado, la secuenciación del genoma completo de *Ustilago maydis* acaparó la atención de la comunidad científica ya que con ello se brindaron herramientas para estudiar una gran variedad de procesos y fenómenos característicos de los hongos, así como de este género y especie en particular. Una de las particularidades de los hongos que más ha sido estudiada es su pared, que llega a representar en algunos el 10% de su peso o composición, es por ello que en el presente trabajo comprobamos la presencia del gen homólogo a GPI1 de la ruta de síntesis del Glicosilfosfatidilinositol en *Ustilago maydis* y caracterizamos la expresión del gen que lo codifica en diferentes condiciones de cultivo. Esto contribuirá con conocimiento básico del funcionamiento de esta ruta que puede ser extrapolado al resto de los basidiomicetos lo cual permitirá además generar mutantes y comprobar las inferencias generadas en el presente estudio.

Antecedentes

Infección y ciclo de vida de *Ustilago maydis*

Ustilago maydis dentro de ciclo de vida (Figura 1) posee dos fases, una saprofita en la cual crece como célula de tipo levadura denominada esporidio con una reproducción por gemación y una fase invasiva en la cual pasa de un estadio de tipo esporidio a desarrollarse como micelio. Cuando dos esporidios compatibles se unen (proceso conocido como mating que corresponde a la reproducción sexual del hongo) se forma una célula dicariótica con crecimiento en forma de micelio, la célula dicariótica resultante invade la planta por medio de estructuras de infección especializadas llamadas apresorios, durante la penetración la membrana plasmática se invagina y rodea la hifa invasora. No se conoce una respuesta de defensa aparente del hospedero y las células de las plantas permanecen vivas hasta etapas tardías de la infección (Kämper *et al.*, 2006., Ruiz-Herrera y León-Ramírez., 2012).

Los tumores característicos producidos por el hongo en la planta son debido a las alteraciones inducidas en el crecimiento de la misma, el hongo prolifera y se diferencia dentro del tejido tumoral. Una vez invadido el tejido, se producen células uninucleadas llamadas teliosporas, las cuales germinan y producen una estructura llamada promicelio, entran a meiosis y producen nuevamente cuatro células en fase haploide, siendo liberadas al ambiente nuevamente como células saprofitas para iniciar el ciclo una vez más (Carlie *et al.*, 2001, Ruiz Herrera y León Ramírez, 2012)

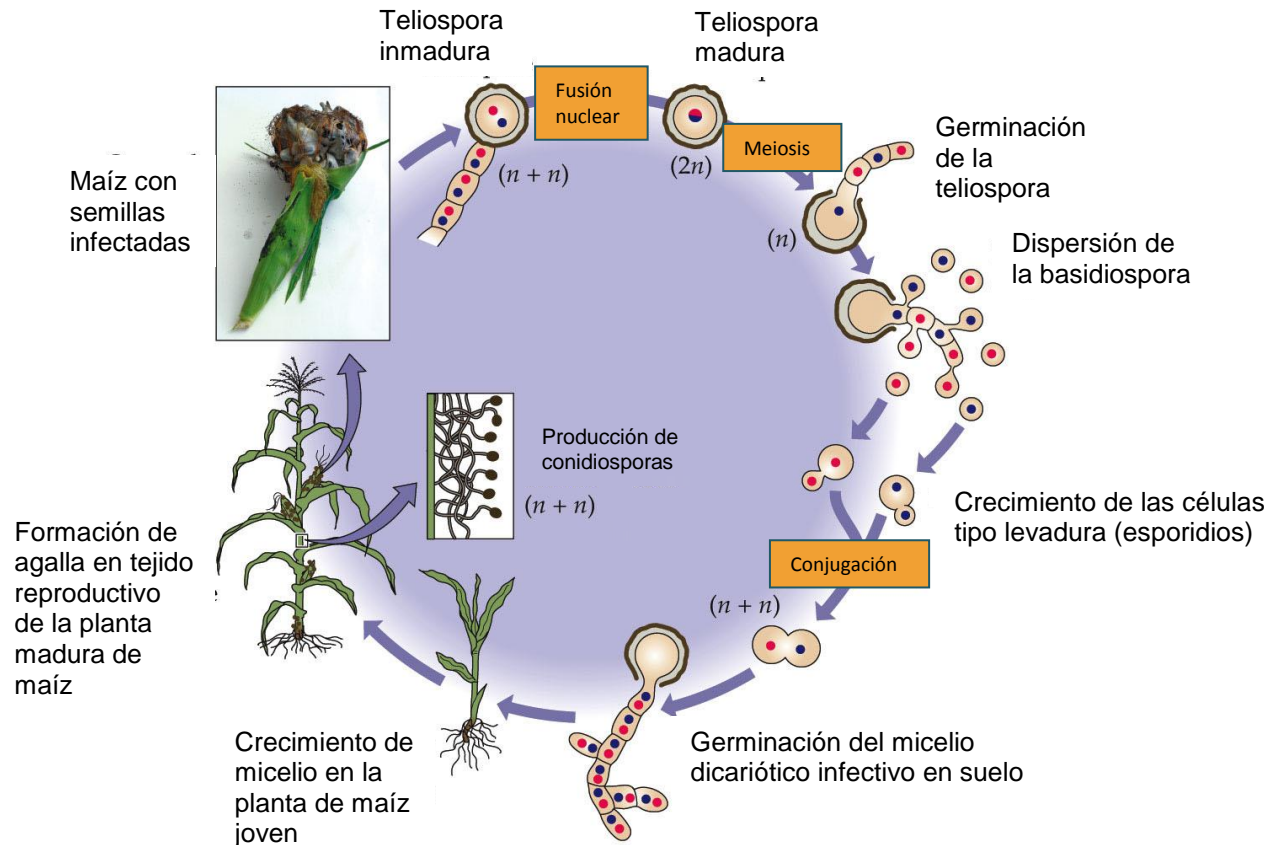


Figura 1. Esquema representativo del ciclo de vida de *Ustilago maydis*.

Tomado de http://department.monm.edu/biology/godde/courses/EukaryoticMicrobes_files/frame.htm

La pared celular de los hongos

Una de las características importantes que distingue a los hongos de otros organismos es su pared celular. Este organelo en los hongos es sustancialmente más grueso que en bacterias y normalmente representa del 10 al 30% de la biomasa, le da soporte osmótico y mecánico a la célula, además de ser el sitio de contacto para muchas interacciones con el ambiente y entre células vecinas (Moran, 2009). La pared celular es una barrera permeable que permite el paso de diferentes tipos de solutos la cual le confiere a la célula estabilidad osmótica, protección contra factores de estrés físicos, mantenimiento de la forma celular (indispensable en la formación de micelio o en la gemación) o como estructuras de sostén para proteínas que poseen una actividad específica, entre otras (Klis *et al.*, 2009).

Nuestro conocimiento acerca de la composición de las estructuras que forman parte de la pared celular está basado en estudios realizados en organismos modelos como las

levaduras *Saccharomyces cerevisiae* y *Candida albicans*, que aunque estas divergieron hace muchos cientos de miles de años pertenecen a la clase de los ascomicetos y poseen características similares en su pared. Además de estas dos levaduras se han realizado estudios en diferentes organismos fúngicos mostrando suficiente evidencia que remarca las diferencias en la estructura de la pared y de algunas moléculas como los glicanos, pero que muestra que el diseño básico de la pared celular esta ampliamente distribuido entre estos organismos. Estudios de bioinformática han demostrado que aunque entre los ascomicetos los componentes y los genes que codifican para proteínas de la pared celular difieren considerablemente, las enzimas involucradas y los procesos celulares están conservados considerablemente (Coronado *et al.*, 2007).

Las anclas de glicosilfosfatidilinositol (GPI), se encuentran asociadas a la pared celular y son estructuras de naturaleza fosfolípida que sirven como anclaje para proteínas de superficie celular, en levaduras estas estructuras son esenciales para la viabilidad de las células y críticas para el mantenimiento de su morfología normal. Las funciones de las proteínas ancladas a GPI son muy variadas, desde poseer actividad hidrolítica y otras actividades enzimáticas hasta servir como proteínas receptoras y adhesinas (Orlean., 2012). Estas estructuras se encuentran ampliamente distribuidas en los organismos eucariotas, desde mamíferos y otros vertebrados hasta grupos mayores de organismos eucariotas incluyendo protozoarios, levaduras, hongos mucilaginosos, nematodos, moluscos, insectos, algas y plantas terrestres mayores (Hoessli., 1999).

Algunos estudios de mutagénesis realizados en levaduras y otros hongos ascomicetos, evidenciaron que la falta de funcionalidad en los genes involucrados en la síntesis de Glicosilfosfatidilinositol causan morfologías aberrantes en estos organismos, así como cierta susceptibilidad a diferentes estímulos ambientales como lo son temperatura, pH, estrés nutricional, osmótico y de agentes que dañan la pared celular, entre otros (Leidich y Orlean., 1996, Vossen *et al.*, 1997, Bowman *et al.*, 2006, Gonzalez *et al.*, 2010).

Estructura de las anclas de GPI

Los primeros indicios que dieron lugar a la sospecha de la existencia de proteínas ancladas a fosfolípidos se mostraron en 1963 con la fosfolípasa C, la cual liberaba de manera selectiva la fosfatasa alcalina de células de mamíferos. A mediados de la década de los setentas, se postuló que las proteínas estaban asociadas con anclas de glicosilfosfatidilinositol basados en la habilidad que tenían las enzimas bacterianas fosfolipasa altamente purificadas para liberar ciertas proteínas como la fosfatasa alcalina y la 5'-nucleotidasa de la membrana plasmática de células de mamíferos. Para 1985 dichas aseveraciones ya habían sido confirmadas con estudios de composición y estructura de diversas enzimas como la acetilcolinesterasa de los eritrocitos bovinos y humanos, la glicoproteína VSG de *Trypanosoma brucei* y el antígeno Thy1 de rata. En

estos dos últimos, fueron resueltas por completo las primeras estructuras de anclas de GPI para el año de 1988 (Ferguson *et al.*, 2009).

Las anclas de GPI son estructuras que se localizan en la pared de las células las cuales están altamente conservadas entre diversos organismos, a la fecha se han identificado cientos de proteínas asociadas con anclas de GPI en diversos organismos eucariotas, en protozoarios y hongos, hasta algunas células de plantas terrestres superiores y mamíferos (Tabla 1). La organización estructural de las anclas de GPI se conforma de un residuo de tri-manosil unido a uno de glucosamina y este a su vez a un fosfatidilinositol (Ferguson *et al.*, 2009, Schmitz *et al.*, 1986, Yin *et al.*, 2008, Ferguson, 1999).

Los arreglos estructurales de las anclas de GPI son únicos entre las asociaciones proteínas-carbohidratos. La terminación reductora del residuo de glucosamina se encuentra enlazado por medio de un enlace α 1-6 glucosídico entre el D-mio-inositol y la cabeza de un grupo fosfatidilinositol. Un residuo de manosa distal esta unido a una proteína por medio de un puente entre la fosfoetanolamina y el grupo hidroxilo del carbono seis de la manosa y un grupo carboxilo alfa del carboxiterminal del aminoácido (Figura 2) (Hoessli, 1999, Ferguson, 1999, Ikazawa, 2002, Ferguson *et al.*, 2009).

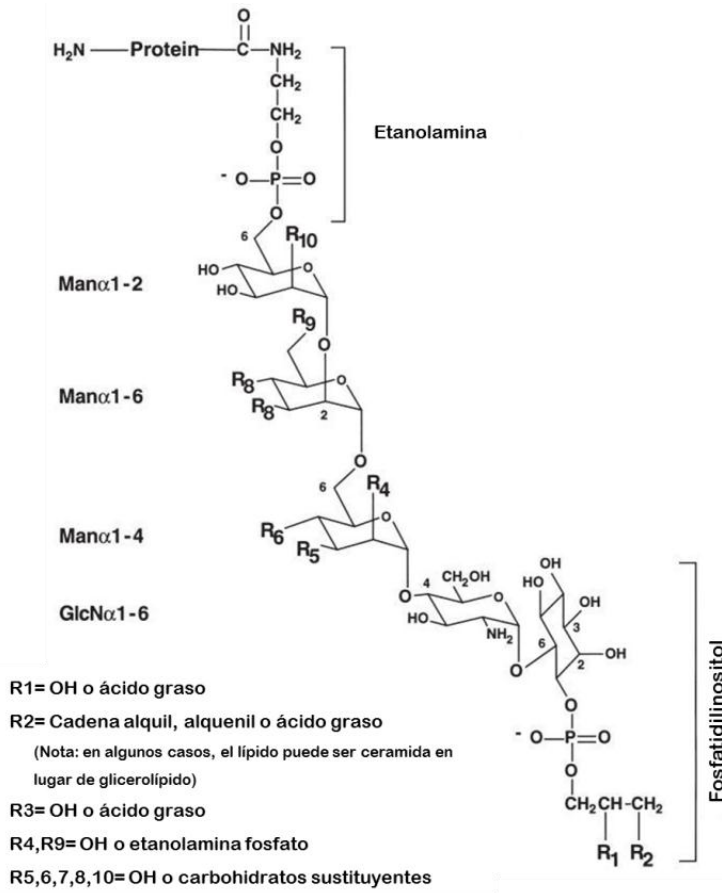


Figura 2. Estructura general de las anclas de GPI (Ferguson *et al.*, 2009)

Tabla 1.Ejemplos de proteínas ancladas a GPI (Ferguson *et al.*2009)

Proteínas asociadas a anclas de GPI	Función
Protozoarios	
<i>Trypanosoma brucei</i> Glicoproteína variante de superficie (VSG)	Cubierta protectora
<i>Leishmania major</i> proteasa de superficie de promastigote (PSP)	Degradación de unión a complemento
<i>Trypanosoma cruzi</i> mucinas ancladas a GPI	Invasión de célula hospedera
<i>Plasmodium falciparum</i> proteína de superficie 1 de merozoito (MSP-1)	Invasión de eritrocito
<i>Toxoplasma gondii</i> antígeno 1 de superficie (SAG-1)	Invasión de célula hospedera
<i>Entamoeba histolytica</i> GPI proteofosfoliglicanos	Factor de virulencia
Hongos, levaduras y mohos mucilaginosos	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> α -aglutinina	Molécula de adhesión
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> GAS1p	Biogénesis de pared celular
<i>Aspergillus fumigatus</i> GEL1p	Biogénesis de pared celular
<i>Candida albicans</i> HWP1	Molécula de adhesión
<i>Dictyostelium discoideum</i> antígeno prespora (PsA)	Molécula de adhesión
<i>Dictyostelium discoideum</i> sitio de contacto A (CsA)	Molécula de adhesión
Plantas	
proteínas arabinogalactan de <i>Pyrus</i> (AGP)	Biogénesis de la pared celular
<i>Arabidopsis thaliana</i> metalo y aspartil proteasas	Desarrollo del tubo de polen
<i>Arabidopsis thaliana</i> β 1-3 glucanasa	Biogénesis de la pared celular
Animales (no mamíferos)	
<i>Schistosoma mansoni</i> gp200	Diana de la droga prazicuantel
<i>Caenorhabditis elegans</i> respuesta anormal de olor (ODR-2)	Olfatorio
<i>Torpedo marmorata</i> acetilcolinesterasa (AChE)	hidrolasa
Mamíferos	
Eritrocito CD59 y factor de decaimiento de aceleración (DAF)	Regulación del complemento
Fosfatasa alcalina	Hidrolasa de superficie celular
5'-Nucleotidasa	Hidrolasa de superficie celular
Dipeptidasa renal	Hidrolasas de superficie celular
Trehalasa	Hidrolasa de superficie celular
Molécula de adhesión de célula neuronal 120 (NCAM-120)	Molécula de adhesión
Molécula de adhesión de célula neuronal TAG-1	Molécula de adhesión
CD58	Molécula de adhesión
Receptor Fc γ III	Receptor Fc
Subunidad α de receptor de factor neurotrófico ciliar (CNTFR)	Receptor neural
Subunidad α de receptor de factor neurotrófico derivado de células Glía (GDNFR)	Receptor neural
CD14	Receptor LPS
Proteína Prion (PrP)	Desconocido
Familia Glipican de proteoglicanos anclados a GPI	Componente de matriz extracelular

Biosíntesis de las anclas de GPI

La vía de biosíntesis de las anclas de GPI fue caracterizada llevando a cabo estudios de marcaje con radioisótopos y mutaciones principalmente en tripanosomas, el producto de más de 20 genes esta directamente involucrado en el ensamblaje de los precursores del glicosilfosfatidilinositol y su transferencia a las proteínas. La mayoría de proteínas productos de estos genes están localizadas en el retículo endoplasmático y ninguna de estas proteínas han sido estructuralmente caracterizadas a nivel atómico (Orlean, 2012). La biosíntesis de las anclas de GPI se lleva a cabo en tres procesos principales: 1) el pre-ensamble de los precursores de GPI en el retículo endoplasmático, 2) la unión del GPI a una proteína recién sintetizada en el lumen del retículo endoplasmático junto con el corte del extremo carboxiterminal y la adición del péptido señal y 3) el reacomodo del residuo lipídico y las modificaciones de la cadena lateral de carbohidratos las cuales se llevan a cabo en el retículo endoplasmático y en el aparato de Golgi (Ferguson *et al.*, 2009).

El proceso de biosíntesis se ha estudiado ampliamente en organismos como, *T. brucei*, *T. cruzi*, *P. falciparum*, *T. gondii*, *L. major*, *Paramecium*, *S. cerevisiae*, *C. neoformans* y células de mamíferos, con esto se hace gran énfasis en la abundancia de éstas estructuras entre los organismos eucariotas. Las rutas mejor caracterizadas son las de *T. brucei* y en células de mamíferos, en las cuales el mecanismo de ensamblaje es el mismo con sus pequeñas variaciones (Ferguson *et al.*, 2009).

La síntesis se inicia con la transferencia de N-acetilglucosaminil (GlcNAc) proveniente de UDP-GlcNAc hacia una molécula de fosfatidilinositol (PI), para formarse el GlcNAc-PI. A estas moléculas se le remueve un sustituyente N-acetilo. Posteriormente el inositol es acetilado y son añadidos tres residuos de manosa seguido de la adición de residuos de fosfoetanolamina para formar la estructura de GPI que se va unir a la proteína (Figura 3) (Hoessli, 1999). El producto del gen GPI1 interviene en el primer paso de la síntesis de las anclas de GPI, llevando a cabo la síntesis de GlcNAc-PI (Orlean, 2012).

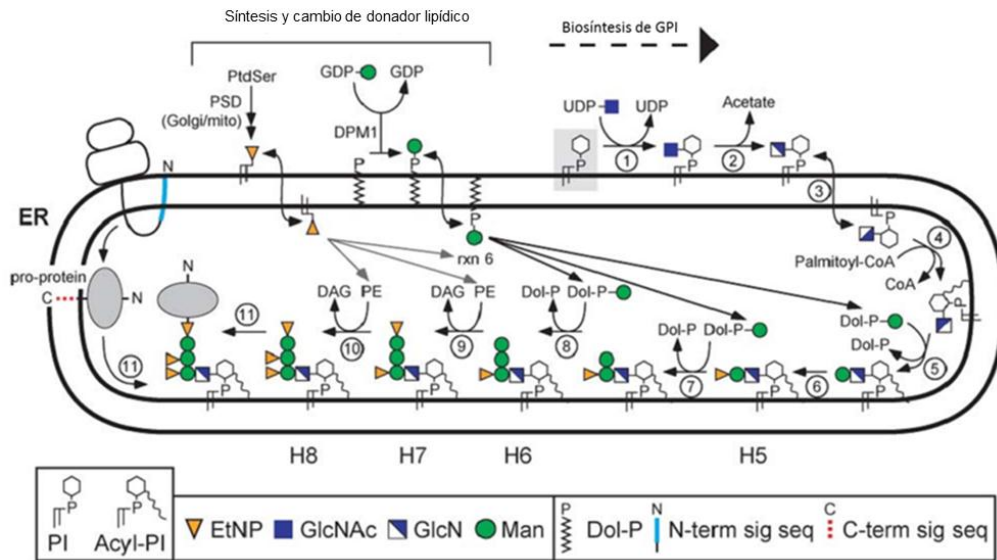


Figura 3. Esquema general de la biosíntesis de GPI en el retículo endoplasmático de levaduras y mamíferos. El retículo endoplasmático se muestra con compartimentos de topología definida (Orlean, 2012).

Función de las anclas de GPI

Las anclas de GPI son esenciales para la mayoría de los organismos, sin embargo, aunque algunas células pueden prescindir de ellas, la falta de estas estructuras generan condiciones de vulnerabilidad en la célula a diferentes tipos de estrés o simplemente alterando algunas de sus funciones (Ferguson *et al.*, 2009).

En la levadura *Saccharomyces cerevisiae* y en quizá muchos de los hongos las anclas de GPI se utilizan como señal para direccionar manoproteínas y para incorporación de β -glucanos en la pared celular. La falta de anclas de GPI en este hongo ocasiona un deterioro en la síntesis de su pared (Popolo *et al.*, 1993).

Por otra parte las células mutantes de *T. brucei* demostraron que las anclas de GPI son esenciales para diferentes estadios de desarrollo de la célula de este protozoo, estas células de tripanosoma sufren de estrés nutricional debido a que el receptor de transferrina es una proteína unida a la célula por medio de anclas de GPI (Steverding, 2000). Incluso en células de mamíferos se han demostrado que aunque no son necesarias las anclas de GPI a nivel celular, son indispensables para el desarrollo de tejido embrionario en ratones Tarutani *et al.*, 1997).

Al igual que en los hongos, las plantas como *Arabidopsis thaliana* requieren de proteínas ancladas a GPI para la síntesis de la pared celular, así como para el desarrollo del tubo polínico (Stewart *et al.*, 2005).

Una de las grandes preguntas que surgió acompañada de la investigación acerca de las anclas de GPI, fue la de la importancia de que las proteínas estuvieran ancladas a la membrana por medio de una molécula de glicosilfosfatidilinositol y no solo por medio de moléculas simples de fosfolípidos (sin la porción del glicano). Se encontró que la ventaja que adquiere la célula al utilizar este mecanismo de anclaje reside en que la molécula completa de GPI proporciona estabilidad mediante aumento de la hidrofobicidad y la afinidad de la proteína por la membrana. Se ha visto que otros lípidos que anclan proteínas como el farnesil o el meristoil de manera intracelular, no son capaces de retener proteínas en el exterior. Se sabe que al aumentar el número de carbonos en las cadenas lipídicas aumenta la estabilidad de la proteína; sin embargo no es suficiente para mantenerla unida a la membrana una vez que la proteína ya se encuentra de cara al medio extracelular (Hoessli, 1999).

Fenotipos de cepas mutantes en genes involucrados en la síntesis de GPI en hongos

Una de las herramientas importantes por las cuales se llegó a caracterizar la ruta de biosíntesis y el papel de las anclas de GPI es la generación de cepas mutantes de los organismos que se utilizan como modelos de estudio. Por medio de la interrupción de algún gen implicado en alguna ruta metabólica se bloquea algún proceso que en una cepa silvestre se lleva a cabo sin mayor complicación, algunas veces la modificación en el genoma del organismo se ve reflejada en cambios fenotípicos los cuales son de gran ayuda para asignar alguna función a las proteínas producto del gen mutado o para el mayor entendimiento de los procesos celulares (Tropp, 2012).

Leidich y colaboradores (1995) generaron una mutante del gen GPI1 en *Saccharomyces cerevisiae* y observaron que las cepas en las cuales se habían generado las mutaciones presentaban sensibilidad a la temperatura dificultando su crecimiento y defectos en la síntesis de GlcNac-PI el cual es un intermediario en la síntesis de GPI, teniendo así células incapaces de sintetizar esta molécula, además de la ineficiencia para incorporar [H^3]-inositol a las proteínas (Leidich *et al.*, 1995). Un año después, Leidich y Orlean (1996) lograron identificar la importancia crucial del gen GPI1 en la síntesis de GPI y que la alteración del mismo es capaz de causar diferencias morfológicas entre las cepas silvestres y las mutantes que ellos analizaron (Figura 4). Al no poseer la capacidad de síntesis de GPI, estos organismos mutantes desarrollaron células de mayores dimensiones, con gemaciones múltiples y con dificultad para separar la célula hija en el crecimiento vegetativo (Leidich y Orlean, 1996)

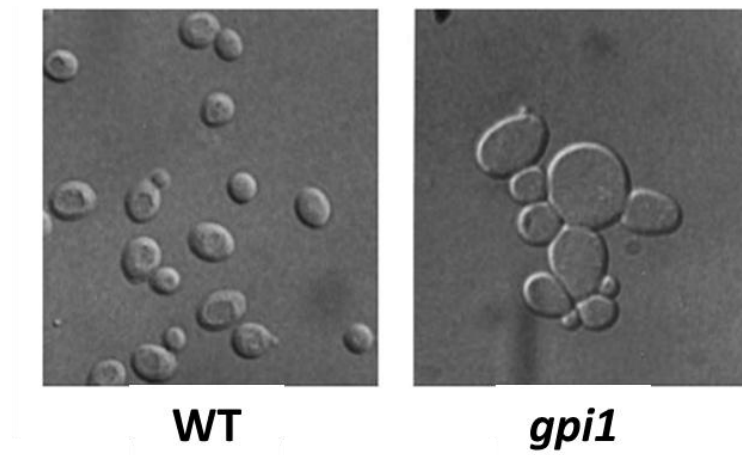


Figura 4. Efectos morfológicos de la mutación de *gpi1* en células vegetativas de *S. cerevisiae*. (Leidich y Orlean, 1996)

Por su parte, Vossen y su equipo de trabajo (1997) analizaron las mutaciones causadas en el gen GPI3 (este gen tiene nombres alternativos como CWH6 y SPT14). Y observaron que la mutación de este gen generaba células sensibles a temperatura además, logró visualizar la acumulación de algunas proteínas en el retículo endoplasmático (Figura 5). Con esto apoyaron la hipótesis de que las anclas de GPI, si bien existen en gran cantidad en la superficie de las células eucariotas también son necesarias para otros procesos intracelulares como el transporte de la proteína Gas1p por medio de vesículas COPII y que está involucrada en la biosíntesis de la pared celular del hongo, alterando indirectamente la biogénesis de este organelo en las cepas mutantes (Vossen *et al.*, 1997).

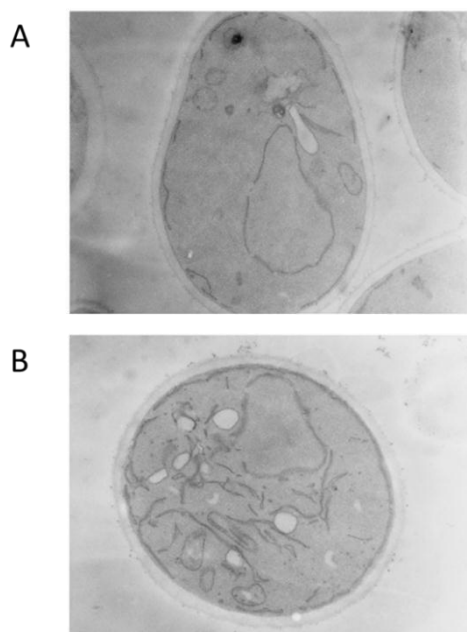


Figura 5. Micrografía de transmisión de electrones de célula silvestres (A) y células mutantes *cwh6* (B) de *S.cerevisiae*. Se observan elementos membranosos de retículo endoplasmático acumulados en células mutantes *cwh6* (Vossen *et al.*, 1997).

Posteriormente se realizaron mutaciones en el gen MCD4 en *S. cerevisiae*, este gen se encarga de añadir los residuos de fosfoetanolamina en la cadena principal de manosa de la molécula de GPI. Las mutaciones realizadas por Maneesri y colaboradores (2005) causaron un cambio de estabilidad importante, siendo evidente la incapacidad de la célula para hacer frente a cambios osmóticos, lo que hacía necesario cultivar las levaduras en medios suplementados con sorbitol además de la morfología aberrante se caracterizó su hipersensibilidad a higromicina B, SDS y toxinas killer K1, agregación celular y el decremento del nivel de proteínas-GPI de pared celular (Maneesri *et al.*, 2005).

Poco se sabe de la ruta biosintética de GPI en otro tipo de hongos, en 2006 Bowman y sus colaboradores realizaron mutaciones en el hongo filamentoso *Neurospora crassa* de tres genes involucrados en la síntesis de GPI (*gpip-2*, *gpip-3* y *gpit-1*). Con esto, ellos demostraron que al igual que en otros casos con levaduras, la pared celular del hongo se veía completamente comprometida, haciendo a las células del hongo más débiles. El efecto producido por las mutaciones causó una reducción dramática de la producción de micelio y en micrografías electrónicas se identificaron morfologías inusuales a las que denominaron “célula dentro de célula” (Figura 6) (Bowman *et al.*, 2006).

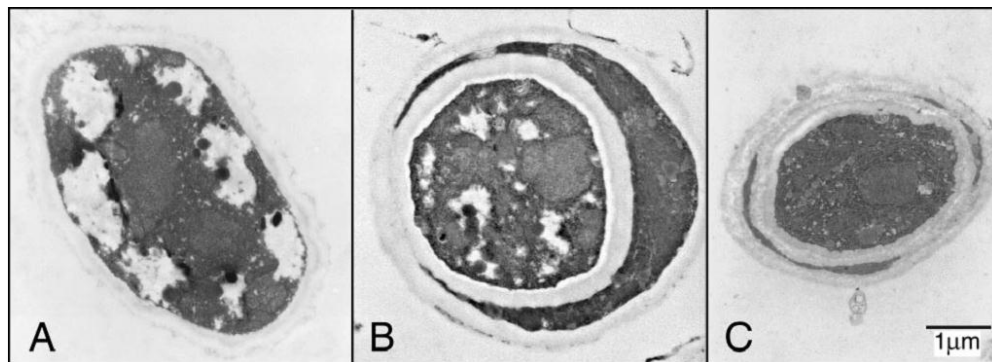


Figura 6. Micrografía electrónica de *N. crassa* mostrando morfología inusual de “célula dentro de célula”; A: muestra la cepa silvestre, B: mutante *gpip-3*, C: mutante *gpit-1* (Bowman *et al.*, 2006).

En contraste con las levaduras, Li y colaboradores en 2007 realizaron mutaciones en el hongo filamentoso *Aspergillus fumigatus*, que si bien también pertenece a la clase de los ascomicetos su morfología, tipo de reproducción y crecimiento es ampliamente diferente que la de las levaduras. Las mutaciones del gen AFPIG-A (identificado como homólogo al gen GPI-3) a diferencia de las levaduras (que generalmente presentan sensibilidad a temperatura), incrementaron considerablemente la lisis celular. El análisis de las mutantes de *A. fumigatus* mostraron un completo bloqueo en la síntesis de GPI además de cambios morfológicos importantes en el micelio del hongo (Figura 7), conidiación aberrante y una rápida germinación de las conidias. Ensayos *in vivo* mostraron la

disminución de la virulencia del hongo en modelos de infección en ratones inmunocomprometidos, concluyendo así que estas estructuras no son esenciales para la viabilidad de la célula pero que juegan un papel importante para la morfogénesis, virulencia y construcción de la pared celular (Yin *et al.*, 2008).

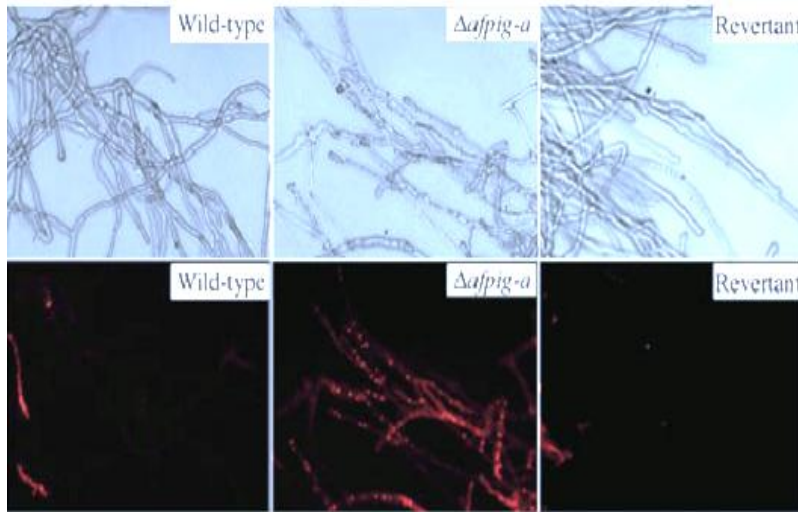


Figura 7. Crecimiento filamentoso de mutantes *afpig-a* de *A. fumigatus*. Wild-type: cepa silvestre; Δ *afpig-a*: cepa mutante; Revertant: cepa mutante transformada con el fragmento del gen *afpig-a* de cepa silvestre (Li *et al.*, 2007)

Estudios recientes realizados con mutantes condicionales de *A. fumigatus* demostraron que cuando se reduce la transcripción del gen AFPIG-A, conduce al incremento de la muerte celular del hongo por medio de un proceso de autofagia acompañado de una necroptosis y de un estrés de retículo endoplasmático (Li *et al.*, 2007)

Hipótesis

El gen GPI de *Saccharomyces cerevisiae* es estructuralmente similar en *Ustilago maydis* y su expresión está influenciada por diferentes condiciones de cultivo.

Objetivos

OBJETIVO GENERAL

Realizar un análisis de expresión del gen homólogo de GPII de *Saccharomyces cerevisiae* en *Ustilago maydis*.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Generar oligonucleótidos para amplificar y clonar el gen homólogo de GPII en *Saccharomyces cerevisiae* de *Ustilago maydis*.
2. Amplificar y clonar el gen GPII
3. Secuenciación del gen GPII.
4. Análisis de expresión del gen GPII bajo diferentes condiciones de cultivo.
5. Generación de mutantes del gen GPII, por medio de plásmidos con secuencias de recombinación homóloga.

Material y métodos

El presente trabajo se llevó a cabo en la Unidad de Manipulación Genética del Laboratorio de Micología y Fitopatología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León. La estrategia experimental consta de cuatro etapas, las cuales son descritas a continuación.

- A) Análisis bioinformático: Por medio de herramientas bioinformáticas se procedió a localizar secuencias del gen de *U. maydis* con clave de acceso um00213 en bases de datos donde se encuentran los genomas de *U. maydis*.
1. Se accedió a bases de datos de *U. maydis* de las cuales se obtuvieron las secuencias de nucleótidos del gen um00213 para posteriormente ser traducidas *in silico* a sus secuencias aminoácidos.
 2. Con la secuencia de aminoácido se buscaron proteínas de alto grado de similitud por medio de la herramienta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, disponible en <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) en diferentes géneros de hongos incluyendo *U. maydis* y *S. cerevisiae*.
 3. Una vez que pudimos asignarle una función *in silico* a estas secuencias se diseñaron oligonucleótidos con ayuda de los programas en línea “Primer BLAST” y “OligoAnalyzer” dirigidos a la amplificación del gen de interés ya mencionado, teniendo en consideración para su óptimo funcionamiento, el valor de las temperaturas de alineación, la dimerización y la formación de estructuras secundarias, además del contenido de G y C en el mismo.
- B) Validación de oligonucleótidos: Por medio de técnicas de biología molecular se validaron los oligonucleótidos diseñados anteriormente.
1. Las secuencias obtenidas *in silico* de los oligonucleótidos diseñados anteriormente se mandaron sintetizar.
 2. Se extrajo DNA de la cepa FB2 de *U. maydis*. Los oligonucleótidos diseñados fueron utilizados para amplificar el gen de interés (um00213) por medio de PCR, y se obtuvo una banda de aproximadamente 3374 para um00213.

3. El producto de PCR se clonó y posteriormente se secuenció en LANGEBIO (Laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad, CINVESTAV), para así conocer la secuencia exacta del gen.
- C) Influencia de la fuente de carbono y pH en la expresión GPI. Se llevaron a cabo cultivos microbiológicos para determinar en base a la literatura, las funciones reportadas de este gen y para las condiciones en las cuales se haría el análisis de expresión.
1. Se realizaron cultivos variando las condiciones de pH y la fuente carbono con la finalidad de conocer en que condiciones se expresa el gen.
 2. Se sometieron las células del hongo a las condiciones de inducción de la expresión para realizar posteriormente extracción de RNA
 3. Se realizó RT-PCR para conocer si el gen de interés se estaba expresando y bajo qué condiciones.
 4. Se llevó a cabo análisis de densitometría y análisis de varianza con prueba de Tukey y t de student, para conocer el comportamiento de los genes bajo las diferentes condiciones de cultivo.
- D) La inferencia de la función del gen GPI1 comienza con la comparación con genes homólogos en otros microorganismos. La confirmación de la función de estos genes se lleva a cabo por medio de la producción de una cepa mutante de *U. maydis*.

Soluciones, reactivos, procedimientos y protocolos

Cepas de microorganismos

- Cepa silvestre de *U. maydis* FB2 (Bannuet y Herskowitz, 1989). Se mantienen a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ en una mezcla de glicerol y medio de cultivo al 50% v/v. Para reactivar las cepas de *U. maydis* se transfirieron a 15 ml de medio completo (MC) (ver la sección medios de cultivo) y se mantuvieron en agitación constante durante 48-72 horas. Estas células se utilizaron como inóculo para cultivos necesarios para otros protocolos.
- Cepa mutante *rim101*⁻ (Aréchiga-Carvajal y Ruiz Herrera, 2005). Se mantienen a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ en una mezcla de glicerol y medio de cultivo al 50% v/v. Para reactivar las cepas de *U. maydis* se transfirieron a 15 ml de medio completo (MC) (ver la sección medios de cultivo) y se mantuvieron en agitación constante durante 48-72 horas. Estas células se utilizaron como inóculo para cultivos necesarios para otros protocolos.
- Cepas de células competentes de *E. coli* como DH5 α y Mach1 T1.

Medios de cultivo

- Solución de sales de *U. maydis* (Holliday, 1961):
Se pesaron 16 g de KH_2PO_4 , 4 g de NaSO_4 , 8 g de KCl , 2 g de MgSO_4 , 1g de CaCl_2 y 8 ml de elementos traza. Se disolvieron en 1 litro de agua destilada. Se esterilizaron en autoclave a 15lb ($121^{\circ}\text{C}/15\text{ min.}$).
- Elementos traza:
Se pesaron 60 mg de H_3BO_3 , 140 mg de $\text{MnCl}_2\cdot 4(\text{H}_2\text{O})$, 400 mg de ZnCl_2 , 40 mg de $\text{Na}_2\text{MoO}_4\cdot 2(\text{H}_2\text{O})$, 100 mg de $\text{FeCl}_3\cdot 6(\text{H}_2\text{O})$, 400 mg de $\text{CuSO}_4\cdot 5(\text{H}_2\text{O})$. Se disolvieron en 11mL de agua destilada y se esterilizaron en autoclave a 15lb ($121^{\circ}\text{C}/15\text{ min.}$).
- Medio completo (MC) (Holliday, 1961):
Se preparó con 2.5 g de caseína hidrolizada, 10 g de extracto de levadura, 1.5 g de NH_4NO_3 , 62.5 ml de solución de sales de *U. maydis*, se ajustó el pH a 7 y aforó a 500 ml con agua destilada. En 500 ml de agua destilada se pesaron 10g de glucosa. Se esterilizaron ambas soluciones por separado en autoclave a 15lb ($121^{\circ}\text{C}/15\text{ min.}$) y se mezclaron.

- Medio Mínimo (Ruiz-Herrera *et al.*, 1995):
Se pesaron 10 g de glucosa, 3 g de NH_4NO_3 , se añadió 62.5 ml de solución de sales de *U. maydis*, se aforó a 500ml con agua destilada y se ajustó el pH según condiciones de cultivo. Se disolvió la glucosa con agua destilada y se aforó a un volumen de 500 ml. Se esterilizaron ambas soluciones por separado en autoclave a 15lb (121°C/15 min.) y se mezclaron.
Nota: Las soluciones de sales y glucosa se mezclan 1:1 v/v al momento de utilizarse.
- DCM-S
Se pesaron 10 g de casaminoácidos, 3 g de NH_4NO_3 , 20 g de extracto de levadura, 125 ml de sales de *Ustilago maydis*, 182.2 g de D-sorbitol, 20 g agar bacteriológico, se aforó en 500 ml de agua destilada y se ajustó el pH a 7. Se pesaron 10 g de glucosa y se aforaron a 500 ml. Se esterilizaron en autoclave a 15lb (121°C/15 min.) ambas soluciones por separado y se mezclaron.
- Medio Luria-Bertani (Caldo LB-Agar LB)
Se pesaron 10 g de peptona de caseína, 5 g de extracto de levadura, 10g NaCl, se ajustó el pH a 7.0, en caso de desear medio solido LB se adicionó 20% de agar bacteriológico. Se aforó a un litro y se esterilizó en autoclave a 15lb (121°C/15 min.).
En caso de requerir este medio con baja concentración de NaCl se redujo a la mitad la cantidad de sal (5g en lugar de 10g).

Soluciones y reactivos

- Buffer NTES
 - 10 mM NaCl
 - 10 mM Tris-Cl (pH 7.5)
 - 1 mM EDTA (pH 7.5)
 - 0.1% SDS
 - Se esterilizó en autoclave a 15lb (121°C/15 min.) y se almacenó a temperatura ambiente
- Buffer TE
 - 100 mM Tris-Cl (pH 8)
 - 10 mM EDTA (pH 8)
 - Se esterilizó en autoclave a 15lb (121°C/15 min.) y se almacenó a temperatura ambiente

- Buffer TAE (50X)
 - 242 g de tris base
 - 57.1 ml de ácido acético glacial
 - 100 ml de EDTA 0.5 M(pH 8)
 - Se aforo a 1 L con agua destilada

- Agarosa para electroforesis
 - Se preparó agarosa con porcentaje deseado (P/V) utilizando el mismo buffer de corrida (TAE 1X).

- Gel-loading buffer (6X)
 - 0.25% (P/V) azul de bromofenol
 - 40% sucrosa en H₂O
 - Se almacenó a 4°C

- Buffer MOPS 10X
 - 0.2M Ácido morfolinopropanelsulfónico (MOPS)
 - 10mM EDTA pH8.0
 - 20mM acetato de sodio
 - Se ajustó el pH 7.0 con NaOH (IMPORTANTE)
 - Disolver los componentes en agua estéril tratada con DEPC y ajustar pH con NaOH
 - Un buffer color paja funciona bien, este buffer no debe de esterilizarse por autoclave, el ácido morfolinopropanelsulfónico es sumamente irritante, se usó cubre bocas o mascarilla al momento de pesar.

- Preparación de gel de agarosa 1.5% con 2.2M formaldehido
 - Se añadió 1.5% de agarosa a 72mL de agua estéril y se disolvió la agarosa
 - Se enfrió la solución hasta 55°C
 - Se añadió 10mL de buffer de corrida MOPS 10X
 - Se añadió 18mL de Formaldehido al 37% y se mezcló
 - Se vertió en molde y se dejó solidificar por lo menos 1hora a temperatura ambiente

- Solución A para digestión de muestras de RNA
 - Mezcla de digestión:
 - Formamida desinozada 10µL
 - MOPS 10X 2µL
 - Formaldehido 37% 4µL
 - RNA 2µL

- SCS
 - 20 mM citrato de sodio pH 5.8
 - 1M sorbitol
 - Esterilizar en autoclave a 15lb (121°C/15 min.)

- SCT
 - 10 mM Tris-Cl pH 7.5
 - 100 mM CaCl₂
 - 1 M sorbitol
 - Esterilizar en autoclave a 15lb (121°C/15 min.).

- Solución de Enzimas líticas de *Trichoderma harzanium*
 - 100 mg enzimas líticas de *Trichoderma harzanium* (Cat. N° L1412) por ml de regulador II
 - Esterilizar por filtración y almacenar en ultracongelación.

- Solución I, extracción DNA plasmídico
 - 25 mM tris-Cl pH 8
 - 10 mM EDTA pH 8
 - 50 mM glucosa
 - Esterilizar en autoclave a 15lb (121°C/15 min.).

- Solución II, extracción DNA plasmídico
 - 0.2 M NaOH
 - 1.0 % SDS

- Solución III, extracción DNA plasmídico
 - 3 M KCH₃CO₂
 - Ajustar pH con ácido acético a 5.5

- Regulador II
 - 25 mM Tris-Cl pH 7.5
 - 25 mM CaCl₂
 - 1 M sorbitol
 - Esterilizar en autoclave

- Agua tratada DEPC
 - Añadir 1 mL de DEPC por cada litro de agua destilada
 - Agitar vigorosamente e incubar a 37°C 24 horas
 - Esterilizar en autoclave a 15 lbs (121°C/15 min.)

Extracción de DNA genómico.

(Sambrook and Russel, 2001)

➤ Materiales

- ✓Perlas de vidrio estériles
- ✓Espátulas estériles
- ✓Tubos eppendorf de 1.5 ml estériles y nuevos
- ✓Puntas azules y amarillas nuevas y estériles
- ✓Fenol :cloroformo: alcohol isoamilico (en relación 25:24:1 respectivamente)
- ✓Buffer NTES (ver soluciones y reactivos)
- ✓Isopropanol (o etanol absoluto) y etanol 70%
- ✓Acetato de amonio 7.5 M (en caso de utilizar etanol absoluto para precipitar ácidos nucleicos)
- ✓Buffer TE (ver soluciones y reactivos)

➤ Procedimiento

1. Se colocaron 15 ml de cultivo de *U. maydis* a crecer previo a la extracción de DNA.
2. Se transfirió cultivo de *U. maydis* a tubos eppendorf de 2 ml y se centrifugó a 13500 rpm durante 1 min, se retiró el sobrenadante y en el mismo tubo se repitió el proceso 3 veces para colectar células de *U. maydis*.
3. Se agregaron 500 µl de buffer NTES.
4. Se resuspendió la pastilla celular en el vortex o pipeteando arriba y abajo.
5. Se incubó en hielo durante 10 min.
6. Se agregó con la espátula estéril dos cucharaditas de perlas de vidrio y se agitó en vortex durante 10 min.
7. Se centrifugó a 13500 rpm durante 10 min y se recuperó el sobrenadante procurando no tomar del sedimento.
8. Se agregaron 400 µl de fenol cloroformo:alcohol isoamilico y se agitó en vortex durante 2 min.
9. Se centrifugó 13500 rpm durante 10 min y se recuperó la fase superior (se forman tres fases, en la fase superior se encuentran los ácidos nucleicos).
10. Se repitió el proceso a partir del paso 8 para asegurar mayor extracción proteica.

11. Se agregaron dos volúmenes de isopropanol frío o etanol absoluto frío (en caso de utilizar etanol absoluto agregar 0.1 volumen de acetato de amonio 7.5 M, no necesario para precipitación con isopropanol).
12. Se incubaron a -20°C durante media hora o durante toda la noche.
13. Se centrifugó a 13500 rpm durante 20 min.
14. Se desechó el sobrenadante.
15. Se lavó con 500 μl de etanol 70% y agitó en vortex durante aproximadamente 5 min.
16. Se centrifugó a 13500 rpm 10 min y se desechó el sobrenadante.
17. Si era necesario se repitió el procedimiento a partir del paso 15 para asegurar eliminar el exceso de sales.
18. Se dejó secar el etanol en hornilla a 60°C o a temperatura ambiente.
19. Se resuspendió el pellet de DNA en 40 μL de buffer TE 1X
20. Se digirió la muestra con RNasa 350ng/ μL (condiciones y concentración dependen del protocolo del proveedor)
21. Se verificaron los resultados de la extracción por medio de electroforesis en agarosa al 1%, se observó una banda discreta de alto peso molecular.

Extracción de DNA plásmidico (miniprep) por medio del método de lisis alcalina
(Birnboim y Doly, 1979)

- Material
 - ✓Medio de cultivo LB
 - ✓Tubos eppendorf 1.5 mL estériles nuevos
 - ✓Solución I, solución II y solución III (ver sección de soluciones y reactivos)
 - ✓Puntas para micropipeta, azules, amarillas y blancas estériles nuevas
 - ✓Isopropanol
 - ✓Etanol al 75% (V/V)
- Procedimiento
 1. Se incubo un cultivo bacteriano en 10 ml de medio LB y antibiótico apropiado hasta el día siguiente.
 2. Se cosecharon las células centrifugando todo el cultivo en un tubo de 15 ml para centrifugadora durante 5 min a velocidad máxima en una centrifugadora de mesa (1300-1500 x g). Se desechó la capa sobrenadante.
 3. Se volvió a suspender el precipitado de células agitando en el vortex. Y se incubaron a temperatura ambiente durante 5 min.

4. Se agregaron 400 µl de la solución II, se mezcló suavemente (no en el vortex) e incubó 15 min sobre hielo.
5. Se agregaron 300 µl de la solución III, y se mezclaron suavemente (no en el vortex) e incube 15 min sobre hielo.
6. Se centrifugaron 15 min a 13500 rpm; se vertió la capa sobrenadante en un tubo eppendorf de 1.5 ml.
7. Se extrajeron las proteínas con 200 µl de fenol/cloroformo 1:1.
8. Se centrifugaron a 13500 rpm 10 minutos y se recuperó el sobrenadante en un tubo eppendorf nuevo.
9. Se agregaron 600 µl de isopropanol muy frío; se mezcló y dejó reposar a -20°C durante 1 hora o a -80°C durante 30 minutos. Se centrifugó 5 minutos a 13500 rpm, y se retiró el sobrenadante.
10. Se lavó el precipitado con 1 ml de 75% EtOH; se centrifugó 15 minutos a 13500 rpm.
11. Se desechó la capa sobrenadante y se secó el tubo al aire o en estufa térmica durante 25 a 20 min.
12. Se disolvió el precipitado en 50 µl de TE pH 8.0
13. Se agregaron 5 µl de 1 mg/ml de RNasa A. Se incubaron a 37 °C (o a la temperatura ambiente) durante 15 min.
14. Se verificó la extracción cargando 5 µl de muestra en un gel de electroforesis.

Extracción de RNA

(Sambrook y Russell, 2001).

➤ Materiales

- ✓Nitrógeno líquido
- ✓Morteros estériles
- ✓Pinzas y espátulas estériles
- ✓Tubos eppendorf de 1.5mL estériles y nuevo
- ✓Puntas azules y amarillas nuevas y estériles
- ✓Buffer NTES
- ✓Fenol :cloroformo: alcohol isoamilico (en relación 25:24:1 respectivamente)
- ✓Acetato de sodio 3M
- ✓Etanol absoluto
- ✓Agua tratada con DEPC
- ✓Acetato de litio 4M

➤ Procedimiento

1. Se colocó 250 ml de medio de cultivo completo inoculado con células de *U. maydis* a crecer según las condiciones de cultivo.
2. Se recolectaron las células a las cuales se les extraerá el RNA por centrifugación (aproximadamente 2g de células).

3. Se vertió un poco de nitrógeno líquido al mortero para enfriarlo.
4. Se sumergió el tubo que contiene la pastilla celular en nitrógeno líquido para congelarla
5. Con ayuda de una espátula se transfirió la pastilla celular congelada al mortero
6. Se trituró la pastilla hasta obtener un polvo fino y se transfirió a un tubo falcón
7. Se agregaron 500µL de buffer NTES y 500µL de fenol: cloroformo: alcohol isoamilico
8. Se agitó en vortex por lo menos 10min, hasta aquí es importante la rapidez en el procedimiento así como evitar en cualquier momento que la pastilla celular o el triturado se descongele, esto para evitar que las nucleasas degraden el RNA
9. Se centrifugó 10min a 13000 rpm
10. Se trasladó la fase acuosa a un nuevo tubo eppendorf y se agregó 400 µL de fenol: Cloroformo: alcohol isoamilico y se centrifugó nuevamente 10 min a 13000 rpm
11. Se agregó una decima parte de volumen de acetato de sodio 3M y dos volúmenes de etanol absoluto (en este paso se lleva a cabo la precipitación de ácidos nucleicos)
12. Se incubó a -20°C por 20 min
13. Se centrifugó 8000 rpm, 10 min
14. Se resuspendió la pastilla en 500 µl de agua DEPC y alcohol 10%, y se incubó en hielo 20 min.
15. Se centrifugó a 5000 rpm, 5 min (en este paso los polisacáridos se encuentran en el sedimento), se recuperó sobrenadante en un tubo nuevo.
16. Se agregaron 500 µl de acetato de litio 4M
17. Se incubó en hielo a 4°C (cuarto frío o refrigerador), al menos 3hrs o toda la noche.
18. Se centrifugó a 3000 rpm por 10 min
19. Se disolvió la pastilla en 400 µl de agua DEPC
20. Se agregaron 40 µl de acetato de sodio 3M, y 900 µl de etanol absoluto
21. Se incubó a -20°C durante 2 horas.
22. Se centrifugó a 8000 rpm por 10 min
23. Se disolvió pastilla en 300 µl de agua DEPC
24. Se determinó la concentración a $\lambda=260$ nm ($ABS*40= [RNA]$)
25. Se almacenó a -80°C

Electroforesis de RNA a través de geles de agarosa con formaldehido

(Sambrook y Russell, 2001).

➤ **Material**

- ✓Tubos eppendorf de 0.5 ml nuevos estériles
- ✓Puntas para micropipeta blancas y amarillas nuevas estériles
- ✓Agua tratada con DEPC
- ✓Formaldehido 37 %
- ✓Solución A (ver sección soluciones y reactivos)
- ✓Buffer MOPS (ver sección de soluciones y reactivos)
- ✓Cámara de electroforesis

➤ **Procedimiento**

1. Previo a realizar el protocolo se colocó la cámara de electroforesis completa a desinfectar con solución de etanol 70% de 20 minutos y enjuagar la cámara con agua DEPC
2. Se preparó el gel de agarosa 1.5% con 2.2M formaldehido (ver sección de soluciones y reactivos)
3. Se digirieron las muestras de RNA con solución A (ver sección de soluciones y reactivos)
4. Se incubaron 10 min. a 85°C
5. Se incubaron en hielo 10 min.
6. Se agregaron 5 µl buffer de carga 6X estéril
7. Se agregó 1µl de bromuro de etidio estéril
8. Se corrió en buffer MOPS 1X 70v

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

(Protocolo fabricante, GoTaq® Flexi DNA Polymerase, Promega).

➤ **Materiales**

- ✓Tubo eppendorf PCR 0.2 ml nuevos estériles
- ✓Puntas de pipetas amarillas y blancas nuevas estériles
- ✓5X Colorless o Green GoTaq® Flexi Buffer (incluido en el kit)
- ✓Mezcla de dNTP's 10 mM (cada uno, no incluido en el Kit)
- ✓Solución de MgCl₂ 25 mM (incluido en el kit)
- ✓Oligonucleótido sentido 10 µM
- ✓Oligonucleótido anti-sentido 10 µM
- ✓GoTaq® DNA Polymerase (5u/µl)
- ✓DNA molde
- ✓Agua libre de nucleasas
- ✓Aceite mineral en caso de que su termociclador un cuente cubierta térmica
- ✓Descongelar perfectamente en hielo y mezclar antes en vortex antes de su uso

➤ Procedimiento

1. En agua libre de nucleasas se preparó la mezcla que se muestra en la Tabla 2.

Componente	Volumen final	Concentración final
5X Colorless o Green GoTaq® Flexi Buffer	10 µl	1X
Solución de MgCl ₂ 25 mM	2-8 µl	1.0-4.0 mM
Mezcla de dNTP's 10 mM	1 µl	0.2 mM cada uno
Oligonucleótido sentido 1ug/ µl	2 µl	40 ng/ µl
Oligonucleótido anti-sentido 1ug/µl	2 µl	40 ng/ µl
GoTaq® DNA Polymerase (5u/µl)	0.25 µl	1.25 u
DNA molde	X µl	< 0.5 µg/50 µl
Agua libre de nucleasas	c.b.p 50 µl	

Tabla 2. Ejemplo de mix de reacción de PCR.

2. se llevaron al termociclador y se corrió el programa según características de amplicón (tamaño) y oligonucleótidos (Tm°)
3. A continuación (Tabla 3) se muestra un ejemplo de programa de PCR

	Temperatura	Tiempo	Numero de ciclos
PCR	94° C	5 min.	1 ciclo
	94° C	1 min.	30 ciclos
	Tm° C	30 sec.	
	72° C	1 min./Kb	
	72°C	5 min.	1 ciclo

Tabla 3. Ejemplo de un programa estándar para la amplificación de DNA.

4. Se verificó la amplificación corriendo las muestras en un gel de electroforesis.

Síntesis de cDNA por medio de reacción de retro-transcripción (RT-PCR)

(protocolo fabricante Super Script® III One-Step RT-PCR System with Platinum® Taq DNA Polymerase).

➤ Materiales

- ✓Tubo eppendorf PCR 0.2 ml nuevos estériles
- ✓Puntas de pipetas amarillas y blancas nuevas estériles
- ✓2X Reaction Mix (el buffer contiene 0.4 mM de dNTP's, 2.4 mM MgSO₄, incluido en el kit)
- ✓Solución de MgSO₄ 5 mM (incluido en el kit)
- ✓Oligonucleótido sentido 10 μM
- ✓Oligonucleótido anti-sentido 10 μM
- ✓Super Script® III RT/ Platinum® Taq High Fidelity Enzyme Mix
- ✓mRNA molde
- ✓Agua tratada con DEPC
- ✓Aceite mineral en caso de que el termociclador no cuente con cubierta de alta temperatura
- ✓Descongelar perfectamente en hielo

➤ Procedimiento

1. Se descongelaron en hielo los reactivos y componentes de la reacción. Las reacciones se montaron en hielo.
2. Se precalentó el baño maría a 62°C
3. Se tomó en un tubo de 0.2 ml X vol. de RNA (500ng) y se agregaron 1 mM de oligonucleótidos específicos, se mezclaron y se llevaron a incubar a 62°C por 5 min, se transfirieron de inmediato en hielo, esto ayudó a que las estructuras secundarias del mRNA se desnaturalizaran y los oligonucleótidos se unieran.
4. En agua libre de nucleasas se preparó la mezcla de reacción de la tabla 4 (se agregó a la preparación la mezcla de mRNA oligonucleótidos preparados en el paso 3)

Componente	Cantidad
2X Buffer Mix	12.5 uL
mRNA molde	5ul (0.1ug/uL)
Oligonucleótido sentido	0.5 uL (1ug/uL)
Oligonucleótido anti-sentido	0.5 uL (1ug/uL)
RT/TaqMix	0.5uL
Agua tratada con DEPC	6.0uL
Total Volumen	25uL

Tabla 4. Mezcla de reacción para una reacción de RT-PCR.

5. Una vez atemperado el termociclador, se colocaron los tubos y se cerró el termociclador. Se corrió el programa según características de amplicón (tamaño) y oligonucleótidos (T_m).
6. Se comprobó la amplificación corriendo las muestras en un gel de electroforesis.
7. A continuación se muestra un ejemplo de un programa de RT-PCR (Tabla 5).

Proceso	Temperatura	Tiempo	Numero de ciclos
Síntesis de cDNA	55° C	30 min.	1 ciclo
PCR	94° C	2 min.	1 ciclo
	94° C	1 min.	40 ciclos
	T_m ° C	30 sec.	
	68° C	1 min./Kb	
	68°C	5 min.	1 ciclo

Tabla 5. Ejemplo de programa para reacción de RT-PCR de un paso.

Preparación de células calcio competentes

(Sambrook y Russell, 2001)

➤ Materiales

- ✓Tubos eppendorf de 1.5 ml nuevos estériles
- ✓Tubos cónico de 50 ml
- ✓Puntas para Micropipeta azules y amarillas nuevas estériles
- ✓Medio de cultivo LB
- ✓Solución de $MgCl_2$ 100 mM
- ✓Solución de $CaCl_2$ 100 mM
- ✓Solución de $CaCl_2$ 85 mM con 15% (V/V) glicerol
- ✓ El procedimiento se debe llevar en su totalidad en hielo y todo el material debe estar previamente atemperado a 4°C incluyendo tubos, puntas y soluciones de trabajo, no asumir que esto no es importante.

➤ Procedimiento

1. Se creció preinoculo de células bacterianas (TOP 10, DH5 α , Mach1 T1, etc.) en 5 ml de LB a 37°C en agitación durante 16 horas.
2. Se inocularon 250 ml de LB con 1.5 ml de preinoculo e incubar a 37° C en agitación.

3. Se midió la densidad óptica a 600 nm cada hora y posteriormente cada 15 o 20 minutos después de que la absorbancia alcanzó 0.2. Una vez que se alcanzó una absorbancia de 0.35-0.4 se transfirieron los cultivos a hielo
4. Se enfrió el cultivo de 20 a 30 min en hielo girándolo ocasionalmente para asegurar un descenso homogéneo de la temperatura.
5. Se colectaron las células en un tubo cónico de 50 ml por centrifugación a 4000 rpm 15 min a 4°C.
6. Se decantó el sobrenadante y gentilmente se resuspendieron las células en 25 ml de MgCl₂ frío.
7. Se centrifugaron a 3000 rpm durante 15 min a 4°C
8. Se decantó el sobrenadante y se resuspendió el precipitado 50 ml de CaCl₂ frío.
9. Se incubó en hielo 20 minutos
10. Se centrifugó a 3 000 rpm 15 min 4°C
11. Se decantó el sobrenadante y se resuspendió el precipitado en 12.5 ml de solución fría de CaCl₂ 85 mM con 15% glicerol.
12. Se centrifugó a 2100 rpm 15 min 4°C
13. Se decantó el sobrenadante y se resuspendieron las células en 2 ml de solución fría de CaCl₂ 85 mM con 15% glicerol.
14. Se hicieron alícuotas de la suspensión con 50 µl en tubos eppendorf de 1.5 ml.
15. Debido a que están suspendidas en solución con glicerol se almacenaron en ultracongelación hasta su uso.

Preparación de protoplastos de *U. maydis*

(Aréchiga E.T., 2005)

➤ Materiales

- ✓Tubos cónicos de 50 ml estériles
- ✓Solución SCS (ver sección soluciones y reactivos)
- ✓Solución de enzimas líticas de *Trichoderma harzanium* (ver sección soluciones y reactivos)
- ✓Solución STC (ver sección soluciones y reactivos)
- ✓DMSO

➤ Procedimiento

1. Se realizó un preinóculo de células de *U. maydis* en 5 ml de medio completo y se incubaron a 28°C con agitación con la finalidad de activar las células.
2. Se realizaron tres cultivos de 500 ml de medio completo, utilizando como inóculo 100 µl, 250 µl, 500 µl de las células cultivadas en el paso 1 en cada uno de los matraces, se incubaron a 28°C con agitación durante 16 horas.
3. Se midió la densidad óptica de los cultivos a 600 nm hasta que alcanzó una absorbancia de 0.8 a 1.0
4. Se colectaron las células en tubos cónicos de 50 ml por medio de centrifugación a 2500 rpm por 10 min a temperatura ambiente.
5. Se decantó todo el sobrenadante.
6. Se resuspendieron las células en 10 ml de SCS (ver sección de soluciones y reactivos) y se aforaron a 30 ml.
7. Se centrifugó a 2500 rpm 10 min a temperatura ambiente.
8. Se re suspendieron las células en 1 ml de SCS y se añadieron 200 µl de solución de enzimas líticas de *Trichoderma harzianum*.
9. Se incubó por 10 min mezclando lentamente por inversión.
10. Se comprobó la formación de protoplastos por medio de su observación al microscopio.
11. Se centrifugaron a 1000 rpm 10 minutos a temperatura ambiente.
12. Se decantó el sobrenadante y se resuspendieron delicadamente las células en 1 ml de SCS.
13. Se transfirió la suspensión a tubos eppendorf de 1.5 ml
14. Durante el resto del protocolo los protoplastos se manipularon con delicadeza.
15. Se centrifugaron los protoplastos 2000 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente.
16. Se retiró el sobrenadante con micropipeta y se resuspendieron las células en 1 ml de SCS.
17. Se centrifugaron 2000 rpm 5 minutos a temperatura ambiente.
18. Se retiró sobrenadante con una micropipeta y se resuspendieron los protoplastos en 1 ml de STC. Se centrifugó 2000 rpm 5 min a temperatura ambiente

19. Se resuspendieron los protoplastos en 1 ml de STC frío, se agregó DMSO lo necesario para que quedará a una concentración final del 7%.
20. Se hicieron alícuotas de 50 μ l y se conservaron en ultracongelación.

Transformación bacteriana

(Protocolo fabricante, TOPO® TA Cloning® Kit)

1. Se agregaron 40 ng de ADN de plásmido a 20 μ l de células competentes descongeladas.
2. Se mezclaron suavemente.
3. Se colocaron sobre hielo durante 20 a 30 min.
4. Se provocó un choque de calor a 42 °C durante 40 segundos en baño de María.
5. Se colocó sobre hielo durante 10 min.
6. Se agregaron 80 μ l de medio LB (sin antibióticos).
7. Se agitaron durante 2 a 4 h a 225 rpm a 37 °C
8. Se diseminaron en forma pareja las células sobre LB adicionado con el antibiótico correspondiente al gen de selección de su plásmido por medio de una varilla en “L”
9. Se cultivaron a 37 °C durante aproximadamente 16 horas.

Transformación de *Ustilago maydis*

(Aréchiga E. T., 2005)

➤ Materiales

- ✓Solución STC (ver sección de soluciones y reactivos)
- ✓15 mg de heparina por cada ml de solución STC
- ✓Protoplastos de *Ustilago maydis*
- ✓Puntas para micropipeta azules, amarillas y blancas nuevas estériles
- ✓Solución de polietilenglicol 40% (ver sección de Soluciones y reactivos)
- ✓Medio de cultivo DMC-S adicionado con higromicina 250 μ g/ml

➤ Procedimiento

1. Se suspendió 1 µg de DNA transformante en 5 µl de solución STC, añadir heparina y se mantuvo en hielo.
2. Se añadieron 50 µl de protoplastos de *U. maydis* se mezcló suavemente con pipeta y se mantuvieron en hielo por 10 minutos.
3. Se adicionaron 500 µl de polietilenglicol 40% frío, se mezcló e incubó en hielo por 15 minutos
4. Se agregaron 500 µl de solución STC y se mezcló por inversión durante un minuto.
5. Se centrifugó a 2500 rpm durante 5 min a 4°C.
6. Se retiró el sobrenadante y se resuspendió en 200 µl de solución STC.
7. Se cultivaron las células en medio de cultivo DMC-S adicionado con higromicina.
8. Se incubaron a 28°C revisando el crecimiento cada 24 horas.
9. Se transfirieron las células resistentes a placas de medio completo adicionado con 150 µl de higromicina por cada ml de medio de cultivo para confirmar su resistencia.

Clonación con topoisomerasa I, por medio de la tecnología TOPO® TA Cloning®
(protocolo fabricante, TOPO® TA Cloning® Kit)

➤ Materiales

- ✓Tubos eppendorf de 0.2 ml estériles nuevos
- ✓Puntas para micropipetas amarillas y blancas estériles nuevas
- ✓Solución de sales (incluida en el kit)
- ✓Vector/topoisomerasa mix (incluido en el kit)
- ✓Agua libre de nucleasas
- ✓Baño maría precalentado a 42°C

➤ Procedimiento

1. Se produjeron por medio de PCR los fragmentos de DNA que se deseaban clonar, se purificaron y se midió su concentración.
2. En agua libre de nucleasas se preparó la siguiente mezcla de reacción (Tabla 6).

Reactivo	Volumen
Producto fresco de PCR*	0.5-4 µl
Solución de sales	1 µl
Agua libre de nucleasas	c.b.p. 5 µl
Vector TOPO®	1 µl
Volumen final	6 µl
*consultar al final del protocolo	

Tabla 6. Mix de reacción para clonación utilizando TOPO® TA Cloning® Kit

3. Se mezclaron los componentes gentilmente e incubaron por cinco minutos a temperatura ambiente (22-23°C).
4. Se colocó la reacción en hielo y procedió a realizar la transformación bacteriana.
5. Se recomendó incluir controles de transformación utilizando un plásmido circular, y transformar paralelamente. En este trabajo se realizó transformación bacteriana por medio de choque térmico con células calcio competentes, en caso de que se cuente con células electro competentes se recomienda revisar el protocolo del fabricante (no incluido en este trabajo).
6. Se analizaron las transformantes por medio de análisis de restricción.

*Las ligaciones fueron llevadas a cabo en proporción molar inserto-vector, 1:3, se utilizó la siguiente fórmula para calcular el volumen en base a los ng de inserto que se requiere para la reacción de ligación.

$$\frac{\text{longitud de inserto (en Kb)} \times \text{ng de vector}}{\text{longitud de vector (en Kb)}} \times \frac{3}{1} = \text{ng de inserto requerido proporción 1:3}$$

Clonación por medio de recombinación usando la tecnología Gateway

(Protocolo fabricante, Gateway® BP Clonase™ II Enzyme Mix)

➤ Materiales

- Tubos eppendorf 1.5 ml estériles nuevos
- Puntas para micro pipetas amarillas, blancas estériles nuevas
- Buffer TE, pH 8.0 (ver sección soluciones y reactivos)
- BP Clonase™ enzyme mix

- *attB*-producto de PCR
- vector DONOR

➤ Procedimiento

1. Se añadieron los siguientes componentes en un tubo eppendorf de 1.5 ml a temperatura ambiente y mezcle (Tabla 7).

attB-Producto de PCR ($\geq 10\text{ng}/\mu\text{l}$; concentración final $\sim 15\text{-}150\text{ ng}$)	1-7 μl
Vector DONOR (150 $\text{ng}/\mu\text{l}$)	1 μl
Buffer TE, pH 8.0	c.b.p. 8 μl

Tabla 7. Mezcla de reacción para recombinación utilizando BP ClonaseTM II enzyme mix

2. Se descongeló en hielo el tubo BP ClonaseTM II
3. Mezcla de enzima por aproximadamente dos minutos. Y se mezcló en vortex brevemente dos veces (2 segundos cada vez)
4. Se añadieron 2 μl de BP ClonaseTM II enzyme mix a la reacción y se mezcló en vortex brevemente dos veces.
5. Se incubó la reacción a 25°C por una hora
6. Se añadió 1 μl de proteínasa K (20 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) para terminar la reacción. Se mezcló en vortex brevemente. Se incubó a 37°C por 10 minutos.
7. Se llevó a cabo una transformación bacteriana (ver sección Transformación bacteriana) utilizando 1 μl de la reacción.

Resultados

Análisis bioinformático

Por medio de bases del Munich Information Center for Proteins Sequences *Ustilago maydis* Data Base, “MUMDB” (disponible en: <http://mips.helmholtz-muenchen.de/genre/proj/ustilago/About/index.html>) (Mewes *et al.*, 2000) se obtuvieron la secuencia de nucleótidos y de aminoácidos del gen en cuestión, haciendo uso de la secuencia de aminoácidos se procedió a realizar un alineamiento de secuencias en bases de datos de otros hongos con la finalidad de correlacionar la función hipotética de las proteínas producto de este gen.

Con la ayuda de la herramienta Basic Local Alingment SeachTool (BLAST, disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) (Altschul *et al.*, 1990), se observó el grado de similitud de la secuencia de aminoácidos de la proteínas producto del gen um00213. De esta manera se sabe que están relacionados con la síntesis de las anclas de glicosilfosfatidilinositol en hongos; sin embargo se pudo observar que la mayoría de las secuencias con las que existe alto grado de similitud entre diversidad de hongos pertenecen a proteínas hipotéticas, por lo que se recurrió a realizar un análisis más selectivo de las secuencias comparándolas con las del hongo que ha sido mayormente estudiado, *Saccharomyces cerevisiae* (Figura 8), el resultado de los análisis llevados a cabo *in silico* muestra similitud con el homólogo funcional en *Saccharomyces cerevisiae* del gen GPI1 (um00213) tomando en cuenta los parámetros que se consideraron para determinar la homología hipotética *in silico* de las secuencias, los cuales definen como homologo a los secuencias que tengan aproximadamente 25% de identidad o menos en el caso de familias y 50% de identidad o menos utilizando herramientas de análisis de secuencias como BLAST (Wan y Xu, 2005).

Poner algo de la función y que posición de la ruta tiene esto para incrementar la importancia de su estudio-interrupción

Ya identificada la función hipotética del gen, se utilizó la secuencia de ADN para diseñar un par de oligonucleótidos para amplificar por medio de PCR el gen de interés incluyendo aproximadamente mil pares de bases río arriba y mil pares de bases río abajo del marco de lectura abierto, para asegurar la amplificación del promotor y del terminador. Utilizando la herramienta en línea Primer-Blast del NCBI, se seleccionaron un par de oligonucleótidos con características deseables los cuales se muestran en la Tabla 8, el mapa de amplificación se esquematizan en la Figura 9.

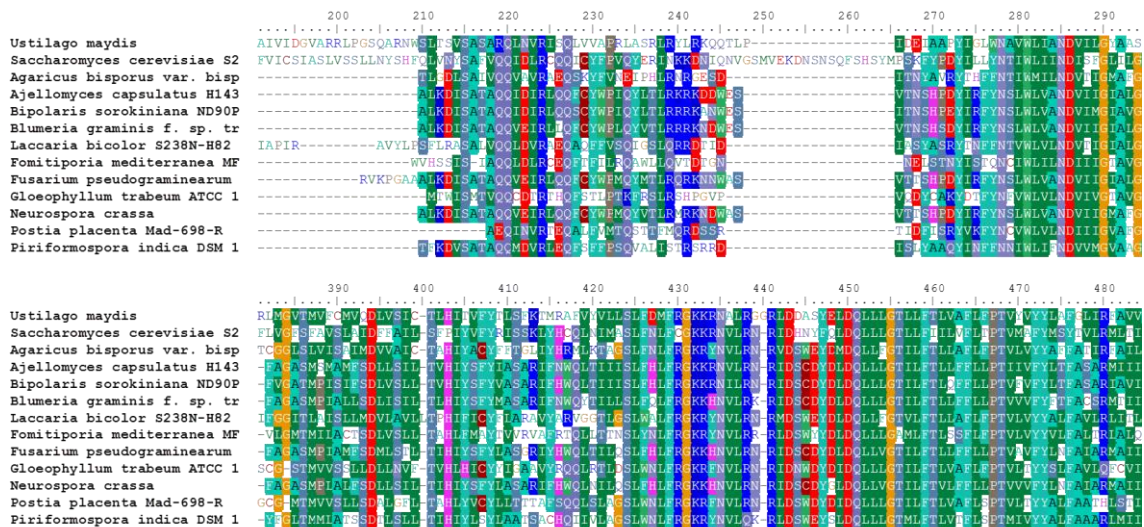


Figura 8. Resultados de los alineamientos realizados con la secuencia de aminoácidos del gen um00213 y las secuencias homologas de GPI1 en diversas especies de hongos incluyendo *S. cerevisiae*, la imagen muestra un fragmento de la proteína donde se localizan zonas conservadas.

Amplificación	Oligonucleótido	Secuencia (5'-3')	Tm (°C)	Tamaño amplicón (pb)
GPI1	GPI-213-F	TGGGACACAGACATGGCGACT	60	2311
	GPI-213-R	GTGCAGAGATGCCTTGGCCTT	58	

Tabla 8. Oligonucleótidos para la amplificación de los genes GPI1

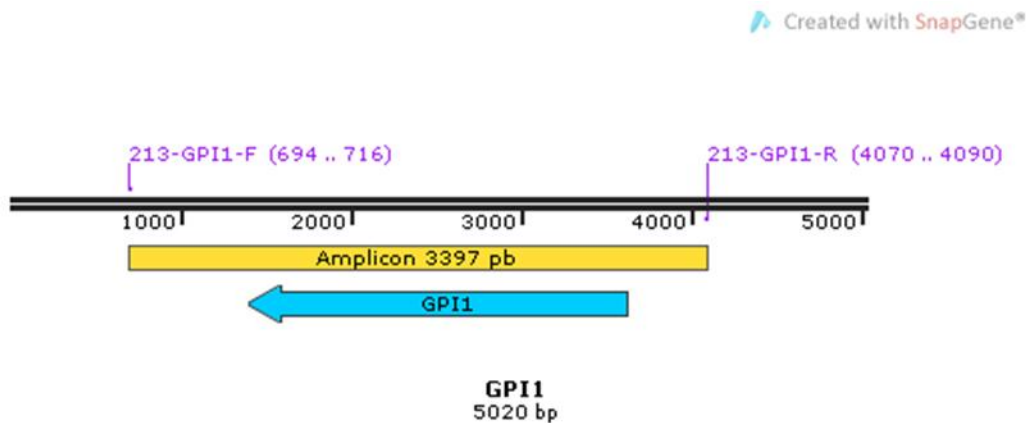


Figura 9. Mapa de amplificación para los oligonucleótidos diseñados para el análisis del gen GPI1. Las posiciones marcadas en color púrpura indican el sitio de unión de los oligonucleótidos, el gen GPI1 se muestra en color azul. (Diagrama creado con el software SnapGene)

Validación de oligonucleótidos

Una vez mandados sintetizar los oligonucleótidos, se procedió a realizar extracción de DNA de la cepa FB2 de *Ustilago maydis*(Figura 10) para utilizarlo como molde para la estandarización de los oligonucleótidos y amplificación del gen GPI1.

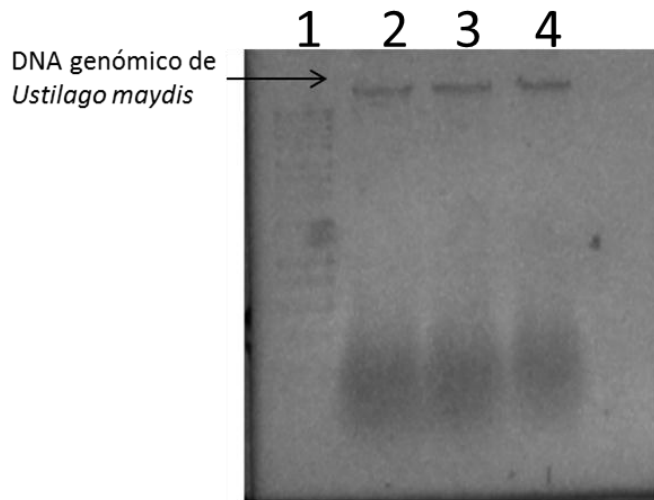


Figura 10. Gel de electroforesis mostrando bandas de alto peso molecular correspondientes a la extracción de DNA genómico de *U. maydis*. Agarosa 1%. La tabla inferior muestra la organización de las muestras en el gel.

Carril	Muestra marca los carriles volumen de carga
1	Marcador DNA (Hiperladder I; Bioline)
2	Muestra 1 DNA FB2 <i>U. maydis</i> 3 μ L de carga, 912 ng/ μ L
3	Muestra 2 DNA FB2 <i>U. maydis</i> 3 μ L de carga, 1118 ng/ μ L
4	Muestra 3 DNA FB2 <i>U. maydis</i> 3 μ L de carga, 1368 ng/ μ L

Una vez estandarizadas condiciones de reacción, se procede a la amplificación de los genes (Figura 11), el producto de PCR de los genes en cuestión fue utilizado para su clonación.

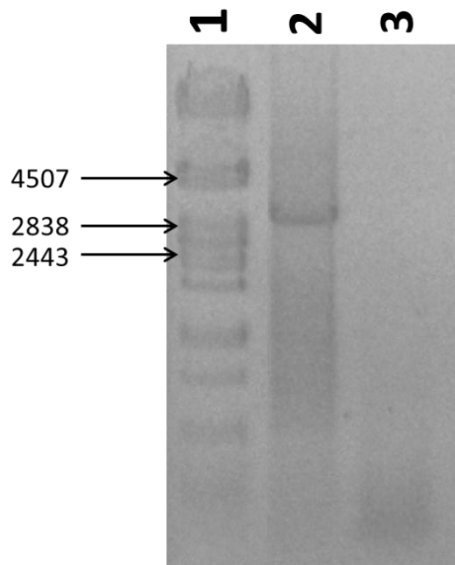


Figura 11. Amplificación por medio de PCR del gen GPII de *U. maydis*. Agarosa 1%. Las tablas inferiores y pagina 38 muestran la distribución en el gel de agarosa las condiciones de reacción

Carril	Muestra
1	Marcador DNA(λ Pst I)
2	GPII (3374 pb)
3	Control negativo

Componente	Concentración final	Condiciones de reacción		
		Tiempo	Temp. (°C)	Ciclos
5X Colorless Flexi Buffer®	10 μ L	5 min.	95	1 ciclo
Solución de MgCl ₂	5 μ L			
Mezcla de dNTP's	2 μ L	1 min.	95	30 ciclos
Oligonucleótido sentido	1 μ L	30 seg.	60	
Oligonucleótido anti-sentido	1 μ L	3 min.	72	
GoTaq® DNA Polymerase	1 μ L	5 min.	72	1 ciclo
DNA molde	500 ng/ μ l			
Agua libre de nucleasas	c.b.p. 50 μ l			

Una vez purificados los fragmentos se procedió a realizar la reacción de clonación, y a la transformación bacteriana, como se indica en la sección de material y métodos. Se obtuvieron tres clonas (identificadas como col1213, col213 y col3213) las cuales fueron analizadas y verificadas por medio de análisis de restricción con la enzima *EcoRI*, esta enzima de restricción liberó el inserto dejando el vector TOPO 2.1 lineal (3.9 kb) y dos

fragmentos (2481pb y 916 pb) que corresponden al gen GPI1 clonado (Figura 12), solo Col1213 contiene el patrón de bandeado, esperado.

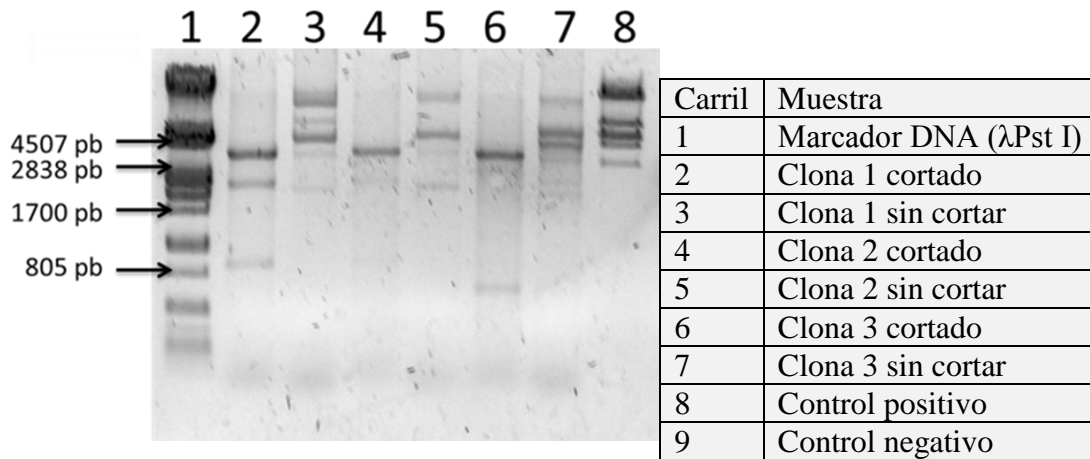


Figura 12. Análisis de restricción con *EcoRI* de la clonación del gen GPI1. Se observan bandas en el carril 1 de 3900pb (que corresponde al vector TOPO 2.1 el cual tiene un tamaño de 3.9 Kb), 2481 pb y 916pb (corresponden al tamaño del inserto, *EcoRI* corta una vez dentro de la secuencia del mismo), comprobando que el gen GPI1 ha sido clonado.

Posterior a la clonación, los fragmentos correspondientes a nuestro gen de interés fueron secuenciados. El diagrama de la Figura 13 muestra un mapa de los oligonucleótidos que se utilizaron para la secuenciación. Los resultados de esta secuenciación se editaron y alinearon por medio de la herramienta Basic Local Alingment Search Tool del NCBI y el programa bioinformático GENTle (Magnus-2004), dando como resultado un grado de identidad de 99 % con la proteína hipotética um00213 de *Ustilago maydis* con clave de acceso XM_751267.1(ver Anexos, A1). La grafica de la Figura 14 muestra los alineamientos y el ensamble de los fragmentos editados producto de la secuenciación.

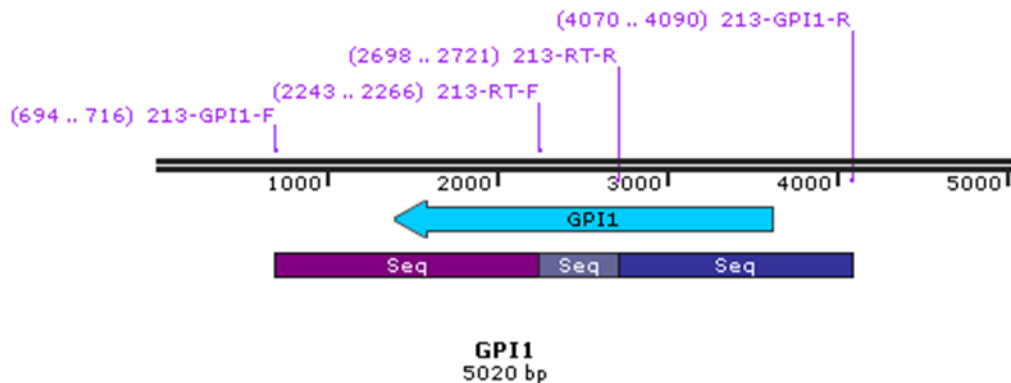


Figura 13. Mapa del gen GPI y de los oligonucleótidos utilizados para su secuenciación. Las posiciones en púrpura indican el lugar de unión de los oligonucleótidos utilizados para la secuenciación, los oligonucleótidos utilizados para esta secuenciación se

muestran en las tablas 8 y 9. Los fragmentos con la leyenda “Seq” esquematizan las distancias de secuenciación, el gen GPII se muestra en color azul. Programa

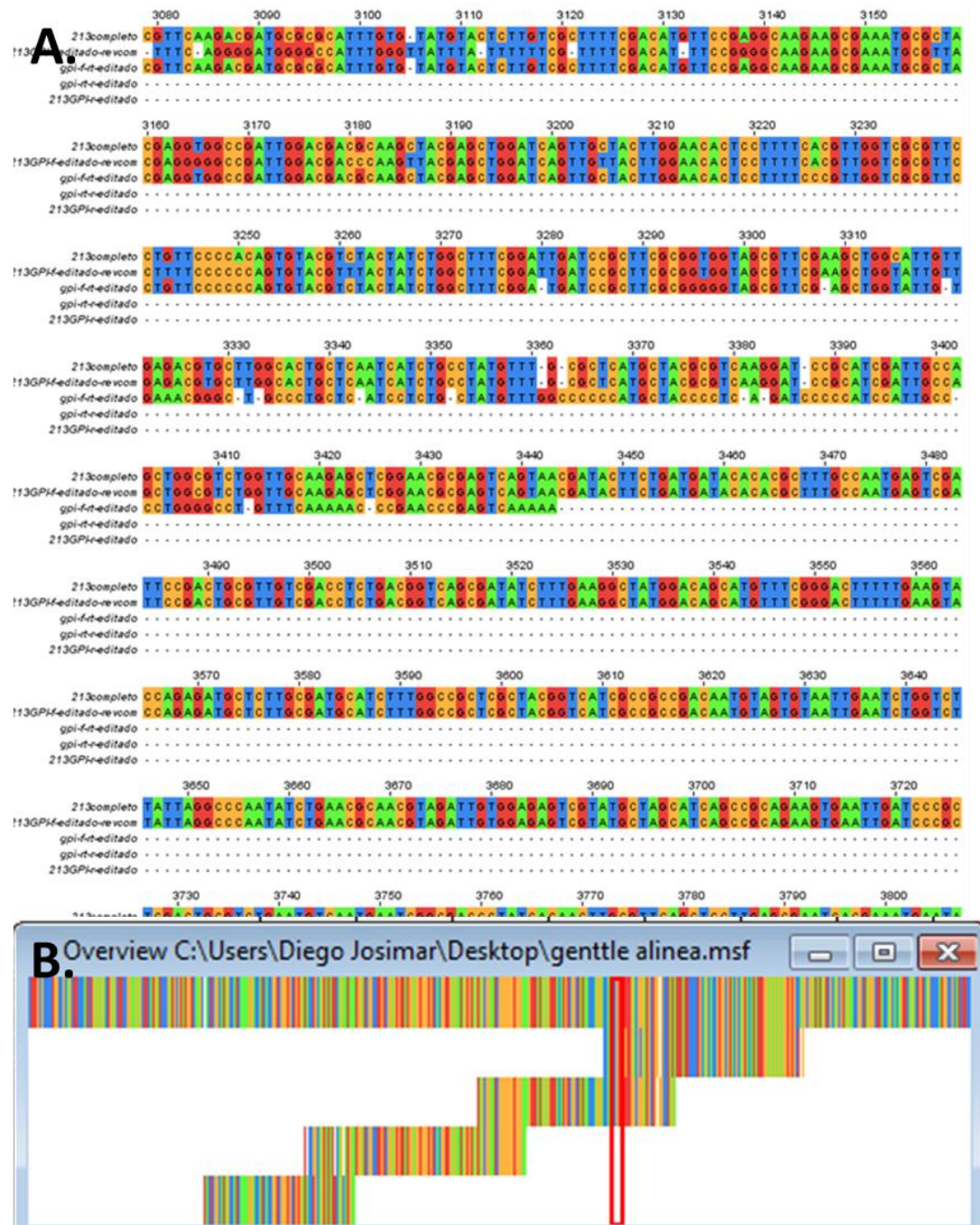


Figura 14. La imagen muestra el alineamiento y ensamblaje de los fragmentos obtenidos de la secuenciación del gen GPII. A. se muestra las secuencias de nucleótidos alineados sobre la secuencia del gen completo, B. Muestra una visión en conjunto de los

fragmentos alineados y ensamblados, el recuadro rojo marca la zona de las secuencias mostrada en A. (Imagen obtenida con el software JalView, Waterhouse *et al.*, 2009)

Influencia de la fuente de carbono y pH en la morfología celular

Se llevaron a cabo pruebas piloto para determinar las condiciones de cultivo para el análisis de expresión del gen GPII. Se eligieron tres diferentes fuentes de carbono: glucosa, glicerol y manosa añadidas en el medio de cultivo al 1% y a un pH 9, pH 7 y pH 4, en las cuales se ve alterada la morfología del hongo, lo anterior con la finalidad de probar si la expresión de GPII muestra diferencias entre la cepa silvestre FB2 y la cepa mutante de RIM101 (BMA).

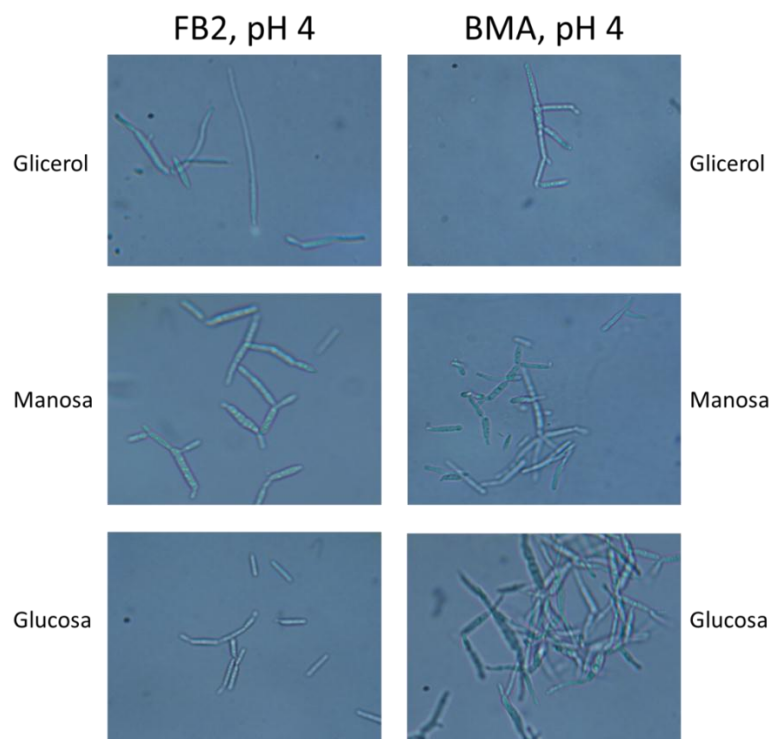
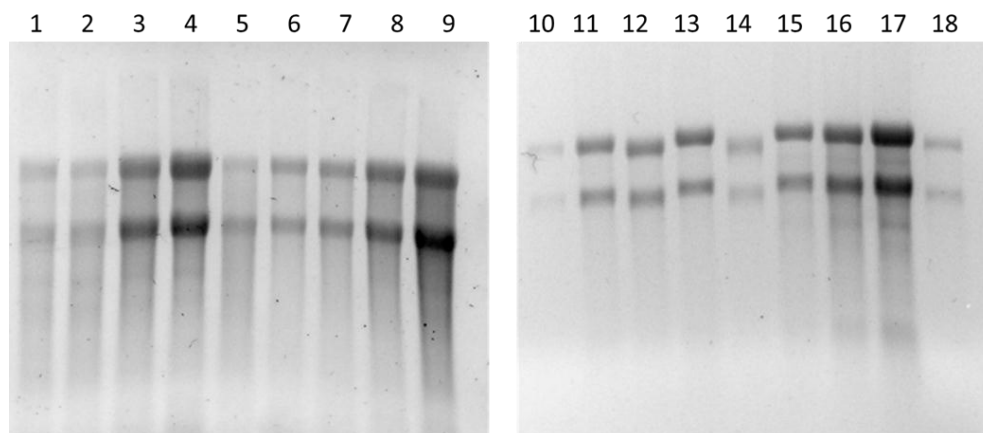


Figura 15. Influencia de la fuente de carbono en el crecimiento de *U. maydis*. Las imágenes muestran un ejemplo de las diferencias morfológicas de las cepas FB2 y BMA creciendo en diferente fuente de carbono y pH 4.

Análisis de expresión

En base a lo anterior se crecieron células de *U. maydis* bajo las condiciones de cultivo ya mencionadas y se procedió a realizar extracción de RNA después de 22 horas de cultivo (Figura 16).



Carril	Muestra	Carril	Muestra
1	FGu9	10	BMa9
2	FGu7	11	BMa7
3	FGu4	12	BMa4
4	BGu9	13	FGi9
5	BGu7	14	FGi7
6	BGu4	15	FGi4
7	FMa9	16	BGi9
8	FMa7	17	BGi7
9	FMa4	18	BGi4

Figura 16. Electroforesis de RNA de *U. maydis* a través de gel de agarosa con formaldehído. La imagen superior muestra los resultados de la extracción de RNA de células de *U. maydis*, la tabla de la izquierda muestra las condiciones a las que crecieron las células y el carril en el cual se ubica el respectivo RNA. F: cepa FB2, B: BMA, Gu: Glucosa, Gi: Glicerol, Ma: Manosa, 4: pH 4, 7: pH 7, 9: pH 9.

Se diseñaron un par de oligonucleótidos (Tabla 9) con los cuales se llevó a cabo el análisis de expresión del gen GPII, la síntesis de cDNA y la amplificación del mismo. La Figura 17 muestra un mapa del gen GPII y la ubicación de los oligonucleótidos utilizados para el análisis de expresión.

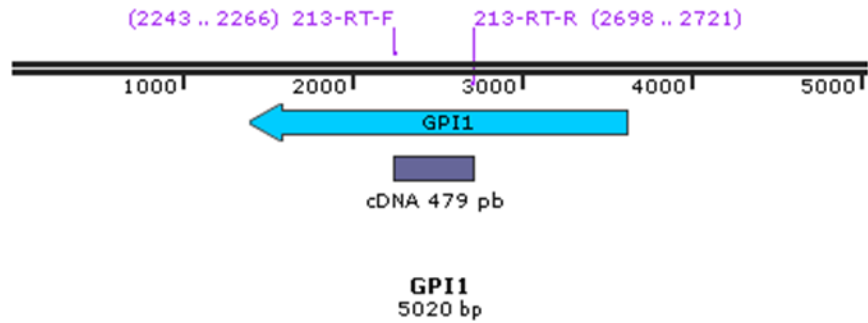
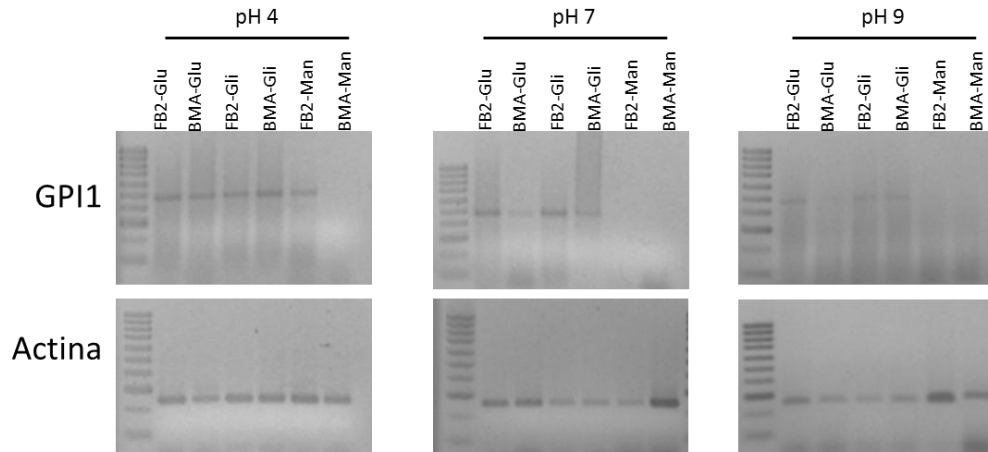


Figura 17. Mapa del gen GPI1 de *Ustilago maydis* donde se muestra la posición dentro del gen de los oligonucleótidos en púrpura utilizados para el análisis de expresión y el tamaño de su amplicón. La tabla 9 muestra las características de los oligonucleótidos, el gen GPI1 se muestra en azul.

Amplificación	Oligonucleótido	Secuencia (5'-3')	T _m (°C)	Tamaño amplicón (pb)
mRNA GPI1	213-RT-F	CCTTCGTAGAGCCATCAAGTATGT	60.2	479
	213-RT-R	CCAAGATAACATCGTTGGCAATCA	59.9	

Tabla 9. Oligonucleótidos utilizados para la reacción de RT-PCR para el análisis de restricción del gen GPI1 en *U. maydis*.

En la Figura 18 se puede observar los geles de electroforesis de las reacciones de RT-PCR del gen GPI1 y del gen de actina de *U. maydis*, la tabla que acompaña la Figura 18 muestra las condiciones de reacción.



Componente	Concentración final	Proceso	Temperatura	Tiempo	Ciclos
2X Buffer Mix	2.5uL	Síntesis de cDNA	55° C	30 min.	1 ciclo
mRNA molde	500 ng	PCR	94° C	2 min.	1 ciclo
Oligonucleótido sentido 1µg/ µL	0.5 µL		94° C	1 min.	40 ciclos
Oligonucleótido anti-sentido 1µg/ µL	0.5uL		60° C	30 seg.	
RT/TaqMix	0.5uL*		68° C	30 seg.	
Agua tratada con DEPC	c.b.p 25uL		68°C	5 min.	1 ciclo

*Concentración no especificada por proveedor

Figura 18. Electroforesis que muestra los resultados de las reacciones de RT-PCR del gen GPI1 con un tamaño de 479 pb, y de actina con tamaño de 270 pb, de células de las cepas FB2 y BMA de *U. maydis* cultivadas a pH 4, pH 7 y pH 9. Agarosa 2%, marcador de DNA, Hyper Ladder IV; Bioline. La tabla muestra las condiciones a las que se llevaron estas reacciones.

Por medio del software ImageJ (Rasband-2012), se llevó a cabo un análisis de densidad para medir semicuantitativamente la expresión del gen GPI1. La Tabla 10 muestra los resultados del análisis estadístico de la densidad relativa del gen GPI1 en comparación con el gen de actina usado como control.

CEPAS	pH	GLUCOSA	GLICEROL	MANOSA
FB2	4	0.3381 ^{b, α}	0.3231 ^{b, α}	0.2208 ^{b, α}
	7	0.7883 ^{c, α}	1.9269 ^{c, α}	0.0000 ^{a, α}
	9	0.1760 ^{a, α}	0.0509 ^{a, α}	0.0000 ^{a, α}
BMA	4	0.3105 ^{c, β}	0.3219 ^{b, β}	0.0000 ^{a, β}
	7	0.2018 ^{b, β}	0.6652 ^{c, β}	0.0000 ^{a, α}
	9	0.0000 ^{a, β}	0.0705 ^{a, β}	0.0000 ^{a, α}

Tabla 10. Resultados del análisis estadístico de la expresión del gen GPI1. Las letras a, b, c indican grupos de homogeneidad de los tratamientos (vertical), es decir, en que condiciones la expresión es igual. Las letras α , β indica diferencia significativa de tratamiento entre las cepas FB2 y BMA (horizontal), es decir, diferencia entre las condiciones de pH de una cepa respecto a la otra, en los cultivos con diferente fuente de carbono.

Construcción de cassette de interrupción del gen GPI

Se diseñaron oligonucleótidos para amplificar fragmentos de aproximadamente mil pares de bases río arriba y río abajo del gen GPI1, a estos oligonucleótidos se les añadieron secuencias de recombinación (*attB*) y un sitio de restricción para la meganucleasa *I-SceI*, la Tabla 11 muestra las secuencias de los oligonucleótidos, la Figura 19 muestra un mapa de las posiciones de los oligonucleótidos y la amplificación de los fragmentos.

Oligonucleótido	Secuencia (5'-3')	Tm(°C)	Tamaño amplicón	Secuencias oligonucleótidos modificadas con las secuencias <i>attB</i> y <i>I-SceI</i> 5'-3'
213-F up	GCAAAGTAGATTG TGGAGAGTCGT	57.05	1000 pb	<u>ACTGATAGTGACCTGTTCGTTGCAACAAATTGA</u> AAAGTAGATTGTGGAGAGTCGT
213-R up	CCACCATCGGAAG AGGAGGTTCT	57.66		TAGGGATAACAGGGTAAT CCACCATCGGAAG AGGAGGTTCT
213-F down	TGCATCGTCTCTTG ATCCGTTTCGAT	58.44	994 pb	TAGGGATAACAGGGTAAT TGCATCGTCTCTTG ATCCGTTTCGAT
213-R down	TCTCAGAGAATTT ACCACGACCTC	58.31		<u>ACTGATAGTGACCTGTTCGTTGCAACAAATTC</u> TACAGAGAATTTACCACGACCTC
Secuencia <i>I-SceI</i>	TAGGGATAACAGGGTAAT			
Secuencia <i>attB</i>	<u>ACTGATAGTGACCTGTTCGTTGCAACAAATT</u>			

Tabla 11. Oligonucleótidos para la amplificación de fragmentos de mil pares de base que flanquean el gen GPI1 de *U. maydis*. Las letras en negritas y subrayadas muestran las secuencias de corte de *I-SceI* y las secuencias de recombinación *attB* respectivamente, se muestra en los sitios en los que estas secuencias han sido añadidas en los oligonucleótidos.

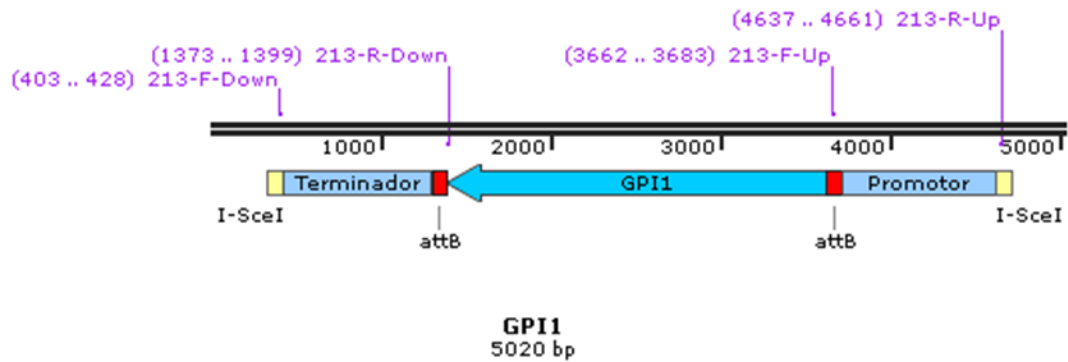


Figura 19. Mapa de la amplificación de los fragmentos correspondientes al promotor (1000 pb río arriba) y terminador (1000 pb río abajo) del gen GPI1 necesarios para la estrategia de mutación. Las posiciones en púrpura indican el sitio de unión de los oligonucleótidos, el gen GPI1 se ilustra en color azul, junto a las secuencias del promotor y del terminador se muestran la posición de las secuencias *IscE-I* y *attB* en amarillo y rojo respectivamente.

Una vez que se amplificaron las secuencias del promotor y el terminador se procedió a realizar la recombinación por medio de la tecnología Gateway. La Figura 20 esquematiza el procedimiento en el cual, por medio de las secuencias *attB* ubicadas en los fragmentos amplificados del promotor y el terminador se clonaron en el plásmido pDONR el cual posee secuencias homologas *attP*.

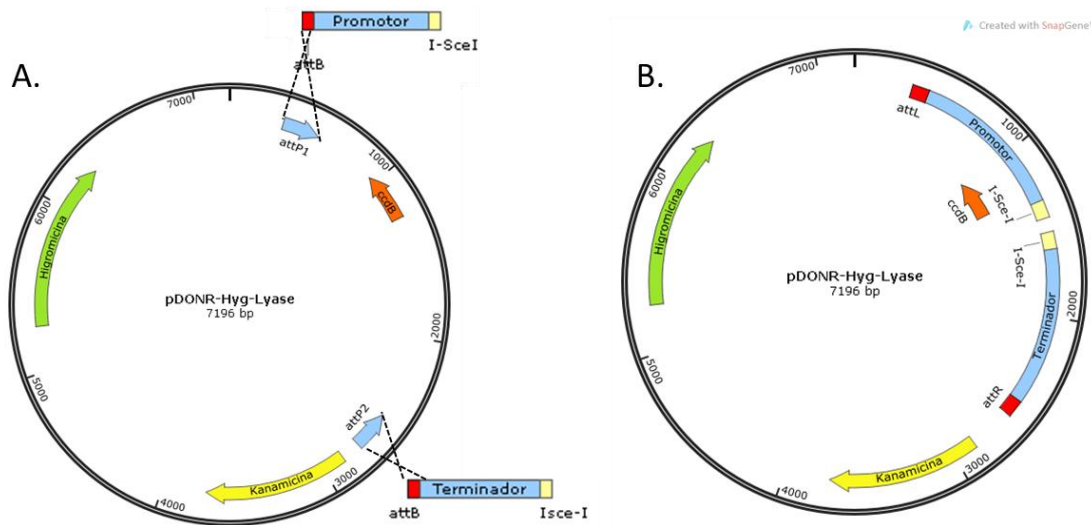


Figura 20. Esquemización del proceso de clonación por medio de recombinación utilizando la tecnología Gateway. **A.** Se muestra el mapa genético junto con los fragmentos del promotor y terminador del GPI1 de *U. maydis* y sus respectivas secuencias de recombinación en color rojo y azul (*attB* y *attP* respectivamente). **B.** muestra el resultado de la clonación, el gen letal *ccdB* es interrumpido por el proceso de recombinación.

Se recuperaron dos clones de la transformación en *E.coli* con el plásmido pDONR una vez llevada a cabo la clonación, las cuales fueron identificadas como PDONR213Col1 y PDONR213Col2. Se comprobó el proceso de recombinación por medio de un análisis de restricción con la enzima *XhoI*, la Figura 21, muestra el mapa genético con los sitios de restricción de la enzima.

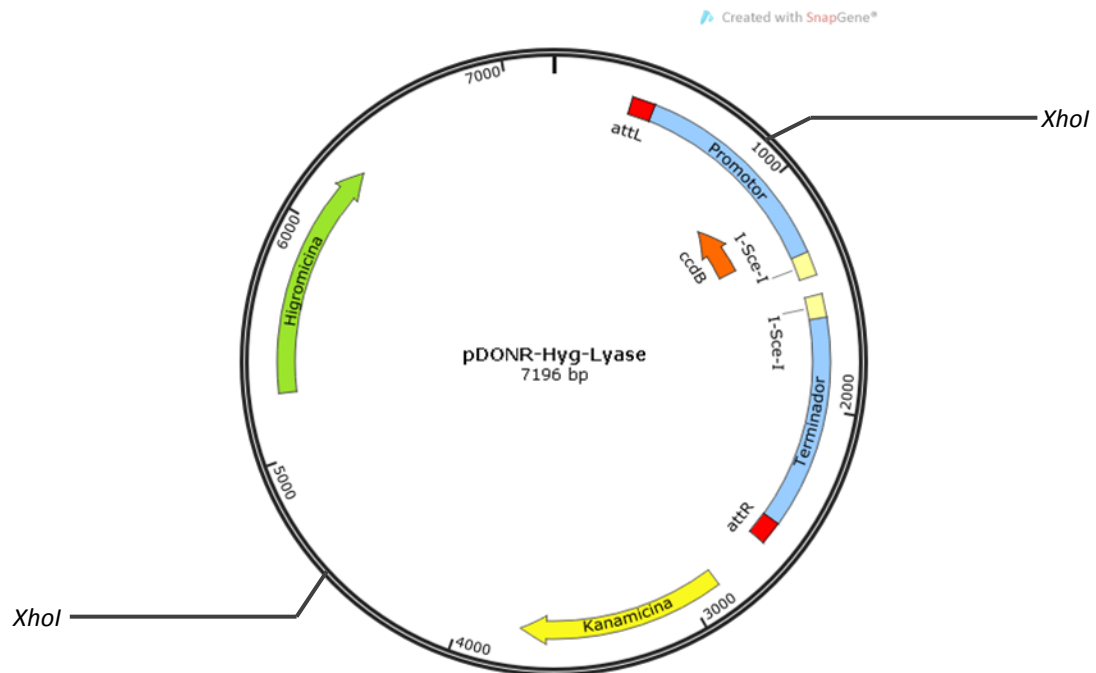


Figura 21. Mapa genético del plásmido pDONR después de haber sido añadidos los fragmentos del promotor y el terminador del gen GPII de *U. maydis*, se observan los sitios de restricción de la enzima *XhoI* utilizados para comprobar el proceso de recombinación.

La Figura 22 muestra el gel de electroforesis del análisis de restricción de la construcción realizada con los fragmentos del promotor y el terminador del gen GPII de *U. maydis* y el plásmido pDONR.

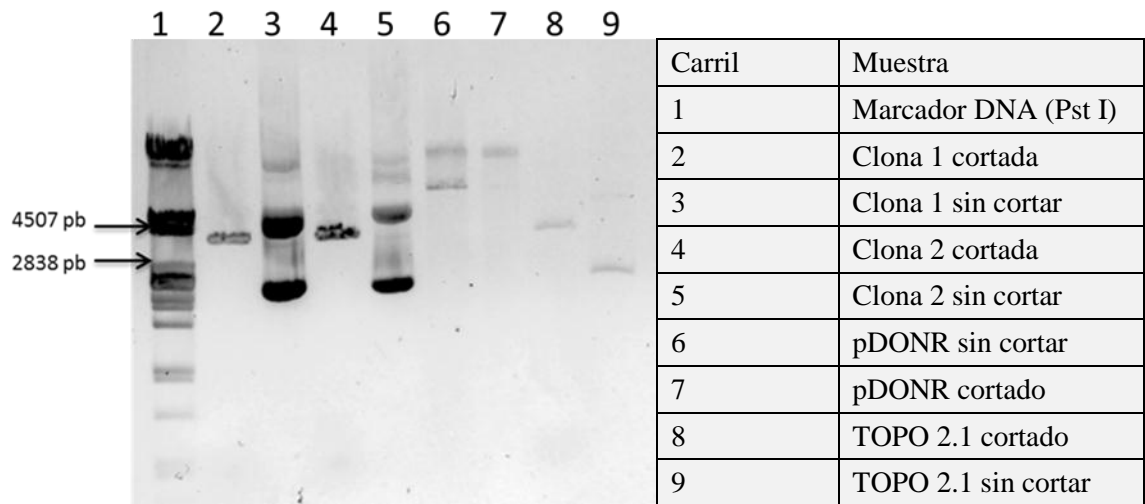


Figura 22. Análisis de restricción de la clonación para la producción de la mutante del gen GPII en *U. maydis*. El corte con *XhoI* produce un fragmento de aproximadamente 3400 pb y uno de 3800 pb, En los carriles 2 y 4 se muestran el producto de la digestión enzimática de las dos clonas recuperadas y en los carriles 7 y 8 se pueden observar los controles positivos donde la enzima *XhoI* produce fragmentos lineales de aproximadamente 7 Kb en el plásmido pDONR sin recombinación y 3 Kb respectivamente del plásmido TOPO 2.1.

Posteriormente se realizó un corte enzimático del plásmido pDONR el cual contiene los fragmentos del promotor y terminador del gen GPII de *U. maydis* con la meganucleasa *I-SceI* para obtener el mismo de forma lineal y proceder a la transformación de las células de *U. maydis*.

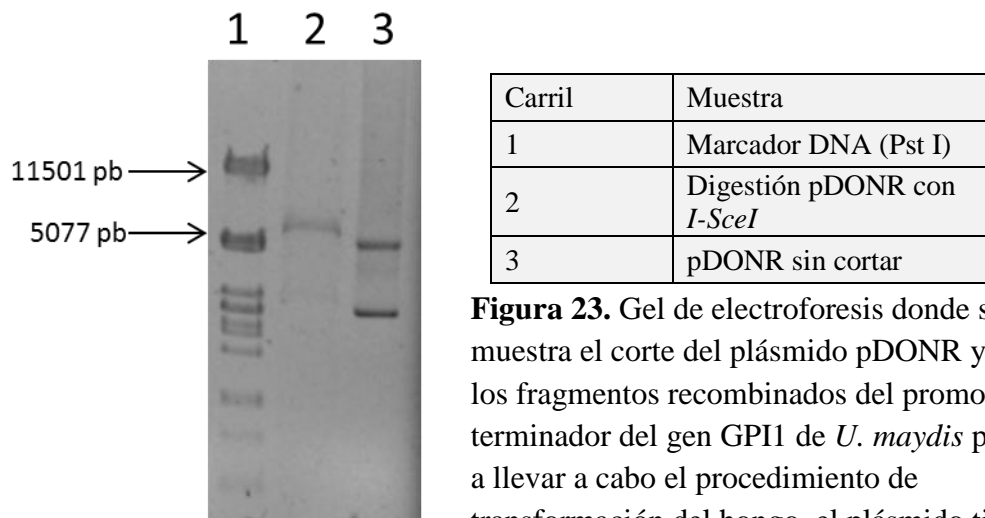


Figura 23. Gel de electroforesis donde se muestra el corte del plásmido pDONR ya con los fragmentos recombinados del promotor y terminador del gen GPII de *U. maydis* previo a llevar a cabo el procedimiento de transformación del hongo, el plásmido tiene un tamaño aproximado de 7200pb .

Una vez obtenido el plásmido lineal, se realizó la transformación en *U. maydis* por medio de recombinación homóloga se lleva a cabo la mutación del gen GPI, la Figura 17 muestra de manera grafica el proceso.

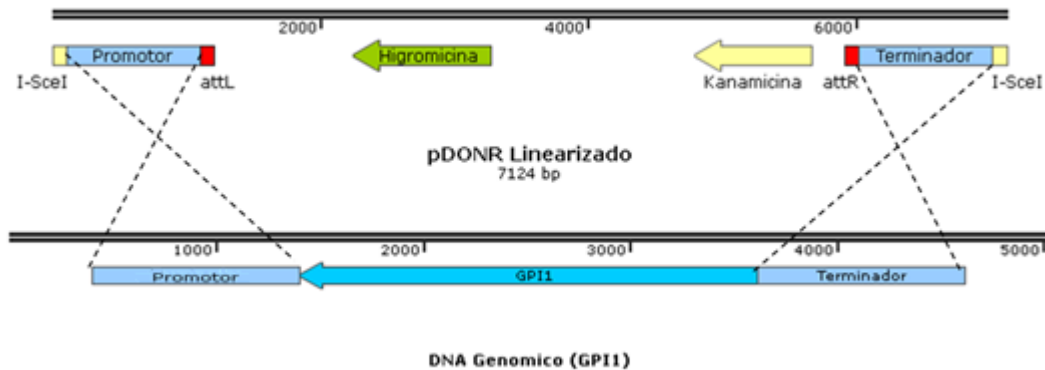


Figura 24. Proceso de transformación de *U. maydis* por medio recombinación homóloga. Se muestra en la parte superior el plásmido pDONR el cual contiene los fragmentos del promotor y el terminador del gen GPI1 de *U. maydis*, en la parte superior se observa la región representativa del DNA genómico de *U. maydis* correspondiente al fragmento donde se encuentra el gen GPI1, se puede observar que el gen GPI1 será remplazado por los genes de resistencia a higromicina y kanamicina presentes en el plásmido pDONR.

Se aislaron seis clones del proceso de transformación identificadas como “transformatesFB2Col1, transformatesFB2Col2... transformantesFB2Col6” y se almacenaron en ultracongelación, la confirmación genotípica de la mutación de las células de *U. maydis* recuperadas y la caracterización de estas células será llevado a cabo en trabajos posteriores a este.

Discusión

Debido a que las anclas de glicosilfosfatidilinositol están ampliamente distribuidas en los organismos y las proteínas que sujetan cumplen funciones muy variables, no es posible extrapolar los efectos específicos de las mutaciones de alguno de los miembros de esta ruta en todos los organismos (Orlean, 2012). Es por ello, que el estudio de todas las características bioquímicas y fisiológicas en las que están involucradas estas estructuras se vuelve importante. Los análisis en diversos organismos llegaron a establecer la estructura principal del glicosilfosfatidilinositol, sin embargo se sabe que aunque la ruta biosintética ha logrado conservar sus características principales a través de la evolución, existen variables como la longitud en el residuo de fosfolípidos en los diversos estadios de *T. bucei*, o las diferentes posiciones en las que se integran las manosas laterales en la estructura principal en *S. cerevisiae*, o como las bases de ceramida en lugar de glicerolípidos en *Dictyostelium* (Ferguson *et al.*, 2009), por lo que supone que a pesar de esta conservación el comportamiento de síntesis es diferente de un organismo a otro.

El análisis bioinformático de la secuencia obtenida experimentalmente en este trabajo del gen GPII de la cepa FB2 de *U. maydis*, mostró un porcentaje de identidad del 99% con la secuencia nucleotídica del gen hipotético de *U. maydis* reportado en las bases de datos de Gene Bank del National Center of Biotechnology Information (secuencia con clave de acceso XM_751267.1), lo cual nos indica que probablemente no exista una diferencia de este gen entre cepas del mismo hongo. Debido a que ambas secuencias poseen un porcentaje de identidad muy elevado se deduce que el dominio funcional de este gen es idéntico al mostrado en el alineamiento de la sección de resultados (inciso A, Figura 8), el cual entra dentro del dominio conservado del gen GPII. La secuencia obtenida experimentalmente en este trabajo se cargó a la base de datos del NCBI y le fue asignado el número de acceso “BankIt1695469 Ustilago KJ361507”

Varios autores (Leidich *et al.*, 1995, Leidich y Orlean, 1996, Vossen *et al.*, 1997, Maneesri *et al.*, 2005, Bowman *et al.*, 2006, Li *et al.*, 2007) han referido que la modificación de los genes que participan en la ruta biosintética del glicosilfosfatidilinositol en hongos se ve reflejada en un cambio de morfología celular, incluso se sabe que la alteración de la biosíntesis de esta estructura afecta íntimamente la síntesis de pared celular en hongos (Mouyna *et al.* 2000, Grimme *et al.* 2004). La variación de pH en cultivos mostró una diferencia morfológica clara entre la cepa silvestre (cepa FB2) y la cepa mutante BMA. Mientras que las células de la cepa FB2 mostraron indicios de un cambio morfológico se mantuvieron mas cercanas a la apariencia típica de *U. maydis*, mientras que las células de la cepa mutante mostraron un marcado cambio en su apariencia, exhibiendo células nodosas, multiseptadas y con estructuras mas cercanas a lo que pareciera es el inicio de un proceso de producción de micelio. Se sabe que el gen GPII se encuentra regulado por medio de sistemas que responden a variaciones de pH (Franco y Aréchiga, 2013, datos no publicados), es de considerar que las estructuras de miceliación y la formación de multiseptos en las células de la cepa BMA este en relación a la expresión de los genes regulados por factores ambientales como lo es el cambio del pH. En células de *Candida albicans* a las cuales se les alteraron sistemas de regulación por pH mostraron la ausencia de filamentación bajo

diferentes condiciones de cultivo, lo cual respalda la relación del cambio morfológico asociado a una variación de pH y de los sistemas de señalización involucrados en estos factores (Ramon *et al.*, 1999)

Debido a que algunos de los componentes estructurales del glicosilfosfatidilinositol son carbohidratos, es importante señalar que la síntesis de los intermediarios de esta estructura tienen como precursor principal la dextrosa (Kanehisa *et al.*, 2012), por lo que la utilización de otras fuentes de carbono bajo condiciones restrictivas de cultivo probablemente deben de influenciar los niveles de expresión de algunos genes involucrados en la síntesis de GPI y que al mismo tiempo están regulados por las variaciones de pH, Nozawa *et al.* (2003) menciona que la mutación de una proteasa de tipo calpaina codificada por el gen *pal B* involucrada en el procesamiento de *pacC* y otros genes *pal* en *Aspergillus nidulans*, muestra un decremento dramático del contenido de manosa y de N-acetilglucosamina en fosfatasas ácidas secretadas por este hongo. Dicho esto y sabiendo que la N-acetilglucosamina y la manosa son intermediarios y componentes respectivamente del glicosilfosfatidilinositol, es probable que las disponibilidad de precursores e intermediarios de la síntesis de este compuesto estén íntimamente relacionados con factores ambientales como lo es el pH y la cascada de señalización desencadenada por este factor ambiental. Por esta razón se caracterizó la expresión del gen *GPI1* en células de dos cepas diferentes de *U. maydis* que fueron cultivadas a diferente pH y con tres diferentes fuentes de carbono a fin de determinar si además del pH, la disponibilidad de las fuentes de carbono afectan la transcripción de este gen e indirectamente la síntesis de las estructuras de GPI.

El análisis estadístico (análisis de varianza con prueba de Tukey y t de student) de los resultados de los niveles de expresión del gen *GPI1* señalan que el pH es un factor que influye de manera altamente significativamente en la transcripción de este gen, indicando que la expresión del gen *GPI1* es diferente en las tres condiciones de pH, tanto para las tres diferentes fuentes de carbono (glucosa, manosa y glicerol) en cada una de las cepas utilizadas (FB2 y BMA), formando de esta manera cada condición un grupo homogéneo diferente. De igual manera la comparación estadística de la expresión del gen en cuestión entre las cepas FB2 y BMA es diferente a pesar de las varias condiciones de cultivo, es decir, la expresión del gen *GPI* no es igual en las dos cepas (diferencia altamente significativa) en cada una de las condiciones de cultivo, siendo la excepción los grupos homogéneos que pertenecen a las condiciones de pH 7 y pH 9 con manosa como fuente de carbono donde la expresión del gen *GPI1* no es detectable. Esto probablemente se deba a que la manosa no es utilizada como precursor de síntesis de GPI y al no haber glucosa en el medio, probablemente se utilicen rutas anabólicas alternativas (Kanehisa *et al.* 2012).

El análisis de expresión por medio de microarreglos de una cepa mutante del gen *afpig-a* (homólogo al gen *GPI3* y que interviene en los primeros pasos de la síntesis de GPI) de *A. fumigatus* llevado a cabo por Yan *et al.* (2013) evidenció la dualidad de la expresión de más de tres mil genes con funciones muy diversas, así pues, la modificación en la síntesis del glicosilfosfatidilinositol alteró tanto la sobreexpresión como la represión (al menos 1.5 fold) de varios genes involucrados en alrededor de 80 rutas metabólicas diferentes, donde se encuentran genes que van desde la construcción de pared celular,

hasta otros involucrados en las vías de señalización MAPK y exporte de proteínas. Esto enfatiza que la expresión de ciertos genes está relacionada con una red de procesos dependientes unos de otros y que la alteración de alguno de ellos, afecta directamente o indirectamente sobre los demás, como sucede en el caso de la supresión de factores transcripciones como sucede con RIM101.

La caracterización completa del gen GPI1 por medio de la generación de una mutación en éste, sin duda, ayudara a esclarecer su función y su relación con el sistema de regulación por pH, además de permitir el alcance de nuevo conocimiento sobre la síntesis de glicosilfosfatidilinositol en hongos basidiomicetos.

Conclusiones

No existe variabilidad importante en la secuencia del gen GPI1 de la cepa FB2 de *Ustilago maydis* obtenida en este trabajo con la reportada en la base de datos existente del National Center of Biotechnology Information.

La disponibilidad de diversos carbohidratos como única fuente de carbono y la variabilidad de pH en el medio de cultivo tienen un efecto directo con la expresión del gen GPI, el cual está relacionado con el aspecto morfológico en las células de *Ustilago maydis*.

El pH y la fuente de carbono tienen una influencia altamente significativa sobre la expresión del gen GPI1 en las cepas FB2 y BMA del hongo *Ustilago maydis*.

La expresión del gen GPI1 exhibe un comportamiento diferente altamente significativo entre las cepas FB2 y BMA de *Ustilago maydis* y está relacionado con la señalización por pH y variabilidad de fuentes de carbono.

La generación de una cepa mutante de *Ustilago maydis* terminara de esclarecer la función de gen GPI1 en este hongo basidiomiceto y contribuirá al entendimiento de la relación entre la señalización por pH y la síntesis de glicosilfosfatidilinositol.

Perspectivas

La caracterización de la un cepa mutante del gen GPII permitirá afirmar la función hipotética de éste, por lo que la realización de estudios sobre la síntesis bioquímica de glicosilfosfatidilinositol, ayudaran a determinar el efecto que tiene al alteración de los primeros pasos de síntesis de esta estructura sobre otros procesos celulares.

El análisis de expresión del gen GPII en tiempo real a diferentes tiempos y escalas de pH permitirá comprender el comportamiento de este gen e identificar el pH umbral para la expresión y su relación con el cambio de la morfología celular, así como un análisis a mayor detalle del análisis expuesto en este trabajo.

Bibliografía

1. Aguilar-Uscanga B., Francois J.M. (2003) A study of the yeast cell wall composition and structure in response to growth conditions and mode of cultivation. *Letters in Applied Microbiology*, 37, 268–274.
2. Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. & Lipman, D.J. (1990) "Basic local alignment search tool." *J. Mol. Biol.* 215:403-410
3. Aréchiga-Carvajal, E. T., & Ruiz Herrera, J. (2005). The Rim101/pacC homologue from the basidiomycete *Ustilago maydis* is functional in multiple pH-sensitive phenomena. *Eukaryotic Cell*, 4(6), 999-1008.
4. Banuett , F., & Herskowitz, I. (1989). Different alleles of *Ustilago maydis* are necessary for maintenance of filamentous growth but not for meiosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86(15), 5878–5882.
5. Bimboim, H. C., & Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid dna. *Nucleic Acid Research*, 7(6), 1513-1523. doi: 10.1093/nar/7.6.1513
6. Bölker M., (2001). *Ustilago maydis* a valuable model system for the study of fungal dimorphism and virulence. *Microbiology*, 147, 1395–1401.
7. Bowman, S. M., Piwowar, A., Al Dabbous, M., Vierula, J., & Free, S. J. (2006). Mutational analysis of the glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchor pathway demonstrates that GPI-anchored proteins are required for cell wall biogenesis and normal hyphal growth in *Neurospora crassa*. *Eukaryotic Cell*, 5(3), 587-600.
8. Carlile, M., Watkinson, S. C., & Gooday , G. W. (2001). *The fungi*. (2nd ed., pp. 57-79). London, England: Academic Press.
9. Coronado , J. E., Mneimneh , S., Epstein , S. L., Qiu, W., & Lipke, P. N. (2007). Conserved processes and lineage-specific proteins in fungal cell wall evolution. *Eukaryotic Cell*, 6(12), 2269-2277.
10. Ferguson MAJ, Kinoshita T, Hart GW. Glycosylphosphatidylinositol Anchors. In: Varki A, Cummings RD, Esko JD, et al., editors. *Essentials of Glycobiology*. 2nd edition. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press; (2009). Chapter 11. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1966/>
11. Ferguson, M. A. J. (1999). The structure, biosynthesis and functions of glycosylphosphatidylinositol anchors, and the contributions of trypanosome research. *Journal of Cell Science*, 112, 2799-2809.
12. Gonzalez M., Goddard N., Hicks C., Ovalle R., Jue C., Lipke P. (2010). A screen for deficiencies in GPI anchorage of Wall glycoproteins in yeast. *Yeast* 27:583-596.
13. Grimme , S., Colussi , P., Taron , C., & Orlean , P. (2004). Deficiencies in the essential smp3 mannosyl transferase block glycosylphosphatidylinositol

- assembly and lead to defects in growth and cell Wall biogenesis in *Candida albicans*. *Microbiology*, 150, 3115-3128. doi: 10.1099/mic.0.27254-0
14. Herrera, T., & Ulloa, M. (1990). *El reino de los hongos: Micología básica y aplicada*. (2nd ed.). Mexico : Universidad Nacional Autónoma de México.
 15. Hoessli, D. (1999). *Gpi-anchored membrane proteins and carbohydrates*. (1 ed., Vol. 7). Austin, TX, USA : Landes Company.
 16. Ikazawa , H. (2002). Glycosilphosphatidylinositol (GPI)-anchored proteins . *Biol. Pharm. Bull.*, 25(4), 409-417.
 17. Kämper, J., Kahmann, R., Bölker , M., Ma, L., Bretfort, T., Saville, B., Baunett, F., &Kronstad, J. (2006). Insightsfromthegenome of the biotrophic fungal plant pathogen *Ustilago maydis*. *Nature*, 444(2), doi: 10.1038/nature05248
 18. Kanehisa, M., Goto, S., Sato, Y., Furumichi, M., and Tanabe, M. (2012); KEGG for integration and interpretation of large-scale molecular datasets. *Nucleic Acids Res.* 40, D109-D114
 19. Klis F.M., Boorsma A. De Groot P. J. W. (2006). Cell wall construction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 23: 185–202.
 20. Leidich S., Orlean P. (1996). Gpi1, a *Saccharomyces cerevisiae* protein that participates in the first step in glycosilphosphatidylinositol anchor sythesis. *The Journal Of Biological Chemistry* 271:27829-27837.
 21. Leidich, S. D., Kostova, S., Latek , R. R., Costello , L. C., Drapp, D. A., Grey, W., Fasler , J. S., &Orlean , P. (1995). Temperature-sensitive yeast GPI anchoring mutants gpi2 and gpi3 are defective in the synthesis of n-acetylglucosaminyl phosphatidylinositol. *Journal of Biological Chemistry*, 270(22), 13029-13035.
 22. Li, H., Zhou, H., Luo, Y., Houyang, H., Hu, H., & Jin, C. (2007). Glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchor is required in *Aspergillus fumigatus* for morphogenesis and virulence. *Molecular Microbiology* , 64(4), 1014-1027.
 23. Magnus M., (2004) GENtle DNA software 1.9.4, University of Cologne, Alemania
 24. Maneesri, J., Azuma , M., Sakai, Y., Igarashi, K., Matsumoto, T., Fukuda, H., Kondo, A., & Ooshima , H. (2005). Deletion of mcd 4 involved in glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchor synthesis leads to an increase in beta-1,6-glucan level and a decrease in gpi-anchored protein and mannan levels in the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal Of Bioscience and bioengineering*, 99(4), 354-360.
 25. Martínez-Espinoza A., García-Pedrajas M, Gold S. (2002). The Ustilaginales as Plant Pests and Model Systems. *Fungal Genetics and Biology*, 35, 1–20.
 26. Mewes HW, Frishman D, Gruber C, Geier B, Haase D, Kaps A, Lemcke K, Mannhaupt G, Pfeiffer F, Schuller C, Stocker S, Weil B. (2000). MIPS: A database for genomes and protein sequences. *Nucleic Acids Research Jan 1;28(1):37-40*

27. Moran, A. P. (2009). *Microbial glycobiology. structures, relevance and applications*. (1st ed., pp. 169-183). San Diego, California, USA :Elsevier.
28. Mouyna, I., Fontaine, T., Vai, M., Monod, M., Fonzi, W., Diaquin, M., Popolo, L., & Hartland, R. (2000). Glycosylphosphatidylinositol-anchored glucanoyltransferases play an active role in the biosynthesis of the fungal cell wall. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(20), 14882-14889.
29. Nozawa, S. R., May, G. S., Martinez-Rossi, N. M., Ferreira-Nozawa, M. S., Coutinho-Netto, J., Maccheroni, W., & Rossi, A. (2003). Mutation in a calpain-like protease affects the posttranslational mannosylation of phosphatases in *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genetics and Biology*, 38(2), 220-227.
30. Orlean, P. (2012). GPI anchoring of protein in yeast and mammalian cells, or: how we learned to stop worrying and love glycospholipids. *Thematic review series: Lipid Posttranslational Modifications*, 48, doi: 10.1194/jlr.R700002-JLR200.
31. Popolo, L., Vai, M., Gatti, E., Porello, S., Bonfante, P., Balestrini, R., & Alberghina, L. (1993). Physiological analysis of mutants indicates involvement of the *Saccharomyces cerevisiae* GPI-anchored protein gpII5 in morphogenesis and cell separation. *Journal Of Bacteriology*, 175(7), 1879-1885.
32. Ramon, A., Porta, A., & Fonzi, W. (1999). Effect of environmental pH on morphological development of *Candida albicans* is mediated via the pacC-related transcription factor encoded by *pr2*. *Journal of Bacteriology*, 181(24), 7524-7530.
33. Rasband, W.S.(1997-2012), ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <http://imagej.nih.gov/ij/>.
34. Robin Holliday (1961). Induced mitotic crossing-over in *Ustilago maydis*. *Genetical Research*, 2, pp 231-248. doi:10.1017/S0016672300000720.
35. Ruiz Herrera, J., León, C., Guevara Olvera, L., & Cárabez Trejo, A. (1995). Yeast-mycelial dimorphism of haploid and diploid strains of *Ustilago maydis*. *Microbiology*, 141(3), 695-703. doi: 10.1099/13500872-141-3-695
36. Ruiz-Herrera, J. (1998). The fungus *Ustilago maydis*, from the Aztec cuisine to the research laboratory. *Internal Microbiol*, 1, 148-159.
37. Ruiz-Herrera, J., & León-Ramírez, C. G. (2012). Development and dimorphism of the phytopathogenic basidiomycota *Ustilago maydis*. In J. Ruiz-Herrera (Ed.), *Dimorphic Fungi: Their Importance as Models for Differentiation and fungal pathogenesis* (1st ed., pp. 105-112). Retrieved from <http://books.google.com.mx/books?id=npvcvGsd0hnwC&lpg=PA114&dq=ustilago maydis&hl=es&pg=PA109>
38. Sambrook, J., & Russell, D. (2001). *Molecular cloning. a laboratory manual*. (3rd ed., Vol. 1, p. 6.31). United States of America: Cold Spring Harbor.

39. Schmitz, B., Klein, R. A., Egge, H., & Katalinic, H. P. (1986). A study of the membrane attachment site of the membrane-form variant surface glycoprotein from *Trypanosoma brucei* using lipid vesicles as a model of the plasma membrane. *Molecular and Biochemical Parasitology*, (20), 191-197.
40. Steverding, D. (2000, January 01). The transferrin receptor of *Trypanosoma brucei*. *Parasitology International*, 48(3), 191-198.
41. Stewar, C., Lukowitz, W., Brininstool, G., Sedbrook, J., Hamann, T., Poindexter, P. & Somerville, C. (2005, April). Glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins are required for cell wall synthesis and morphogenesis in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 17(4), 1128-1140.
42. Tarutani, M., Itami, S., Okabe, M., Ikawa, M., Tezuka, T., Yoshikawa, K., Kinoshita, T., & Takeda, J. (1997). Tissue-specific knockout of the mouse pig-a gene reveals important roles for GPI-anchored proteins in skin development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94, 7400-7405.
43. Tropp, B. E. (2012). *Molecular biology*. (4th ed., pp. 265-267). United States of America: Jones and Bartlett Publishers.
44. Vossen, J. H., Müller, W. H., Lipke, P. N., & Klis, F. M. (1997). Restrictive glycosylphosphatidylinositol anchor synthesis in *incwh6/gpi3* yeast cells causes aberrant biogenesis of cell wall proteins. *Journal of Bacteriology*, 179(7), 2202-2209.
45. Wan, X., & Xu, D. (2005). Computational methods for remote homolog identification. *Current Protein and Peptide Science*, 6(6).
46. Waterhouse, A.M., Procter, J.B., Martin, D.M.A, Clamp, M. and Barton, G. J. (2009)
 "Jalview Version 2 - a multiple sequence alignment editor and analysis workbench"
Bioinformatics 25 (9) 1189-1191 doi: 10.1093/bioinformatics/btp033
47. Yan, J., Du, T., Zhao, W., Hartmann, T., Lu, H., Lü, Y., Ouyang, H., & Jiang, X. (2013). Transcriptome and biochemical analysis reveals that suppression of GPI-anchor synthesis leads to autophagy and possible necroptosis in *Aspergillus fumigatus*. *PLOS ONE*, 8(3), doi: 10.1371/journal.pone.0059013
48. Yin Q., de Groot P., de Koster C., Klis F. (2008). Mass spectrometry-based proteomics of fungal cell wall glycoproteins. *Trends Microbiology*. 16:20-26

Anexos

A) Secuencia del gen GPII de *Ustilago maydis* cepa FB1. Número de acceso NCBI “BankIt1695469 Ustilago KJ361507”

> GPII *U. maydis*

```
TGGGACACAGACATGGGCGACACTCGTGACTGACGACTCGACGTGCGACGCGGAGATGT
GAGACACGAACAGAGATGTTATATCGACATACGTTTTATGCTCATTCCGCTAAAAAGGG
CGAACCGTGAATCGTGAATCACGAATCAGATCACTTTCCGCAGTCACGAGGCTCTGGAG
TGCTTTATTTCCCGTGATTCTAAAATGAGAAAAGTTTCAGCACGCAAGTAAGTGAGTCACG
AGTGGGATTTTCAAGTTAAGTATTATAATTTGAACTTGTGCGAAAAGGGGATCGACAAC
CATCAGAATTTTTCAGCACACGCTTCTTCTCTTCCATCATCGACGGTAACGGCACAGTCC
GATTCGGTAGTGTACACACAGAGTGAGTATCCAATCAGGCAAGTACAGCCATCGATTG
TATCGAATCCCTTTCTGTGTCAAAGGATGATAAACACTTTCACAGACCTGATCCGAAAC
ACCTTTGAGCCGAATCAGCTCAGAGGGTCAGAGGACAACCACTTTATTGCCTATTTTTG
GCTGATCACATGGAAGAGGCATCGGTACATTCTCGTTGGGTATGGATCGCACTTGCTGA
CCGAATTTTGGGTTTTCTGACTTGATGCAATAGATTCCAGATGCTCCGTTTTGTCCATTT
CAGCAGCTTCGTGCCCTCCGCGTACCTGTTTCGAGGTCGTGGTAAATTTCCGTCAGAAAG
ATGTCACATTTTGAAGCAACAAACATCAAGAAGCGGTCATCGATACCCGCACAACAGGA
CGAGGTAGATGCGCGTGCCCATGGCATGGCTATTACCGCAACGTTTTGATGTGGCAGGCA
TTGAAAGCTTGCTTGTCTTTTGGCCGGACAAGCTGGTTCGACCTGTCCCCGCTCGTCGCT
GCTCAACGCAAGATCGGTCCACAACAGGATGGAATTCAGCGAGGCTGCTTGTCCGCAA
TATTGTTTCATGGCCATTCATGCGAGGCAGCTGTCGTTATCGTTGGGACCATCCAAGTGT
CGGACTTTGACCACATTTTCGAGCAAGATCGTCGCAAACGGGCTTCGTGTTGTTGGGTCC
ATGCCGACCACCAGACAAAACACGGAATCTTCGGCACCTCTACCTCTACTATGCTCGC
TGATAGTCCGGTCTGGTTGTTTCATGTCATCGTTTTGCCCACGAGGAGCTACCGTCAG
TCACGTCTGTGAAATTTTCGCGGATCAGTTTTCCGGTGATGGTCATGCTGATATCTGTGCA
GCACATATCCACCCAGCTCCCTGTGCGGTCACTATGATTCGCTACAGCGTGCCAGCTC
GCGGATGTTGCAATACTTTGCACTCGAGCCGCTTCGGCTTGCTCCTGTCTCGGGTATGA
AGCTCGTATCGACCGCGAAAGCTCTGCTCGTGCCCGATTCTCAGCTCTCGGCCACTCT
AGCCTCCTTGCTGCCAGTTCAGCACCATCAGAGCTCGAGAACAAGTTCCTGCAGCTGCT
CATGCTGGATCCGCTCCATTGGCATTCTTCCGCAGCGTCGGCCCGCATCAGTGTCAA
TGCCTTGCGGCACAGCCCTTCGTAGAGCCATCAAGTATGTCAACCGTCTGCAAGCTCAG
CACGAGTGCCTAGCTGCTTCCCTCAAGCCAAAATGGCGCCGGTAATGGAGCGATTCT
TCCATCGCGCTACGGCATCAAAGCTAGCGTCTCGACCGGCCCGCTTGCGCGGGTTCGGCA
AAGCAGCGACCCTGATGGCTCTTGTGTTTCAGGCGATTTTGCAGCACCCGCTATTTACG
GTCAAGAAACGCGCTATAGTGATTGATGGCGTGCGGAGACGGCTACCTGGTTCCCAGGC
TAGAAACTGGAGCCTAACAAAGCGTGTGTCAGCGAGCGCGAGGCAACTCAACGTACGCATCT
CGCAGCTAGTTGTTGCTCCTCGGCTGGCTTCGCGATTGCGCTACCTGCGCAAGCAACAG
ACACTACCTATCGACGAGATTGCTGCGCCTTATATCGGGTTGTGGAACGCTGTTTGGCT
GATTGCCAACGATGTTATCTTGGGTTATGCCGCCAGTGTTTTGCTACTTCAATATAGAT
CGCAGCTAGCGCAATTGTGCCGCGACCTATCAGAACGCTTTTCTAGTAGACTCGATATTG
TGGTTGCTCTCATGGCTCGAGAACTGGCCAGCGGGATTGAAGCTCAACACAGAGCTGTC
TCTGTTCTTCAGCGATGCCTATTCTTCGCTCACGATTGCCTGGCAAGCTCAGGGATTGG
```

GTTACGTTCTGCCGCGGCTAGAGACCATCATCACTGCAATGGCAATTGCTGGCCGGTTG
ATGGGAGTGACCATGGTGTGTTTTGCATGGTGCAGGATCTCGTATCGATCTGCACGTTGCA
CATCACGGTGTTCTACACCTTGTCTGTTCAAGACGATGCGCGCATTTTGTGTATGTACTCT
TGTCGCTTTTCGACATGTTCCGAGGCAAGAAGCGAAATGCGCTACGAGGTGGCCGATTG
GACGACGCAAGCTACGAGCTGGATCAGTTGCTACTTGGAACTCCTTTTCACGTTGGT
CGCGTTCCGTGTTCCCCACAGTGTACGTCTACTATCTGGCTTTCGGATTGATCCGCTTCG
CGGTGGTAGCGTTCGAAGCTGGTATTGTTGAGACGTGCTTGGCACTGCTCAATCATCTG
CCTATGTTTGCCTCATGCTACGCGTCAAGGATCCGCATCGATTGCCAGCTGGCGTCTG
GTTGCAAGAGCTCGGAACGCGAGTCAGTAACGATACTTCTGATGATACACACGCTTTGC
CAATGAGTCGATTCCGACTGCGTTGTCGACCTCTGACGGTCAGCGATATCTTTGAAGGC
TATGGACAGCATGTTTCGGGACTTTTTGAAGTACCAGAGATGCTCTTGCGATGCATCTT
TGGCCGCTCGCTACGGTCATCGCCGCCGACAATGTAGTGTAATTGAATCTGGTCTTATT
AGGCCCAATATCTGAACGCAACGTAGATTGTGGAGAGTCGTATGCTAGCATCAGCCGCA
GAAGTGAATTGATCCCCTCGACTGCGTCTGAATGTCAATGAATCGGGACCCCTATCAC
AACTTGCGTTCAGCTCCTTGAGCGAATCACGAAATGAATACTTAACAGCGAGCGAGAAC
TAATATATGTTAAGTTGACAAAAGGAAAAGCGAGCCGGATCTTTACCGATCCCAAACG
CAGCGCTGATGCAGGGTTAGGGTTGCTCATAGTTGACGAAATCAGCCCAGATAGACGC
AATTACGAATCCAACTAAATGAAGGGTTTGCCCTCGAAAATTCAAATTTTCGCAGTCACA
GTAGCAGGAAAGGCGCTGCTCGTGGCTCGCGGCTCGAGGCTCGGTGCAGCGGGGTCGAG
GATGTGGGTTGCTAAAGGCCAAGGCATCTCTGCA