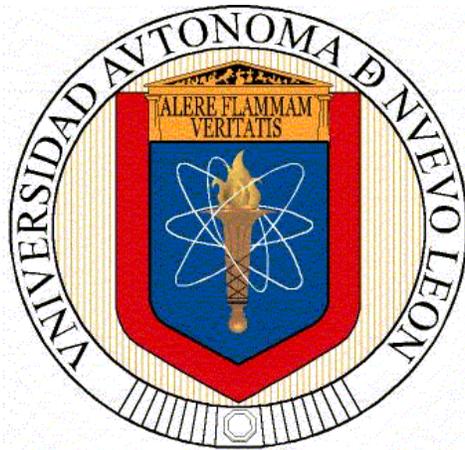


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



**RESPUESTA A ESTRÉS IÓNICO/pH ALCALINO  
EN *Ustilago maydis* (STEVENSON AND JOHNSON, 1944)  
(*Ustilaginales, Ustilaginaceae*).**

**POR**

**ADRIANA MAYREL MARTHA PAZ**

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO  
DE MAestrÍA EN CIENCIAS CON ACENTUACIÓN  
EN MICROBIOLOGÍA.**

**MAYO 2015**

**RESPUESTA A ESTRÉS IÓNICO/pH**

**ALCALINO EN *Ustilago maydis*.**

**Comité de Tesis**



---

**Dra. Elva Teresa Aréchiga Carvajal**

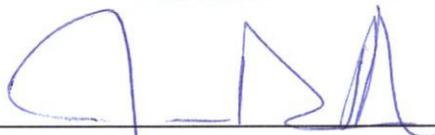
**Directora de Tesis**



---

**Dra. Susana Favela Lara**

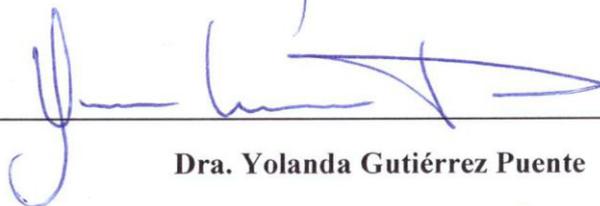
**Secretaria**



---

**M.C. Juan Manuel Adame Rodríguez**

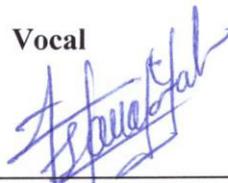
**Vocal**



---

**Dra. Yolanda Gutiérrez Puente**

**Vocal**



---

**Dr. Arturo Espinoza Mata**

**Vocal**

## AGRADECIMIENTOS

A mis padres Rosalía y Ramiro, por su apoyo incondicional, por enseñarme con su ejemplo a jamás rendirme, gracias por darme la oportunidad de tener una vida hermosa a su lado, siempre están en mi mente y corazón.

A ti mami Mari, gracias por siempre estar a mi lado, por nunca dejarme sola, por luchar para lograr mis metas, que se han convertido en tuyas, y que poco a poco hemos ido logrando juntas, te admiro por ser como eres, simplemente maravillosa.

A mis hermanos Samuel y Kevin quienes me han apoyado y han tenido que sacrificarse, para que yo haya llegado hasta aquí, nunca terminaré de agradecerles. También gracias a ti hermana Imelda por tu apoyo, por estar conmigo en todo momento. A mis hermanas Alibeth, Mónica y Armida quienes siempre están ahí para mí.

Gracias a Daniel, mi colega favorito, quien vivió este proyecto como si fuera suyo, de quien he aprendido muchas cosas, gracias a tu ayuda y consejos todo esto fue posible.

A la doctora Elva, quien ha sido mi guía, mi apoyo y mi maestra, quien me abrió las puertas de la ciencia y creyó en mí, pero lo más importante me enseñó a hacerlo también a mí, festejó mis logros y sufrió mis fracasos, estuvo conmigo en esos momentos difíciles, estoy infinitamente agradecida.

Agradezco al doctor David Eide por recibirme en su laboratorio y darme la oportunidad de aprender de alguien como él, quien no solo me compartió su sabiduría, si no que me enseñó el gran respeto y admiración que se le puede tener a una persona que se muestra tan sencilla y humilde, sin duda él es un gran ejemplo para mí. Gracias a Janet, Michael, Jeeyon y Colin por su paciencia y por ayudarme en todo momento, por haber compartido sus conocimientos conmigo, sin ustedes esto no hubiera sido posible.

Es importante mencionar a la Sra. Nancy Aguilar y Sr. Francisco Herrera, quienes me abrieron las puertas de su casa durante mi estancia en Wisconsin, y nunca me dejaron sola, dios los bendiga siempre por ese gran corazón.

Gracias a mis amigos, aquellos hermanos que tuve la fortuna de elegir, Mariana, Alejandro y Alberto, quienes me acompañaron en esta aventura y de quienes aprendí lo hermosa que es la vida cuando se comparte con personas como ustedes.

Agradezco a mis compañeros de la unidad de manipulación genética, amigos, que fueron y son como mi familia, Diego quien compartió muchos de sus conocimientos conmigo, al igual que Cecy, Asael, Adriana, Madory, Eduardo, Luisa (Hija), Paola (Nieta), Irasema, Eli, Carmen, Ana y Yolanda.

A Omar Tovar por siempre apoyarme con el prestamo del Thermo.

Agradezco a los doctores Arturo Espinoza, Guadalupe Rojas, Juan Alcocer por prestarme las instalaciones de su laboratorio y su equipo para llevar a cabo el proyecto.

A la doctora Susana Favela y a Teresa Carreón por compartir sus conocimientos conmigo, al doctor Mercado por ayudar con los aspectos de bioestadística y contribuir con ello al desarrollo de la tesis.

Gracias a la Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Ciencias Biológicas y a la Universidad de Wisconsin-Madison, departamento de ciencias nutricionales, por aportar las instalaciones y equipo necesario para el desarrollo de este proyecto y permitirme crecer personal y profesionalmente.

Al consejo de ciencia y tecnología por el apoyo económico, y por hacer posible la superación de miles de personas.

¡Gracias a todos por formar parte de este proyecto!

“Debo dar gracias a todos aquellos que me dijeron no. Gracias a ellos, lo logré.”

– **Albert Einstein** –

## **DEDICATORIA:**

### **Con todo mi amor dedico este trabajo a mi familia.**

A mis padres, Rosalía Paz y Ramiro Martha. El mejor ejemplo de vida, de amor y respeto, quienes me salvaron y me salvan cada día, me dan la fortaleza para continuar, son los ángeles que vinieron a dar sentido a mi vida, soy infinitamente bendecida por ser su hija, y sin ustedes nada en mi vida sería posible.

Maribel, mi madre y amiga, por ser esa mujer excepcional, que jamás se da por vencida, a quien no le asusta nada, siempre se levanta tras una caída, y lo da todo por sus hijos, tú mi mejor maestra, quien ha creído en mí y me ha impulsado a lograr las metas que parecían imposibles, ¡lo logramos mami!

A mis hermanos Samuel y Kevin quienes siempre están en mi mente y por quienes me esfuerzo para ser un buen ejemplo y mejor persona. A Imelda, con quien tuve la dicha de crecer y amar como verdadera hermana.

Daniel, mi mejor amigo, mi compañero de vida, a quien le ha tocado la mejor y peor parte de mi persona, y aun así me brinda su mejor versión en todo momento, quien me protege y me levanta en esos días grises, y con quien he vivido los mejores momentos.

## LISTA DE TABLAS:

Tabla	Página
I. Resumen de cepas utilizadas en el presente trabajo.....	29
II. Plásmidos empleados en el proyecto.....	30
III. Componentes de reacción de PCR llevada a cabo con enzima Easy-A.....	46
IV. Programa de PCR implementado tras el uso de enzima Easy-A.....	47
V. Reacción de PCR realizada mediante la enzima BIOLASE™.....	47
VI. Programa de PCR realizado con el uso de la enzima BIOLASE™.....	48
VII. Componentes de reacción de RT-PCR.....	49
VIII. Programa utilizado para reacción de RT-PCR.....	49
IX. Oligonucleótidos para la amplificación de umZRT1 y umZRT2 con regiones H5' y H3'.....	50
X. Oligonucleótidos utilizados para la secuenciación de las construcciones pDR195umZRT1 (96 <sup>a1</sup> y 96 <sup>b3</sup> ) y pDR195umZRT2 (10 <sup>a1</sup> y 10 <sup>b1</sup> ).....	51

XI.	Oligonucleótidos diseñados para el desarrollo de RT-PCR punto final.....	51
XII.	Oligonucleótidos diseñados para el desarrollo de construcciones de delección mediante la técnica DelsGate.....	52
XIII.	Componentes de reacción de recombinación para el desarrollo de construcción de delección.....	64
XIV.	Reacción de restricción general.....	65
XV.	Reacción para secuenciación con enzima Big Dye™.....	66
XVI.	Programa para secuenciación con Big Dye™.....	66
XVII.	Factores de transcripción con posible función reguladora de los genes de interés.....	80
XVIII.	Componentes de reacción de restricción para linealización del plásmido pDR195 con enzima NotI. ....	85
XIX.	Componentes de las reacciones de restricción para la caracterización de construcciones pDR195umZRT1 (a y b) y pDR195umZRT2 (a y b).....	91
XX.	Estadísticos descriptivos de absorbancias en base a cada tratamiento y concentración de ZnCl <sub>2</sub> .....	101
XXI.	Pruebas de los efectos inter-sujetos.....	102
XXII.	Comparaciones múltiples, DHS (honest significant difference) de Tukey.....	103
XXIII.	DHS de Tukey.....	104

## LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Principales manifestaciones del carbón común del maíz.....	4
2. Ciclo biológico del hongo fitopatógeno <i>Ustilago maydis</i> .....	7
3. Procesamiento y conformación de la proteína PacC de <i>A. nidulans</i> .....	11
4. Topología de proteínas integrantes de la familia ZIP.....	17
5. Estructura en común de las proteínas de la familia CDF.....	19
6. Anatomía del factor de transcripción Zap1p.....	21
7. Mecanismos para la homeostasis de zinc en <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	26
8. Esquema de construcción de plásmidos de expresión con pDR195.....	61
9. Diagrama de la recombinación <i>in vitro</i> mediante la tecnología DelsGate.....	63
10. Dominios funcionales de umZrt1p caracterizados <i>in silico</i> .....	69
11. Dominios funcionales en umZrt2p caracterizados <i>in silico</i> .....	70

12. Predicción <i>in silico</i> de la topología de umZrt1p y umZrt2p.....	71
13. Comparación aminoacídica entre um00096/umZrt1 y diferentes organismos. ....	72
14. Proteína um03110/umZrt2 comparada con secuencias aminoacídicas de diferentes organismos.....	72
15. Alineamiento de secuencias proteicas de um00096 de <i>U. maydis</i> con Zrt1p de <i>S. cerevisiae</i> .....	73
16. Alineamiento de secuencias proteicas de um03110 de <i>U. maydis</i> con Zrt2p de <i>S. cerevisiae</i> .....	73
17. Relación evolutiva de umZrt1p y umZrt2p con otros organismos por el método Neighbor-Joining. ....	76
18. Análisis filogenético molecular por el método de Máxima verosimilitud de umZrt1p y umZrt2p, con otros organismos.....	78
19. Variación del pH por las cepas de <i>U. maydis</i> FB <sub>2</sub> y BMA2 en medio mínimo sin amortiguador.....	81
20. Curva de variaciones de pH por las cepas de <i>U. maydis</i> FB <sub>2</sub> y BMA2 en MM con buffer TRIS.....	82
21. Electroforesis de DNA genómico de la cepa FB <sub>2</sub> .....	83
22. Electroforesis de fragmentos correspondientes a los genes umZRT1 y umZRT2 flanqueados por las secuencias H5' y H3'.....	84
23. Electroforesis de la restricción de pDR195 con la enzima NotI.....	85
24. Resultado de transformación de la cepa BY4743 con los controles y pDR195umZRT1 y pDR195umZRT2.....	87

25. Gel comprobatorio de extracción de los plásmidos pDR195umZRT1 (a y b) y pDR195umZRT2 (a y b).....	88
26. Electroforesis de DNA plasmídico extraído de la cepa DH5α de <i>E. coli</i> previamente transformada con material genético de las colonias seleccionadas de las reacciones pDR195umZRT1 (a y b) y pDR195umZRT2 (a y b).....	89
27. Mapas de restricción de los plásmidos pDR195umZRT1 y pDR195umZRT2.....	91
28. Electroforesis de la caracterización de los plásmidos pDR195umZRT1 (a y b).....	92
29. Electroforesis de la caracterización de construcción pDR195umZRT2 (a y b). ....	93
30. Alineamiento de los nucleótidos obtenidos por secuenciación, de las construcciones pDR195umZRT1 (96 <sup>a1</sup> y 96 <sup>b3</sup> ) con el marco de lectura abierto de um00096 (umZRT1).....	94
31. Alineamiento del marco de lectura abierto del gen um03110 (umZRT2) con los nucleótidos obtenidos por secuenciación a partir de las construcciones pDR195umZRT2 (10 <sup>a1</sup> y 10 <sup>b1</sup> ).....	95
32. Resultados obtenidos de complementación de la cepa ZHY3 con construcciones pDR195umZRT1 (a y b) y pDR195umZRT2 (a y b).....	97
33. Curva de crecimiento de las cepas AMP96: 96 <sup>a1</sup> , 96 <sup>b3</sup> , RRM10: 10 <sup>a1</sup> , 10 <sup>b1</sup> y controles ZHY3/pMC5 y ZHY3/pDR195 en LZM adicionado con 1μM, 10μM, 100μM y 1000μM de ZnCl <sub>2</sub> .....	98
34. Crecimiento de las cepas AMP96, RRM10 y controles ZHY3/pMC5 y ZHY3/pDR195 en LZM sólido, en diferentes concentraciones de ZnCl <sub>2</sub> .....	100

35. Gráfica de medias observadas de los grupos de subconjuntos homogéneos más/menos una desviación estándar.....	105
36. Crecimiento de las cepas FB <sub>2</sub> y BMA2 en LZM4, 7 y 9.....	106
37. Crecimiento de cepas FB <sub>2</sub> y BMA2 en LZM4, 7 y 9 adicionados con 10X.....	107
38. Estandarización del crecimiento de FB <sub>2</sub> y BMA2 en LZM9, ante diferentes tratamientos de metales.....	108
39. Electroforesis de RNA de las cepas FB2 y BMA2 de <i>U. maydis</i> crecidas en LZM4 y 7.....	109
40. Electroforesis de RT-PCR punto final mostrando la expresión de genes de FB <sub>2</sub> y BMA2, en LZM4 y 7.....	111
41. Electroforesis de las reacciones correspondientes a la estandarización de la amplificación de los promotores y terminadores de umZRT1 y umZRT2.....	113
42. Electroforesis de DNA plasmídico obtenido mediante recombinación de insertos (Promotor y terminador) con el plásmido pDONR-Hyg-Lyase con la técnica DelsGate.....	114

## LISTA DE SÍMBOLOS

### Símbolo

°C	Grados Celsius
μl	Microlitros
™	Trade mark
®	Registrado
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)
Cat	Catálogo
CDF	Cation Diffusion Facilitator
cDNA	Ácido Desoxirribonucleico cadena complementaria
DEPC	Dietilpirocarbonato
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EGTA	Ácido etilenglicoltetraacético
g	Gramos
h	hora, horas.

Kb	Kilobases
L	Litro
LB	Luria-Bertani
lb	Libras
LZM	Low zinc médium (Medio bajo en zinc)
M	Concentración Molar
MC	Medio completo
MM	Medio mínimo
mg	Miligramos
min	Minutos
ml	Mililitros
mM	Concentración milimolar
MOPS	Ácido mofolinopropanelsulfónico
MTs	Metalotioneínas quelantes de zinc
NCBI	National Center of Biotechnology Information (Centro Nacional de Información Biotecnológica)
neg	Negativo
ng	Nanogramos
NTA	Ácido nitrilotriacético
num	Número
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
pg	Picogramos
RE	Retículo endoplásmico
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
tip	Típica
T <sub>m</sub> °	Temperatura de alineamiento
TRIS	2-Amino-2-hydroxymethyl-propane-1,3-diol
V	Voltz
v	Volumen.
YPD	Yeast Extract-Peptone-Dextrose
ZIP	Zrt-, Irt-like Proteins.
ZREs	Zinc-responsive element
Zrt	zinc-regulated transporter

## TABLA DE CONTENIDO

Sección	Página.
AGRADECIMIENTOS.....	iii
DEDICATORIA.....	v
LISTA DE TABLAS.....	vi
LISTA DE FIGURAS.....	viii
LISTA DE SIMBOLOS.....	xii
RESUMEN.....	xxi
ABSTRACT.....	xxii
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES.....	3
2.1. Generalidades de <i>Ustilago maydis</i> .....	3
2.1.1. Ciclo de vida de <i>U. maydis</i> .....	5
2.1.2. <i>Ustilago maydis</i> como modelo de estudio.....	7
2.2. Respuestas homeostáticas ante variaciones de pH en hongos.....	9
2.2.1. Conformación y procesamiento de PacC/Rim101.....	10

2.2.2. Efecto del pH en la biodisponibilidad de metales.....	12
2.3. El zinc como elemento fundamental en los organismos.....	13
2.3.1. Funciones biológicas del zinc.....	13
2.3.2. Homeostasis de zinc.....	14
2.3.3. Mecanismo homeostático de zinc en levaduras.....	21
2.3.3.1. Mecanismo de homeostasis ante la deficiencia y condiciones elevadas de zinc.....	22
3. HIPÓTESIS.....	27
4. OBJETIVOS.....	28
4.1. Objetivo general.....	28
4.2. Objetivos específicos.....	28
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	29
5.1. Microorganismos y su conservación.....	29
5.2. Plásmidos.....	30
5.3. Medios de cultivo .....	30
5.3.1. Crecimiento de cepas de <i>U. maydis</i> .....	31
5.3.2. Desarrollo de cepas correspondientes a <i>S. cerevisiae</i> :.....	32
5.3.3. Medios para el control de la concentración de zinc.....	32
5.3.4. Crecimiento de <i>Escherichia coli</i> .....	35
5.4. Estrés nutritivo.....	36
5.5. Protocolos de manipulación de ácidos nucleicos.....	37
5.5.1. Soluciones y reactivos.....	37
5.5.2. Extracción de ADN genómico.....	39

5.5.3. Extracción de DNA plasmídico por el método de lisis alcalina (Miniprep).....	41
5.5.4. Extracción de DNA plasmídico por kit.....	42
5.5.5. Extracción de RNA.....	43
5.5.5.1. Digestión de la muestra de RNA.....	44
5.5.5.2. Preparación de gel para corrida de RNA.....	45
5.5.5.3. Tratamiento de RNA con DNasa.....	45
5.5.6. Técnica de reacción en cadena de polimerasa (PCR).....	46
5.5.7. Síntesis de cDNA a través de retro-transcripción (RT-PCR).....	48
5.5.8. Oligonucleótidos empleados en el estudio.....	50
5.5.9. Purificación a partir de geles de agarosa.....	53
5.5.10. Elaboración de células calcio-competentes.....	54
5.5.11. Desarrollo de células electro-competentes.....	54
5.5.12. Transformación bacteriana.....	55
5.5.12.1. Cálculo de eficiencia de transformación.....	56
5.5.13. Electroporación bacteriana.....	56
5.5.14. Transformación de levaduras con acetato de litio.....	57
5.6. Análisis bioinformático.....	58
5.7. Análisis filogenético.....	60
5.8. Elaboración de vectores de expresión.....	60
5.9. Elaboración de construcciones de delección mediante la técnica DelsGate utilizando la tecnología Gateway.....	62
5.10. Linealización de vectores y caracterización de construcciones por restricción enzimática.....	64
5.11. Secuenciación de genes.....	65
5.12. Ensamblaje y edición de secuencias.....	67
5.13. Análisis bioestadístico.....	67

6. RESULTADOS.....	68
6.1. Identificación y análisis de genes transportadores de zinc en <i>U. maydis</i> .....	68
6.1.1. Estructura <i>in silico</i> de umZrt1p y umZrt2p.....	70
6.1.2. Alineamiento de secuencias aminoacídicas de umZrt1p y umZrt2p con las de otros organismos. ....	71
6.1.3. Análisis filogenético de transportadores de zinc.....	74
6.1.4. Caracterización de promotores de genes que codifican transportadores de zinc.....	79
6.2. Respuesta a variaciones en el pH extracelular por <i>U. maydis</i> .....	81
6.3. Análisis de complementación de mutantes.....	82
6.3.1. Construcción de plásmidos de expresión.....	82
6.3.1.1. Amplificación de los genes umZRT1 y umZRT2.....	83
6.3.1.2. Clonación en el plásmido pDR195.....	84
6.3.1.2.1. Linealización.....	84
6.3.1.2.2. Recombinación de umZRT1 y umZRT2 con pDR195.....	86
6.3.1.3. Extracción de material genético de la cepa BY4743 transformada con pDR195umZRT1 y pDR195umZRT2.....	87
6.3.1.4. Obtención de DNA plasmídico correspondiente a las construcciones pDR195umZRT1 (a y b) y pDR195umZRT2 (a y b).....	89
6.3.1.5. Caracterización de construcciones por restricción enzimática.....	90

6.3.1.6.	Secuenciación de construcciones pDR195umZRT1 (a y b) y pDR195umZRT2 (a y b).....	93
6.3.2.	Complementación de mutantes de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> deficientes de los genes ZRT1 y ZRT2 con las construcciones pDR195umZRT1 y pDR195umZRT2. ....	96
6.3.3.	Caracterización de las cepas complementantes.....	97
6.3.4.	Análisis estadístico de resultados de complementaciones.....	101
6.4.	Análisis de expresión.....	105
6.4.1.	Estandarización de condiciones.....	105
6.4.2.	Análisis de expresión de los genes umZRT1, umZRT2 y genes relacionados.....	108
6.4.2.1.	Niveles de expresión en ambientes ácidos.....	110
6.4.2.2.	Niveles de expresión en ambientes neutros.....	110
6.5.	Elaboración de construcciones de delección por el método DelsGate.....	112
6.5.1.	Amplificación de regiones promotoras y terminadoras de umZRT1 y umZRT2. ....	112
6.5.2.	Recombinación de genes umZRT1 y umZRT2 con el plásmido pDONR-Hyg-Lyase.....	113
7.	DISCUSIÓN.....	115
8.	CONCLUSIONES.....	120
9.	LITERATURA CITADA.....	121
10.	ANEXOS.....	136

10.1.	Secuencias de genes umZRT1 y umZRT2.....	136
10.1.1.	Marco de lectura abierto gen Um00096 (umZRT1).....	136
10.1.2.	Marco de lectura abierto gen Um03110 (umZRT2) .....	137
10.2.	Secuencias de Plásmidos .....	138
10.2.1.	pDR195.....	138
10.2.1.1.	Mapa del plásmido pDR195.....	141
10.2.2.	Plásmido pDONR-HYG-LYASE.....	141
10.2.2.1.	Mapa de pDONR-Hyg-Lyase.....	144
10.2.3.	Plásmido pDR195umZRT1.....	144
10.2.3.1.	Mapa de plásmido pDR195umZRT1.....	147
10.2.4.	pDR195umZRT2.....	148
10.2.4.1.	mapa de pDR195umZRT2.....	151

## RESUMEN

Todo organismo se enfrenta a condiciones desafiantes durante su desarrollo; variaciones de temperatura, humedad, presión osmótica y de pH, esta última condición se ve implicada en el grado de disponibilidad de nutrientes, entre ellos los metales, cuya solubilidad depende del pH del medio, por lo que la homeostasis de las concentraciones intracelulares de iones es fundamental para la fisiología de todo organismo vivo. El zinc forma parte estructural y es cofactor catalítico de numerosas enzimas y factores de transcripción, es por ello, que el transporte del metal está altamente regulado. Se han descrito transportadores de zinc y/o hierro pertenecientes a la familia ZIP, donde los principales representantes son Zrt1p y Zrt2p de alta y baja afinidad a zinc respectivamente, expresados ante condiciones limitantes de zinc en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. En el presente estudio fueron caracterizados 2 genes que codifican para transportadores de zinc en el hongo basidiomiceto *Ustilago maydis*; el gen codificado en el marco de lectura abierto um00096 corresponde a un transportador de alta afinidad a zinc, siendo ortólogo a ZRT1 de *S. cerevisiae*, mientras que el gen codificado en el marco um03110 presentó menor afinidad por el metal, nuestros resultados indican que pudiese ser transportador de otro metal. Mediante transcripción reversa y reacción en cadena de polimerasa punto final (RT-PCR), se identificó que el factor de transcripción Rim101p participa en la regulación del gen ZRT2 de *U. maydis*, actuando como represor, en ambientes ácidos y limitantes de zinc, y como activador en pH neutro y bajas concentraciones de zinc.

## ABSTRACT

Every living organism faces challenging conditions during its development; they can be; variations in temperature, humidity, osmotic pressure and pH, the latter condition is involved in the degree of nutrient availability, including metals, which solubility depend of the medium pH, because of that, homeostasis of the intracellular concentrations of ions is essential to the physiology of all living organisms. Zinc is structural part and acts as a catalytic cofactor for many enzymes and transcription factors, so the transport of the metal is highly regulated. Zinc and/or iron transporters have been described, that belongs to the ZIP family, where the main representatives are Zrt1p and Zrt2p, of high and low affinity to zinc respectively, expressed in zinc limiting conditions in *Saccharomyces cerevisiae* yeast. In the present study were characterized two genes encoding zinc transporters in the basidiomycete fungus *Ustilago maydis*, the codified gene by the um00096 open frame corresponds to a high-affinity transporter zinc, being orthologous to *S. cerevisiae* ZRT1, while the gene codified by um03110 frame had lower affinity for the metal, our results also indicate that it can transport other metal. By reverse transcription and endpoint polymerase chain reaction (RT-PCR) was identified that Rim101p transcription factor is involved in regulation of *U. maydis* ZRT2 gene as repressor, in acidic and zinc limited environments, and as an activator at neutral pH and low zinc concentration

## 1. INTRODUCCIÓN

El zinc es un componente importante para todos los organismos, ya que influye en procesos celulares imprescindibles para la vida tales como la replicación, transcripción, procesamiento de RNA, expresión génica y diferenciación celular, al formar parte estructural o como cofactor catalítico de numerosas enzimas (Kramer and Clemens, 2005). Los organismos pueden verse afectados ante condiciones limitantes de zinc, pero también por su exceso. Todas las células poseen sistemas de transporte mediante los cuales aseguran y mantienen concentraciones intracelulares óptimas del metal para su desarrollo. Un importante grupo de transportadores de zinc y/o hierro, corresponde a la superfamilia ZIP, donde los principales representantes, son los transportadores localizados a nivel membrana plasmática, uno de alta afinidad al metal, denominado Zrt1p y otro de baja afinidad nombrado Zrt2p, expresados en condiciones limitantes del metal (Zhao and Eide, 1996a; 1996b). Dichos sistemas se han encontrado en todos los niveles filogenéticos incluyendo bacterias, hongos, plantas y mamíferos (Gaither and Eide, 2001), estos han sido ampliamente estudiados en hongos ascomicetos como *Saccharomyces cerevisiae* y *Aspergillus nidulans*, y muy poco en organismos del filo Basidiomycota debido a su complejidad.

Los hongos basidiomicetos son de gran importancia, ya que dentro de esta división se encuentran hongos degradadores de la lignina (*Trametes versicolor*) (Agrios, 2005), algunos capaces de formar relaciones simbióticas con plantas de tipo ectomicorrícicas (*Amanita boletus*) (Pérez-Moreno, 2012), otros son comestibles (*Agaricus bisporus*) (Andrade *et al.*, 2012) y también los hay causantes de fitopatologías que ocasionan pérdidas económicas como lo son las royas y carbones (*Puccinia graminis* y *Ustilago maydis*) (Agrios, 2005; Rojas-Ramírez, 2013). *Ustilago maydis* es un hongo basidiomiceto, patógeno del maíz, causante de la enfermedad del carbón común del maíz (Ruíz-Herrera, 2008), ha sido considerado modelo biológico desde mediados de la década de los 40's para el estudio de las interacciones planta-microbio (Kamper, 2006). Comparado con otros sistemas, *U.*

*maydis* exhibe una número de propiedades genéticas que lo hacen un excelente candidato para elucidar mecanismos moleculares complejos (Bolker, 2001) y debido a su fácil manipulación ha servido como modelo para describir funciones en otros hongos biotróficos complejos. Al igual que otros hongos, *U. maydis* se enfrenta a condiciones desafiantes como cambios de temperatura, humedad y variaciones de pH, produciendo estas últimas variaciones en la disponibilidad de nutrientes, entre ellos seguramente de metales como el zinc, por lo cual pudiera verse forzado a implementar estrategias para lograr una homeostasis y de esa manera sobrevivir. Se ha descrito un factor de transcripción llamado PacC/Rim101p capaz de regular numerosos genes en respuesta a pH, principalmente dentro de un rango de pH neutro a alcalino (Peñalva *et al.*, 2008). Con el paso de los años se le ha ido atribuyendo una probable funcionalidad en ambientes ácidos (Trushina *et al.*, 2013). En *U. maydis* se ha descrito su participación en la regulación de genes ante un estrés iónico, deposición de septos, en la integridad de la membrana y también en la secreción de proteínas del tipo proteasas, lipasas y polisacáridos (Aréchiga and Ruiz-Herrera, 2005; O'Meara *et al.*, 2010).

Para la identificación y estudio de transportadores de zinc en *U. maydis*, se procedió al análisis bioinformático de los genes um00096 (umZRT1) y um03110 (umZRT2) del hongo, comparándolo con diferentes bases de datos y tras su caracterización, se encontró que umZRT1 codifica para un transportador de alta afinidad ortólogo a ZRT1 de *Saccharomyces cerevisiae*, mientras que umZRT2 para un transportador de menor afinidad a zinc, contribuyendo ambos a la homeostasis y supervivencia del hongo basidiomiceto. Además en el presente estudio se determinó la participación de Rim101/PacCp en la regulación de la expresión de los transportadores de zinc en *U. maydis* ante ambientes con variaciones en el pH y condiciones limitantes del metal, mediante RT-PCR punto final. Rim101p resultó solo implicado en la regulación de umZRT2 en pH ácido, actuando como represor, mientras que en pH neutro actúa como activador del mismo. Lo cual indica que dicho factor de transcripción pudiera presentar alguna forma activa de su proteína, siendo la misma funcional ante ambientes ácidos.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1. Generalidades de *Ustilago maydis*.

Es un hongo basidiomiceto denominado carbón del maíz, el cual pertenece al subfilum Ustilaginomicota y orden Ustilaginales (James *et al* 2006), que constituyen un importante grupo de hongos fitopatógenos con más de 50 géneros y 1200 especies; causales de enfermedades conocidas comúnmente como carbones (Martínez-Espinoza *et al.*, 2002; Agrios, 2005; Guerra, 2005; Ruiz-Herrera, 2008)

Existen alrededor de 1000 especies de carbones que atacan a las angiospermas de más de 75 familias (Agrios, 2005; Sharma, 2014) pero *U. maydis* solo es patógeno en el maíz (*Zea mays*) y de su probable ancestro el teocintle (*Zea mays ssp. parviglumis*) (Bolker, 2001), causando e induciendo la formación de tumores o agallas en diferentes partes de la planta, enfermedad conocida como huitlacoche o carbón común del maíz (La ambrosia de los aztecas), los tumores generados en esta infección, son considerados una delicia culinaria en diferentes regiones del centro de México, y se utilizan como alimento en diversos platillos desde el periodo precolombino (Ruíz-Herrera and Martínez, 1998) (Fig. 1). En contraste con dicho uso benéfico de la enfermedad, *U. maydis* también da lugar a pérdidas económicas considerables en los cultivos comerciales de maíz (Martínez-Espinoza *et al.*, 2002; Agrios, 2005; Chavan and Smith, 2014) ya que el carbón del maíz aparece donde quiera que se cultive la planta, aunque con mayor frecuencia en áreas cálidas y moderadamente secas, y puede atacar a sus huéspedes en cualquier estadio de crecimiento. Produce síntomas que incluyen el desarrollo de clorosis, convierte las flores femeninas en borlas, acúmulo de pigmentos de antocianina, y formación de tumores en mazorcas, espigas, hojas y tallos, los cuales dan como resultado alteraciones en la morfología de la planta y reducción del crecimiento y la producción de grano (Banuett, 1992, 1995; Ruiz-Herrera and Martínez, 1998;

Agrios, 2005; Klosterman, 2007; Villanueva *et al.*, 2007). Las pérdidas debidas a este patógeno varían ampliamente de una localidad a otra y pueden ir desde un valor insignificante hasta un 10% o más en áreas localizadas. Algunos campos de maíz dulce pueden mostrar pérdidas que se aproximan a un 100 %. Sin embargo, en general, en relación a las áreas extensas y al uso de variedades resistentes, las pérdidas en rendimiento de grano tienen un promedio de casi un 2% (Agrios, 2005).



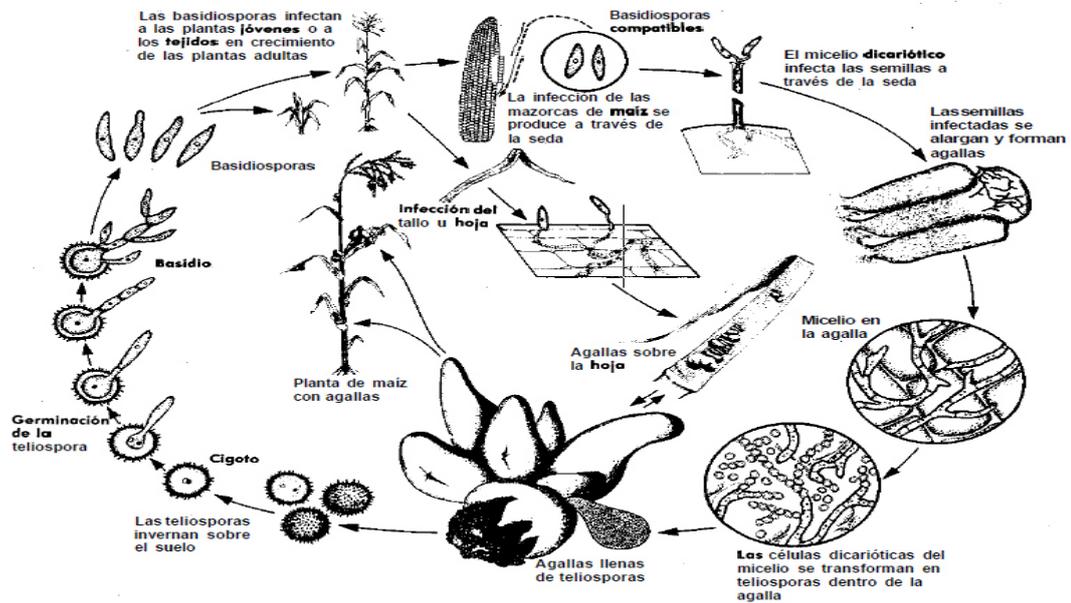
**Figura 1. Principales manifestaciones del carbón común del maíz.** Tumoraciones en la mazorca, dentro de las cuales crece el micelio y se forman millones de teliosporas.

(<http://comunicacion.cinvestav.mx/Inicio/TabId/55/ArtMID/954/ArticleID/211/Huitlacoche-podr237a-controlar-plagas-en-agro.aspx>)

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

*U. maydis* es un hongo dimórfico: presenta una fase haploide, unicelular y levaduriforme, dividiéndose por gemación, siendo este, su estadio saprofítico o no patogénico; La otra forma es diploide o sexual y proviene de la unión de dos células haploides (basidiosporas) compatibles a nivel genético, de 2 locus; los loci a y b. que dan lugar a una estructura filamentosa dicariótica (micelio) con diferentes alelos en los loci a y b (por ejemplo a1 b1 más a2b2), capaz de parasitar a la planta hospedera (Banuett and Herkowitz, 1989; Banuett, 1992, 1995; Kahmann and Kämper, 2004; Klosterman, 2007); las basidiosporas germinan sobre la superficie del hospedante y producen una hifa fina, la cual se introduce en las células epidérmicas, aprovechando aberturas naturales de la planta, por penetración directa mediante la formación de apresorios (León *et al.*, 2014; Agrios, 2005), aunque la hifa atraviese las células de la planta, no se presenta una respuesta defensiva y el tejido de la planta permanece vivo, mientras la infección continúa (Kämper, 2006). Sin embargo, después de un desarrollo inicial, el crecimiento de la hifa se detiene y por lo común se marchita y en ocasiones muere, a menos que entre en contacto y se fusione con una hifa haploide proveniente de una basidiospora del tipo de apareamiento compatible. En caso de que ocurra la unión, la hifa resultante aumenta su diámetro y se vuelve dicariótica. Esta hifa se desarrolla en los tejidos de la planta principalmente a nivel intercelular. Las células que rodean a la hifa son estimuladas, sufren hipertrofia e hiperplasia y comienzan a formarse las agallas, la hiperplasia puede producirse antes de que el hongo invada a los tejidos, luego las células alargadas del maíz son invadidas por micelio, provocando que colapsen y mueran, por lo que la agalla consiste de micelio dicariótico y restos celulares. La mayoría de las hifas dicarióticas comienzan a septarse, posteriormente ocurre un proceso de cariogamia y dan lugar a teliosporas diploides, negras, esféricas o elipsoidales que presentan protuberancias prominentes y en forma de espina (Banuett, 1995; Ruiz 1995; Ruíz-Herrera and Martínez, 1998; Kahmann and Kämper, 2004; Agrios, 2005; Klosterman, 2007), es importante señalar que hasta el momento no se ha logrado la formación de dichas estructuras

fuera de las plantas de maíz o teozinte (León *et al.*, 2014). Solo la membrana que cubre a la agalla no es afectada por el hongo, pero finalmente se rompe y las teliosporas son liberadas. Las esporas, que no son capaces de desarrollar crecimiento vegetativo, son esparcidas en los restos del cultivo y en el suelo, manteniéndose viables por años. En la primavera y el verano, las teliosporas germinan y producen basidiosporas que son llevadas por el aire, por insectos o por salpicaduras de la lluvia hasta los tejidos jóvenes meristemáticos y en proceso de desarrollo de las plantas del maíz. Estas germinan produciendo un tubo germinal, el núcleo de la espora migra a dicha estructura, donde ocurre una ronda de meiosis produciendo un basidio septado de cuatro células (el promicelio), de cada una de las cuales se desarrolla una basidiospora hialina, ovalada haploide, que por divisiones mitóticas dan lugar como progenie a células haploides (Agrios, 2005, Ruiz-Herrera and Martínez, 1998), que al encontrarse con células compatibles producen nuevas infecciones y agallas, durante la misma estación, reiniciando el ciclo de vida del hongo (León *et al.*, 2014; Ruiz-Herrera, 2008), el cual puede ser completado en dos o tres semanas bajo condiciones controladas de invernadero (Villanueva, 1997; Villanueva-Verduzco *et al.*, 2007) (Figura 2).



**Figura 2. Ciclo biológico del hongo fitopatógeno *Ustilago maydis*.** Durante la fase asexual del hongo las levaduras se dividen por gemación. En la fase sexual: las células haploides compatibles se unen dando lugar micelio dicariótico infectivo, que se introduce en la planta por penetración directa o apresorios; las células que rodean la hifa forman agallas llenas de micelio, donde se septan y ocurre cariogamia, dando lugar a teliosporas diploides con forma de espina, que son liberadas al romperse la membrana de la agalla y al germinar forman un tubo donde se da meiosis generando un basidio septado de 4 células, de las cuales surgen basidiosporas que por divisiones mitóticas dan lugar a células haploides que al encontrar células compatibles reinician el ciclo (Agrios, 2005).

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

*U. maydis* ha sido considerado modelo biológico desde mediados de la década de los 40's para el estudio de las interacciones planta-microbio (Kamper, 2006), la especificidad en el apareamiento, la recombinación genética, los genes que participan y controlan el proceso de dimorfismo, vías de señalización, entre otros

(Ruiz-Herrera and Martínez, 1998; Bölker, 2001; Martínez *et al.*, 2002; Klosterman, 2007, Ruiz-Herrera *et al.*, 2008; Brefort *et al.*, 2009; Vollmeister *et al.*, 2011; Ruiz-Herrera and León, 2012; Valdés *et al.*, 2012; Ruiz *et al.*, 2013; León *et al.*, 2014) y ha servido como modelo para describir funciones en otros hongos biotróficos complejos. Comparado con otros sistemas, *U. maydis* exhibe un número de propiedades genéticas que lo hacen un excelente candidato para elucidar mecanismos moleculares complejos (Bolker, 2001). Dentro de las principales características que han hecho de este hongo un importante modelo de estudio por diferentes aspectos de la biología fúngica, se pueden citar los siguientes: 1) La existencia de una fase haploide durante la cual el hongo forma colonias de levaduras compactas, permitiendo el uso de técnicas bacteriológicas simples; 2) la posibilidad de construir diploides para el análisis de la complementación y dominancia; 3) su capacidad para ser transformado genéticamente; 4) la existencia de recombinación homóloga; 5) La existencia de diferentes marcadores de selección y manipulación genética; 6) la facilidad para llevar a cabo análisis de segregación; 7) La capacidad de completar su ciclo de vida en un tiempo corto en plantas de maíz jóvenes; 8) La posibilidad de obtener su transición dimórfica invitro por diferentes procesos; 9) la existencia de hospederos experimentales alternativos; 10) La posibilidad de obtener su ciclo sexual in vitro (Ruiz-Herrera, 2008; León *et al.*, 2014)

Otra ventaja en el uso de *U. maydis* radica en que su genoma ha sido totalmente secuenciado, parcialmente anotado y disponible libremente (Kämper *et al.*, 2006; León *et al.*, 2014). Por lo que se sabe que este hongo posee un genoma con 20.5 millones de bases, organizadas en 23 cromosomas, contiene 6,902 genes que codifican proteínas, y posee relativamente pocos intrones debido a una alta eficiencia en recombinación homóloga; explicando esta última característica, el porqué de un genoma relativamente pequeño (Kämper *et al.*, 2006; Klosterman, 2007) (<http://mips.gsf.de/genre/proj/ustilago/>).

Como se mencionó anteriormente este hongo ha sido utilizado para dilucidar procesos fisiológicos y moleculares, dentro de los cuales destacan aquellos en respuesta a variaciones de pH (Aréchiga and Ruiz-Herrera, 2005; Cervantes-Chávez *et al.*, 2010).

## **2.2. Respuestas homeostáticas ante variaciones de pH en hongos:**

A diferencia del ambiente predecible al que se enfrenten la mayoría de las células de mamíferos los organismos como los hongos y las plantas, se enfrentan a condiciones desafiantes ante variaciones en el medio en que se desarrollan. De entre todos los microorganismos, los hongos son comúnmente capaces de sobrevivir en diferentes rangos de condiciones ambientales, como variaciones de temperatura, de presiones osmóticas y de pH. Los cambios en el pH inducen a muchos tipos de estrés celular, incluyendo la alteración de la disponibilidad de nutrientes, función de proteínas, y potencial de membrana. Se sabe que los hongos son capaces de sobrevivir en ambientes extremos de acidez y alcalinidad en un rango de pH de 2-10 (Selvig and Alspaugh, 2011). La adaptación a dicho rango, requiere no solo de un sistema de homeostasis intracelular del pH, sino que también las células se deben asegurar de que moléculas directamente expuestas al ambiente como permeasas, enzimas secretadas y metabolitos exportados sean sintetizados solo en valores de pH en los cuales puedan funcionar, evitando de esa manera el gasto innecesario de recursos y energía (Peñalva *et al.*, 2008). Por lo tanto, vías de señalización que responden a señales de pH externo son componentes de suma importancia en su maquinaria celular (Selvig and Alspaugh, 2011).

Las señales en respuesta a pH ambiental en hongos fueron primeramente elucidados en *A. nidulans* (Caddick *et al.*, 1986; Arst *et al.*, 1994) y *S. cerevisiae* (Su and Mitchell, 1993). El principal efector, PacC en *A. nidulans* y Rim101p en *S. cerevisiae* es un factor de transcripción que media los cambios en la expresión genética en respuesta a pH alcalino o neutro (Tilburn *et al.*, 1995), y justo cuando se

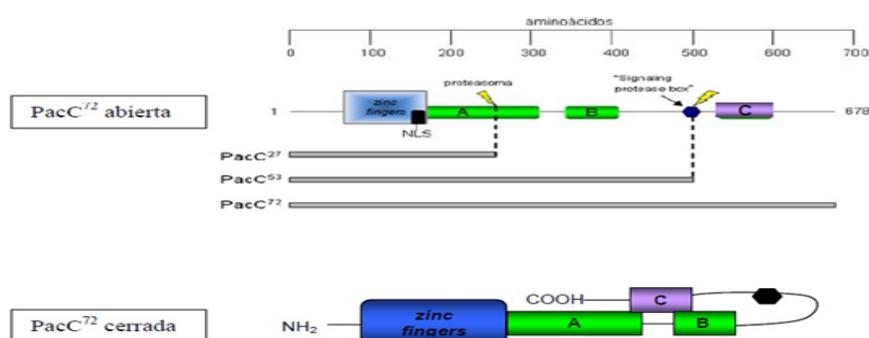
creía que dicha proteína solo era expresada en hongos ascomicetos y deuteromicetos, se describió un gen homólogo a RIM101 en el hongo basidiomiceto *Ustilago maydis* (Aréchiga and Ruiz-Herrera, 2005).

El factor de transcripción PacC/Rim101p regula una amplia variedad de funciones en diferentes organismos; en *A. nidulans* es necesario para su crecimiento en ambientes alcalinos, interfiere en su virulencia, en la formación de apresorios y germinación de sus esporas (Tilburn *et al.*, 1995; You & Chung, 2007); en *S. cerevisiae* es capaz de regular la tolerancia a iones, diferenciación celular, estimula la expresión del gen activador de meiosis Ime1 (Su and Mitchell, 1993; Li and Mitchell, 1997; Lamb *et al.*, 2001; Lamb and Mitchell, 2003); en *U. maydis* este factor de transcripción se ve implicado en la regulación de genes ante un estrés iónico, deposición de septos, en la integridad de la membrana y también en la secreción de proteínas del tipo proteasas, lipasas y polisacáridos (Aréchiga and Ruiz-Herrera, 2005; O'Meara *et al.*, 2010).

### **2.2.1. Conformación y procesamiento de PacC/Rim101.**

En *A. nidulans* PacC contiene 3 dedos de zinc Cys<sup>2</sup>His<sup>2</sup>, donde solo los dedos 2 y 3 tienen contacto con el sitio de unión a DNA (consenso 5'-GCCARG-3') (Espeso *et al.*, 1997). En condiciones ácidas la forma completa y predominante de PacC es un residuo de 674 aminoácidos (72-kD PacC<sub>72</sub>) (Peñalva *et al.*, 2008) y además, en la proteína existen tres regiones, denominadas A, B y C), que le permiten establecer interacciones intramoleculares, dichas interacciones, la mantienen en una forma inerte cerrada, previniendo su activación mediante un proceso proteolítico (Espeso *et al.*, 2000; Mingot *et al.*, 2001; Flaherty *et al.*, 2003); pero en pH neutro a alcalino, PacC es sometido a un procesamiento de 2 cortes proteolíticos sucesivos. El primero es dependiente de pH y remueve 180 residuos de la región del C-terminal, dando lugar a PacC<sub>53</sub>. El segundo corte, es independiente de pH y catalizado por el proteosoma (Hervás *et al.*, 2007), donde se remueven 245 residuos del área C-

terminal, dejando la región de dedo de zinc intacta y generando la forma PacC<sub>27</sub>, siendo esta última represora de los genes expresados a pH ácido y un activador de los genes expresados a pH alcalino (Orejas *et al.*, 1995; Mingot *et al.*, 1999; Díez *et al.*, 2002; Peñalva *et al.*, 2008). El Procesamiento de PacC se da principalmente en condiciones de crecimiento alcalinas y presenta su mínimo en condiciones ácidas (Denison *et al.*, 1995; Orejas *et al.*, 1995; Tilburn *et al.*, 1995; Denison *et al.*, 1998; Mingot *et al.*, 1999; Negrete *et al.*, 1999; Espeso *et al.*, 2000; Díez *et al.*, 2002; Caracuel *et al.*, 2003) (Fig. 3). PacC tiene una cierta expresión basal constitutiva. Cuando *Aspergillus* crece en un medio ácido, PacC se encuentra libre en el citoplasma en la conformación cerrada e inactiva (PacC<sub>72</sub>) (Espeso *et al.*, 2000). Pero se ha visto la formación de una pequeña cantidad de PacC<sub>27</sub> independientemente de la señal de pH, lo cual es probablemente atribuible al equilibrio entre esta conformación cerrada y una forma abierta mucho menos favorable (Peñalva *et al.*, 2008; Selvig and Alspaugh, 2011).



**Figura 3. Procesamiento y conformación de la proteína PacC de *A. nidulans*.**

PacC contiene 3 regiones denominadas A, B y C que permiten establecer interacciones intramoleculares. En ambientes ácidos PacC se encuentra en forma completa cerrada de 674 aminoácidos (72-Kd PacC<sub>72</sub>). En pH alcalino PacC es sometido a cortes proteolíticos, el primero dependiente de pH, en el que se remueven 180 residuos de la región C terminal dando lugar a PacC<sub>53</sub> y el segundo independiente de pH mediado por el proteosoma donde se remueven 245 residuos del extremo C terminal generando la forma PacC<sub>27</sub> (Amich, 2010).

PacC/Rim101p es uno de los factores de transcripción cuya función ha sido ampliamente estudiada; sin embargo se ha descrito la participación de otros factores en respuestas adaptativas por variaciones de pH, como lo es Nrg1p, el cual juega un papel importante en la regulación genética dependiente del pH y en la tolerancia a iones; se ha descrito como represor principalmente y se describe como responsable de la activación de genes en pH ácido, tras la represión del mismo por acción de Rim101p en *S. cerevisiae* (Lamb and Mitchel, 2003; Peñalva *et al.*, 2008).

### 2.2.2. Efecto del pH en la biodisponibilidad de metales.

Como ya se mencionó, los organismos de todo tipo se encuentran frecuentemente con desafíos a la sobrevivencia, ante los cuales deben lidiar y hacer frente, formando parte de ello, las variaciones de pH, que juegan el papel más importante en la determinación de la especiación de metales, solubilidad de las superficies minerales, movimiento y la eventual biodisponibilidad de metales (Mühlbachová *et al.*, 2005; Zhao *et al.*, 2010). Existe una correlación negativa entre el pH y la movilidad y disponibilidad de los metales; al decrecer el pH, aumenta la biodisponibilidad de metales, y al incrementarse el pH se ve disminuida. Al presentarse un pH ácido, los iones hidrógeno presentan mayor afinidad por las cargas negativas, de esa manera compiten con los iones metálicos por los sitios, y provocan su liberación. En ambientes alcalinos se propicia la formación de compuestos como carbonatos, luego hidróxidos y óxidos, los cuales tienden a precipitar (Prasad and Hagemeyer, 1999).

Al enfrentarse los organismos a variaciones de pH y por lo tanto a fluctuaciones en la disponibilidad de metales, la homeostasis de las concentraciones intracelulares de iones es fundamental para la fisiología de las células vivientes. La regulación correcta del flujo iónico es necesaria para que las células mantengan bajas las concentraciones de iones tóxicos y para el almacén de iones esenciales (Zhu, 2003). La demanda de elementos iónicos depende de la especie, de las condiciones

en el lugar donde se desarrolla o del medio de cultivo utilizado para el crecimiento y de las interacciones de los constituyentes, especialmente entre los cationes divalentes. Las especies iónicas se pueden clasificar dentro del grupo de macroelementos, que son aquellos requeridos en grandes cantidades y donde se encuentran minerales como el magnesio, potasio, calcio, nitrógeno, fósforo entre otros, los cuales, a excepción del fósforo que está más disponible en el rango de pH de 6.0 a 7.0, se encuentran más disponibles dentro de un rango de 6.5 a 8.0 (Heggart *et al.*, 1999); por otra parte están los microelementos que son esenciales para el crecimiento y nutrición de los organismos y son requeridos en cantidades pequeñas, dentro de dichos oligoelementos se encuentran: el fierro, manganeso, boro, cobre, níquel, zinc, etc., los cuales se encuentran más disponibles en un rango de pH de 5.0 a 7.0 (Prasad and Hagemeyer, 1999; Hänsch and Mendel, 2009).

### **2.3. El zinc como elemento fundamental en los organismos.**

De entre todos los micronutrientes, el zinc es un mineral importante para la fisiología celular, es el segundo más abundante en las células eucariotas, siendo superado solamente por el hierro (Coleman, 1992; King, 2006) pero el hecho de estar en menor cantidad no impide que el zinc sea componente esencial de muchas más proteínas que el hierro. (Barret *et al.*, 1992; Maret *et al.*, 2001). Se estima que más de 1200 proteínas contienen, unen, o transportan  $Zn^{+2}$  (Kramer and Clemens, 2005), y que este es requerido para la actividad de más de 300 enzimas que abarcan las 6 clases existentes (McCall *et al.*, 2000).

#### **2.3.1. Funciones biológicas del zinc.**

El zinc es un nutriente esencial para todos los organismos, porque sirve como cofactor estructural, catalítico o co-catalítico para diferentes proteínas formando distintos tipos de enlaces en cada una de ellas (McCall *et al.*, 2000; Auld, 2001; Institute of Medicine, 2001; Amich, 2010). Dichas proteínas son encontradas en el

citoplasma y dentro de organelos de células eucariotas incluyendo el núcleo, el retículo endoplasmático, aparato de Golgi, vesículas secretoras, y en la mitocondria (Eide, 2006), donde el zinc al actuar como estabilizador estructural establece cuatro enlaces de coordinación con residuos peptídicos, estabilizando la estructura de la enzima o del sustrato en cuestión (Amich, 2010). Debido a que éste metal de transición es el único que no tiene actividad biológica redox (orbital d10 lleno) y por contar con alta afinidad a proteínas es el más adecuado para dicha función estructural (Williams, 1987; Maret and Chem, 2009). Las principales combinaciones del zinc con los ligandos de proteínas, incluyen el nitrógeno de la histidina, el oxígeno del aspartato o glutamato y el sulfuro de la cisteína, pero la más comúnmente observada es con la histidina seguida por la cisteína (Gregory, 1993).

Este metal es capaz de desempeñar muchas funciones fundamentales entre las principales se encuentran: la replicación, transcripción, procesamiento de RNA, expresión génica y diferenciación celular. Esto es debido a que el  $Zn^{+2}$  es necesario para la actividad de todas las polimerasas de ácidos nucleicos. RNA-polimerasas, histonas deacetilasas, factores de splicing, y enzimas involucradas en edición de RNA en la mitocondria y cloroplastos (Kramer and Clemens, 2005), además forma parte de dominios tipo “*zinc-finger*” de unión a ADN presente en una amplia variedad y elevado número de factores de transcripción de eucariotas (Iwata *et al.*, 1999; Cario *et al.*, 2000; Institute of Medicine, 2001; Amich, 2010). Por tanto, la deficiencia de zinc afectará en gran medida a la capacidad de crecimiento, desarrollo y diferenciación de todos los organismos vivos (Prasad, 1993).

### **2.3.2. Homeostasis de zinc.**

Todo organismo se enfrenta a condiciones cambiantes en el medio en que se desarrolla, por lo que debe valerse de diferentes estrategias que lo lleven a su supervivencia y éxito ante situaciones desafiantes, y la adquisición de metales suele ser una de ellas, por lo que las células se ven en la necesidad de regular las

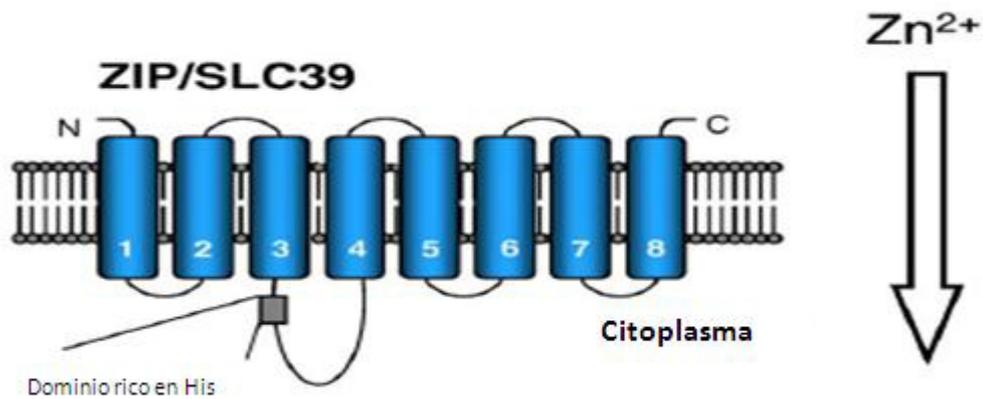
concentraciones intracelulares de los mismos, entre ellos el zinc, para ello requieren de mecanismos de transporte, para permitir su almacenamiento y distribución.

Toda célula necesita de un contenido total de zinc para su óptimo crecimiento, a lo cual se le denomina “cuota de zinc” (Eide, 2006). Se ha observado una similitud remarcada en la concentración de zinc requerida entre los diferentes tipos celulares: En *Escherichia coli*, la cuota de zinc es aproximadamente  $10^5$  átomos de zinc por célula (Outten and O'Halloran, 2001). La cuota de zinc para levaduras está estimada en aproximadamente  $10^7$  átomos por célula, mientras en muchos tipos celulares de mamíferos en cultivo se requiere de alrededor de  $10^8$  átomos por célula (MacDiarmid *et al.*, 2000; Palmiter and Findley, 1995; Suhy *et al.*, 1999). Realizando un ajuste en relación al volumen de los diferentes tipos de células, la concentración celular total del ion corresponde a valores dentro de 0.1-0.5mM. Dicha similitud en los niveles del metal reflejan los papeles conservados del zinc en la bioquímica celular, por lo que viéndose desde la perspectiva celular el zinc no es un elemento traza como comúnmente es llamado (Outten and O'Halloran, 2001), siendo muy importante en los procesos metabólicos de la célula, tanto su exceso como su déficit, pueden tener efectos dramáticos en la fisiología celular (Koh *et al.* 1996; Amich, 2010). Cuando la concentración de zinc desciende por debajo de un valor mínimo, el crecimiento celular se detiene. Por el contrario, un exceso de zinc puede resultar tóxico para las células al inactivar proteínas interaccionando o compitiendo con otros iones metálicos por sus sitios activos (Gaither and Eide, 2001). Debido a ello, el aflujo, movilidad, almacenamiento y eflujo del metal debe ser ampliamente regulado (Eide, 2009). Por lo cual, las células están dotadas de un sistema para lograr la homeostasis del metal, este sistema está formado por:

- **Transportadores de zinc de la familia ZIP (*Zrt-, Irt-like Proteins*)**. A los miembros mamíferos de esta familia se les ha dado la designación sistemática “SLC39” (Eide, 2004). Una característica clave de la familia ZIP es que, sin ninguna excepción, estas proteínas transportan zinc y/u otro ion metálico

como sustrato del espacio extracelular o lumen organelar en el citoplasma, probablemente mediante un antiportador  $Zn^{+2}/H^{+}$  (Balaji and Colvin, 2005). La mayoría de las proteínas ZIP tienen ocho dominios transmembranales y topologías similares con los extremos N- y C-terminales localizados hacia el espacio extracelular de la membrana plasmática o hacia el interior del orgánulo. Muchos miembros también presentan una región rica en histidinas localizada entre los dominios transmembranales 3 y 4, que probablemente se encuentra implicada en el transporte de zinc o en su regulación (Fig. 4). Los transportadores ZIP son encontrados en todos los niveles filogenéticos incluyendo bacterias, hongos, plantas y mamíferos (Gaither and Eide, 2001). Existen cuatro subfamilias de proteínas ZIP: subfamilia I (agrupa fundamentalmente proteínas de plantas y hongos), subfamilia II (un pequeño grupo de proteínas de mamíferos y nematodos), subfamilia *gufA* (incluye proteínas de procariotas y de eucariotas) y la subfamilia LIV-1 (exclusiva de eucariotas) (Gaither and Eide, 2001; Eide, 2006; Amich, 2010).

Los principales representantes de este tipo de transportadores son Zrt1p y Zrt2p, los cuales han sido bien caracterizados en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* y se encuentran posicionados en la membrana plasmática. Zrt1p (zinc-regulated transporter) es un transportador de alta afinidad a  $Zn^{+2}$  y es inducido en condiciones de bajos niveles del metal. En *S. cerevisiae* el gen ZRT1 se encuentra localizado en el cromosoma XII y codifica para una proteína de 376 aminoácidos. Zrt2p es un sistema para la toma de  $Zn^{+2}$  que tiene baja afinidad por el sustrato, y es activo en células repletas de zinc. También el gen codificante se encuentra en el cromosoma XII (Zhao and Eide 1996a y 1996b). Por otra parte se ha encontrado un transportador muy similar a los anteriormente citados, Zrt3p, que bombea zinc de la vacuola al citoplasma, donde éste puede ser utilizado, bajo condiciones limitadas del metal (Eide, 2009; MacDiarmid, 2000).



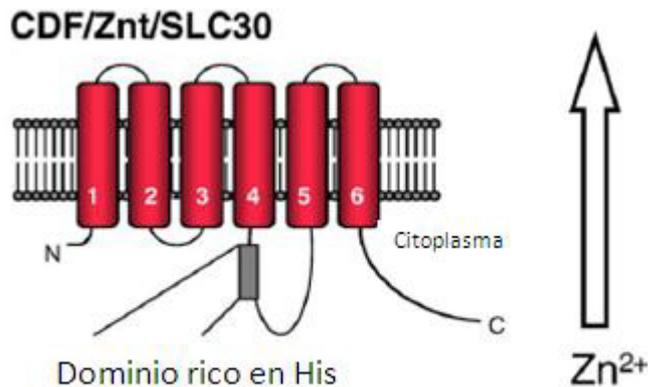
**Figura 4. Topología de proteínas integrantes de la familia ZIP.** Integrantes de la familia ZIP comparten las mismas características principales: ocho dominios transmembranales, extremos N- y C-terminales hacia el espacio extracelular de la membrana plasmática o hacia el interior del orgánulo, región rica en histidinas localizada entre los dominios transmembranales 3 y 4 (Eide, 2006).

- **Transportadores de zinc de la familia CDF (Cation Diffusion Facilitator).** Miembros mamíferos han sido nombrados “ZnT” y se les ha dado el nombre sistemático de SLC30 (Palmiter and Huang, 2004). La característica clave de esta familia es que transportan zinc y/u otro ion metálico del citoplasma al lumen de organelos o hacia afuera de la célula. De esa manera, las proteínas CDF trabajan de forma opuesta a los transportadores ZIP, participando en la detoxificación y/o acúmulo de metales. Parece ser que la función es realizada gracias al flujo mediante un antiportador  $Zn^{+2}/H^{+}$  (Colvin *et al.*, 2000; Ohana *et al.*, 2009; MacDiarmid *et al.*, 2002; Chao and Fu. 2004). Se caracterizan por tener seis dominios transmembranales, con los extremos N-terminal y C-terminal orientados hacia el citosol. Al igual que las proteínas ZIP poseen una extensa región citoplasmática entre los dominios transmembranales IV y V, donde muchos miembros de la familia CDF tienen motivos ricos en histidinas. Los transportadores CDF también son encontrados en todos los niveles filogenéticos (Gaither and Eide, 2001) (Fig. 5). Los miembros de este grupo se han clasificado en tres subfamilias (I, II y III), la subfamilia I está

comprendida principalmente por procariotas, mientras que las subfamilias II y III contienen miembros tanto procariotas como eucariotas, siendo su clasificación en base a la similitud de las secuencias de aminoácidos (Gaither and Eide, 2001; Eide, 2006). Sin embargo, recientemente se ha propuesto una nueva clasificación en base al metal que transportan, formando las subfamilias: Fe/Zn-CDF, Mn-CDF y Zn-CDF (Montanini *et al.*, 2007; Amich, 2010).

Algunos integrantes de esta familia de transportadores son los siguientes:

- Zrc1p y Cot1p: son proteínas que se han caracterizado en *S. cerevisiae* y predominantemente se encuentran en la membrana vacuolar, por lo que se encargan del transporte de zinc del citoplasma a dicho organelo (Paulsen and Saier, 1997; Li and Kaplan, 1998).
- Msc2p y Zrg17p: son una ruta de entrada de zinc al retículo endoplásmico, donde mantienen la función de dicho compartimento y probablemente de otros organelos de la vía secretoria. Estos solamente son activos como complejos heterodiméricos, y se sabe que la actividad de Msc2/Zrg17 solamente es requerida ante condiciones limitantes de zinc (Ellis *et al.*, 2005; Fukunaka *et al.*, 2009).

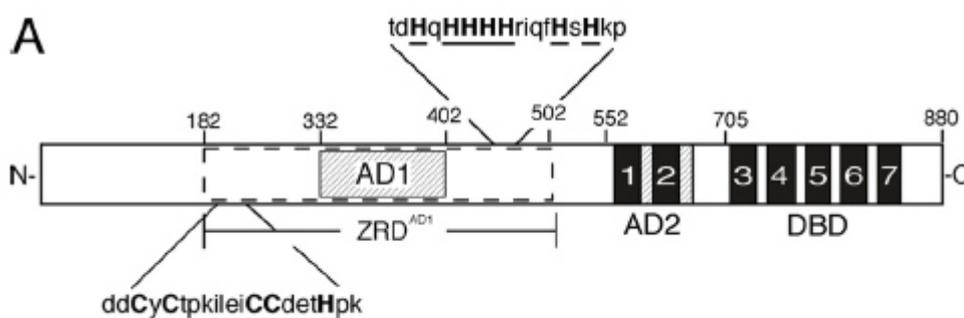


**Figura 5. Estructura en común de las proteínas de la familia CDF.** Contienen seis dominios transmembranales, con los extremos N-terminal y C-terminal orientados hacia el citosol y una extensa región citoplasmática con motivos ricos en histidinas entre los dominios IV y V (Gaither and Eide, 2001).

- **Metalotioneínas quelantes de zinc (MTs).** Son proteínas de bajo peso molecular con un alto contenido de cisteínas y muy bajo o nulo de histidinas y aminoácidos aromáticos (Vasak and Kagi, 1994) y forman enlaces tiol con iones metálicos, para secuestrar metales pesados tóxicos (ej. cadmio, mercurio, etc.), almacenar metales esenciales como el cobre y zinc, y para regular metales dependientes de procesos fundamentales para vías celulares (Vasak and Hasler, 2000). Tienen una gran variedad en secuencias, aunque siempre poseen características estructurales que les permiten unirse fuertemente a metales (particularmente Cu<sup>+2</sup>, Cd<sup>+2</sup> y Zn<sup>+2</sup>). Las MTs participan en la homeostasis del zinc mediante la donación o secuestro del metal y/o control redox, regulando así el proceso de detoxificación y el metabolismo. Este tipo de quelantes han sido aislados de varios organismos incluyendo plantas, vertebrados, invertebrados, hongos, eucariotas unicelulares y algunos procariotas (Coyle *et al.*, 2002).

- **Factores de transcripción.** Siempre ha de existir al menos un factor regulador que active o inhiba la expresión de los genes relacionados con la homeostasis del zinc en función de la concentración ambiental de este metal (Gaither and Eide, 2001). Uno de los factores de transcripción más importantes implicados en dicha regulación es:
  - **Zap1p:** está formada por 880 aminoácidos (93 kDa) y siempre reside en el núcleo, bajo cualquier condición de zinc (Bird *et al.*, 2000). Tiene 7 *zinc fingers* (ZnF1-ZnF7), formando los cinco más próximos al extremo carboxilo (ZnF3-ZnF7) el dominio de unión a ADN (Amich, 2010). Además Zap1p en su extremo amino contiene 2 dominios de activación, AD1 y AD2 que activan la transcripción (Bird *et al.*, 2000); AD1 se encuentra localizada en la mitad de la región N-terminal de las proteínas y contiene dominios de unión a zinc dentro de una región aminoacídica denominada ZRD<sup>AD1</sup> (Herbig *et al.*, 2005) (Fig. 6). AD2 esta formada por una región de dos dedos de zinc regulados por la unión de zinc, denominados ZF1 y ZF2, estos al unir zinc se pliegan formando una estructura, que previene que AD2 reclute co-activadores para los promotores de ZAP1, una característica importante es que la unión de zinc a estos sitios es muy lábil, por lo que la regulación de AD2 involucra un ciclo constante de unión y desprendimiento del metal, permitiendo de esa manera medir las concentraciones intracelulares de zinc (Bird *et al.*, 2006; Wang, 2006; Qiao *et al.*, 2006), de manera que Zap1p se activa cuando la concentración de zinc es baja y se inactiva si aumenta. Cuando Zap1p está activo es capaz de unirse a secuencias específicas de ADN, presentes en los promotores de sus genes diana, denominadas elementos de respuesta a zinc o ZREs (*Zinc-responsive element*). La secuencia consenso de estos elementos es 5'-ACCTTNAAGGT-3 (Zhao *et al.*, 1998; Lyons *et al.*, 2000). Zap1p actúa como activador

transcripcional e incrementa la expresión de genes cuando los niveles de zinc son bajos, en otros pocos casos actúa como represor.



**Figura 6. Anatomía del factor de transcripción Zap1p.** El factor de transcripción Zap1p está formado por 880 aminoácidos (93 kDa), contiene 7 dedos de zinc (ZnF1-ZnF7), los correspondientes a ZnF3-ZnF7 forman el dominio de unión a ADN. Zap1p contiene en su extremo amino, a los dominios de activación de la transcripción AD1 y AD2. AD1 contiene dominios de unión a zinc en la región llamada ZRD<sup>AD1</sup> (Eide, 2009).

Adicionalmente, pueden existir otros factores reguladores de la expresión de los genes diana respondiendo a condiciones ambientales distintas a la disponibilidad de zinc, pero que afectan a la biodisponibilidad de metal. Un ejemplo de esto es la regulación por pH (mediante Rim101p) antes descrita, que presentan los transportadores ZIP de *A. fumigatus* (Vicente-franqueira *et al.*, 2005).

### 2.3.3. Mecanismo homeostático de zinc en levaduras.

La toma de zinc hacia dentro de las células y de sus organelos y fuera de ellos, es muy importante para lograr concentraciones intracelulares óptimas del metal, por lo que se requieren proteínas transportadoras que atraviesen las membranas para facilitar su movimiento. Con el paso de los años, se han identificado los papeles que desempeñan muchos transportadores en diferentes organismos y tipos celulares. La mayoría de los cuales pertenecen a la familia de transportadores

ZIP con algunas excepciones. Pero la homeostasis del zinc ha sido mayormente estudiada en *Saccharomyces cerevisiae* (Eide, 2003; Eide, 2009). En esta levadura se han encontrado proteínas pertenecientes a todas las clases de transportadores que forman los sistemas de homeostasis de zinc, tales como transportadores ZIP (Zrt1p, Zrt2p, Zrt3p y Ke4), transportadores CDF (Zrc1p, Cot1p, Msc2p y Zrg17p), una metalotioneína (Csr5) y un factor de transcripción regulador (Zap1p) (Eide, 2009; Amich, 2010).

### **2.3.3.1. Mecanismo de homeostasis ante la deficiencia y condiciones elevadas de zinc.**

La primera respuesta de un organismo ante variaciones de zinc es a nivel transcripcional, siendo Zap1p quien desempeña el papel principal, comenzando con la activación de su propia transcripción, resultando en el incremento de los niveles de la proteína, repercutiendo en las respuestas a zinc de otros genes diana de Zap1p (Eide, 2009; Amich, 2010).

Posteriormente tal como se describe en la figura 7, el primer paso en la biología celular del zinc, es el transporte del ion a través de la membrana hacia el interior de la célula. Por lo que tras la activación de Zap1p, se incrementa la expresión de transportadores involucrados en la toma de zinc y una gran cantidad de diferentes proteínas que cumplen con dicha función (Eide, 2006). El sistema primario para la adquisición de zinc regulado por Zap1p, esta conformado por transportadores Zrt1p, el cual tiene mayor afinidad por  $Zn^{+2}$  (Zhao and Eide, 1996a, 1997), y son requeridos en condiciones limitantes del mismo (Zhao and Eide, 1996a), donde su expresión es inducida aproximadamente 100 veces mas sobre niveles de expresión de células repletas del metal (Zhao and Eide, 1996b), ya que al aumentar los niveles intracelulares del metal, la expresión de Zap1p es reprimida, tras la unión de zinc a la proteína.

Un segundo gen es tanto inducido como reprimido por Zap1p (Bird, *et al.*, 2004), ZRT2, cuya proteína tiene menor afinidad por el  $Zn^{+2}$  libre y juega un papel importante en la adquisición del metal en condiciones limitantes de zinc menos severas (Zhao and Eide, 1996b). La expresión de Zrt2p se incrementa bajo condiciones de mediana deficiencia de zinc, pero decrece a niveles bajos en severa deficiencia, dicha regulación es debido a la presencia de 3 ZREs en el promotor de ZRT2. Dos sitios de afinidad de Zap1, ZRE1 y ZRE2 están localizados río arriba de la caja TATA y median la activación dependiente de Zap1p. El tercer ZRE, ZRE3, presenta una afinidad 10 veces menor a Zap1p que los otros sitios ZREs presentes en el promotor y está localizado río abajo de la caja TATA cerca del sitio de inicio de la transcripción. ZRE3 es esencial para la represión de la expresión de ZRT2. Bajo condiciones moderadas de deficiencia de zinc, Zap1p se une a ZRE1 y ZRE2 y activa la transcripción. Bajo severa deficiencia, cuando los niveles de Zap1p aumentan debido a autorregulación, Zap1p también se une a ZRE3 y bloquea la expresión de ZRT2 (Bird *et al.*, 2004), este patrón de expresión asegura que el transporte de baja afinidad mediado por Zrt2p no sea expresado en momentos donde su contribución de toma de zinc es innecesaria (Eide, 2009) (Fig. 7).

Se han encontrado otros transportadores con menos afinidad por zinc en la membrana plasmática, uno de ellos es Fet4p, inducido por Zap1, el cual además de zinc, transporta cobre y hierro (Waters and Eide, 2002). Otro sistema de toma del ion es Pho84p (Jensen *et al.*, 2003), no inducido por Zap1, que tiene alta afinidad por fosfatos y menor por zinc en condiciones limitantes de fosfato, por lo que este sistema solo desempeña su papel en la toma de zinc ante dichas situaciones (Bun-Ya *et al.*, 1991) (Fig. 7).

Una vez dentro de la célula se activan mecanismos para evitar la toxicidad por exceso del zinc, incluyendo la unión del mismo a macromoléculas citoplasmáticas denominadas metalotioneínas, que con su función quelante logran

secuestrar el metal, contribuyendo a la detoxificación y dejándolo disponible ante la deficiencia del mismo (Hamer, 1986).

Otra estrategia para evitar daño celular por exceso del metal es su almacenamiento dentro de diferentes compartimientos. El zinc cumple con funciones importantes dentro de organelos, uno de ellos es el retículo endoplasmático (RE), donde se da el plegamiento inicial y las modificaciones postraduccionales de proteínas, siendo este metal indispensable para dichos procesos. Los transportadores de zinc responsables de repartir el zinc en vías secretorias, pertenecen a la familia CDF. En levaduras el complejo Msc2/Zrg17 media el transporte de zinc al retículo endoplasmático, bajo condiciones limitantes de zinc (Ellis *et al.*, 2004, 2005; Li and Kaplan, 2000). Otro transportador localizado en el RE es la permeasa Ke4, la cual tiene función bidireccional, de forma que introduce o retira zinc según las necesidades del momento. En cuanto a la regulación de su expresión, ZRG17 está controlado por Zap1p, mientras que MSC2 y KE4 no lo están (Ellis *et al.*, 2005; Kumanovics *et al.*, 2006). Por otra parte también se ha observado que los transportadores Zrc1p y Cot1p contribuyen al aporte de  $Zn^{+2}$  en dicho organelo, en etapas tempranas de la vía secretoria poco después de su síntesis y luego migrar a la vacuola (Ellis *et al.*, 2004) (Fig. 7).

Las vacuolas sirven como el principal sitio de almacenamiento y detoxificación de zinc (Ramsay and Gadd, 1997; Ma *et al.*, 2005). Cuando los sistemas de transporte para el secuestro vacuolar de zinc son eliminados, el máximo nivel de tolerancia de zinc por la célula cae ~100 veces (Kamizono *et al.*, 1989; Conklin *et al.*, 1994, MacDiarmid *et al.*, 2003). Existen situaciones a las que se enfrentan los organismos donde se ven privados del metal por periodos prolongados “Zinc Shock”, por lo que se da una sobreexpresión de los transportadores de alta afinidad Zrt1p, y al presentarse suministros esporádicos de zinc y ser transportado hacia el interior celular, dichas células deficientes, tienden a acumular sustanciales cantidades del metal en organelos como la vacuola, antes de que los mecanismos

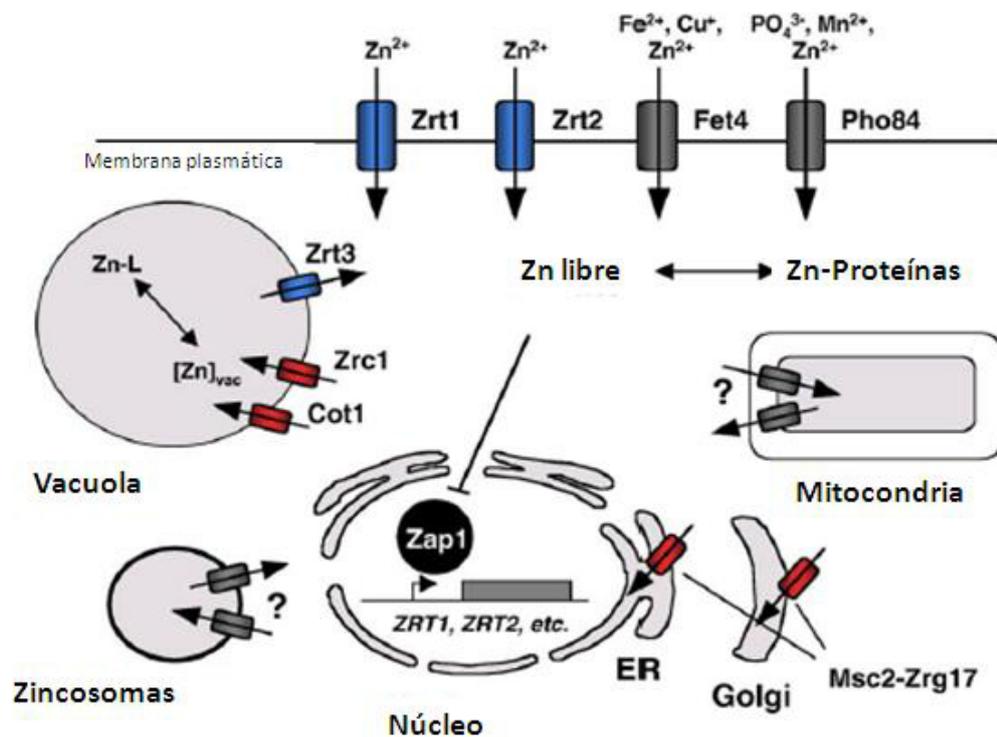
transcripcionales y postraduccionales que regulan a ZRT1 apagan la toma de zinc a través de él (Eide, 2006, 2009). El zinc secuestrado dentro de la vacuola además de evitar la toxicidad de la célula ante el incremento intracelular del metal, también puede servir como reserva y movilizarse hacia el citoplasma bajo condiciones de deficiencia del ion, siendo suficientes dichas reservas para el desarrollo durante muchas generaciones en ausencia de algún aporte exógeno (Simm *et al.*, 2007). La toma de zinc en la vacuola de la levadura es mediada por dos miembros de la familia CDF; Zrc1p y Cot1p. Zrc1p es un transportador  $Zn^{+2}/H^{+}$  que permite la acumulación de zinc en la vacuola debido a un gradiente de protones generado por las ATPasas vacuolares (MacDiarmid *et al.*, 2002). Cot1p puede actuar de una manera similar, aunque sus propiedades bioquímicas no han sido analizadas. La liberación de zinc de la vacuola al citosol bajo condiciones de deficiencia de zinc esta mediada por Zrt3p, un miembro de la familia de transportadores ZIP (MacDiarmid *et al.*, 2000). La expresión de Zrt3p es aumentada ante condiciones de bajo zinc para facilitar la movilización vacuolar del metal (Eide, 2006) (Fig. 7).

Por otra parte, se han encontrado estructuras muy similares a las vacuolas y se les ha nombrado “zincosomas”, Los cuales pueden servir como buffer citosólico para lograr una homeostasis intracelular de zinc, tal como se describió en las vacuolas, el almacenaje del metal en dichas estructuras puede ser movilizado después de una deficiencia. El almacenamiento vesicular de zinc al igual que en levaduras (Li and Kaplan, 2000; Devirgiliiset *al.*, 2004), puede existir en células de mamíferos (Li and Kaplan, 2000; Michalczyk *et al.*, 2002; Palmiter 1996; Nasir *et al.*, 1999; Ho *et al.*, 2000; Coyle *et al.*, 1994; Burdette *et al.*, 2001; St Croix *et al.*, 2002), y su acúmulo en los zincosomas es dependiente de Zrt1p pero no de Zrc1p o Cot1p (Devirgiliis *et al.*, 2004) (Fig. 7).

Mediante todos los procesos llevados a cabo por la célula, a pesar de que los niveles de zinc lleguen a ser altos en el espacio intracelular (ej. 200  $\mu$ M) (Palmiter and Findley 1995), muy poco zinc se encuentra presente en forma “libre” o lábil. Se

estima que las concentraciones de zinc libre dentro de la célula son en rango nanomolar (Suhy and O'Halloran 1995).

Existe otro mecanismo para lograr la homeostasis celular del zinc y se da a nivel postraduccional (Gaither and Eide 2001). Como ya se describió anteriormente en *S. cerevisiae* ante condiciones con bajas concentraciones de zinc, el transportador Zrt1p es estable en la membrana plasmática, pero al exponerse a cantidades extracelulares elevadas del metal, se desencadena la rápida pérdida de la actividad y de la síntesis de Zrt1p, dicha inactivación ocurre por endocitosis de la proteína, tras ser ubiquitinada, (Gitan and Eide 2000) y posteriormente degradada en la vacuola (Gitan *et al.* 1998). Por lo que dicho sistema previene la sobreacumulación de este metal potencialmente tóxico (Gaither and Eide 2001).



**Figura 7. Mecanismos para la homeostasis de zinc en *Saccharomyces cerevisiae* (Modificado de Eide, 2006).**

### 3. **HIPÓTESIS**

El transporte de zinc a través de la regulación de Rim101p forma parte de la adaptación génica y fisiológica de *Ustilago maydis* ante variaciones del pH.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1. Objetivo General

- Describir el mecanismo de regulación de transportadores de zinc en respuesta a variaciones de pH.

### 4.2. Objetivos específicos

- Determinar mediante análisis bioinformáticos, si existen genes similares a ZRT1 y ZRT2, existentes en ascomicetos, en *Ustilago maydis* y si Rim101p tiene sitios de unión en sus promotores.
- Demostrar la función de las proteínas codificadas por los probables ZRT1 y ZRT2 de *U. maydis*, mediante complementación de mutante de los mismos en *Saccharomyces cerevisiae*.
- Determinar la función de los probables ZRT1 y ZRT2 de *U. maydis* mediante curvas de crecimiento a diferentes concentraciones de zinc, tras el diseño de medio bajo en zinc.
- Demostrar a través del análisis de expresión de los probables ZRT1 y ZRT2, si Rim101p interviene en la regulación de dichos genes.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1. Microorganismos y su conservación.

Las cepas de microorganismos empleadas a lo largo del estudio fueron almacenadas en una mezcla de glicerol y el medio específico, dependiendo de la cepa, en una relación de 50% v/v en ultracongelación, a -80°C. Para su activación, las cepas del hongo *Ustilago maydis* fueron transferidas a medio completo y crecidas en agitación a 28°C durante 48 a 72 horas. En el caso de las cepas correspondientes a *Saccharomyces cerevisiae* fueron activadas en medio YPD o SD dependiendo de la ocupación e incubadas a 30°C durante 15 horas (Ver sección 5.3).

Las cepas utilizadas durante el trabajo, así como su genotipo y origen se describen a continuación en la tabla 1.

**Tabla 1. Resumen de cepas utilizadas en el presente trabajo.**

Organismo	Cepa	Genotipo	Origen
<i>Ustilago maydis</i>	FB <sub>2</sub>	(a2b2)	F. Bannuet Facilitada por: (UMGE)
	BMA2	(a2b2Δrim101::hyg)	Aréchiga and Ruiz-Herrera 2005. Facilitada por: UMGE
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	BY4743	aY. Marcadores: his3 his3; leu2 leu2; met15 MER15; lys2 LYS2; ura3 ura3	Brachmann <i>et al.</i> , 1998 Facilitada por: David Eide.
	ZHY3	aY. ade6 can1 -100oc his3 leu2 tp1 ura3 Δ zrt1:: LEU2 Δzrt2:: HIS3	Zhao and Eide, 1996* Facilitada por: David Eide
	AMP96	aY. ade6 can1 -100oc his3 leu2 tp1 ura3 Δ zrt1:: LEU2 Δzrt2:: HIS3 pDR.195umZRT1	Este trabajo
	RRM10	aY. ade6 can1 -100oc his3 leu2 tp1 ura3 Δ zrt1:: LEU2 Δzrt2:: HIS3 pDR.195umZRT2	Este trabajo
	ZHY3 pMC5	aY. ade6 can1 -100oc his3 leu2 tp1 ura3 Δ zrt1:: LEU2 Δzrt2:: HIS3 pMC5	Este trabajo
	ZHY3 pDR.195	aY. ade6 can1 -100oc his3 leu2 tp1 ura3 Δ zrt1:: LEU2 Δzrt2:: HIS3 pDR.195	Este trabajo
	DH5α	F-Φ80lacZΔM15 Δ(lacZYA-cargF) U169 recA1 endA1 hsdR17 (rK-, mK+) phoA supE44 λ-thi-1 gyrA96 relA1.	Invitrogen
<i>Escherichia coli</i>			

## 5.2. Plásmidos.

Los plásmidos empleados para este estudio, se presentan en la tabla 2, los mapas, así como sus secuencias se muestran en anexos (Sección 10.2).

**Tabla 2. Plásmidos empleados en el proyecto.**

Plásmido	Características principales	Origen
pDR195	Marcadores de selección ampicilina (Amp) para <i>E. coli</i> y uracilo (URA3) para levaduras. Promotor de alta eficiencia de expresión: pPMA1.	Rentsch <i>et al.</i> , 1995. Facilitado por: David Eide
pDR195umZRT1	Contiene una copia del gen umZRT1 de <i>Ustilago maydis</i> .	Presente trabajo
pDR195umZRT2	Contiene una copia del gen umZRT2 de <i>Ustilago maydis</i> .	Presente trabajo
pMC5	Contiene una copia del gen zrt1 de <i>S. cerevisiae</i> , contiene los marcadores de selección Amp y URA3 para <i>E. coli</i> y levaduras respectivamente.	Zhao and Eide, 1996 a. Facilitado por: David Eide
pDONR-HYG-LYASE	Contiene sitios de recombinación attP1 y attP2, el gen letal CcdB, y como marcador de selección la kanamicina para bacterias e higromicina en hongos.	Facilitado por: UMGE
pUC19	Marcador de selección: ampicilina	Invitrogen

## 5.3. Medios de cultivo.

Para la preparación de los medios de cultivo fue utilizada agua bidestilada o agua ultra pura mili-Q según los requerimientos, dependiendo de la necesidad se añadía ampicilina (100µg/ml de medio), Kanamicina (50µg/ml de medio) o Higromicina (Invitrogen™, No. Catalogo: 10687-010) (100µg/ml de medio). En caso de requerir medio sólido se agregó el 2% de agar bacteriológico. Todo medio fue

esterilizado en autoclave a 121°C, 15lb de presión, durante 20 minutos o por filtración.

### 5.3.1. Crecimiento de cepas de *U. maydis*:

La elaboración de los principales medios en los que fueron desarrolladas las cepas del hongo *U. maydis* ocuparon la preparación previa de las soluciones que se describen a continuación:

- **Elementos traza (Holliday, 1961):** 60mg de H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 140mg de MnCl<sub>2</sub> 4(H<sub>2</sub>O), 400mg de ZnCl<sub>2</sub>, 40mg de Na<sub>2</sub>MgMoO<sub>4</sub>, 100mg de FeCl<sub>3</sub> 6(H<sub>2</sub>O) y 400 mg de CuSO<sub>4</sub> 5(H<sub>2</sub>O), se disolvieron en 1L de agua bidestilada y la solución fue esterilizada bajo las condiciones antes mencionadas. De ser requerido algún medio sin zinc se omitió la adición del compuesto que contuviese dicho metal.
- **Solución de sales (Holliday, 1961):** 16g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 4g de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 8g de KCl, 2g de Mg SO<sub>4</sub>, 1g de CaCl<sub>2</sub> y se adicionaron 8ml de los elementos traza, se aforó a 1L de agua bidestilada y se procedió a la esterilización.
- **Medio completo (MC) (Holliday, 1961):** 2.5g de peptona de caseína, 10g de extracto de levadura, 1.5g de nitrato de amonio y se adicionaron 62.5 ml de la solución de sales, se llevó a pH 7.0 y se aforó a 500ml con agua bidestilada y por separado se pesaron 10g de glucosa y fueron llevados a un volumen de 500ml, se procedió a la esterilización de ambas soluciones y después de dicho paso, se procedió a mezclar las dos soluciones.
- **Medio Mínimo (MM) (Ruiz-Herrera *et al.*, 1995):** Este medio fue preparado en pH 3.0, 7.0 y 9.0 según lo requerido, en el crecimiento de *U. maydis*. Para la preparación del MM pH 3.0 (MM3) se pesaron 3g de nitrato

de amonio y para el MM pH 7.0 (MM7) se pesaron 3g de nitrato de potasio, se agregó ácido fosfórico de manera que el medio resultante estuviera a una concentración de 100mM del mismo, posteriormente se agregaron 62.5 ml de solución de sales (descritas en el apartado anterior), se llevó al pH deseado 3.0 o 7.0 con Tris (2-Amino-2-hydroxymethyl-propane-1,3-diol) 3.5 M y se aforó a 500 ml con agua bidestilada. Por separado se pesaron 10g de glucosa y se aforó a 500 ml. Se procedió a esterilizar por autoclave y finalmente se mezclaron las 2 soluciones. Para la elaboración de MM pH 9.0 (MM9) Se pesaron 3g de nitrato de potasio, se adicionaron 62.5ml de solución de sales y se agregó TRIS 3.5 M, de manera que se completará una concentración de 50mM en el medio, se ajustó a pH 9.0 con ácido fosfórico y se aforó a un volumen de 500ml. Por separado se pesaron 10g de glucosa y se aforaron a 500ml con agua bidestilada. Se procedió a su esterilización por autoclave y finalmente se mezclaron las soluciones.

### **5.3.2. Desarrollo de cepas correspondientes a *S. cerevisiae*:**

- **Medio YPD (Yeast Extract-Peptone-Dextrose):** Para la preparación de 1L de medio se pesaron 10g de extracto de levadura, 20g de peptona y 20g de dextrosa, se mezclaron los componentes y se procedió a su esterilización.

### **5.3.3. Medios para el control de la concentración de zinc.**

Este tipo de medios fue utilizado para el crecimiento tanto para cepas de *U. maydis* como de *S. cerevisiae*, para la preparación de dichos medios, el material usado fue lavado con una solución de EDTA a una concentración de 3.5 mM durante 24 horas, con agitación constante en un agitador magnético con ayuda de una bala magnética, para eliminar cualquier traza de metales que pudiese existir (entre ellos el zinc), posteriormente se enjuagó a fondo dicho material con agua mili-Q. Para evitar cualquier contaminación de metales, todo tubo utilizado en el crecimiento de

microorganismos en este tipo de medios, fue completamente nuevo y estéril. En todo caso se utilizó agua mili-Q para la elaboración de los medios y fueron esterilizados por filtración (Corning® bottle-top vacuum filters, membrana de acetato de celulosa, tamaño de poro 0.22 µm, diámetro de membrana 70 mm) o por autoclave separando la glucosa.

- **Medio mínimo para levaduras (Yeast minimal media-SD/Synthetic Defined):** Para la preparación del medio SD se utilizaron 6.7g de medio YNB (yeast nitrogen base) sin aminoácidos y 5 g de glucosa para preparar 1L de medio, en el caso de cepas auxótrofas, se agregó el aminoácido requerido. Por último la mezcla fue esterilizada por filtración.
  
- **Medio bajo en zinc base (LZM/ Low zinc medium) (modificado de Zhao and Eide, 1996a por MacDiarmid and Bucci Wisconsin Madison University):** Para la elaboración del LZM primero fueron realizadas las siguientes soluciones concentradas:
  - **Solución de sales principal 10X.** (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 400 mM, CaCl<sub>2</sub> (2H<sub>2</sub>O) 10 mM, MgCl<sub>2</sub> (6H<sub>2</sub>O) 50 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM, se esterilizó en autoclave.
  
  - **Elementos traza 10,000X:** H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 100 mM, CuSO<sub>4</sub> (5H<sub>2</sub>O) 2 mM, KI 5 mM, Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> (2H<sub>2</sub>O) 1.0 10 mM disolver componentes en HCl 0.1 N (no fueron esterilizados).
  
  - **Solución de vitaminas 1000X:** biotina 0.2 mg (Sigma-Aldrich), pantotenato de calcio 40 mg, ácido fólico 0.2 mg, mioinositol 1000mg, niacina 40mg, ácido p-aminobenzoico 20mg, hidrocloreuro de piridoxina 40mg, riboflavina 20mg, hidrocloreuro de tiamina 40mg, se aforó a 100ml con agua mili-Q y se esterilizó por filtro.

Una vez realizadas las soluciones requeridas, para la preparación de 1L de medio LZM, se utilizaron: 100 ml de la solución sales 10X, 1 ml de solución de vitaminas 1000X, 100  $\mu$ l de solución de metales 10,000X, además se agregó  $\text{FeCl}_3$  para alcanzar la concentración de 10  $\mu$ M,  $\text{MnSO}_4$  para 25  $\mu$ M, 2 ml de EDTA 500mM y 20 ml de citrato de sodio 1 M. En caso de requerir aminoácidos para selección, solo se agregaron los que fuesen necesarios y no intervinieran en dicho proceso. Las cantidades de aminoácidos sugeridas son las siguientes (Para 1L de medio): uridina 0.1g, adenina 0.1g, histidina 0.1g, leucina 0.11g, triptófano 0.1g, metionina 0.1g, Lisina 0.12g, fenilalanina 0.05g, serina 0.4g, treonina 0.2, glutamato 0.1g. Se agregaron en la misma solución 20g de glucosa, y se esterilizó por filtración. Una vez realizado el LZM base, se adicionaban las concentraciones de zinc necesarias para el desarrollo de los experimentos.

- **Medio bajo en zinc modificado para expresión de los genes ZRT1 y ZRT2.**

Para lograr que los genes probables ZRT1 y ZRT2 se expresaran en *Ustilago maydis* fueron imitadas las condiciones en las cuales dichos genes son expresados en *Saccharomyces cerevisiae*, además fue de especial interés determinar si dichos genes son regulados por el factor de transcripción pacC/Rim101 ante variaciones de pH.

Para cumplir con los principales objetivos del presente estudio, mediante el uso del programa MAXCHELATOR software (<http://maxchelator.stanford.edu/>) (ChrisPatton, Stanford University), fueron diseñados 3 tipos de medios, correspondientes a los pH 4.0, 7.0 y 9.0, utilizando el protocolo del LZM (cuyo pH es de 4.2) como base, y se realizaron modificaciones en cuanto a los agentes quelantes, debido a que los mismos muestran su actividad quelante óptima en diferente pH y era crítico mantener las

mismas condiciones de zinc libre en el medio ( $1 \times 10^{-12} \mu\text{M}$  de  $\text{Zn}^{+2}$ ) independientemente del pH.

La preparación de los 3 medios se llevó a cabo tal como se describió anteriormente para el LZM base, solo varían los agentes quelantes y se ajustó cada uno al pH requerido, antes de su esterilización. Para el medio bajo en zinc a pH 4.0 (LZM4) se utilizó como quelante, al igual que en el LZM base, el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) en una concentración final de 1mM, adicionándose  $\text{ZnCl}_2$  hasta alcanzar  $0.17 \mu\text{M}$ . En el caso de LZM pH 7.0 (LZM7) se utilizó como agente quelante el ácido etilenglicoltetraacético (EGTA), logrando en solución una concentración de 10 mM y añadiéndose  $\text{ZnCl}_2$  hasta llegar a  $3 \mu\text{M}$ . Por último el LZM pH 9 (LZM9), fue realizado con ácido nitrilotriacético (NTA) (Ver ficha técnica en: <http://www.sigmaaldrich.com/MSDS/MSDS/DisplayMSDSPage.do?country=US&language=en&productNumber=N9877&brand=SIAL&PageToGoToURL=http%3A%2F%2Fwww.sigmaaldrich.com%2Fcatalog%2Fproduct%2Fisial%2Fn9877%3Flang%3Den>) a una concentración final de 1mM y  $10 \mu\text{M}$  de  $\text{ZnCl}_2$ . Todas las medidas anteriores, fueron realizadas con el propósito de lograr una concentración de  $\text{Zn}^{+2}$  libre de  $1 \times 10^{-12} \mu\text{M}$  en todos los pH.

#### 5.3.4. Crecimiento de *Escherichia coli*.

- **Medio Luria-Bertani (Sambrook *et al.*, 1982):** Fue el principal medio utilizado en el crecimiento de la bacteria *E. coli* tanto en caldo como en agar, su incubación siempre fue realizada a temperatura de  $37^\circ\text{C}$  y en agitación en el caso de medios líquidos. El periodo de crecimiento manejado fue entre 16 y 18 horas, para evitar la formación de colonias satélite en el caso de transformaciones. Para su elaboración se pesaron 10g de peptona de caseína, 5g de extracto de levadura, 10g de cloruro de sodio (NaCl), se ajustó a pH

7.0, se aforó a 1L y se procedió a su esterilización por autoclave. (En caso de requerir medio bajo en sodio, se redujo la cantidad de cloruro de sodio a 5g).

- **Medio SOC (Super optimal broth with catabolite repression) (Hanahan, 1983):** Fue utilizado para el crecimiento de *E. coli* durante los procedimientos de transformación; 20g de triptona, 5g de extracto de levadura, 3.6 g de glucosa, 0.186g de cloruro de potasio, 0.5g de cloruro de sodio. 0.96 g de cloruro de magnesio y por último fue esterilizado por autoclave.

5.4. **Estrés nutritivo (Ruiz-Herrera *et al.*, 1995):** Para llevar acabo la disminución de reservas existentes principalmente en cepas de *U. maydis* fue llevado acabo el siguiente protocolo: Se preparó un inóculo en agitación a 28°C durante 24 horas, y se centrifugó a 3000rpm durante 5 min, las células fueron posteriormente lavadas con agua bidestilada estéril y se volvió a centrifugar, se repitió el lavado, posteriormente se resuspendieron las células en agua bidestilada estéril en un volumen correspondiente al inóculo inicial, se incubó a 28°C en agitación por 2-4 horas, se centrifugó y se repitió el lavado 2 veces, por último se resuspendieron las células en agua destilada estéril, en un volumen correspondiente al 10% del inoculo inicial y se incubaron en hielo por 15 minutos en caso de utilizarse en ese momento o se almacenaron a 4°C por un periodo no mayor a 48 horas.

## 5.5. Protocolos de manipulación de ácidos nucleicos:

### 5.5.1. Soluciones y reactivos.

- **Buffers:**

- **Sodio-Tris-EDTA-SDS (NTES) (Sambrook and Rusel, 2001):** Se llevó a cabo tras añadir los siguientes componentes con sus respectivas concentraciones finales en solución: 10mM de NaCl, 10mM de Tris-Cl (pH 7.5), 1mM de EDTA (pH 7.5) y 1% de SDS. La mezcla fue posteriormente esterilizada por autoclave.
- **Tris-EDTA (TE) (Sambrook and Rusel, 2001):** Fue desarrollado tras adicionar Tris-Cl (pH 8) en una concentración final de 100Mm (a partir de un stock 1M) y 10mM de EDTA (stock .05M pH8), seguido de la propia esterilización en autoclave.
- **Tris-Acetato-EDTA (TAE) 50X (Sambrook and Rusel, 2001):** Se elaboró después de mezclar 242g de Tris, 57.1 ml de ácido acético glacial, 100 ml de EDTA 0.5 M (pH 8.0) en 1L de agua bidestilada (No se esterilizó).
- **Tris-Ácido bórico-EDTA (TBE) 5X (Sambrook and Rusel, 2001):** Fue realizado mediante la mezcla de 54g de Tris base y 27.5g de ácido bórico, disolviendo ambos en 900ml de agua bidestilada y agregando 20 ml de EDTA 0.5 M (pH 8.0), aforando finalmente a 1L (No se esterilizó).

- **De carga 6X:** Fue llevado a cabo a una concentración de 0.25% (P/V) (25mg) de azul de bromofenol y 40% (4g) de sucrosa en 10 ml de agua bidestilada, (no se esterilizó).
- **Ácido Morfolino Propano Sulfónico (MOPS) 10X (Sambrook and Rusel, 2001):** 0.2M ácido morfolinopropano sulfónico (MOPS) (Sigma-Aldrich), 10mM EDTA pH 8.0, 20 mM de acetato de sodio, se ajustó el pH a 7.0 con NaOH 3.5M, se disolvieron los componentes con agua estéril tratada con agua de DEPC (Ver en apartado de soluciones) y se ajustó el pH con NaOH. No se esterilizó en autoclave ya que es un compuesto irritante y no lo requiere, y se uso mascarilla durante su manipulación.
- **Soluciones:**
  - **Extracción de DNA plasmídico (Miniprep) (Sambrook and Rusel, 2001):**
    - **Solución I:** 25mM de tris-Cl pH 8.0, 10mM de EDTA pH 8.0, 50mM de glucosa y se esterilizó por autoclave bajo las condiciones antes mencionadas.
    - **Solución II:** NaOH 0.2 M y 1% de SDS, disueltos en agua bidestilada estéril, no se esterilizó.
    - **Solución III:** Se agregaron 3M de  $KCH_3CO_2$ , y se procedió al ajuste de pH con ácido acético hasta 5.5, se esterilizó por autoclave.
  - **Fenol cloroformo alcohol isoamílico (Sambrook and Rusel, 2001):** proporción 25:24:1 vol/vol/vol respectivamente.
  - **Agua libre de nucleasas (Sambrook and Rusel, 2001):** Fue obtenida tras un tratamiento con el reactivo dietilpircarbonato (DEPC); se añadió

1ml de DEPC por cada litro de agua bidestilada (en condiciones de obscuridad), se agitó vigorosamente e incubó a 37°C por 24 horas, y posteriormente se esterilizó en autoclave.

- **Acetato de litio (1X) (Gietz *et al.*, 1995):** Se disolvieron 5.1 g de acetato de litio dihidratado (Sigma) en 50 ml de agua y se esterilizó por autoclave; la solución fue almacenada a temperatura ambiente.
- **Solución de PEG 3350 (1X) (Gietz *et al.*, 1995):** Se disolvieron 50g de PEG 3350 (Sigma), en 30 ml de agua mili-Q mediante la aplicación de calor. Cuando la solución se enfrió a temperatura ambiente, se aforó a 100 ml, y se mezcló por inversión, y finalmente se esterilizó en autoclave; fue conservada a temperatura ambiente.
- **Solución acarreadora de DNA de cadena sencilla (ssDNA) (2.0mg/ml) (Gietz *et al.*, 1995):** Se disolvieron 200mg de DNA de esperma de salmón (Sigma) en 100ml de buffer TE pH 8.0 (Ver apartado X), se mezcló durante 1-2 horas a una temperatura de 4°C. Se realizaron alícuotas de 1ml y se almacenaron a -20°C.

Nota: El acarreador de DNA fue desnaturalizado al hervirlo en baño maría por 5 minutos, y enfriado inmediatamente en hielo antes de usarse.

#### **5.5.2. Extracción de ADN genómico (Sambrook and Rusel, 2001).**

- En el caso de cepas de *U. maydis* después de ser activadas, fueron inoculadas en MC durante 24 horas, En el caso de cepas correspondientes a *S. cerevisiae* fueron crecidas en medio YPD durante 15 horas.
- Se tomaron 3ml de medio de cultivo con células en crecimiento y se centrifugaron a 13,500 rpm durante 15 minutos (la centrifuga Eppendorf

Microcentrifuge 5415R, fue utilizada durante todo el procedimiento), A 4°C y posteriormente se vació el sobrenadante.

- Fueron agregados 500µl de Buffer NTES y se resuspendió la pastilla celular.
- Posteriormente se incubó en hielo durante 20 minutos, enseguida fueron agregados 0.3g de perlas de vidrio estériles y se mezcló en vortex durante 10 minutos.
- Se centrifugó a 13,500 rpm durante 15 minutos y se recuperó el sobrenadante.
- Fueron agregados 400µl de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico y se mezcló en vortex por 1 minuto.
- Posteriormente se centrifugó a 13,500rpm durante 15 minutos y se recuperó la fase superior.
- Se agregaron 0.1 volumen de acetato de amonio 7.5 M y 2 volúmenes de etanol al 96% o isopropanol al 100% y se mezcló por inversión y se incubó a -20°C por mínimo 12 horas.
- Luego se centrifugó a 13,500rpm durante 20 min.
- Se retiró el sobrenadante y se procedió al lavado de la pastilla, agregando 500µl de etanol al 70%.
- Se mezcló en vortex durante 2 min y se centrifugó a 13,500 rpm durante 10 minutos, se retiró sobrenadante y se dejó evaporar el etanol restante a 65°C en el Thermomixer® durante 10 minutos.
- Finalmente se resuspendió la pastilla en 30µl de buffer TE.

Nota. Las muestras fueron corridas en un gel de agarosa al 1%, durante 40 minutos a 80 voltz.

### **5.5.3. Extracción de DNA plasmídico por el método de lisis alcalina (Miniprep) (Birnboim and Doly 1979).**

- Se cultivó una colonia seleccionada en 5 ml de medio LB y al cual se le agregó previamente el antibiótico usado como marcador de selección, durante 16 horas.
- Posteriormente se centrifugaron los 5 ml del medio a 13,500rpm durante 5 min y se decantó el sobrenadante.
- Se resuspendió la pastilla celular en 150µl de la solución 1 (ver sección de soluciones), se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos.
- Fueron adicionados 200µl de la solución 2 por las paredes del tubo y se mezcló suavemente por inversión durante 5 min y se procedió a incubar en hielo durante 15 minutos.
- Se agregaron 150µl de la solución 3 y se mezcló gentilmente durante 3 minutos y se procedió a incubar en hielo durante 15 minutos.
- Posteriormente se centrifugó a 13,000rpm durante 15 minutos y se recuperó el sobrenadante.
- Se agregaron 200µl de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico y se mezcló en vortex durante 1 minuto.
- Se centrifugó a 13,500rpm durante 10 minutos y se recuperó la fase superior.
- Luego se adicionaron 2 volúmenes de isopropanol previamente enfriado a -20°C y se mezcló por inversión.
- Posteriormente se incubó a -20°C durante 12 horas y se centrifugó a 15,000rpm durante 10 minutos, se decantó el sobrenadante.
- Se agregaron 500µl de etanol al 70% frío y se mezcló en vortex durante 1 minuto y se centrifugó a 13,500 rpm durante 15 minutos.
- Fue vaciado el etanol y se colocó el tubo en el Thermomixer® a una temperatura de 65°C, para evaporar el etanol restante, durante 10 minutos.
- Posteriormente se resuspendió la pastilla en 30µl de buffer TE.

Nota. Las muestras fueron corridas en un gel de agarosa al 1%, durante 40 minutos a 80 voltz.

**5.5.4. Extracción de DNA plasmídico por kit (Wizard® Plus SV Minipreps kit) (Promega, <http://www.promega.com>; Cat# A1460).**

- Se obtuvo pastilla celular de un cultivo en medio LB incubado durante 16 horas y fue resuspendida en 250 µl de la solución de resuspensión celular contenida en el kit, en un mezclador tipo vortex.
- Se añadieron 250µl de la solución de lisis a cada muestra; se invirtió 4 veces para mezclar.
- Fueron adicionados 10µl de solución de proteasa alcalina se mezcló por inversión 4 veces, y se incubo a temperatura ambiente durante 5 minutos.
- Se agregaron 350 µl de solución neutralizadora; se invirtió 4 veces para mezclar.
- Dicha mezcla fue centrifugada a 13,000 rpm por 10 minutos a temperatura ambiente.
- La columna fue insertada en un tubo de recolección y el contenido lisado fue decantado dentro de la columna.
- Se centrifugo a 13,000rpm por 1 minuto a temperatura ambiente, se descartó el líquido resultante y se reinsertó la columna en el tubo de recolección.
- Fueron adicionados 750µl de la solución de lavado (con la previa adición de etanol).
- Se centrifugó a 13,000 rpm por 1 minuto y se decantó el flujo acumulado en el tubo, posteriormente se reinsertó la columna. Se repitió el paso de lavado, pero esta vez con 250 µl de la solución de lavado.
- Se centrifugó a 13,000 rpm por 2 minutos a temperatura ambiente.
- La columna fue transferida a un nuevo tubo de microcentrífuga de 1.5ml estéril y se agregaron 100 µl de agua libre de nucleasas a la columna.

- Se centrifugó a 13,000rpm por 1 minuto a temperatura ambiente, y finalmente el líquido obtenido con el DNA fue almacenado a una temperatura de -20°C

Nota. Las muestras fueron corridas en un gel de agarosa al 1%, durante 40 minutos a 80 voltz.

#### **5.5.5. EXTRACCIÓN DE RNA (Sambrook and Russell, 2001):**

**Nota:** Durante toda la técnica las muestras fueron conservadas en hielo.

- Fue recolectado lo correspondiente a 2 gramos de pastilla celular de las levaduras, se centrifugó a 4,000rpm durante 5 minutos y se decantó el sobrenadante.
- Fueron enfriados con nitrógeno líquido los morteros a utilizar, posteriormente se sumergió el tubo con las células en el nitrógeno durante 10 segundos, para congelarlas, después con ayuda de una espátula estéril dicha pastilla congelada fue vertida en el mortero y se procedió al rompimiento de la pared celular, hasta obtener un polvo blanco, que fue inmediatamente colocado en un tubo de microcentrífuga.
- Se agregaron 500µl de buffer NTES y 500µl fenol cloroformo alcohol isoamílico de y se resuspendió la pastilla celular y se mezcló durante 10 minutos en el agitador tipo vortex, intercalando con periodos de 1 minuto en hielo y se centrifugó durante 10 minutos a 13,000rpm.
- Fue transferida la capa superior a un tubo nuevo y se agregaron 400µl de fenol cloroformo alcohol isoamílico y se centrifugó a 13,000rpm durante 10 minutos.
- Se transfirió el sobrenadante a tubos de microcentrífuga nuevos y se agregó 0.1 volumen de Acetato de sodio 3M y 2 volúmenes de etanol absoluto.
- Posteriormente se incubó a -20°C durante 20 minutos y se centrifugó a 8000rpm durante 10 minutos y se decantó el sobrenadante.

- Se resuspendió la pastilla en 500µl de agua tratada con DEPC.
- Luego se agregó etanol al 96%, en un volumen correspondiente al 10% del total existente en el tubo.
- Se centrifugó a 5,000rpm durante 5 minutos y se recuperó el sobrenadante en un tubo nuevo.
- Fueron agregados 500µl de acetato de litio 4M y se incubó a -20°C mínimo por 3 horas o durante la noche.
- Se centrifugó a 3000 rpm durante 10 minutos y se decantó el sobrenadante.
- Posteriormente se disolvió la pastilla en 400µl de agua previamente tratada con DEPC.
- Se agregaron 40µl de acetato de sodio 3M y 900µl de etanol absoluto y se incubó a -20°C durante 2 horas.
- Se centrifugó a 8000rpm durante 10 minutos y se disolvió la pastilla en 300µl de agua tratada con DEPC.
- Por último se almacenó a -80°C.

#### **5.5.5.1. Digestión de la muestra de RNA (Sambrook and Russell, 2001).**

- Se realizó una mezcla de digestión, a la cual se le adicionaron 10µl de formamida desionizada, 2 µl de MOPS 10X, 4µl de formaldehído, y 2µl de RNA.
- Posteriormente se incubó 10 minutos a 35°C y se colocó en hielo durante 10 minutos.
- Fueron agregados 5µl de Buffer de carga 6X.
- Se agregó 1µl de bromuro de etidio estéril 1X y se corrió la muestra en buffer MOPS 1X a 70 voltz, durante 1 hora y media.

### **5.5.5.2. Preparación de gel para corrida de RNA (Sambrook and Russell, 2001).**

**NOTA:** Un día previo a realizar el protocolo se colocó la cámara de electroforesis completa a desinfectar con solución de cloro al 10% y al día siguiente se enjuagó con agua tratada con DEPC.

- Se añadió 1.5% de agarosa a 72ml de agua estéril y se disolvió.
- Posteriormente se enfrió la solución hasta 55°C (es importante dejar enfriar para evitar la liberación de gases irritantes).
- Se añadieron 10ml de buffer de corrida MOPS 10X.
- Fueron agregados 18 ml de formaldehído y se mezcló.
- Se vertió en molde y se dejó solidificar por lo menos durante 1 hora a temperatura ambiente.
- Previo a correr la muestra se corrió el gel vacío durante 5 minutos, con buffer TAE.

### **5.5.5.3. Tratamiento de RNA con DNasa (<https://worldwide.promega.com/~media/files/resources/protocols/product%20information%20sheets/g/rq1%20rnase-free%20dnase%20protocol.pdf>).**

Antes de utilizar cualquier muestra de RNA, se procedió a eliminar cualquier resto de DNA que pudiese existir tras la extracción del mismo, mediante un tratamiento con DNasa, siguiendo las especificaciones del proveedor (Promega), implementando la mezcla de los siguientes componentes: RNA (1-8  $\mu$ l), buffer RQ1 RNasa-DNasa libre 10X (1  $\mu$ l) (Promega, Cat.# M6101), enzima RQ1 RNasa-DNasa libre (1U/ $\mu$ g RNA) (Promega, Cat.# M6101), y agua tratada con DEPC (hasta completar 10 $\mu$ l). Una vez adicionados los componentes a la reacción, esta fue

incubada a 37°C durante 30 min, finalmente se agregó 1 µl de la solución inactivadora de la RQ1 DNasa y se incubó a 65°C por 10 min.

Nota: La reacción de digestión realizada contenía una concentración final de 10mM de MgSO<sub>4</sub>, la cual fue contemplada, en reacciones subsecuentes.

### 5.5.6. Técnica de reacción en cadena de polimerasa (PCR).

Para la amplificación de fragmentos de DNA mediante la técnica de PCR fueron utilizadas diferentes enzimas, por lo que las reacciones se llevaron a cabo dependiendo del tipo de las mismas, y en todos los casos se agregaron controles negativos, llevando a cabo las reacciones bajo las mismas condiciones pero sin la adición de DNA.

Para la elaboración de las construcciones de expresión fue utilizada la enzima de alta fidelidad para la clonación por PCR Easy-A (Agilent technologies, número de catálogo 600400) y la mezcla realizada para la amplificación de los genes se describe en la tabla 3.

**Tabla 3: Componentes de reacción de PCR llevada a cabo con enzima Easy-A** (<http://www.chem.agilent.com/library/usermanuals/Public/600400.pdf>).

Componente	Cantidad por reacción
Agua mili-Q estéril	41.1 µl
Buffer de reacción Easy-A 10X	5.0 µl
dNTPs (25 mM cada dNTP)	0.4 µl
DNA molde (100ng/µl)	1.0 µl
Oligonucleótido 5' (100ng/µl)	1.0 µl
Oligonucleótido 3' (100ng/µl)	1.0 µl
Enzima Easy-A (5U/µl)	0.5 µl (2.5 U)
Reacción total	50 µl

El programa utilizado con el uso de la enzima Easy A fue el descrito en la tabla 4, y la T<sub>m</sub> fue seleccionada dependiendo del oligonucleótido empleado (sección 5.5.8.).

**Tabla 4. Programa de PCR implementado tras el uso de enzima Easy-A.**

(<http://www.chem.agilent.com/library/usermanuals/Public/600400.pdf>).

Segmento	Numero de ciclos	Temperatura	Duración
1	1	95°C	2 minutos
2	34	95°C	40 segundos
		Oligo T <sub>m</sub>	30 segundos
		72°C	2 minutos
3	1	72°C	7 minutos

Para la amplificación de los segmentos utilizados en la elaboración de las construcciones de delección fue utilizada la enzima BIOLASE™ DNA polymerase (Bioline, número de catálogo: BIO-21042), para lo cual se tuvieron que estandarizar las concentraciones de cloruro de magnesio en las cuales la enzima cumplía con su función, probando con diferentes concentraciones, y la mezcla de reacción se describe a grandes rasgos en la tabla 5.

**Tabla 5. Reacción de PCR realizada mediante la enzima BIOLASE™.**

Componente	Cantidad por reacción
Buffer 10X	5 µl
MgCl <sub>2</sub> 50mM	1-4 µl
dNTPs 10mM	1 µl
Oligonucleótido 5' (10mM)	2 µl
Oligonucleótido 3' (10mM)	2 µl
Enzima (500U)	0.25 µl
DNA molde (100ng/µl)	1 µl
H <sub>2</sub> O mili-Q o libre de nucleasas	Completar a 50 µl

Las condiciones mediante las cuales se llevo a cabo la amplificación fueron aquellas descritas en la tabla 6.

**Tabla 6. Programa de PCR realizado con el uso de la enzima BIOLASE™**

([http://www.bioline.com/us/downloads/dl/file/id/2683/biolase\\_dna\\_polymerase\\_product\\_manual.pdf](http://www.bioline.com/us/downloads/dl/file/id/2683/biolase_dna_polymerase_product_manual.pdf)).

Segmento	Numero de ciclos	Temperatura	Duración
1	1	94°C	5 minutos
2	30	94°C	1 minuto
		Oligo T <sub>m</sub>	30 segundos
		72°C	2 minutos
3	1	72°C	5 minutos

Después de los procesos anteriormente mencionados, se corrieron las muestras en gel de agarosa al 1%, durante 40 minutos a 80 Volts.

#### **5.5.7. Síntesis de cDNA a través de retro-transcripción (RT-PCR)**

(modificado de <https://worldwide.promega.com/~media/files/resources/protocols/product%20information%20sheets/g/amv%20reverse%20transcriptase%20protocol.pdf>).

Para medir los niveles de expresión de genes analizados en el presente estudio, se llevaron a cabo reacciones de retrotranscripción a partir de las muestras de RNA extraídas y previamente tratadas con DNasa. Dichas reacciones se muestran en la tabla 7, siguiendo las especificaciones del proveedor (Promega), como controles positivos se utilizaron genes de expresión constitutiva como lo es la actina. Por otra parte se agregaron 2 tipos de controles negativos; uno sin la adición de RNA y agregando todos los componentes de la reacción, y otro tipo de control negativo para cada muestra de RNA, utilizando todos los componentes de la reacción antes

mencionada excepto la enzima AMV retrotranscriptasa, con el objetivo de asegurar la ausencia de contaminación con DNA.

**Tabla 7. Componentes de reacción de RT-PCR (modificado de <https://worldwide.promega.com/~media/files/resources/protocols/product%20information%20sheets/g/amv%20reverse%20transcriptase%20protocol.pdf>)**

Componente	Cantidad
Agua libre de nucleasas (Hasta 50 µl)	X µl
AMV/Tfl 5X Buffer	10µl
dNTPs (10µM cada uno)	1µl
Oligonucleótido 5´	1µl
Oligonucleótido 3´	1µl
25mM MgSO4	Y µl
AMV Transcriptasa reversa (5U/µl)	1µl
Tfl DNA Polimerasa (5u/µl)	1µl
RNA	Z µl

Posteriormente se procedió a llevar a cabo la síntesis de cDNA y su amplificación al someter la reacción a las condiciones mostradas en la tabla 8, en el termociclador (S100™ Thermal Cycler, BIO-RAD), la elección de la T<sub>m</sub> dependió del oligonucleótido empleado (Sección 5.5.8).

**Tabla 8. Programa utilizado para reacción de RT-PCR.**

Segmento	Numero de ciclos	Temperatura	Duración
1	1	45°C	45 minutos
2	1	94°C	2 minutos
3	40	94°C	30 segundos
		Oligo T <sub>m</sub>	1 minuto
		68°C	2 minutos
4	1	68°C	7 minutos

### 5.5.8. Oligonucleótidos empleados en el estudio.

Para el diseño de oligonucleótidos fueron empleados los programas bioinformáticos PrimerBlast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>), Primer3 Plus (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi/>) y el IDT oligoanalyzer (<https://www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/>), y se describen en las tablas 9-12.

**Tabla 9. Oligonucleótidos para la amplificación de umZRT1 y umZRT2 con regiones H5' y H3'.** Las bases resaltadas corresponden a las secuencias de homología, mientras las no resaltadas al respectivo gen.

Gen amplificado	Oligonucleótido	Secuencia	T <sub>m</sub> °C	Amplicon (pb)
umZRT1	um00096F	<b>GAAAGAAAAAAAATAT</b> <b>ACCCAGCCTCGACCC</b> AGCCTCGAGATGGCTG ACGAAATTCAGTG	53.2°C	1237
	um00096R	<b>GAGACTTGACCAAACC</b> <b>TCTGGCGAAGAAGTCC</b> AAAGCTGGATCCCTGT AGAGAGGAAAGAATCG AGGT	55.6°C	
umZRT2	um03110F	<b>GAAAGAAAAAAAATAT</b> <b>ACCCAGCCTCGACCC</b> AGCCTCGAGATGTTGG GGATCAATGTTAAGAG	52.9°C	1623
	um03110R	<b>GAGACTTGACCAAACC</b> <b>TCTGGCGAAGAAGTCC</b> AAAGCTGGATCCGGTT GCTATGCCAGACCTTAG	55.4°C	

**Tabla 10. Oligonucleótidos utilizados para la secuenciación de las construcciones pDR195umZRT1 (96<sup>a1</sup> y 96<sup>b3</sup>) y pDR195umZRT2 (10<sup>a1</sup> y 10<sup>b1</sup>).**

Gen secuenciado	Oligonucleótido	Secuencia	Tm °C
umZRT1	pma1pro seq 5'	CAATCGTTAATAATTAATTAA TTGGAAAATAAC	50.4°C
	pDR195seq 3'b	CTACCAACGATTGACCC	50.4°C
umZRT2	pma1pro seq 5'	CAATCGTTAATAATTAATTAA TTGGAAAATAAC	50.4°C
	ZRT2485seq 5'	ACAATCTGCCACTTCACATTG	53.6°C
	pDR195seq 3'b	CTACCAACGATTGACCC	50.4°C

**Tabla 11. Oligonucleótidos diseñados para el desarrollo de RT-PCR punto final.** Se muestran los genes de interés para la amplificación, el nombre del oligonucleótido, su secuencia, Tm y el tamaño del amplicón esperado.

Gen amplificado	Oligonucleótido	Secuencia	Tm °C	Amplicón (pb)
umZRT1	ZRT1FORWARD	CTTCCTCTCGGCATGAAGTC	55.3°C	212pb
	ZRT1REVERSE	ATGAACTCGTGTGCAAGCAG	55.9°C	
umZRT2	ZRT2 F	CGTCTCTCCCTGCTAAGGTG	57°C	244pb
	ZRT2 R	TCTTCTGCATCTGCCTGTIG	55.3°C	
Actina	ActinaF	CTCBATCATGAAGTGTGA	50°C	242pb
	ActinaR	BTGCTTYGARATCCACAT	52°C	
Rim101	RimFb2F	GAC TCG CAC ATG GCT GAG AGG	60.1°C	98pb
	RimFb2R	GCC GAG GGA TCA AAG GCG G	61.4°C	
Nrg1	Nrg1 F	ACTTGACCACCTCGACCTTG	56.9°C	460pb
	Nrg1R	AAAGGCGACACCATTCAATC	53.5°C	460pb

**Tabla 12. Oligonucleótidos diseñados para el desarrollo de construcciones de delección mediante la técnica DelsGate. Los oligonucleótidos de detección se combinan con el de Hyg-Dg.**

Gen amplificado	Oligonucleótido	Secuencia	Tm °C	Amplicon (pb)
<b>Promotor umZRT1</b>	1(SceI)0096	TAGGGATAACAGGGTAATGA ACAGCAGCGGTTTCTGAC	56.7°C	987pb
	2(attB1)0096	GGGACAAGTTTGTACAAAA AAGCAGGCTAAAACAGAGTG GGTGTGGAAGG	57.1°C	
<b>Terminador umZRT1</b>	3(attB2)0096	GGGACCACCTTTGTACAAGAA AGCTGGGTACGTTTTCTTTCT GTCTTTCTGC	52.5°C	1032pb
	4(SceI)0096	ATTACCCTGTTATCCCTACTA GAG AGG TTA GAG TTG CGA C	54.3°C	
<b>Promotor umZRT2</b>	1(SceI)03110	TAGGGATAACAGGGTAATCAT GAA TGC TTG GCA AAG GCG	57.8°C	1012pb
	2(attB1)03110	GGGACAAGTTTGTACAAAA AAGCAGGCTAACTTGGGTTCG GATGGATGAGG	57.7°C	
<b>Terminador umZRT2</b>	3(attB2)03110	GGGACCACCTTTGTACAAGAA AGCTGGGTACCCCGCTTCTGT TCGTATTC	55.8°C	980pb
	4(SceI)03110	ATTACCCTGTTATCCCTACAA CACGTTGGGCATCTACC	56.3°C	
<b>Extremo 3' gen de resistencia a higromicina</b>	Hyg-DG	AGAGCTTGGTTGACGGCAATT TC	58.2°C	
<b>Detección umZRT1</b>	um00096detec	TGGAGAGGTCCTCCTTTTCC	56.1°C	2522pb
<b>Detección umZRT2</b>	um03110detec	TGGACTACCGACCAGAAACC	56.5°C	2549pb

### **5.5.9. Purificación a partir de geles de agarosa (Modificado de QIAquick® Spin Handbook):**

Para la elaboración de construcciones de delección fue requerida la purificación de los amplificadores de DNA obtenidos por PCR. Y se llevó a cabo mediante modificaciones del protocolo correspondiente al kit de extracción QIAquick, tal como se muestra a continuación:

- Se procedió a cortar la banda del gel después de haberlo corrido en buffer TAE o TBE y ser teñido, la banda fue transferida a un tubo de microcentrífuga previamente pesado.
- Fueron agregados 3 volúmenes de buffer QG (QIAGEN, No. Catálogo 19063) con respecto al peso de la banda y se incubó a 50°C hasta lograr que se disolviera.
- Se colocó la solución en columna sobrepuesta en tubo de microcentrífuga y se centrifugó por 1 min a 13,000rpm.
- Posteriormente se descartó el líquido y se colocó la columna en tubo colector, fueron agregados 200 µl de etanol frío al 70% y se centrifugó durante 5 minutos a 13,000rpm.
- Se decantó el etanol y se centrifugó la columna aun en el mismo tubo, durante 3 minutos a 13,000 rpm.
- Se agregaron 30 µl de buffer TE pre calentado a 95°C y se procedió a centrifugar a las mismas rpm antes mencionadas durante 5 minutos.
- Por último se corrió un gel de agarosa para comprobar la pureza de las bandas.

**5.5.10. Elaboración de células calcio-competentes (Sambrook y Russel, 2001):**

- La cepa a tratar fue crecida en una placa de medio LB, a 37°C durante 16 horas.
- Fue seleccionada una colonia y se realizó un preinóculo en 5 ml de medio LB líquido, bajo las condiciones ya mencionadas, pero en agitación.
- Se inocularon 1.5 ml del preinóculo en 250ml de medio LB líquido, fue incubado a 37°C en agitación y se midió la densidad óptica a 600nm hasta alcanzar una absorbancia de 0.35 a 0.4, en la cual, las bacterias se encuentran a la mitad de su fase logarítmica.
- Se colocó el matraz en hielo por 20 minutos y se procedió a centrifugar todo el medio a 4000rpm durante 15 min a 4°C y se decantó el sobrenadante.
- La pastilla formada fue resuspendida en 25 ml de una solución fría de MgCl<sub>2</sub> a 100 mM, se centrifugó a 3000 rpm durante 15 min a 4°C y se decantó el sobrenadante.
- Se resuspendió en 50 ml de CaCl<sub>2</sub> frío a una concentración de 100 mM, fue incubado en hielo mínimo por 20 min, centrifugado a 3000 rpm durante 15 minutos a 4°C y se decantó el sobrenadante.
- Por último se agregó 1ml de una solución de CaCl<sub>2</sub> 85mM con 15% de glicerol fría, y se realizaron alícuotas de 50 µl, siendo almacenadas en ultracongelación a -80°C.

**5.5.11. Desarrollo de células electro-competentes (Adaptado de; Sambrook and Russell, 2001):**

- Fue sembrada la cepa de *E. coli* DH5α en placas de medio LB, se incubaron por 16 horas a 37°C.

- Se preparó el cultivo inicial, seleccionando 1 sola colonia de la placa y se inocularon 5 ml de medio LB, se incubó durante 16 horas a 37 °C en agitación.
- Al siguiente día se transfirieron los 5 ml inoculados a 500 ml de medio LB y se incubó a 37°C en agitación hasta alcanzar una que se alcanzó una DO 600 de 0.35-0.4 y se colocó el cultivo en hielo por 20 minutos.
- Todas las células fueron recolectadas por centrifugación, durante 20 minutos a 2500 rpm y a 4°C.
- Las células fueron resuspendidas en 500 ml de agua mili-Q estéril previamente enfriada a 4°C.
- Se centrifugó a 2500 rpm a 4°C por 20 minutos y se resuspendió en 250 ml de una solución de glicerol al 10% previamente enfriada en hielo y se centrifugaron a 2500 rpm por 20 minutos a 4°C y se retiró el sobrenadante.
- Las células recolectadas fueron resuspendidas en 10ml de una solución de glicerol a 10% fría y se volvió a centrifugar bajo las mismas condiciones.
- La pastilla celular fue resuspendida en 1ml de glicerol al 10% frío
  - Finalmente se realizaron alícuotas de 50µl en tubos de microcentrífuga previamente enfriados en hielo y fueron almacenadas en ultracongelación a -80°C.

**5.5.12. Transformación bacteriana (Invitrogen <sup>TM</sup>: [https://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/subcloningefficiencydh5alpha\\_man.pdf](https://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/subcloningefficiencydh5alpha_man.pdf))**

- Las cepas de *E. coli* DH5α previamente procesadas para su quimio o electro competencia fueron descongeladas en hielo.
- Fueron agregados 10pg-100ng del plásmido en el vial de las células.
- Se mezcló gentilmente e incubó en hielo por 30 minutos.

- Se le dio un choque térmico a 42°C durante 30 a 45 segundos y se colocó de inmediato en hielo por un periodo de 2-5 min.
- Fueron agregados 250 µl de medio SOC o LB previamente precalentado y se incubó a 37°C en agitación a 225 rpm.
- Por último se sembraron de 25 a 100 µl en placas con el antibiótico de selección y se incubó durante 16 horas a 37°C.

**5.5.12.1. Cálculo de eficiencia de transformación (Invitrogen <sup>TM</sup>: [https://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/subcloning/efficiencydh5alpha\\_man.pdf](https://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/subcloning/efficiencydh5alpha_man.pdf)):**

Se llevó a cabo tras la transformación de 50 µl de células calciocompetentes (ver protocolo anterior) con 250 pg de DNA del plásmido pUC19 y se calculó con la siguiente formula:

Eficiencia de transformación (# de transformantes/µg DNA)=

$$\frac{\# \text{ de colonias}}{\text{pg pUC19 DNA}} \times \frac{10^6 \text{ pg}}{\mu\text{g}} \times \frac{\text{Volumen de transformantes}}{\text{X } \mu\text{l inoculados}} \times \text{Factor de dilución}$$

**5.5.13. Electroporación bacteriana**

**(file:///C:/Documents%20and%20Settings/adriana%20marta/Mis%20documentos/Downloads/4307\_900\_012\_08\_1207\_e.pdf):**

Dicho procedimiento fue llevado a cabo en el aparato Electroporator 2510 marca eppendorf, mediante los siguientes pasos, siguiendo las recomendaciones del manual:

- Las células electro-competentes previamente desarrolladas fueron colocadas a descongelar en hielo.

- las cubetas para electroporar y los tubos de microcentrífuga fueron enfriados en hielo.
- Se colocaron 25  $\mu$ l de células en cada tubo y se agregó 1  $\mu$ l de plásmido.
- Dicha mezcla fue transferida a una cubeta, y se procedió a electroporar en el aparato a 1500 V.
- Se agregaron 975  $\mu$ l de medio LB atemperado a 37°C, se mezcló por pipeteo y se transfirió todo el contenido a un tubo tipo falcón de 15 ml de capacidad.
- Se incubó en agitación por 1 h.
- Fueron inoculados 100 $\mu$ l en placas de LB, con el antibiótico requerido, previamente atemperadas.
- Se incubaron a 37°C por 16 horas.

#### **5.5.14. Transformación de levaduras con acetato de litio (modificado de Gietz *et al.*, 1995)**

- Fueron inoculados 5ml de medio YPD durante la noche hasta una densidad óptica de 1.0 a 600nm.
- Se sembraron 0.5ml del cultivo en 9.5 ml de YPD.
- Se incubó a 30°C en agitación por un tiempo de 4 a 4.5 horas hasta alcanzar una densidad óptica de 4.0 a 600nm, se mantuvo en hielo durante todo el procedimiento.
- Las células fueron centrifugadas por 5 minutos a 3000 rpm a 4°C, se decantó el sobrenadante y fueron resuspendidas las células en 5 mililitros de acetato de litio 1X.
- Se centrifugaron las células bajo las condiciones ya mencionadas y el sobrenadante fue decantado.
- Posteriormente se procedió a resuspender las células en 0.5 ml de acetato de litio 1X.

NOTA: Para la generación de un plásmido por recombinación homóloga: se usó de 200-500 ng del vector linealizado más 500ng/μg del inserto de PCR.

- Se hirvió el ssDNA (solución stock 10mg/ml) por 1 minuto y se pasó a hielo.
- Fueron mezclados en un tubo de microcentrífuga: 10μl del ssDNA, 50μl de las células resuspendidas, el plásmido linealizado y el producto de PCR.
- Se agregaron 0.5 ml de una solución de PEG 3350-Acetato de litio 1X y se colocó en un agitador tipo vortex inmediatamente.
- Se incubó la transformación a 30°C por 45 min, y se dio un choque térmico a 42°C por 15 min, después se llevó a la transformación a temperatura ambiente.
- Por último se centrifugaron las células durante 1 minuto a 3000 rpm, se decantó el sobrenadante, y se resuspendió en líquido residual. Fueron sembradas todas las células en placas elaboradas con el respectivo marcador de selección.

#### 5.6. Análisis bioinformático:

- **Obtención de secuencias y su análisis:** A partir de la base de datos de *U. maydis* MUMDB (MIPS *Ustilago maydis* Data Base) (<http://mips.helmholtz-muenchen.de/genre/proj/ustilago/Search/index.html>) fueron obtenidas las secuencias nucleotídicas y aminoacídicas de los marcos de lectura abierto um00096 y um03110, los cuales son nombrados en éste trabajo umZRT1 y umZRT2 respectivamente. Las secuencias proteicas obtenidas fueron alineadas con proteínas de diferentes hongos en las bases de datos NCBI (The National Center for Biotechnology Information) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), Pfam (Finn *et al.*, 2014) (<http://pfam.sanger.ac.uk/>), Uniprot (The UniProt Consortium, 2015) (<http://www.uniprot.org/>) e InterProScan (Jones *et al.*, 2014)

(<http://www.ebi.ac.uk/interpro/>), de esa manera se determinó la función hipotética de umZrt1p y umZrt2p.

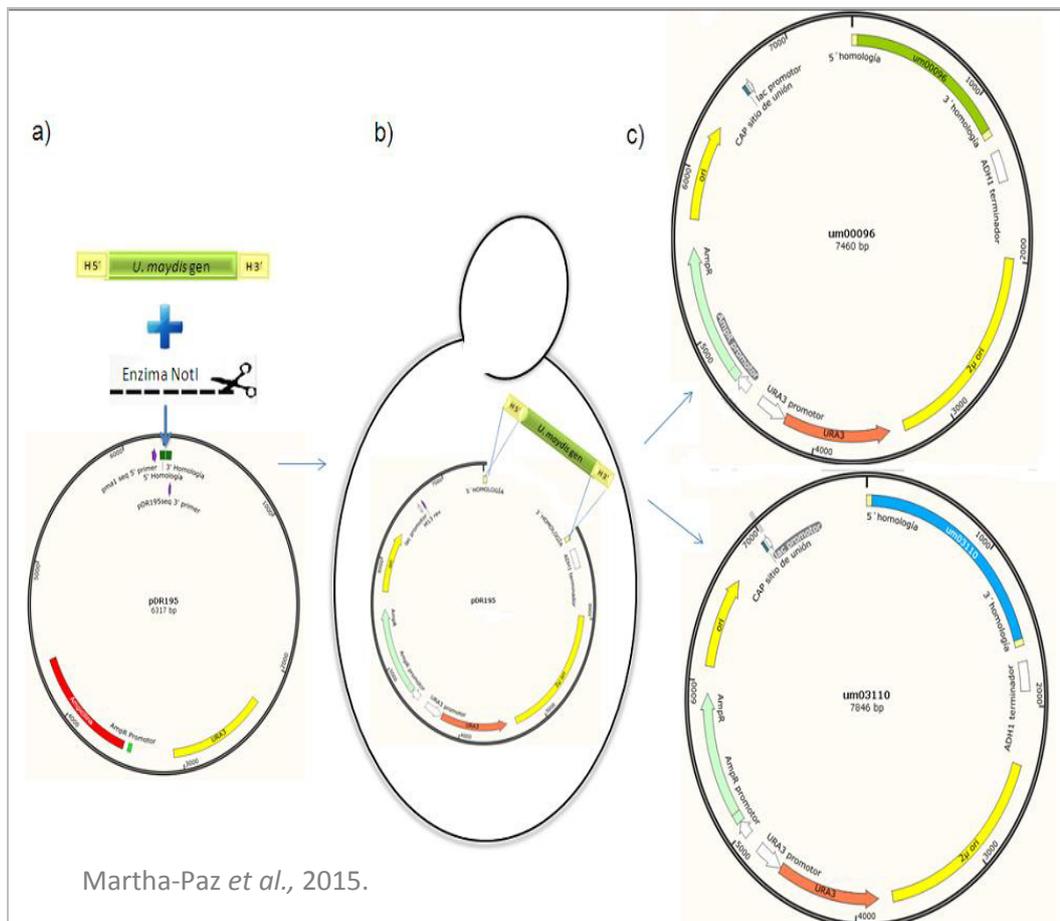
- **Conformación proteica y topología de umZrt1p y umZrt2p:** Se detectaron dominios funcionales en ambas proteínas y se determinaron las topologías *in silico* de las mismas con el programa PSIPRED (Predict Secondary Structure) de UCL department of computer science con la herramienta FFpred y MEMSAT-SVM (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/result/c76d0c7c-b34e-11e4-8a7e-00163e110593>) (Finn *et al.*, 2014).
- **Caracterización de promotores de genes que codifican transportadores de zinc:** Se analizaron los promotores (1000 pb río arriba del ORF) de umZRT1 y umZRT2 y de ZRT1 y ZRT2 en *S. cerevisiae* (organismo en el cual el transporte de zinc ha sido ampliamente estudiado, sirviendo como punto de comparación), con el propósito de identificar si contenían sitios consenso para la unión de factores de transcripción en respuesta a variaciones de pH, con ayuda de la base de datos YEASTRACT (**Yeast Search for Transcriptional Regulators And Consensus Tracking**) (<http://www.yeasttract.com/>).
- **Alineamiento de secuencias:** Fue llevado a cabo en el programa BioEdit Sequence Alignment Editor (Hall, 1999) y en ApE plasmid editor, disponible en línea (<http://www.biology.utah.edu/jorgensen/wayned/ape/>).

### **5.7. Análisis Filogenético:**

Se utilizó el programa MEGA 5.2 en donde se llevo a cabo la alineación de las secuencias mediante la herramienta Muscle, posteriormente se realizaron dos tipos de análisis; bajo el algoritmo del método de Neighbor-Joining (NJ) se infirieron y construyeron árboles, basados en las distancias que existen entre las secuencias analizadas y colapsando la información de cada carácter en una única medida de distancia. Por otra parte se realizó el análisis de las secuencias con el método de máxima verosimilitud (ML), para inferencia filogenética, y se uso el modelo Jones-Taylor-Thornton (JTT) basado en el número de cambios observados en aminoácidos entre las secuencias de interés, ambos análisis se realizaron incluyendo grupos taxonómicos cercanos evolutivamente. Los árboles resultantes fueron sometidos a un análisis “*bootstrap*” con 1000 replicaciones de donde se obtuvo un árbol consenso.

### **5.8. Elaboración de vectores de expresión**

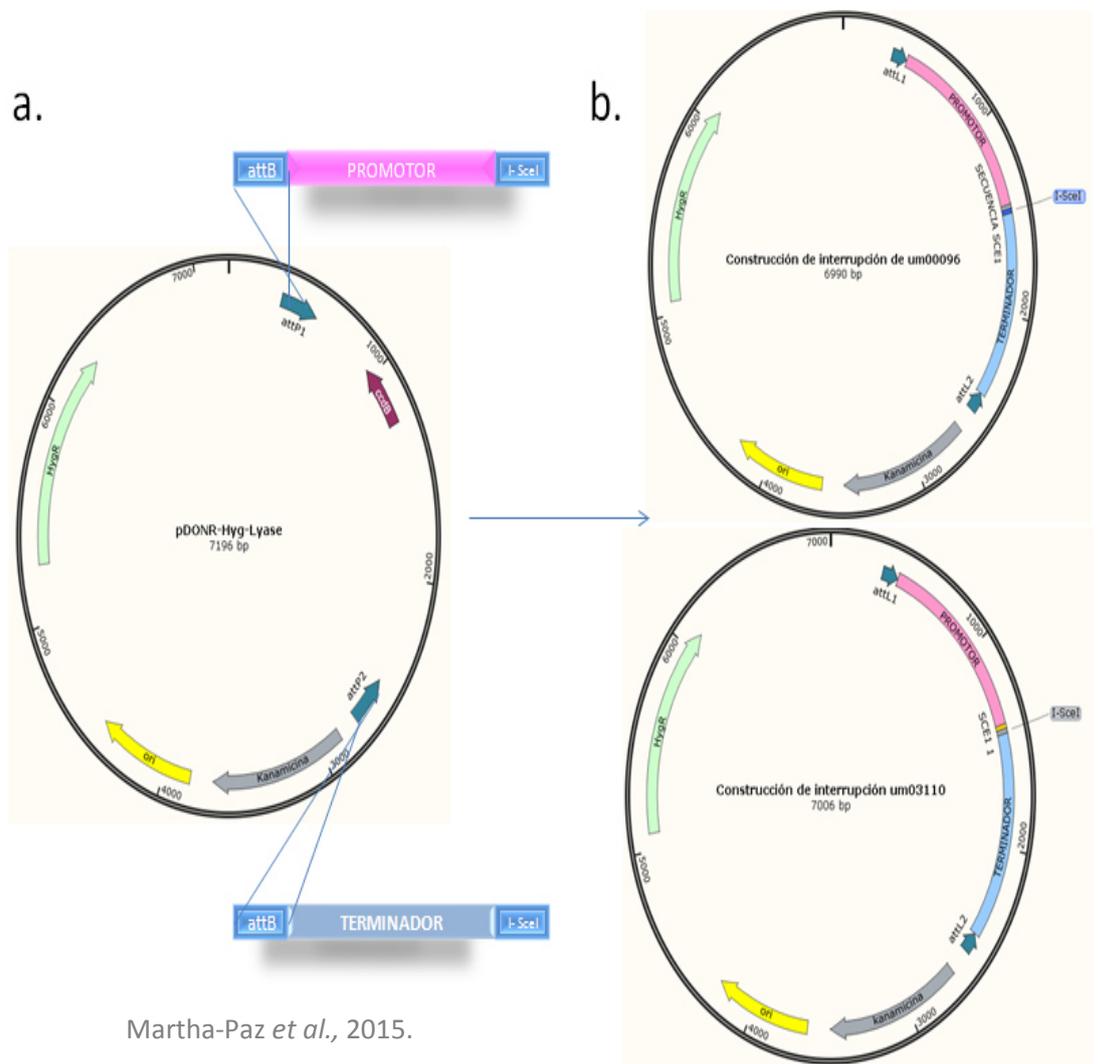
El desarrollo de las construcciones para la expresión de genes del hongo *Ustilago maydis* en la cepa mutante de *S. cerevisiae* ZHY3, fue llevada acabo tras amplificar los genes de interés utilizando oligonucleótidos diseñados con fragmentos de recombinación y con el protocolo de transformación de levaduras mediante acetato de litio antes descrito, con el uso de la cepa de *S. cerevisiae* BY4743 y el plásmido pDR195 que contiene regiones de recombinación, la cual es llevada dentro de la levadura integrando el gen de interés en el vector, dicho proceso se describe en la figura 8.



**Figura 8. Esquema de construcción de plásmidos de expresión con pDR195.** a) Adición de fragmentos de homología H5' y H3' a los genes umZRT1 y umZRT2 mediante PCR y linealización del plásmido pDR195 con la enzima NotI; b) Transformación de la cepa BY4743 de *S. cerevisiae* con los elementos descritos en inciso a, a través del protocolo de transformación de acetato de litio y su recombinación *in vivo*; c) Plásmidos resultantes de la recombinación pDR195umZRT1 y pDR195umZRT2.

**5.9. Elaboración de construcciones de delección mediante la técnica DelsGate utilizando la tecnología Gateway (Protocolo fabricante, Gateway® BP Clonase™ II Enzyme Mix) (García-Pedrajas, 2008).**

Para llevar a cabo el desarrollo de las construcciones por recombinación, se utilizó la enzima BP clonase™ II (Invitrogen™ num. catálogo: 11789-013) y se siguió el protocolo según el proveedor. Primeramente fueron diseñados oligonucleótidos con regiones necesarias para la recombinación (attB) y con fragmentos correspondientes a la enzima I-SceI. Fue utilizado el plásmido pDONR-Hyg-Lyase que presenta los sitios de recombinación attP, el procedimiento se resume en la figura 9.



Martha-Paz *et al.*, 2015.

**Figura 9. Diagrama de la recombinación *in vitro* mediante la tecnología DelsGate.** a. Se muestran la recombinación *in vitro* de los sitios attB contenidos tanto en el promotor como en el terminador con los sitios attP del plásmido pDONR-Hyg-Lyase, interrumpiendo el gen letal *ccdB* y linealizando el plásmido; b. Se presentan las construcciones resultantes, tras la recombinación de los sitios attB con los attP, generando sitios attL, y la circularización de los plásmidos debido a la homología de los sitios I-SceI presentes en los insertos.

El protocolo llevado a cabo fue el siguiente: Después de haber colocado en un tubo, de 200µl de capacidad, las cantidades correspondientes a los productos de PCR, del vector, y de buffer TE, se procedió a descongelar la enzima BP clonase™ II en hielo durante 2 minutos, mezclando en dos ocasiones en vortex por 2 segundos, se añadió la enzima a la mezcla y se procedió a incubar la reacción a 25°C durante la noche. Para terminar la reacción, se añadió 0.5µl de proteinasa K (Invitrogen™) (20µg/µl), se mezcló en agitador tipo vortex y se incubó a 37°C por 10 min. La reacción fue almacenada a -20°C, hasta ser ocupada en la transformación bacteriana, donde solo fue utilizado 1µl de la reacción por transformación. Los componentes y cantidades empleados en la reacción para el desarrollo de la construcción son enlistados en la tabla 13.

**Tabla 13. Componentes de reacción de recombinación para el desarrollo de construcción de delección (García-Pedrajas, 2008).**

Componente	Cantidad
Productos de PCR (75-125ng/ µl)	Máximo 3µl
pDONR-Hyg-Lyase (75ng/µl)	1µl
BP clonase™ II	1µl
Buffer TE pH 8.0	Completar 5 µl

**5.10. Linealización de vectores y caracterización de construcciones por restricción enzimática**  
 (<https://worldwide.promega.com/~media/files/resources/protocols/technical%20manuals/101/restriction%20enzymes%20protocol.pdf>)

Toda restricción fue llevada a cabo siguiendo el protocolo del proveedor de los reactivos, la selección de la enzima, y por lo tanto su respectivo buffer, temperatura y tiempo de incubación, dependió de la secuencia necesaria a cortar, ya

fuera para linealización o caracterización de algún plásmido. A continuación se describe una reacción de restricción general en la tabla 14.

**Tabla 14. Reacción de restricción general**

Componente	Cantidad
Agua mili-Q estéril	Completar a 20 $\mu$ l
Buffer 10X	2 $\mu$ l
BSA 1X	2 $\mu$ l
DNA	X (Cantidad necesaria)
Enzima	1U/ $\mu$ g de DNA

De ser necesaria la inactivación de la enzima, se incubó la reacción a 65°C durante 15 minutos.

### **5.11. Secuenciación de genes:**

Para confirmar la amplificación sin presencia de mutaciones de los genes ZRT1 y ZRT2 de *U. maydis*, fueron secuenciados dichos genes a partir de los plásmidos de construcción desarrollados. Antes de procesar las muestras en el secuenciador se realizó una reacción con la enzima BigDye Terminator v. 3.1 mix (Applied Biosystems), los componentes requeridos para llevarla a cabo así como sus cantidades, son enlistados en la tabla 15.

**Tabla 15. Reacción para secuenciación con enzima Big Dye™**

Componente	Cantidad
Plásmido	5 µl
Oligonucleótido (10µM)	2 µl
10 X Big Dye Buffer	3 µl
Big Dye Terminator mix	2 µl
DMSO	1 µl
Agua Mili-Q estéril	2 µl
Total	20 µl

Después de realizar la mezcla de los componentes de la reacción a secuenciar, se colocaron en el termociclador bajo las condiciones en la tabla 16:

**Tabla 16. Programa para secuenciación con Big Dye™**

Segmento	Numero de ciclos	Temperatura	Duración
1	1	95°C	3 minutos
2	50	96°C	10 segundos
		58°C	4 minuto
3	1	72°C	7 minutos

La secuenciación fue llevada acabo en el secuenciador Applied Biosystems 3730xl automated DNA sequencing instrument y los datos fueron analizados usando el programa PE-Biosystems versión 3.7 of Sequencing Analysis en el centro de biotecnología de la universidad de Wisconsin-Madison.

### **5.12. Ensamblaje y edición de secuencias.**

Una vez obtenidas las secuencias complementarias de las reacciones de secuenciación, fueron ensambladas y editadas en el programa ApE plasmid editor, disponible en línea (<http://www.biology.utah.edu/jorgensen/wayned/ape/>).

### **5.13. Análisis bioestadístico.**

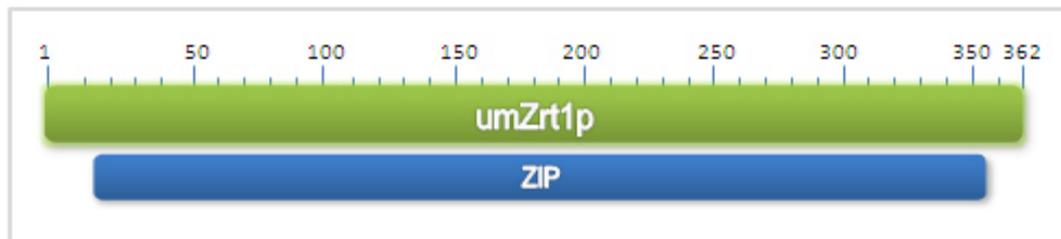
Para la validación de resultados, se realizaron análisis descriptivo e inferenciales, con el uso del programa SPSS versión 17.0. Las pruebas se realizaron tomando en cuenta las absorbancias en base a cada tratamiento (plásmido con el que se transformó) y concentración de  $ZnCl_2$ . Se realizó una prueba de ANOVA y Tukey para determinar entre que niveles de los factores se encuentran diferencias significativas entre las medias de las absorbancias.

## 6. RESULTADOS

### 6.1. Identificación y análisis de genes transportadores de zinc en *U. maydis*

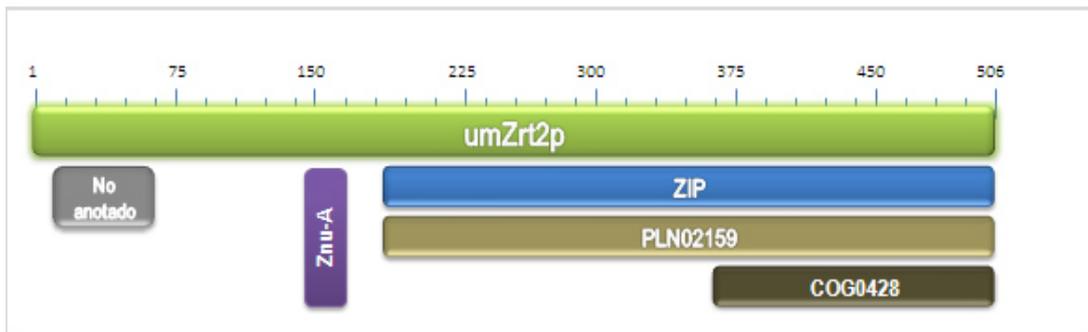
Con ayuda de la base de datos del hongo *U. maydis* MUMDB (*MIPS Ustilago maydis* Data Base) (<http://mips.helmholtz-muenchen.de/genre/proj/ustilago/Search/index.html>) fueron identificados 2 genes con probable función de transporte de baja afinidad a zinc ZRT2, dichos genes corresponden al número de identificación um00096 y um03110, nombrados umZRT1 y umZRT2 respectivamente en el presente trabajo, localizados en el cromosoma 1 (umZRT1) y 7 (umZRT2). Con el propósito de identificar la función real de cada gen fueron obtenidas de la base de datos antes mencionada tanto las secuencias nucleotídicas como proteicas (Ver en anexos 10.1), y con el uso de las posibles proteínas se realizaron alineamientos en diferente bases de datos como lo es NCBI (The National Center for Biotechnology Information) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), Pfam (Finn *et al.*, 2014), Uniprot (The UniProt Consortium, 2015) e InterProScan (Jones *et al.*, 2014).

El gen umZRT1 (acceso a GenBank: XP\_756243.1) codifica para una proteína de 362 aminoácidos aun no caracterizada. Según las bases de datos, tras un análisis comparativo con proteínas cuya función ha sido previamente reportada, la mayor parte de su secuencia aminoacídica corresponde al dominio funcional característico de la familia ZIP (aminoácido 18-359), que integra transportadores de zinc y en algunos casos de otros metales como el hierro, presentes en la membrana plasmática (Fig. 10).



**Figura 10. Dominios funcionales de umZrt1p caracterizados *in silico*.**

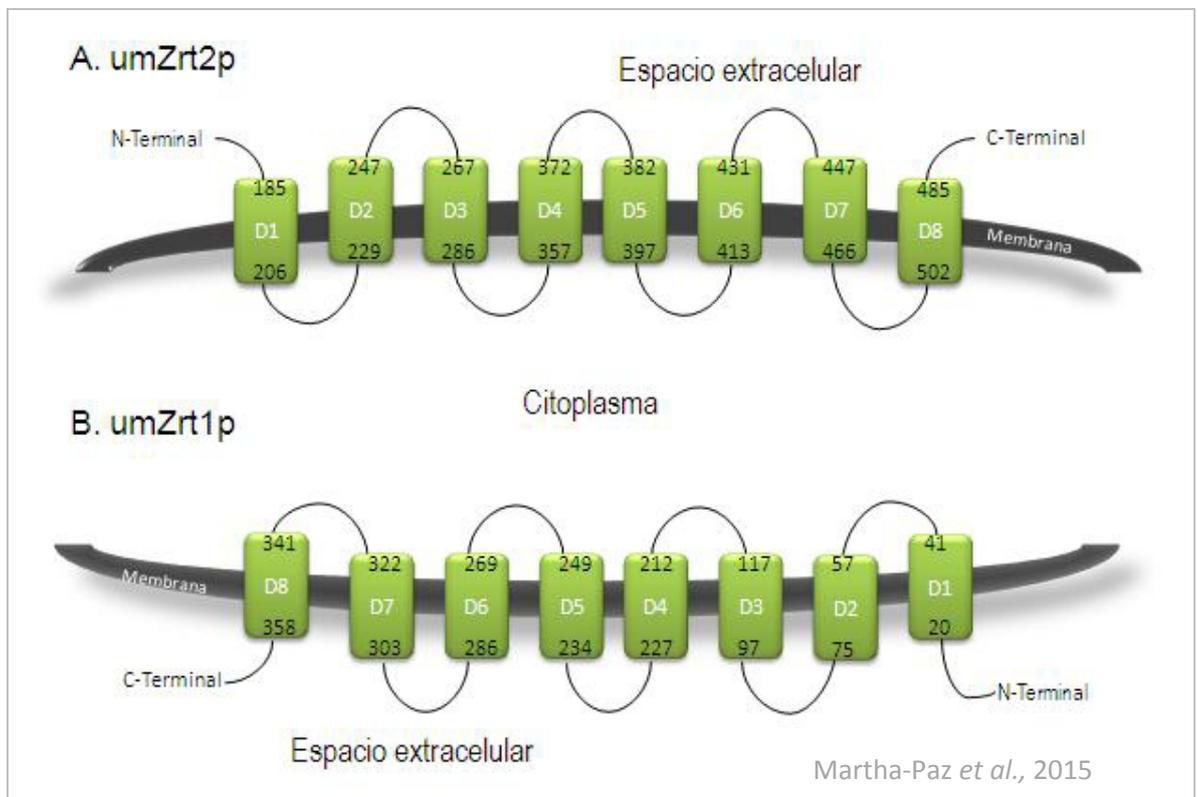
El gen umZRT2 (Acceso a GenBank: XP\_759257.1) codifica para una proteína de 506 aminoácidos, al alinearla con ayuda de la herramienta Basic Local Alignment Search tool (BLAST) del NCBI se obtuvo como resultado la existencia de varios dominios *in silico*, siendo el principal correspondiente a la superfamilia ZIP (en intervalo aminoacídico 182-506), otra región detectada es similar a la secuencia proteica registrada como PLN02159 que tiene como función el transporte de  $\text{Fe}^{+2}$  y también corresponde a la familia ZIP (intervalo 182-506), por otra parte en una región pequeña (aminoácido 352-502) se encontró similitud con COG0428, el cual tiene como función hipotética, el transporte de metales pesados divalentes; además se identificó similitud con la proteína Znu-A de la superfamilia TroA-Li, el cual en organismos procariontes, es un transportador de zinc de alta afinidad, situado en el espacio periplásmico (intervalo 141-166) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Una última región (secuencia aminoacídica 14-69) identificada como Pfam-B\_11456 presenta secuencias similares a las encontradas en la planta *Arabidopsis thaliana* pero no se detectó función anotada (Finn *et al.*, 2014) (Fig. 11).



**Figura 11. Dominios funcionales en umZrt2p caracterizados *in silico*.**

### 6.1.1. Estructura *in silico* de umZrt1p y umZrt2p

Mediante un análisis bioinformático (ver sección 5.6) se detectó que umZrt1p y umZrt2p podrían contener 8 dominios transmembranales, con los extremos amino y carboxilo terminales situados en el espacio extracelular (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/result/c76d0c7c-b34e-11e4-8a7e-00163e110593>) (Fig. 12).

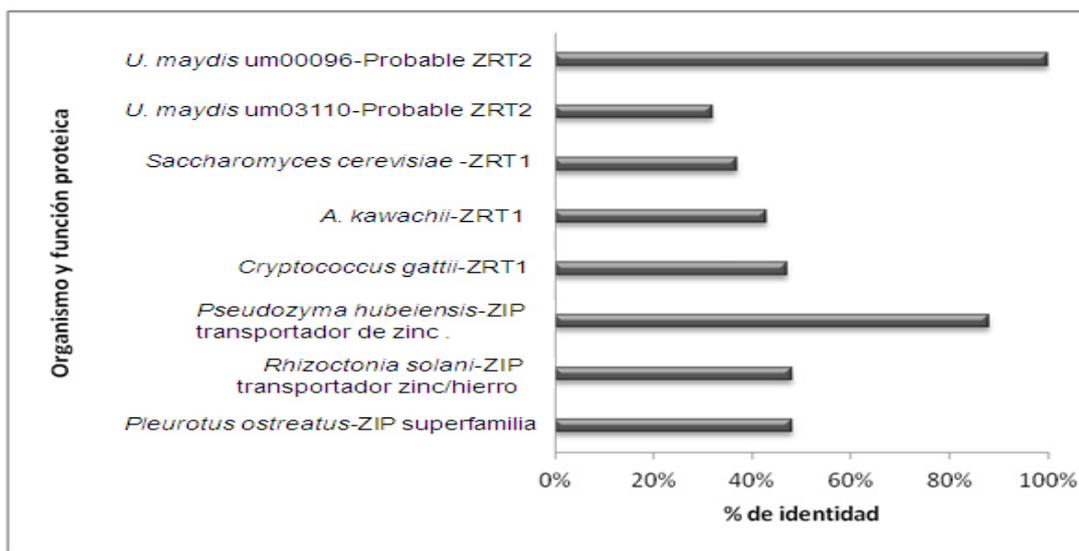


**Figura 12. Predicción *in silico* de la topología de umZrt1p y umZrt2p.** Ambas proteínas presentan 8 dominios transmembranales (D1-D8), con los extremos N y C terminal hacia el espacio extracelular, los intervalos comprendidos entre cada dominio se encuentran indicados en cada cuadro de color verde (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/result/c76d0c7c-b34e-11e4-8a7e-00163e110593>).

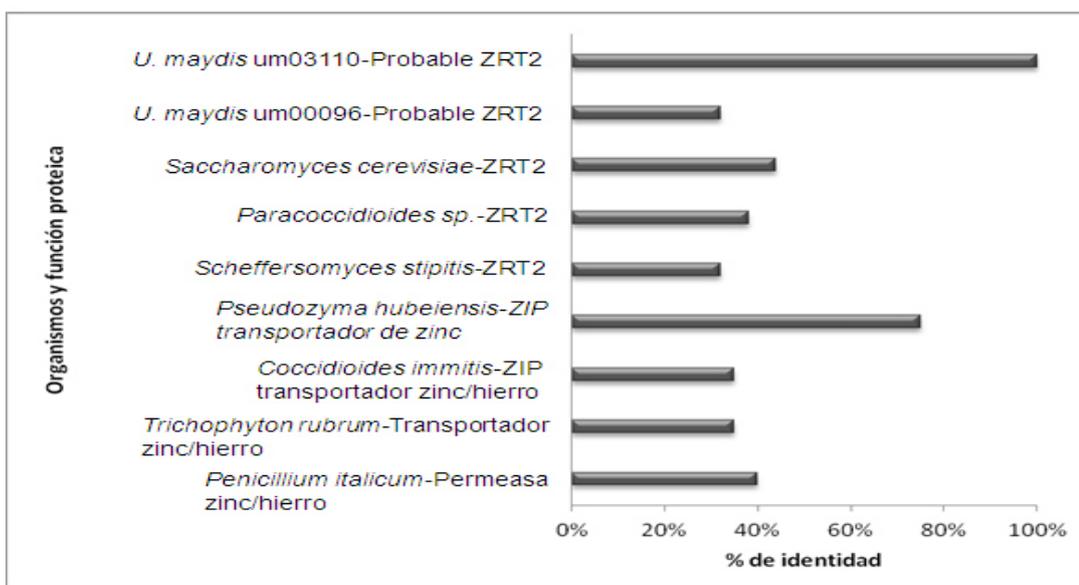
### 6.1.2. Alineamiento de secuencias aminoacídicas de umZrt1p y umZrt2p con las de otros organismos.

Las secuencias proteicas codificadas por ambos genes fueron comparadas con las de organismos en los cuales ya habían sido identificadas y reportadas sus funciones, mediante la herramienta BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). En el análisis, fueron identificados varios organismos cuyas proteínas presentan altos porcentajes de identidad con respecto a las proteínas de interés, tanto con funciones ya reportadas como con aquellas hipotéticas relacionadas con el transporte de zinc, la

mayoría presenta el dominio funcional ZIP. En las figuras 13 y 14 se muestran algunos organismos cuyas secuencias aminoacídicas presentan similitud con respecto las secuencias umZrt1p y umZrt2p, y por lo tanto con su función.



**Figura 13. Comparación aminoacídica entre um00096/umZrt1p y diferentes organismos.**



**Figura 14. Proteína um03110/umZrt2 comparada con secuencias aminoacídicas de diferentes organismos.**

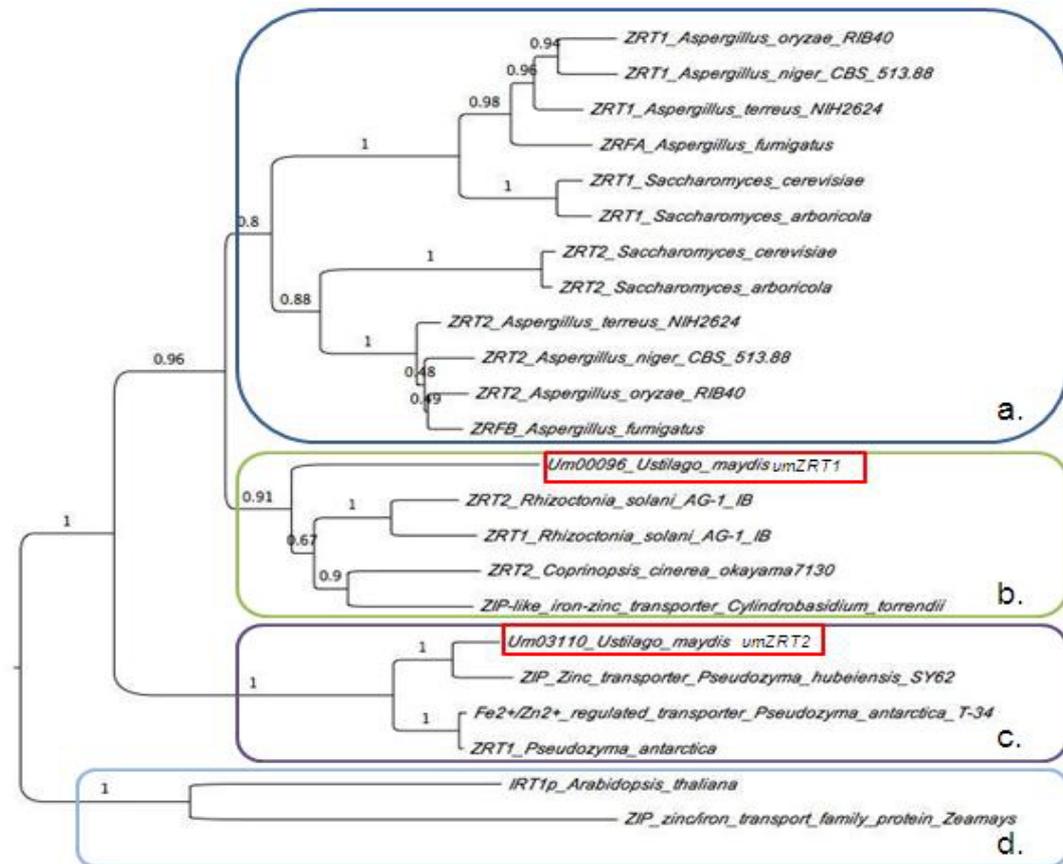


### 6.1.3. Análisis filogenético de transportadores de zinc.

Los transportadores de la familia ZIP se encuentran en una gran variedad de organismos y son muy importantes para la nutrición, sobrevivencia, virulencia y asociaciones simbióticas de los organismos (Eide, 2009). Con el objetivo de identificar las relaciones evolutivas y/o funcionales de los genes umZRT1 y umZRT2 con respecto otros organismos, y generar asociaciones estructura/función realizamos un análisis filogenético de las proteínas (ver sección 5.6). Tomando en cuenta transportadores de zinc reportados en organismos cercanos evolutivamente a *U. maydis* y en los cuales su función ya ha sido caracterizada. Por otro lado, se utilizaron secuencias de hongos ascomicetos de los géneros *Sacharomyces* y *Aspergillus*, y secuencias correspondientes a hongos basidiomicetos de los géneros *Rhizoctonia*, *Coprinopsis*, *Cylindrobasidium*, y *Pseudozyma*, cabe señalar que el número de secuencias ya reportadas como transportadores de zinc en hongos basidiomicetos es muy reducido, lo que dificultó la comparación tanto estructural como funcional de las proteínas de interés con organismos de esta división. Por lo que tuvieron que ser tomados en cuenta organismos pertenecientes a otras clases de basidiomicetos, siendo el más cercano, el género *Pseudozyma*. Como grupo externo se utilizaron las secuencias correspondientes a Irt1p de *Arabidopsis thaliana*, ya que fue a partir de la comparación con dicha proteína, que se describieron los primeros transportadores de zinc, Zrt1p y Zrt2p en *Saccharomyces cerevisiae* (Zhao and Eide, 1996a). Por otra parte se usó la proteína transportadora de zinc y hierro tipo ZIP de la planta *Zea mays*, debido a la estrecha relación de *U. maydis* con la misma.

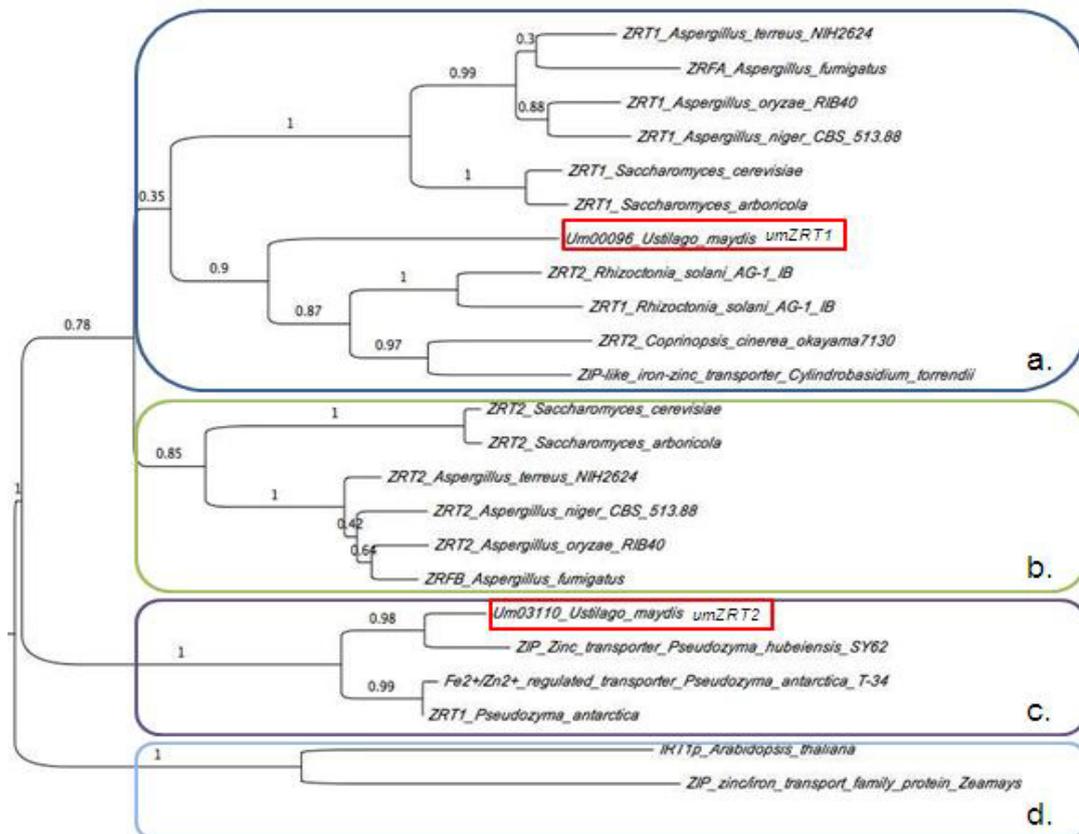
Mediante el uso del método NJ se observó que las secuencias aminoacídicas correspondientes a transportadores de tipo ZIP en plantas, fueron clasificadas como raíz o ancestro común, en el árbol generado, representando al grupo externo, tal como se observa en el clado "d" (Fig. 17d); a partir de ello, los transportadores de zinc de hongos se agrupan en 3 grandes clados (para fines descriptivos en figura 17 a, b, c). En el clado "a" se agruparon transportadores de zinc correspondientes a

hongos ascomicetos, viéndose separados los transportadores de alta y de baja afinidad por zinc, independientemente del género, lo que indica la similitud de secuencias dentro de la división Ascomycota, pero a su vez la marcada diferencia entre las secuencias correspondientes a transportadores tipo Zrt1p y Zrt2p, lo que refleja la diferencia funcional, en cuanto a su especificidad por zinc. En el clado "b" se observa a la proteína umZrt1p, que muestra mayor similitud estructural con transportadores de la familia ZIP, Zrt1p y Zrt2p de hongos basidiomicetos *Rhizoctonia*, *Coprinopsis* y *Cylindrobasidium*, pero como ya se mencionó, debido a la baja cantidad de proteínas caracterizadas en basidiomicetos, no se observó una clara diversidad en base a similitud estructural donde fueran asociadas respecto a su función. En el clado "c" se presentan agrupadas proteínas transportadoras de zinc de basidiomicetos del género *Pseudozyma* junto a la secuencia umZrt2p de *U. maydis*.



**Figura 17. Relación evolutiva de umZrt1p y umZrt2p con otros organismos por el método Neighbor-Joining.** La historia evolutiva fue inferida usando el método Neighbor-Joining. El porcentaje de árboles replicados en los cuales los taxa asociados se agrupan en la prueba de bootstrap (1000 replicas) se muestran en cada rama, con longitudes de ramas en las mismas unidades que aquellas distancias evolutivas usadas para inferir el árbol filogenético. Las distancias fueron calculadas usando el método de corrección de Poisson y están basadas en las unidades de los números de sustituciones de aminoácidos por sitio. El análisis involucró 23 secuencias de aminoácidos. Todas las posiciones que contenían gaps y datos perdidos se eliminaron. Hubo un total de 257 posiciones en el conjunto de datos finales. El análisis evolutivo se llevó a cabo en MEGA 5.

A partir del uso del método ML se observa a la proteína umZrt1p más relacionada evolutivamente con proteínas transportadoras de zinc de alta afinidad de tipo Zrt1p de hongos ascomicetos (Fig. 18 a y b). Según el método usado, la proteína umZrt2p se encuentra evolutivamente relacionada con transportadores pertenecientes al hongo basidiomiceto del género *Pseudozyma* (Fig. 18c). Por lo que la proteína umZrt1p parece estar más relacionada evolutivamente con los hongos ascomicetos, mientras que umZrt2p es más similar y evolutivamente cercana a hongos basidiomicetos de su misma familia, siendo según el análisis, los transportadores de plantas sus principales antecesores (Fig. 18d).



**Figura 18. Análisis filogenético molecular por el método de Máxima verosimilitud de umZrt1p y umZrt2p, con otros organismos.** La historia evolutiva fue inferida mediante el uso de método de máxima verosimilitud basado en el modelo en matriz JTT. El árbol inicial para la búsqueda heurística fue obtenido automáticamente mediante la aplicación de algoritmos Neighbor-Join y BioNJ a la matriz de distancias por pares usando un modelo JTT, y después seleccionando la topología con el valor de mayor probabilidad de verosimilitud. El árbol es dibujado a escala, con las longitudes de las ramas medidas en el número de sustituciones por sitio. El análisis involucró 23 secuencias de aminoácidos. Todas las posiciones que contenían gaps y datos perdidos fueron eliminadas. Hubo un total de 257 posiciones en el conjunto de datos finales. Los análisis evolutivos fueron llevados a cabo en MEGA5.

#### **6.1.4. Caracterización de promotores de genes que codifican transportadores de zinc.**

La disponibilidad de metales se ve afectada por cambios externos de pH, debido a ello se analizaron los promotores (1000 pb río arriba del ORF) de los genes umZRT1, umZRT2 y de ZRT1 y ZRT2 en *S.cerevisiae* (organismo en el cual el transporte de zinc ha sido ampliamente estudiado, sirviendo como punto de comparación), con el propósito de identificar si contenían sitios consenso para la unión de factores de transcripción en respuesta a variaciones de pH, con ayuda de la base de datos YEASTRACT (Yeast Search for Transcriptional Regulators And Consensus Tracking) (<http://www.yeasttract.com/>).

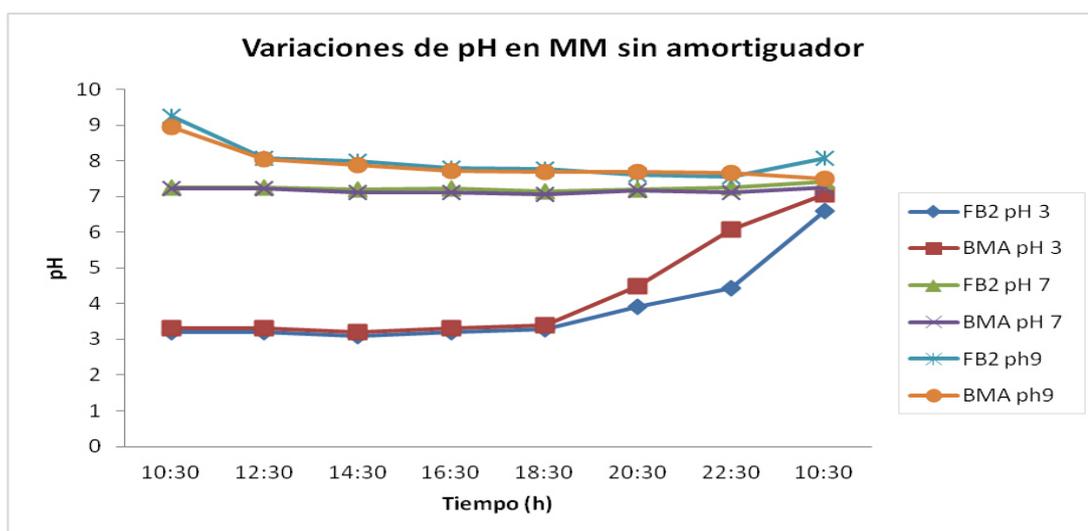
El promotor del gen umZRT1 no presentó unión de PacC/Rim101p pero sí de Nrg1p, el cual se sabe es regulado por Rim101p (Valmik et al., 2005), por otra parte se encontró, en el promotor de umZRT2, la existencia de sitios de unión tanto para PacC/Rim101p como para Nrg1p, cabe señalar que a diferencia de los promotores de los genes ZRT1 y ZRT2 en *S. cerevisiae*, en los genes de *U. maydis* no se detectaron regiones consenso de unión al factor de transcripción Zap1p, encargado de regular la mayoría de los genes codificantes para transportadores de zinc en los organismos en los que se ha descrito (Tabla 17).

**Tabla 17. Factores de transcripción con posible función reguladora de los genes de interés.** Se presentan los sitios de unión para los factores de transcripción Rim101p, Nrg1p y Zap1p.

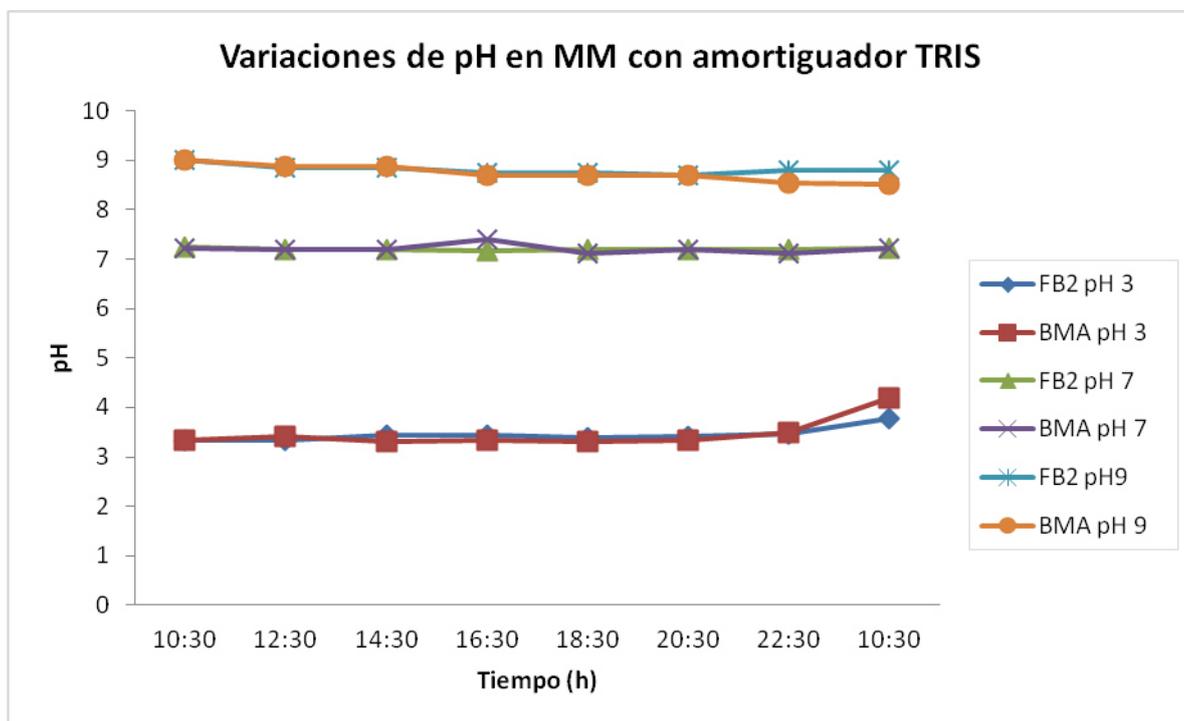
<b>Organismo y gen</b>	<b>Factor de transcripción</b>	<b>Región consenso</b>	<b>Sitio de unión</b>	<b>Cadena</b>
<b>umZRT1</b> <i>U. maydis</i>	Nrg1p	CCCCT	-49	5´
	Nrg1p	CCCTC	-214	5´
	Nrg1p	CCCTC	-207	5´
	Nrg1p	CCCTC	-54	5´
<b>umZRT2</b> <i>U. maydis</i>	Rim101p	TGCCAAG	-363	5´
	Nrg1p	CCCCT	-256	5´
	Nrg1p	CCCCT	-129	5´
	Nrg1p	CCCTC	-255	5´
<b>ZRT1</b> <i>S. cerevisiae</i>	Zap1p	ACCYYNAAGGT	-319	5´
	Zap1p	ACCYYNAAGGT	-204	5´
	Zap1p	ACCYYNAAGGT	-193	3´
	Zap1p	ACCYYNAAGGT	-445	3´
	Zap1p	ACCTTNAAGGT	-204	5´
	Zap1p	ACCTTNAAGGT	-193	3´
	Zap1p	ACCTTGAAGGT	-204	5´
	Rim101p	TGCCAAG	-735	5´
	Nrg1p	CCCTC	-318	5´
<b>ZRT2</b> <i>S. cerevisiae</i>	Zap1p	ACCYYNAAGGT	-311	5´
	Zap1p	ACCYYNAAGGT	-251	5´
	Rim101p	TGCCAAG	-787	3´

## 6.2. Respuesta a variaciones en el pH extracelular por *U. maydis*.

Los hongos son capaces de cambiar el pH externo y de esa manera llegar a una homeostasis en la cual exista la disponibilidad adecuada de nutrientes como el zinc. Con el propósito de averiguar si *U. maydis* es capaz de mediar a través de PacC/Rim101p el cambio de pH del medio extracelular, fueron realizadas curvas de pH por triplicado, monitoreando durante 12 y después de 24 horas los cambios de pH realizados por las cepas FB<sub>2</sub> y BMA2 (*Rim101*<sup>-</sup>) en medio mínimo MM3, 7 y 9, con y sin buffer TRIS. Los resultados obtenidos se muestran en las figuras 16 y 17, tanto la cepa mutante de PacC/Rim101p como la silvestre mostraron variaciones de pH muy similares en los diferentes tipos de medios, se observaron cambios más significativos en los medios con ausencia de amortiguador, con una tendencia a alcanzar la neutralidad en los medios de pH extremo: 3.0 y 9.0, mientras el MM7 solo mostró pequeñas variaciones, manteniéndose en su pH inicial (Fig. 19). Por otra parte en los medios con amortiguador se presentaron ligeros cambios de pH incluso en los MM3 y 9 (Fig. 20).



**Figura 19. Variación del pH por las cepas de *U. maydis* FB<sub>2</sub> y BMA2 en medio mínimo sin amortiguador.** El experimento fue llevado a cabo en MM3, 7 y 9 sin Buffer, durante 12 h y una medición final a las 24 h.



**Figura 20. Curva de variaciones de pH por las cepas de *U. maydis* FB<sub>2</sub> y BMA2 en MM con buffer TRIS.** Se llevo a cabo a partir de pH 3.0, 7.0 y 9.0, durante 12 h y una medición final a las 24 h.

### 6.3. Análisis de complementación de mutantes.

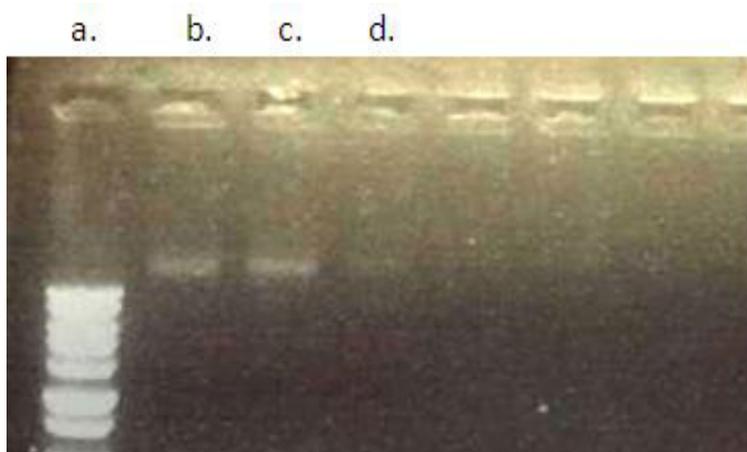
#### 6.3.1. Construcción de plásmidos de expresión

Con el objetivo de identificar si las funciones de los genes de interés umZRT1 y umZRT2 complementan las desempeñadas por ZRT1 y ZRT2 respectivamente en *S. cerevisiae*, los marcos de lectura abierto de dichos genes en *U. maydis* fueron amplificados e insertados en el plásmido pDR195 (Rentsch *et al.*, 1995) (Anexo 10.2.1), el cual contiene un promotor de alta eficiencia para la expresión (pPMA1) y regiones de homología (H5' y H3') para llevar a cabo recombinación con los insertos de interés. Para la amplificación de dichos genes fueron diseñados oligonucleótidos

con las secuencias H5' y H3' adicionales al oligonucleótido sentido y antisentido de cada gen (Tabla 9).

### 6.3.1.1. Amplificación de los genes umZRT1 y umZRT2.

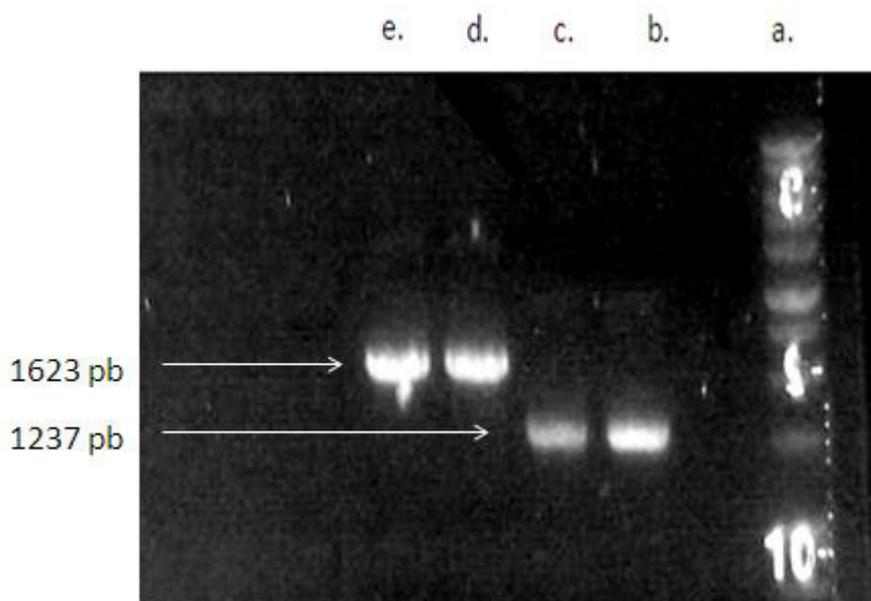
Después de la síntesis de oligonucleótidos se procedió a realizar la extracción de DNA genómico de la cepa de *U. maydis* FB<sub>2</sub>, para utilizarlo como molde en la amplificación de los genes de interés (Fig. 21).



**Figura 21. Electroforesis de DNA genómico de la cepa FB<sub>2</sub>.** Electroforesis de DNA genómico de la cepa FB<sub>2</sub>, se muestran bandas de alto peso molecular características, se cargaron 5  $\mu$ l por muestra. a) Marcador de peso molecular 1 Kb DNA ladder (Promega); b) muestra 1 (300ng/ $\mu$ l); c) muestra 2 (280ng/ $\mu$ l), muestra 3 (80ng/ $\mu$ l).

Una vez realizada la extracción de DNA genómico (Sambrook and Rusel, 2001), se procedió a amplificar por duplicado, mediante PCR, los genes umZRT1 y umZRT2 flanqueados por las regiones H5' y H3'. Los elementos, las cantidades y las condiciones utilizadas en cada reacción se muestran en las tablas 3 y 4, bajo una T<sub>m</sub> de 50.6 °C para todas las reacciones. Tal como se muestra en la tabla 9, los tamaños esperados tras la amplificación de cada gen flanqueado con las secuencias de

homología, son de 1237pb para umZRT1 y 1623 pb para umZRT2, en la figura 22 se observan las bandas obtenidas correspondientes a dichos pesos moleculares.



**Figura 22. Electroforesis de fragmentos correspondientes a los genes umZRT1 y umZRT2 flanqueados por las secuencias H5' y H3'. a) 1 Kb DNA ladder (Promega); b. Reacción 1; umZRT1a (1237pb); c. Reacción 2 gen umZRT1b (1237pb); c. Reacción 1 gen umZRT2a (1623pb); d. reacción 2 gen umZRT2b (1623pb).**

### 6.3.1.2. Clonación en el plásmido pDR195.

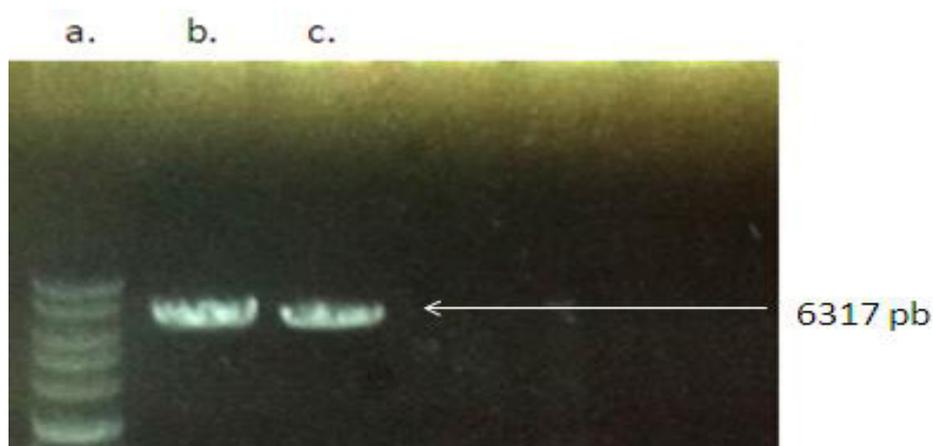
#### 6.3.1.2.1. linealización:

Se digirió el plásmido pDR195 con la enzima NotI para su linealización y posterior uso para la recombinación inserto-vector, ya que es capaz de cortar secuencias localizadas entre las dos secuencias de homología H5' y H3' (GC $\nabla$ GGCC GC - CG CCGG $\blacktriangle$ CG). La reacción llevada a cabo se muestra en la tabla 18, se realizó por duplicado y fue incubada durante 16 horas a 37°C, para asegurar la mayor cantidad de plásmido cortado.

**Tabla 18. Componentes de reacción de restricción para linealización del plásmido pDR195 con enzima NotI.**

Componente	Cantidad
Agua mili-Q estéril	5 $\mu$ l
Buffer D 10X	2 $\mu$ l
BSA 10X	2 $\mu$ l
DNA pDR195 (109ng/ $\mu$ l)	10 $\mu$ l
Enzima NotI (10 u/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l

Después de llevar a cabo la restricción del plásmido, se procedió a realizar una electroforesis para asegurar que el corte se hubiese realizado correctamente, esperando un patrón de bandeo correspondiente a 6317 pb (Fig. 23)



**Figura 23. Electroforesis de la restricción de pDR195 con la enzima NotI.** Se obtuvieron las bandas correspondientes a 6317 pb del plásmido linealizado: a. 1 Kb DNA ladder (Promega); b. restricción no.1 de pDR195; c. reacción de restricción no. 2 del plásmido.

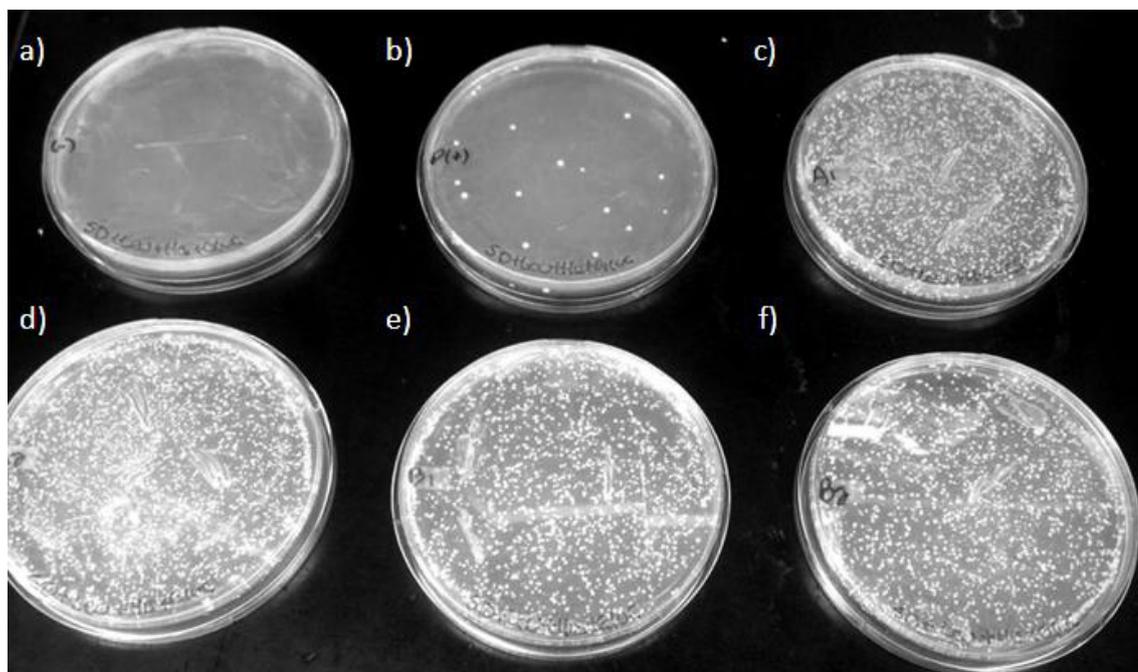
### 6.3.1.2.2. Recombinación de umZRT1 y umZRT2 con pDR195.

Después de obtener los elementos necesarios para la recombinación homóloga de los mismos, se creció a la cepa de *S. cerevisiae* BY4743 en medio YPD, y se llevó a cabo el protocolo de transformación con acetato de litio (modificado de Gietz *et al.*, 1995).

Como control negativo se transformó a la cepa BY4743 únicamente agregando ssDNA; además se agregó un control en el cual se adicionó el plásmido linealizado sin los insertos durante la transformación con el objetivo de averiguar si existía plásmido cerrado después de la digestión, y de ser así, saber que grado de confiabilidad tenía la selección de colonias; por otro lado se procedió a transformar a la levadura con los fragmentos amplificados por PCR (por duplicado), umZRT1 y umZRT2 flanqueados por las regiones H5' y H3' (por separado), y el plásmido linealizado, para lograr dentro de la levadura, una recombinación homóloga, obteniendo como resultado la clonación de los genes de *U. maydis* dentro del vector, logrando de esa manera, la construcción *in vivo* de los plásmidos de expresión pDR195umZRT1a, pDR195umZRT1b, pDR195umZRT2a y pDR195umZRT2b. Una vez llevado a cabo el proceso de transformación, se inoculó en placas elaboradas con medio SD con los aminoácidos histidina y leucina, siendo el uracilo el marcador de selección. El proceso para la construcción de los plásmidos de expresión *in vivo* se resume en la figura 8.

Después de haberse incubado las transformantes durante 2 días, en la placa donde se inoculó el control negativo (transformado solo con ssDNA) no se presentó crecimiento (Fig. 24a), en donde fue sembrada la transformación con el plásmido linealizado únicamente, se obtuvieron pocas colonias (Fig. 24b), en comparación con las transformadas con pDR195umZRT1 y pDR195umZRT2 (Fig. 24 c, d, e, f), lo

que indicaba que a pesar de quedar poco plásmido cerrado, era factible la selección de transformantes y que el procedimiento fue exitoso.

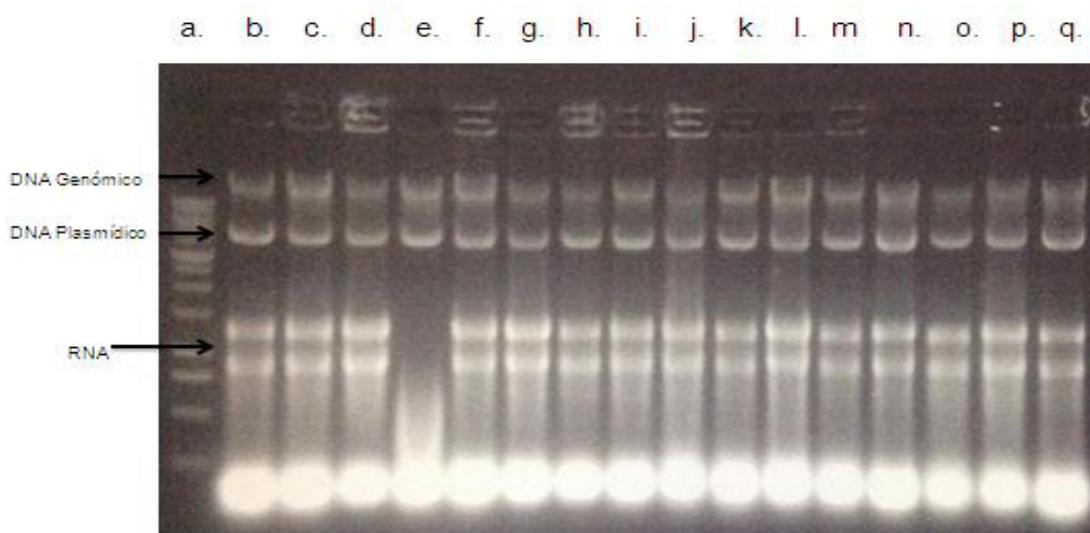


**Figura 24. Resultado de transformación de la cepa BY4743 con los controles y pDR195umZRT1 y pDR195umZRT2.** a) Control negativo: correspondiente a la transformación de la levadura con ssDNA; b) control con plásmido pDR195 linealizado; c y d) colonias con plásmido pDR195umZRT1a y pDR195umZRT1b respectivamente; e y f) colonias correspondientes a la cepa BY4743 transformada con pDR195umZRT2a y pDR195umZRT2b.

### **6.3.1.3. Extracción de material genético de la cepa BY4743 transformada con pDR195umZRT1 y pDR195umZRT2.**

Para la liberación de los plásmidos pDR195umZRT1 (a y b) y pDR195umZRT2 (a y b), fueron seleccionadas 4 colonias por transformación y se les realizó extracción de todo el material genético; DNA genómico, plasmídico y RNA, mediante la técnica de extracción de DNA genómico (Sambrook and Rusel, 2001), después de haberlas crecido en medio SD más la adición de los aminoácidos histidina

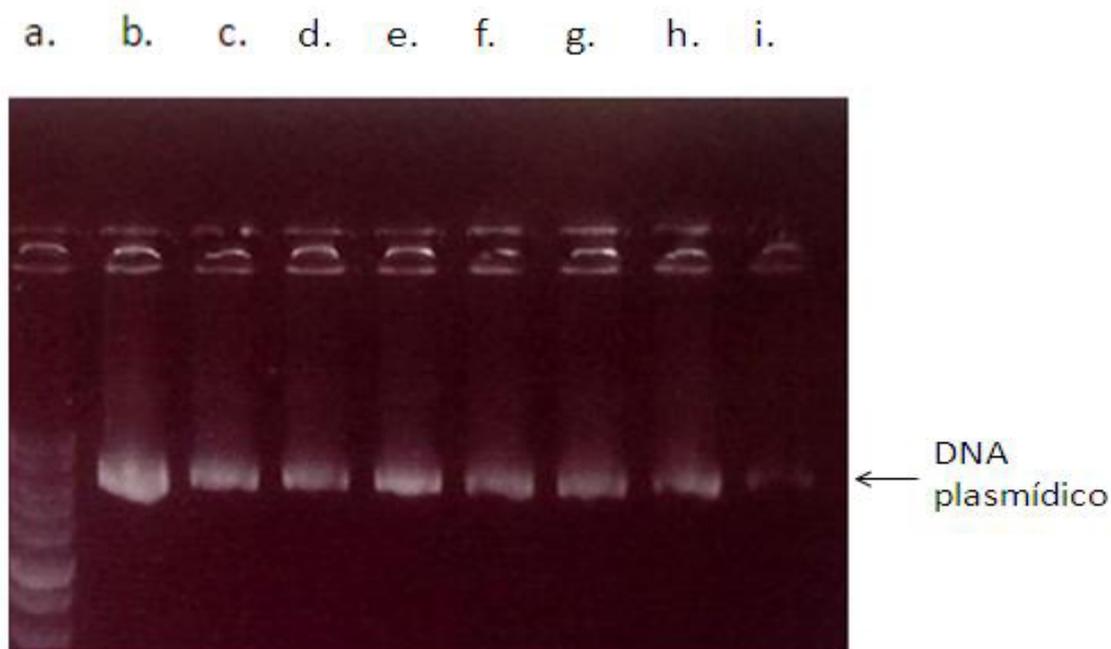
y leucina. Las colonias correspondientes a pDR195umZRT1a fueron identificadas como  $96^{a1}$ ,  $96^{a2}$ ,  $96^{a3}$  y  $96^{a4}$ ; las de pDR195umZRT1b:  $96^{b1}$ ,  $96^{b2}$ ,  $96^{b3}$  y  $96^{b4}$ ; pDR195umZRT2a:  $10^{a1}$ ,  $10^{a2}$ ,  $10^{a3}$  y  $10^{a4}$ ; por último las correspondientes a pDR195umZRT2b fueron nombradas con:  $10^{b1}$ ,  $10^{b2}$ ,  $10^{b3}$  y  $10^{b4}$ . Los resultados de la extracción se muestran en la fig. 25.



**Figura 25. Gel comprobatorio de extracción de los plásmidos pDR195umZRT1 (a y b) y pDR195umZRT2 (a y b).** a) Marcador de peso molecular 1 Kb DNA ladder (Promega); Se muestra el material genético extraído a partir de las 4 colonias seleccionadas de la cepa BY4743 transformada con las construcciones de expresión generadas *in vivo*, en el siguiente orden: b, c, d, e) transformantes  $96^{a1}$ ,  $96^{a2}$ ,  $96^{a3}$  y  $96^{a4}$ ; f, g, h, i)  $96^{b1}$ ,  $96^{b2}$ ,  $96^{b3}$  y  $96^{b4}$ ; j, k, l, m)  $10^{a1}$ ,  $10^{a2}$ ,  $10^{a3}$  y  $10^{a4}$ ; n, o, p, q)  $10^{b1}$ ,  $10^{b2}$ ,  $10^{b3}$  y  $10^{b4}$ .

#### 6.3.1.4. Obtención de DNA plasmídico correspondiente a las construcciones pDR195umZRT1 (a y b) y pDR195umZRT2 (a y b).

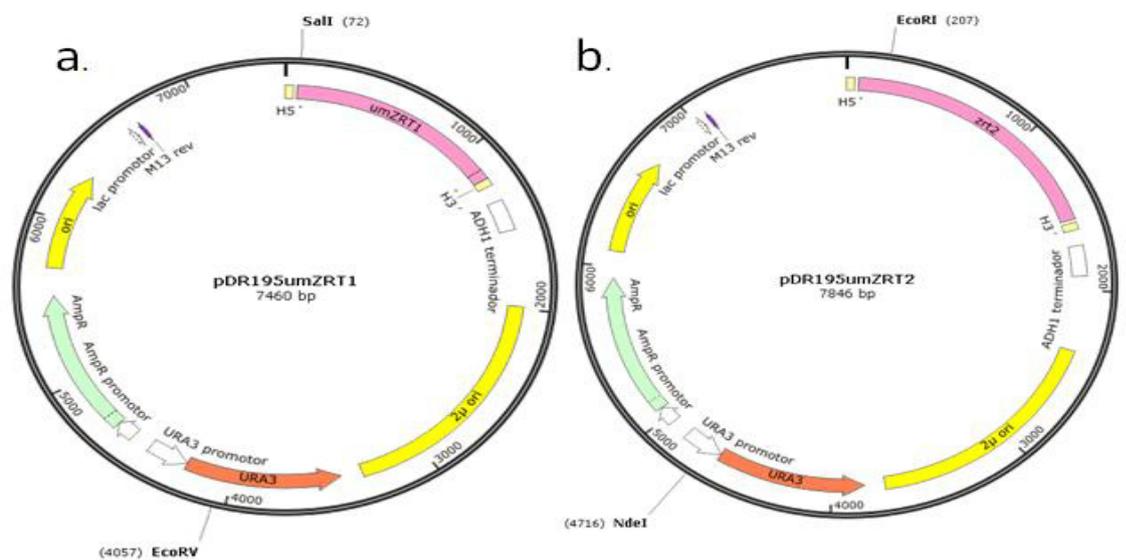
Con la intención de lograr obtener únicamente el DNA plasmídico, se procedió a electroporar a la cepa DH5 $\alpha$  de *E. coli* según se describe en materiales y métodos, con el material genético extraído de las colonias seleccionadas, dejando crecer en placas de LB con ampicilina durante 16 horas a 37°C después de la transformación, seleccionando finalmente 1 colonia por placa. Posteriormente se realizó la extracción de los plásmidos por medio del kit Wizard® Plus SV Minipreps kit (Promega) (Fig. 26).



**Figura 26.** Electroforesis de DNA plasmídico extraído de la cepa DH5 $\alpha$  de *E. coli* previamente transformada con material genético de las colonias seleccionadas de las reacciones pDR195umZRT1 (a y b) y pDR195umZRT2 (a y b). Se corrió en un gel de agarosa al 1% con buffer TAE 1X a 100 V. a) 1 Kb DNA ladder (Promega). b, c y d) corresponden al plásmido de la colonia 96<sup>a1</sup>, 96<sup>a2</sup> y 96<sup>b1</sup> respectivamente; f, g corresponden a los plásmidos de las colonias 10<sup>a1</sup>, y 10<sup>a2</sup>; mientras que h e i) a 10<sup>b1</sup> y 10<sup>b2</sup>.

### **6.3.1.5. Caracterización de construcciones por restricción enzimática.**

Una vez obtenido el DNA plasmídico correspondiente a las construcciones pDR195umZRT1 (a y b) y pDR195umZRT2 (a y b), se procedió a realizar la caracterización por medio de enzimas, las cuales fueron seleccionadas de manera estratégica, cortando una en pDR195 y otra en umZRT1 o umZRT2, pero no en ambos insertos. Se colocó siempre un control, adicionando las mismas enzimas al plásmido pDR195 vacío (sin los insertos), esperando como resultado en la electroforesis solo una banda correspondiente a la linealización del mismo. Las enzimas seleccionadas para las construcciones de pDR195umZRT1 fueron Sall y EcoRV (Promega) esperando fragmentos de 3475 y 3985 pb (Fig. 27a). Por otra parte se utilizaron las enzimas NdeI y EcoRI (Promega) para los plásmidos pDR195umZRT2, generando fragmentos de 3337 y 4509 pb (Fig. 27b), en la tabla 19 se describen las reacciones realizadas, las cuales fueron incubadas a 37°C durante 2 horas y posteriormente las enzimas fueron inactivadas tal como se describe en materiales y métodos.

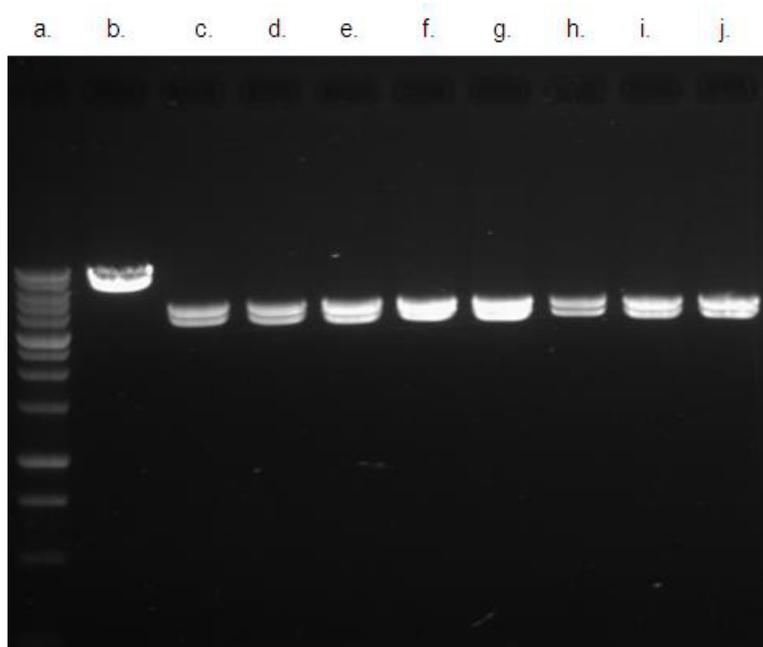


**Figura 27. Mapas de restricción de los plásmidos pDR195umZRT1 y pDR195umZRT2.** a) Representación de la restricción de pDR195umZRT1 con enzimas Sali y EcoRV, con fragmentos esperados de 3475 y 3985 pb; b) corte enzimático de pDR195umZRT2 con las enzimas EcoRI y NdeI, generando fragmentos de 3337 y 4509 pb.

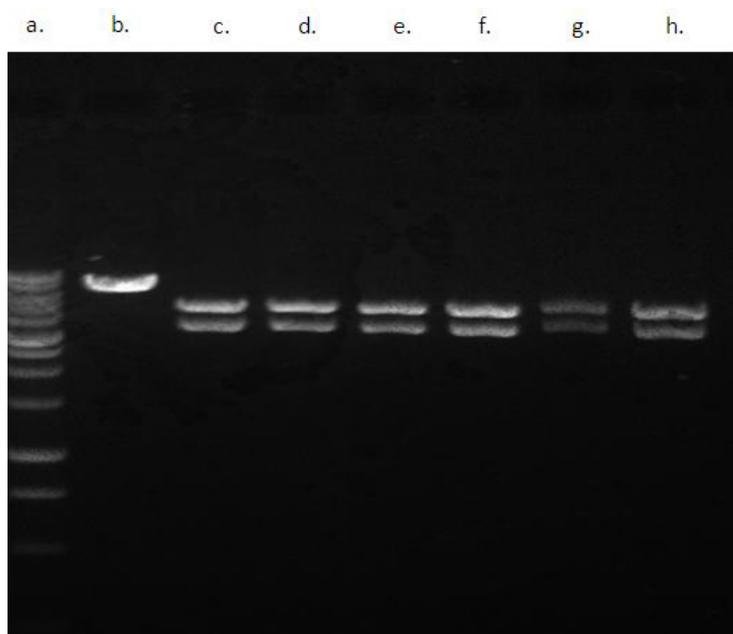
**Tabla 19. Componentes de las reacciones de restricción para la caracterización de construcciones pDR195umZRT1 (a y b) y pDR195umZRT2 (a y b).**

Caracterización pDR195umZRT1		Caracterización pDR195umZRT2	
Componente	Cantidad	Componente	Cantidad
Agua mili-Q estéril	9 $\mu$ l	Agua mili-Q estéril	9 $\mu$ l
Buffer 10X	2 $\mu$ l	Buffer 10X	2 $\mu$ l
BSA 10X	2 $\mu$ l	BSA 10X	2 $\mu$ l
DNA	5 $\mu$ l	DNA	5 $\mu$ l
Enzima Sali (Promega)	1 $\mu$ l	Enzima NdeI (Promega)	1 $\mu$ l
Enzima EcoRV (Promega)	1 $\mu$ l	Enzima EcoR1 (Promega)	1 $\mu$ l
Reacción total	20 $\mu$ l	Reacción total	20 $\mu$ l

Después de realizar las restricciones se procedió a realizar electroforesis, y de esa manera se determinó que todos los plásmidos extraídos y sometidos a caracterización, contenían los insertos correspondientes a los genes umZRT1 y umZRT2, ya que se observaron los patrones de bandeo esperados, tanto para las construcciones realizadas como para los controles, dichos resultados se muestran en las figuras 28 y 29.



**Fig. 28. Electroforesis de la caracterización de los plásmidos pDR195umZRT1 (a y b).** Todos los plásmidos fueron digeridos con las enzimas Sall y EcoRV. a) 1 Kb DNA ladder (Promega); b. restricción de pDR195 sin insertos (6317pb); los incisos c, d, e, f, g, h, i y j corresponden a los plásmidos 96<sup>a1</sup>, 96<sup>a2</sup>, 96<sup>a3</sup>, 96<sup>a4</sup> y 96<sup>b1</sup>, 96<sup>b2</sup>, 96<sup>b3</sup>, 96<sup>b4</sup> respectivamente (3475 y 3985pb).



**Fig. 29. Electroforesis de la caracterización de construcción pDR195umZRT2 (a y b).** Los plásmidos fueron digeridos con las enzimas NdeI y EcoRI. a) Marcador de peso molecular 1 Kb DNA ladder (Promega); b) corte enzimático de pDR195 vacío (6317pb); incisos c, d, f, g y h corresponden a las construcciones pDR195umZRT2;  $10^{a1}$ ,  $10^{a2}$ ,  $10^{a3}$ ,  $10^{a4}$ ,  $10^{b1}$  y  $10^{b2}$  respectivamente (3337 y 4509pb).

#### **6.3.1.6. Secuenciación de construcciones pDR195umZRT1 (a y b) y pDR195umZRT2 (a y b).**

Posterior a la caracterización enzimática de las construcciones obtenidas, fueron elegidas 2 clonas por cada gen para su secuenciación:  $96^{a1}$  y  $96^{b3}$  para umZRT1;  $10^{a1}$  y  $10^{b1}$  para umZRT2, con el objetivo de comprobar que no existiera alguna mutación. Los oligonucleótidos utilizados para dicho procedimiento se muestran en la tabla 10, las reacciones de secuenciación con la enzima Big Dye™, así como las condiciones bajo las cuales se llevaron a cabo, se muestran en la sección 5.11 de materiales y métodos.

Una vez obtenidos los resultados de la secuenciación, estos fueron editados mediante el programa ApE plasmid editor (<http://biologylabs.utah.edu/jorgensen/wayned/ape/>) y posteriormente se realizaron alineamientos de las secuencias con los marcos de lectura abierto de cada uno de los genes, con ayuda del programa BioEdit (Hall, 1999) y la herramienta BLAST, obteniéndose secuencias completas y sin mutación alguna en sus marcos de lectura, con un porcentaje de identidad de 100% en todos los casos (Fig. 30 y 31).



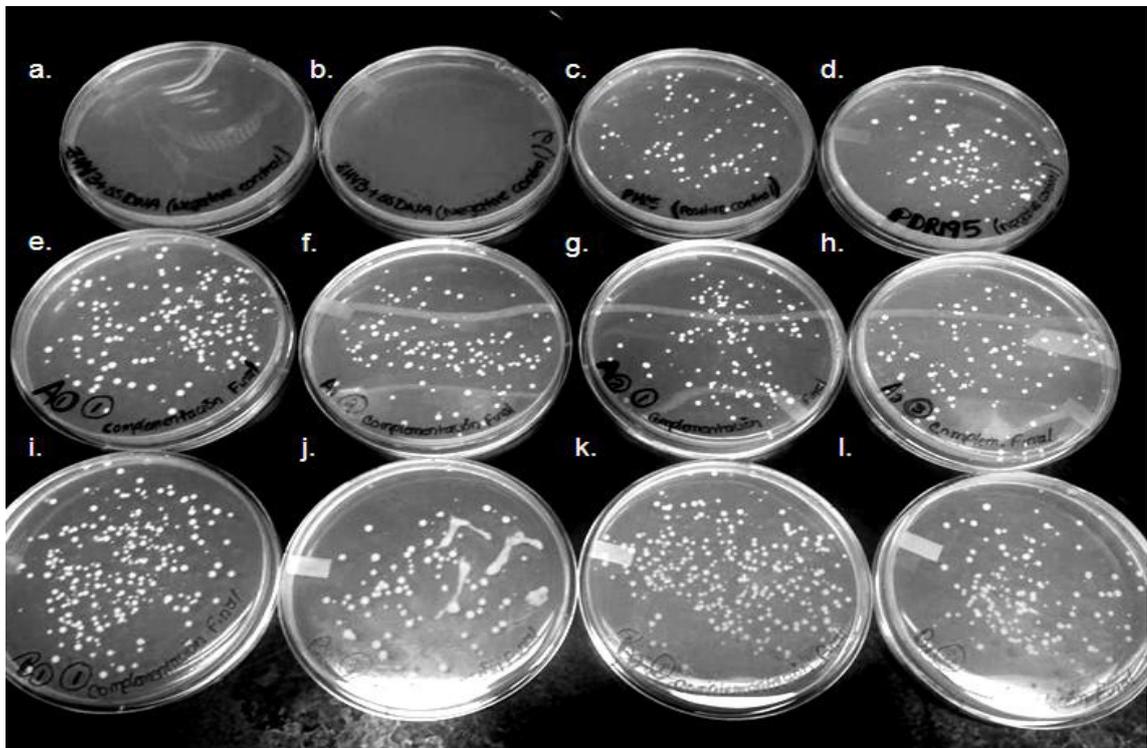
**Figura 30.** Alineamiento de los nucleótidos obtenidos por secuenciación, de las construcciones pDR195umZRT1 (96<sup>a1</sup> y 96<sup>b3</sup>) con el marco de lectura abierto de um00096 (umZRT1).



**Fig. 31. Alineamiento del marco de lectura abierto del gen *um03110* (*umZRT2*) con los nucleótidos obtenidos por secuenciación a partir de las construcciones pDR195umZRT2 (10<sup>a1</sup> y 10<sup>b1</sup>).**

### **6.3.2. Complementación de mutantes de *Saccharomyces cerevisiae* deficientes de los genes ZRT1 y ZRT2 con las construcciones pDR195umZRT1 y pDR195umZRT2.**

Al haber logrado la correcta construcción de los plásmidos de expresión con los genes de *U. maydis* umZRT1 y umZRT2, se procedió a transformar a la cepa de *S. cerevisiae* mutante de los genes ZRT1 y ZRT2 (ZHY3), con el objetivo de determinar si dichos genes eran ortólogos a los existentes en la levadura *S. cerevisiae*. Dicho proceso se llevó a cabo mediante el protocolo de transformación con acetato de litio (modificado de Gietz *et al.*, 1995), las levaduras transformantes fueron inoculadas en placas con medio SD tras la adición de los aminoácidos histidina, leucina, triptófano y la base adenina, fungiendo como marcador de selección el uracilo. En el experimento se incluyeron dos controles negativos, para descartar contaminación, que corresponden a la realización del procedimiento transformando únicamente con ssDNA (Fig. 32a y b); otro control negativo que se utilizó, fue el obtenido después de transformar con el plásmido pDR195 vacío (sin insertos) (Fig. 32d); por otra parte se agregó un control positivo, al cual nos referiremos como ZHY3/pMC5, el cual se realizó al transformar con dicho vector que contiene al gen ZRT1 (ver sección de plásmidos en materiales y métodos) (Fig. 32c); por último se procedió a transformar a la cepa ZHY3 con las construcciones previamente generadas: pDR195umZRT1: 96<sup>a1</sup>, 96<sup>a2</sup>, 96<sup>b1</sup>, 96<sup>b3</sup> (Fig. 32e-h) y pDR195umZRT2: 10<sup>a1</sup>, 10<sup>a2</sup>, 10<sup>b1</sup>, 10<sup>b2</sup>, siendo nombradas AMP96 y RRM10 respectivamente las cepas resultantes tras la correcta transformación (Fig. 32i-l).

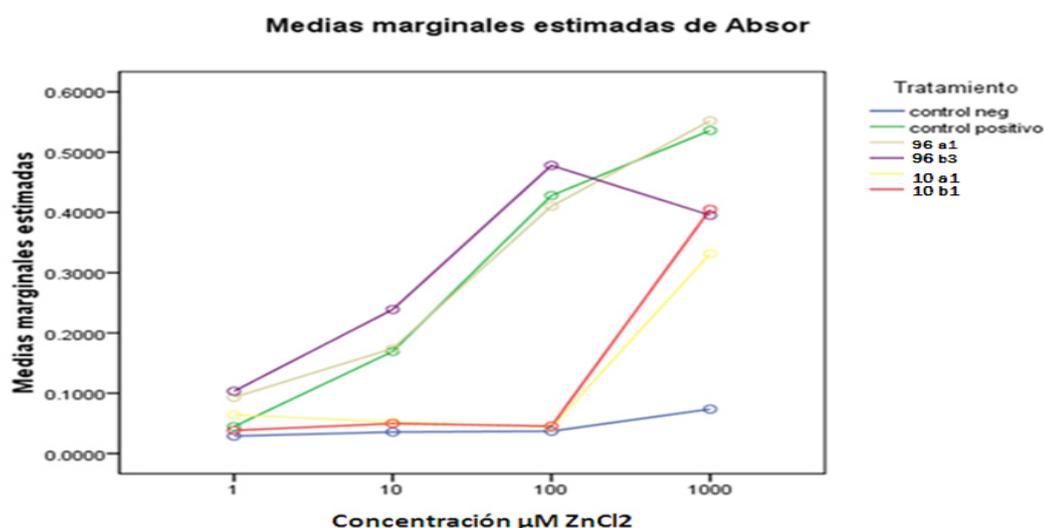


**Fig. 32. Resultados obtenidos de complementación de la cepa ZHY3 con construcciones pDR195umZRT1 (a y b) y pDR195umZRT2 (a y b).** a.-b. Controles negativos producto de la transformación con ssDNA; c. Control positivo, cepa ZHY3/pMC5; d. Control negativo (ZHY3/pDR195); e.-h. Colonias de cepa AMP96: 96<sup>a1</sup>, 96<sup>a2</sup>, 96<sup>b1</sup>, 96<sup>b3</sup> respectivamente; i.-l. Cepa RRM10: 10<sup>a1</sup>, 10<sup>a2</sup>, 10<sup>b1</sup>, 10<sup>b2</sup>.

### 6.3.3. Caracterización de las cepas complementantes.

Con el objetivo de determinar las funciones de los genes umZRT1 y umZRT2, así como de identificar si son homólogos a los genes ZRT1 y ZRT2 en *S. cerevisiae*, se realizaron curvas de crecimiento, por triplicado de las colonias AMP96: 96<sup>a1</sup>, 96<sup>b3</sup> y RRM10: 10<sup>a1</sup>, 10<sup>b1</sup> (construcciones caracterizadas por restricción y secuenciadas), partiendo de un inóculo de DO<sub>600</sub>=0.01 en LZM adicionado con leucina, histidina, triptófano y adenina, con concentraciones de: 1μM, 10μM, 100μM y 1000μM de ZnCl<sub>2</sub>, durante 15 horas, en agitación y a una

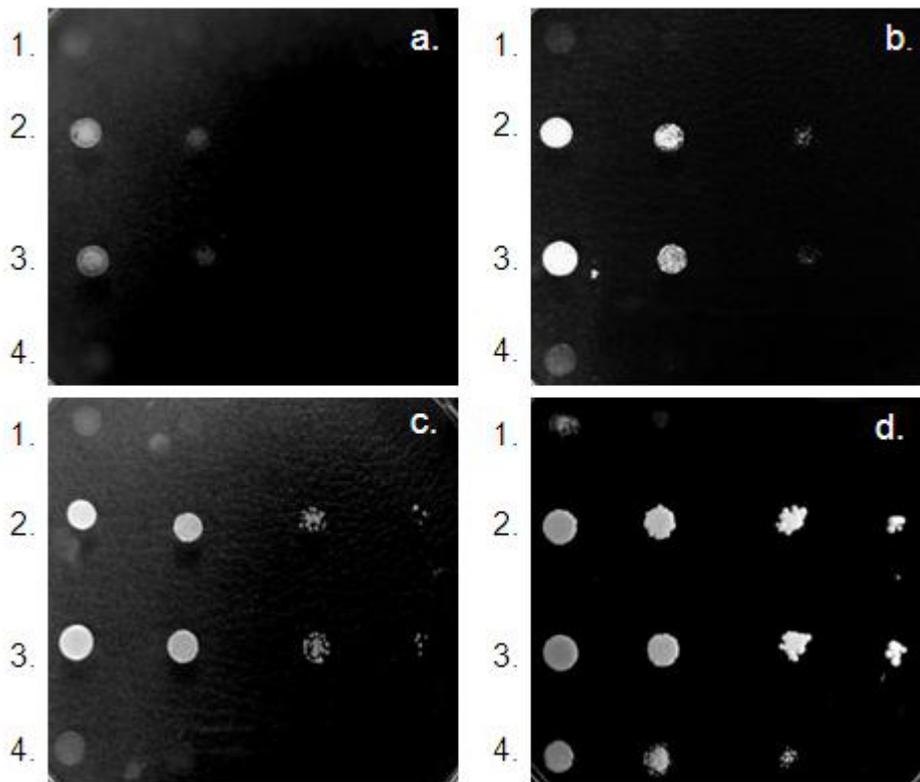
temperatura de 30°C y posteriormente se procedió a medir su absorbancia. Tal como se aprecia en la fig. 33, las levaduras AMP96: 96<sup>a1</sup>, 96<sup>b3</sup> (Fig. 33 color dorado y morado), presentaron absorbancias muy similares a las del control positivo ZHY3/pMC5 (Fig. 33 verde); por otra parte las correspondientes a RRM10: 10<sup>a1</sup>, 10<sup>b1</sup> (Fig. 33 amarillo y rojo), presentaron un crecimiento similar al control negativo (pDR195) (Fig. 33 color azul) en las concentraciones 1-10µM de ZnCl<sub>2</sub>, presentándose un cambio drástico a partir de la concentración 100µM aumentando su crecimiento hasta la concentración de 1000µM, diferenciándose del control negativo.



**Figura 33. Curva de crecimiento de las cepas AMP96: 96<sup>a1</sup>, 96<sup>b3</sup>, RRM10: 10<sup>a1</sup>, 10<sup>b1</sup> y controles ZHY3/pMC5 y ZHY3/pDR195 en LZM adicionado con 1µM, 10µM, 100µM y 1000µM de ZnCl<sub>2</sub>. En color azul se representa al control negativo producto de la transformación de la levadura con el vector pDR195; en color verde se muestra el control positivo obtenido de la transformación con el plásmido pMC5; en color dorado y morado se presentan las absorbancias de la cepa AMP96: 96<sup>a1</sup>, 96<sup>b3</sup>; en amarillo y rojo se muestran las correspondientes a RRM10: 10<sup>a1</sup>, 10<sup>b1</sup>.**

Además de crecer a las transformantes en LZM líquido, se procedió a realizar en LZM sólido bajo las mismas concentraciones de ZnCl<sub>2</sub>, 1, 10, 100 y 1000µM, para la apreciación visual de los resultados, en esta ocasión se utilizó al control negativo

(ZHY3/pDR195), el control positivo (ZHY3/pMC5), y solo una construcción correspondiente a cada gen (levaduras AMP96 y RRM10), dichas células fueron lavadas con agua mili-Q estéril y diluidas en la misma, a través de su conteo en cámara de Neubauer, siendo inoculadas por gota  $1 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^3$  y  $1 \times 10^2$  células de cada transformante. Los resultados obtenidos coincidieron con los presentados en medio líquido; en todas las concentraciones, la cepa AMP96, presentó crecimiento similar al control positivo (ZHY3/pMC5), mientras que la cepa RRM10 presentó un crecimiento similar al control negativo en las concentraciones 1 y 10  $\mu\text{M}$  de  $\text{ZnCl}_2$ , en contraste con las concentraciones de 100 y 1000  $\mu\text{M}$  donde mostraron diferencias, ya que se observó mayor crecimiento levaduriforme (Fig. 34).



**Figura 34. Crecimiento de las cepas AMP96, RRM10 y controles ZHY3/pMC5 y ZHY3/pDR195 en LZM sólido, en diferentes concentraciones de  $\text{ZnCl}_2$ .** Las levaduras transformantes fueron inoculadas por gota en diluciones correspondientes a  $1 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^3$  y  $1 \times 10^2$  células. Las imágenes a, b, c y d corresponden a LZM 1, 10, 100, 1000  $\mu\text{M}$  de  $\text{ZnCl}_2$ . En todos los casos: el número 1 corresponde al control negativo (ZHY3/pDR195); 2. Control positivo (ZHY3/pMC5); 3. Diluciones de levaduras correspondientes a AMP96; 4. RRM10.

### 6.3.4. Análisis estadístico de resultados de complementaciones.

Para validar los resultados obtenidos de las complementaciones en la cepa de *Saccharomyces cerevisiae* ZHY3 con las construcciones realizadas y los controles, se determinaron los estadísticos descriptivos de las absorbancias en base a cada tratamiento (plásmido con el que se transformó) y concentración de ZnCl<sub>2</sub> (Ver tabla 20).

**Tabla 20. Estadísticos descriptivos de absorbancias en base a cada tratamiento y concentración de ZnCl<sub>2</sub>.**

Variable dependiente: Absorbancia				
Tratamiento	Concentración (µM Zn)	Media	Desviación típica	N
Control negativo	1	0.028967	0.0072342	3
	10	0.035633	0.0130512	3
	100	0.036967	0.0120554	3
	1000	0.073633	0.0119304	3
	Total	0.0438	0.0206508	12
Control positivo	1	0.044633	0.0126623	3
	10	0.169333	0.0411015	3
	100	0.428	0.0481352	3
	1000	0.536	0.0451774	3
	Total	0.294492	0.2078349	12
umZRT1 (96 a1)	1	0.0932	0.0111772	3
	10	0.174	0.0091652	3
	100	0.410333	0.0155349	3
	1000	0.552	0.0353695	3
	Total	0.307383	0.1920482	12
umZRT1 (96 b3)	1	0.103333	0.0028868	3
	10	0.239	0.008544	3
	100	0.478	0.0190788	3
	1000	0.395333	0.044859	3
	Total	0.303917	0.1520302	12
umZRT2 (10 a1)	1	0.063967	0.0188237	3
	10	0.0523	0.0117898	3
	100	0.043633	0.010116	3
	1000	0.331333	0.0115036	3
	Total	0.122808	0.1264952	12
umZRT2 (10 b1)	1	0.0383	0.0036056	3
	10	0.049633	0.0095044	3
	100	0.0453	0.0075498	3
	1000	0.405	0.0327872	3
	Total	0.134558	0.1638241	12
Total	1	0.062067	0.0300462	18
	10	0.119983	0.0815229	18
	100	0.240372	0.2061592	18
	1000	0.352217	0.1656058	18
	Total	0.20116	0.1839208	72

Por otra parte se aplicó un ANOVA de dos factores: tratamiento y concentración, con el fin de determinar la diferencia de medias de la absorbancia debido a los factores, obteniendo los resultados mostrados en la tabla 21, obteniéndose un F elevada, por lo que se rechazó la hipótesis nula de igualdad de medias.

**Tabla 21. Pruebas de los efectos inter-sujetos.** Siendo la variable dependiente, la absorbancia; a. R cuadrado = .989 (R cuadrado corregida = .984).

Origen	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	2.376 <sup>a</sup>	23	0.103	193.09	0
Intersección	2.913	1	2.913	5445.677	0
Tratamiento	0.791	5	0.158	295.576	0
Concentración	1.085	3	0.362	675.751	0
Tratamiento * Concentración	0.501	15	0.033	62.396	0
Error	0.026	48	0.001		
Total	5.315	72			
Total corregida	2.402	71			

Posteriormente se usó la prueba de Tukey para determinar entre que niveles de los factores se encuentran diferencias significativas entre las medias de las absorbancias, también se graficaron dichas medias en base a los factores tal como se muestra en la tabla 20. Dentro de los resultados obtenidos se encontró diferencia del control negativo (pDR195) con el resto de los tratamientos; el control positivo mostró una similitud altamente significativa con aquellos correspondientes a las cepas complementadas con pDR195umZRT1: 96<sup>a1</sup> y 96<sup>b3</sup>, mientras que se encontró

diferente al control negativo y a los tratamientos pDR195umZRT2:  $10^{a1}$  y  $10^{b1}$ ; por otra parte ambos correspondientes a  $10^{a1}$  y  $10^{b1}$  se mostraron significativamente similares, pero diferentes tanto al control positivo (pMC5) como al negativo (pDR195) y a los tratamientos  $96^{a1}$  y  $96^{b3}$  (Tabla. 22).

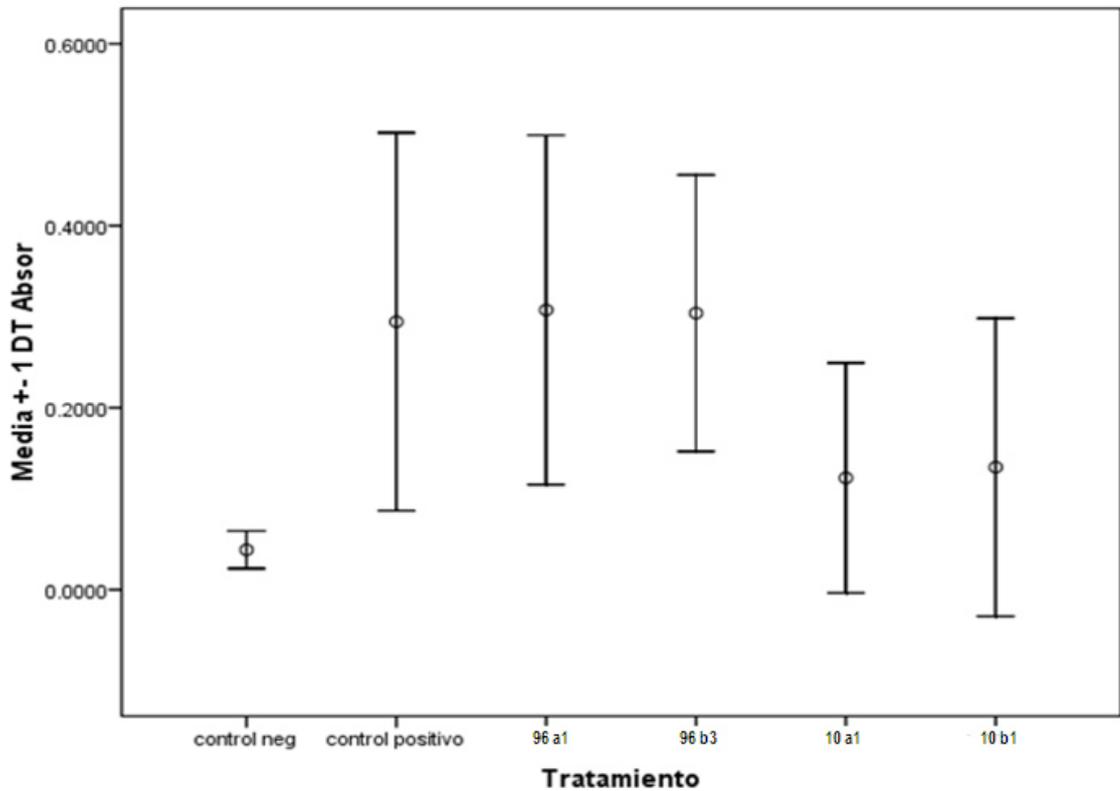
**Tabla 22. Comparaciones múltiples, DHS (honest significant difference) de Tukey.** Ensayo realizado en base a las medias observadas. El término de error es la media cuadrática (Error) = .001 \*. La diferencia de medias es significativa al nivel .05.

(I) Tratamiento	(J) Tratamiento	Diferencia de medias (I-J)	Error tip.	Sig.	Limite inferior	Limite superior
control neg (pDR195)	control positivo	-250692*	0.0094429	0	-0.278717	-0.222666
	umZRT1 (96 a1)	-263583*	0.0094429	0	-0.291609	-0.235558
	umZRT1 (96 b3)	-260117*	0.0094429	0	-0.288142	-0.232091
	umZRT2 (10 a1)	-079008*	0.0094429	0	-0.107034	-0.050983
	umZRT2 (10 b1)	-090758*	0.0094429	0	-0.118784	-0.062733
control positivo (pMC5)	control neg	250692*	0.0094429	0	0.222666	0.278717
	umZRT1 (96 a1)	-0.012892	0.0094429	0.747	-0.040917	0.015134
	umZRT1 (96 b3)	-0.009425	0.0094429	0.916	-0.037451	0.018601
	umZRT2 (10 a1)	171683*	0.0094429	0	0.143658	0.199709
	umZRT2 (10 b1)	159933*	0.0094429	0	0.131908	0.187959
umZRT1 (96 a1)	control neg	263583*	0.0094429	0	0.235558	0.291609
	control positivo	0.012892	0.0094429	0.747	-0.015134	0.040917
	umZRT1 (96 b3)	0.003467	0.0094429	0.999	-0.024559	0.031492
	umZRT2 (10 a1)	184575*	0.0094429	0	0.156549	0.212601
	umZRT2 (10 b1)	172825*	0.0094429	0	0.144799	0.200851
umZRT1 (96 b3)	control neg	260117*	0.0094429	0	0.232091	0.288142
	control positivo	0.009425	0.0094429	0.916	-0.018601	0.037451
	umZRT1 (96 a1)	-0.003467	0.0094429	0.999	-0.031492	0.024559
	umZRT2 (10 a1)	181108*	0.0094429	0	0.153083	0.209134
	umZRT2 (10 b1)	169358*	0.0094429	0	0.141333	0.197384
umZRT2 (10 a1)	control neg	079008*	0.0094429	0	0.050983	0.107034
	control positivo	-171683*	0.0094429	0	-0.199709	-0.143658
	umZRT1 (96 a1)	-184575*	0.0094429	0	-0.212601	-0.156549
	umZRT1 (96 b3)	-181108*	0.0094429	0	-0.209134	-0.153083
	umZRT2 (10 b1)	-0.01175	0.0094429	0.813	-0.039776	0.016276
umZRT2 (10 b1)	control neg	090758*	0.0094429	0	0.062733	0.118784
	control positivo	-159933*	0.0094429	0	-0.187959	-0.131908
	umZRT1 (96 a1)	-172825*	0.0094429	0	-0.200851	-0.144799
	umZRT1 (96 b3)	-169358*	0.0094429	0	-0.197384	-0.141333
	umZRT2 (10 a1)	0.01175	0.0094429	0.813	-0.016276	0.039776

Por otra parte en base a las medias observadas, fueron agrupados los tratamientos en subconjuntos homogéneos, donde se aprecia de mejor manera las diferencias o similitudes entre ellos tal como se mencionó anteriormente (Tabla 23 y Fig. 35).

**Tabla 23. DHS de Tukey.** Se muestran las medias de los grupos de subconjuntos homogéneos. Prueba basada en las medias observadas. El término de error es la media cuadrática (Error) = .001. a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 12.000. b. Alfa = .05.

Tratamiento	N	Subconjunto		
		1	2	3
control negativo	12	0.0438		
umZRT2 (10 a1)	12		0.122808	
umZRT2 (10 b1)	12		0.134558	
control positivo	12			0.294492
umZRT1 (96 b3)	12			0.303917
umZRT1 (96 a1)	12			0.307383
Sig.		1	0.813	0.747



**Figura 35. Gráfica de medias observadas de los grupos de subconjuntos homogéneos más/menos una desviación estándar.**

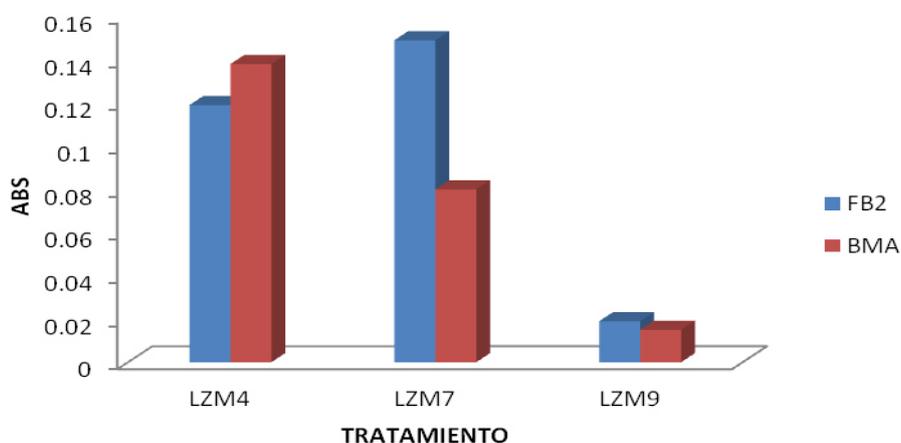
#### **6.4. Análisis de expresión.**

##### **6.4.1. Estandarización de condiciones.**

Con el propósito de definir los niveles de expresión de los genes umZRT1 y umZRT2 y si dicho proceso era regulado por los factores de transcripción Rim101p y/o Nrg1p ante variaciones de pH y bajas concentraciones de zinc, se procedió a definir las condiciones bajo las cuales se realizarían las extracciones del RNA, para dicho fin, fueron diseñados 3 diferentes medios, usando como base el medio LZM, mediante el programa MAXCHELATOR software (ChrisPatton, Stanford University) tal como se describió en materiales y métodos, utilizando los agentes

quelantes EDTA, EGTA y NTA, para los pH 4.0, 7.0 y 9.0 respectivamente, logrando una concentración libre de zinc en todos los casos de  $1 \times 10^{-12} \mu\text{M}$  de  $\text{ZnCl}_2$ .

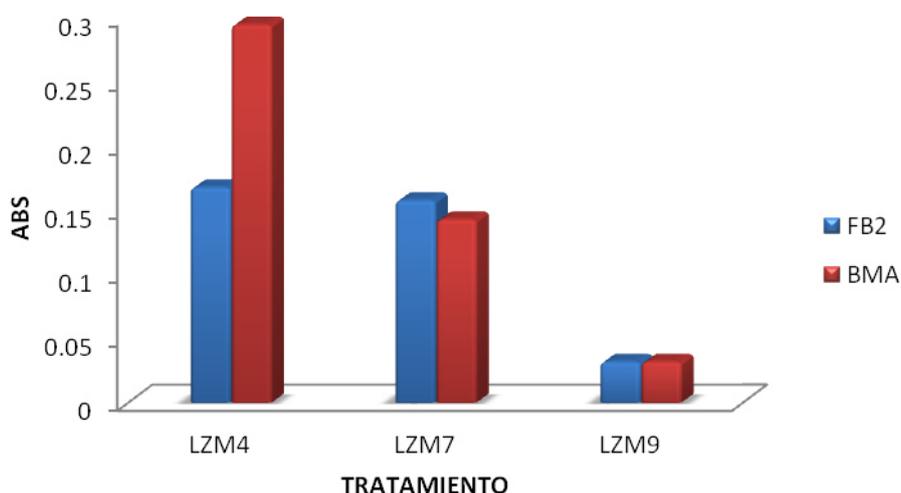
Una vez diseñados y elaborados los medios, se procedió a evaluar el crecimiento de las cepas de *U. maydis* FB<sub>2</sub> y BMA2 en los mismos, para ello fueron crecidas, por triplicado, en medio SD después de ser activadas en MC, posteriormente las células fueron lavadas con agua mili-Q estéril e inoculadas en los medios LZM4, 7 y 9, partiendo de una  $\text{DO}_{600} = .01$ , y después de 15 horas se midió la absorbancia, obteniendo los resultados mostrados en la figura 33; tanto FB<sub>2</sub> como BMA2 lograron crecer en LZM4 presentando absorbancias un poco mayores la cepa BMA2, en LZM7 FB<sub>2</sub> mostró mayor crecimiento que BMA2, pero ambas cepas mostraron complicaciones para crecer en LZM9, presentando absorbancias similares muy bajas (Fig. 36).



**Figura 36. Crecimiento de las cepas FB<sub>2</sub> y BMA2 en LZM4, 7 y 9.** Las cepas fueron inoculadas partiendo de una  $\text{DO}_{600} = .01$  durante 15 horas.

Debido al pobre crecimiento de ambas cepas en LZM9, se supuso que el quelante NTA, presentaba mayor afinidad por zinc de la calculada en el programa antes mencionado, por lo que se procedió a realizar un experimento en el cual se adicionaron 10 veces más la cantidad de zinc a los 3 tipos de medios, y se crecieron

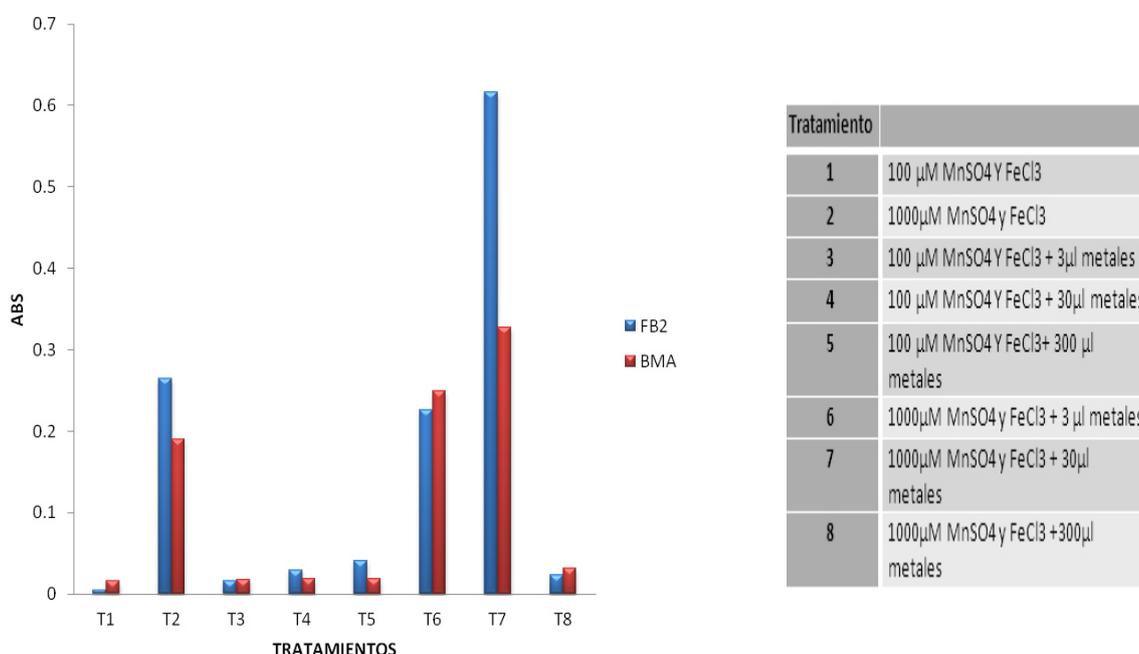
tanto BMA2 como FB<sub>2</sub>, obteniendo después de 15 horas los resultados mostrados en la fig. 37, se presentaron resultados muy similares al experimento anterior, mayor crecimiento de la cepa BMA2 que FB<sub>2</sub> en LZM4, en LZM7 un ligero crecimiento mayor por parte de FB<sub>2</sub> con respecto a BMA2 y en LZM9 se obtuvieron absorbancias muy bajas, lo que sugiere que el NTA presenta alta afinidad por otros metales esenciales para el desarrollo del hongo, aunado al alto pH que propicia, la baja disponibilidad de metales.



**Figura 37. Crecimiento de cepas FB<sub>2</sub> y BMA2 en LZM4, 7 y 9 adicionados con 10X de ZnCl<sub>2</sub>.** Se realizó la medición después de 15 horas, partiendo de una DO<sub>600</sub>= .01.

Debido a los resultados obtenidos, se procedió a realizar un nuevo experimento, para la estandarización del LZM9, para lo cual se adicionaron diferentes concentraciones de MnSO<sub>4</sub> y FeCl<sub>3</sub> y de la solución de metales (descrita en materiales y métodos para elaboración de LZM) tal como se describe en la figura 38, al igual que en los experimentos anteriores, las células fueron crecidas primeramente en medio SD y posteriormente lavadas con agua mili-Q, siendo inoculadas bajo las diferentes condiciones, partiendo de una DO<sub>600</sub>= .01, obteniendo

altas absorbancias a partir de los tratamientos 2, 6 y 7, pero al medir el pH, tanto inicial como el final en dichos tratamientos, se observó variación de pH, descendiendo hasta un pH 7, por lo que se decidió solo medir los niveles de expresión en los LZM4 y 7.

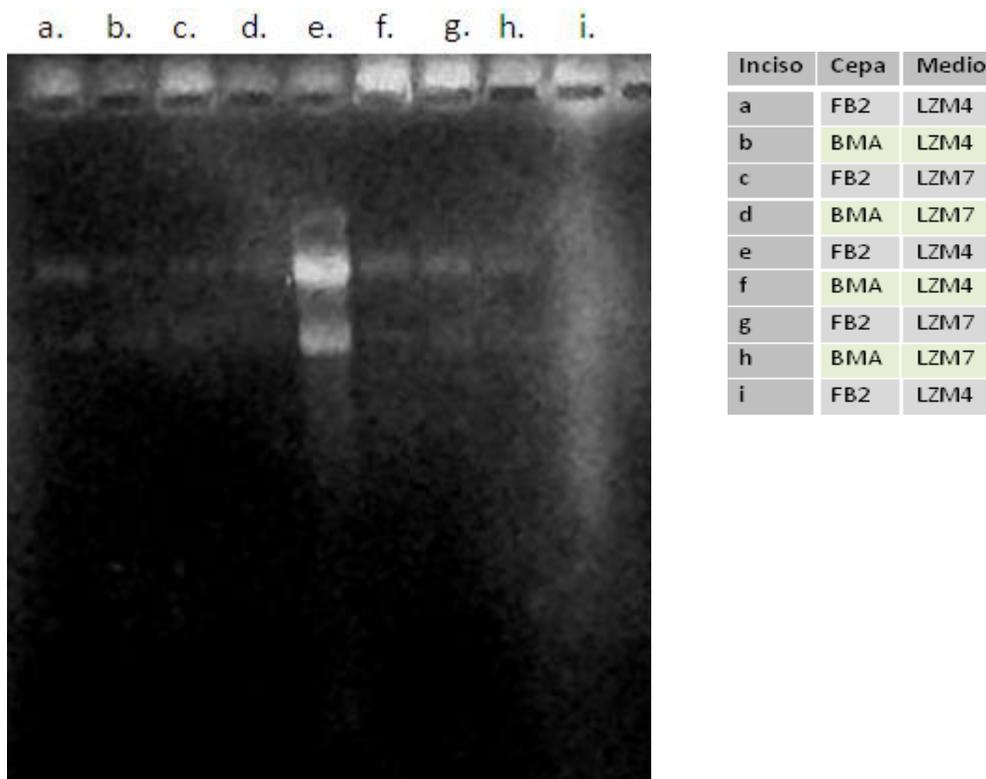


**Figura 38. Estandarización del crecimiento de FB<sub>2</sub> y BMA2 en LZM9, ante diferentes tratamientos de metales.**

#### 6.4.2. Análisis de expresión de los genes umZRT1, umZRT2 y genes relacionados.

Una vez estandarizadas las condiciones bajo las cuales se realizaría la extracción de RNA, se procedió a cultivar tanto a FB<sub>2</sub> como BMA2 en medios SD y las células fueron lavadas con agua mili-Q estéril, e inoculadas en los medios LZM4 y 7 partiendo de una DO<sub>600</sub> = .01 (por triplicado), se incubaron durante 15 horas en agitación a 28°C y se procedió a realizar las extracciones de RNA (Ver materiales y

métodos). En la fig. 39 se muestra la electroforesis correspondiente a algunas de las muestras extraídas.



**Figura 39. Electroforesis de RNA de las cepas FB2 y BMA2 de *U. maydis* crecidas en LZM4 y 7.** Fue realizada en un gel de agarosa al 2% con formaldehido. En la tabla adjunta se indican las muestras correspondientes a cada cepa y medio en que fueron crecidas.

Para llevar a cabo el análisis de expresión, mediante RT-PCR punto final, se procedió a diseñar oligonucleótidos correspondientes a los genes de *Ustilago maydis* umZRT1 y umZRT2, y se utilizaron otros previamente diseñados, correspondientes al gen de actina, utilizando como control, RIM101 y NRG1 (Tabla 20).

Se desarrollaron reacciones a partir de los RNA extraídos en las condiciones correspondientes a los medios LZM4 y LZM7 tanto de la cepa FB<sub>2</sub> como de BMA<sub>2</sub>, con los oligonucleótidos enlistados en la tabla 9. Se colocó un control negativo y uno positivo por cada muestra de RNA utilizada, donde se utilizaron oligonucleótidos

para la amplificación del gen de Actina, cuya expresión es constitutiva. Por otra parte se realizaron reacciones con los oligonucleótidos para la amplificación de los genes que codifican para los factores de transcripción Rim101p y Nrg1p, y los genes umZRT1 y umZRT2. Todas las reacciones de RT-PCR punto final, así como sus condiciones, fueron llevadas a cabo tal como se describe en materiales y métodos, con una Tm de 53°C y una concentración de 2.5mM de MgCl<sub>2</sub> final.

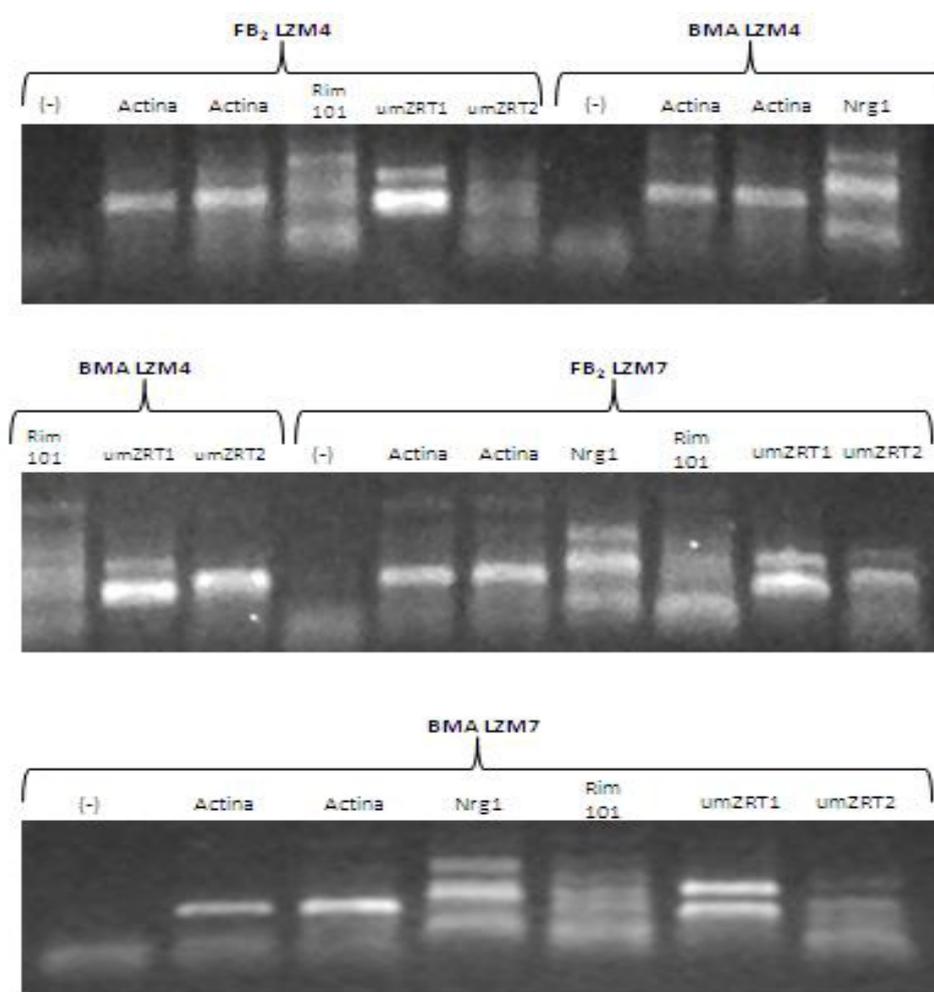
#### **6.4.2.1. Niveles de expresión en ambientes ácidos.**

A partir de las muestras de RNA extraídas tanto de la cepa silvestre (FB<sub>2</sub>) como de la cepa mutante de RIM101 (BMA2) de *U. maydis*, se obtuvo la expresión correspondiente al gen de actina (control positivo), y no se observó amplificación en el control negativo, lo que indica que las muestras no se encontraban contaminadas o con residuos de DNA genómico. En las reacciones correspondientes a la cepa FB<sub>2</sub>, se observó la amplificación de los genes NRG1 y RIM101, por otra parte el gen umZRT1 presentó una mayor expresión que el gen umZRT2, ya que en este último se observó muy poca expresión. En lo concerniente a las muestras de BMA2, se observó la expresión de NRG1, y en la electroforesis llevada a cabo, se presentaron algunas bandas de diferentes tamaños, en el carril de RIM101, lo que indica que fueron amplificados otros dedos de zinc, diferentes a la banda esperada de 98 pb correspondiente a RIM101. Los genes umZRT1 y umZRT2 presentaron niveles de expresión muy similares bajo estas condiciones (Fig. 40).

#### **6.4.2.2. Niveles de Expresión en ambientes neutros.**

El análisis de la expresión bajo condiciones neutras, se llevo a cabo a partir de RNA extraído de las cepas FB<sub>2</sub> y BMA2 crecidas en LZM7. Al igual que lo descrito anteriormente se realizaron reacciones como control negativo y positivo con oligonucleótidos de actina, por cada muestra de RNA utilizada. Obteniendo los resultados esperados. En lo correspondiente a FB<sub>2</sub> se obtuvo la expresión de NRG1 y

RIM101. El gen umZRT1 presentó mayor expresión que umZRT2, a la vez que este último aumentó sus niveles de expresión presentados en pH ácido. Por otra parte las muestras pertenecientes a BMA2 mostraron los mismos patrones que en pH ácido en las reacciones de NRG1 y RIM101, mientras que umZRT1 permaneció con niveles de expresión similares que FB<sub>2</sub>, umZRT2 presentó una menor expresión que la observada en la cepa silvestre (Fig. 40).



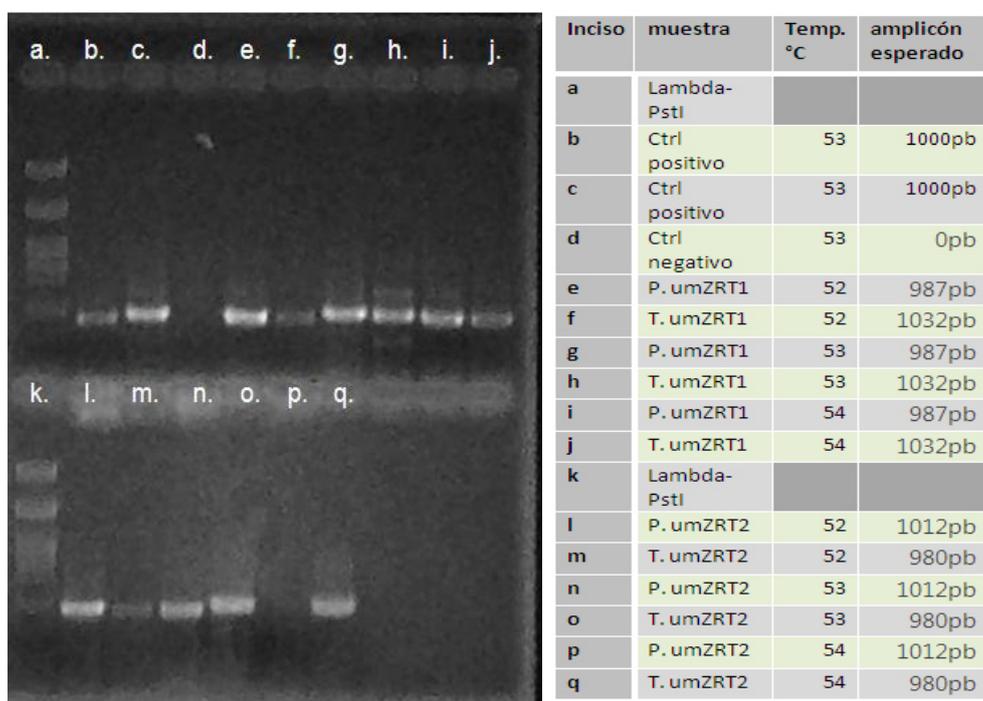
**Figura 40. Electroforesis de RT-PCR punto final mostrando la expresión de genes de FB<sub>2</sub> y BMA2, en LZM4 y 7. Las reacciones de los controles negativo y positivo fueron realizadas con oligonucleotidos para la amplificación del gen constitutivo de actina (242pb), por otra parte se midieron los niveles de expresión de NRG1 (212pb), RIM101 (98pb), umZRT1 (212pb) y umZRT2 (244pb).**

## **6.5. Elaboración de construcciones de delección por el método DelsGate.**

Para realizar construcciones de delección, para llevar a cabo la interrupción de los genes umZRT1 y umZRT2 se utilizó el método DelsGate (ver materiales y métodos). Se procedió a diseñar los oligonucleótidos necesarios para la amplificación de aproximadamente 1000pb río arriba y río abajo de cada marco de lectura abierto de los genes antes mencionados, sitio donde se localizan tanto el promotor como el terminador, adicionando secuencias correspondientes a las regiones de recombinación attB y las secuencias de corte de la enzima I-Sce1, además se diseñaron y sintetizaron los oligonucleótidos de detección, para la caracterización y ubicación de los insertos dentro de las construcciones (Tabla 10).

### **6.5.1. Amplificación de regiones promotoras y terminadoras de umZRT1 y umZRT2.**

Se realizó la estandarización de las condiciones mediante las cuales se amplificaron los segmentos de interés, las reacciones se llevaron a cabo con la enzima BIOLASE™ DNA Polymerase (Bioline), tal como se muestra en materiales y métodos; se probaron las temperaturas de 52°C, 53°C y 54°C, obteniendo mejores resultados con una concentración de MgCl<sub>2</sub> de 2.5 mM a una T<sub>m</sub> de 53°C (Fig. 41).

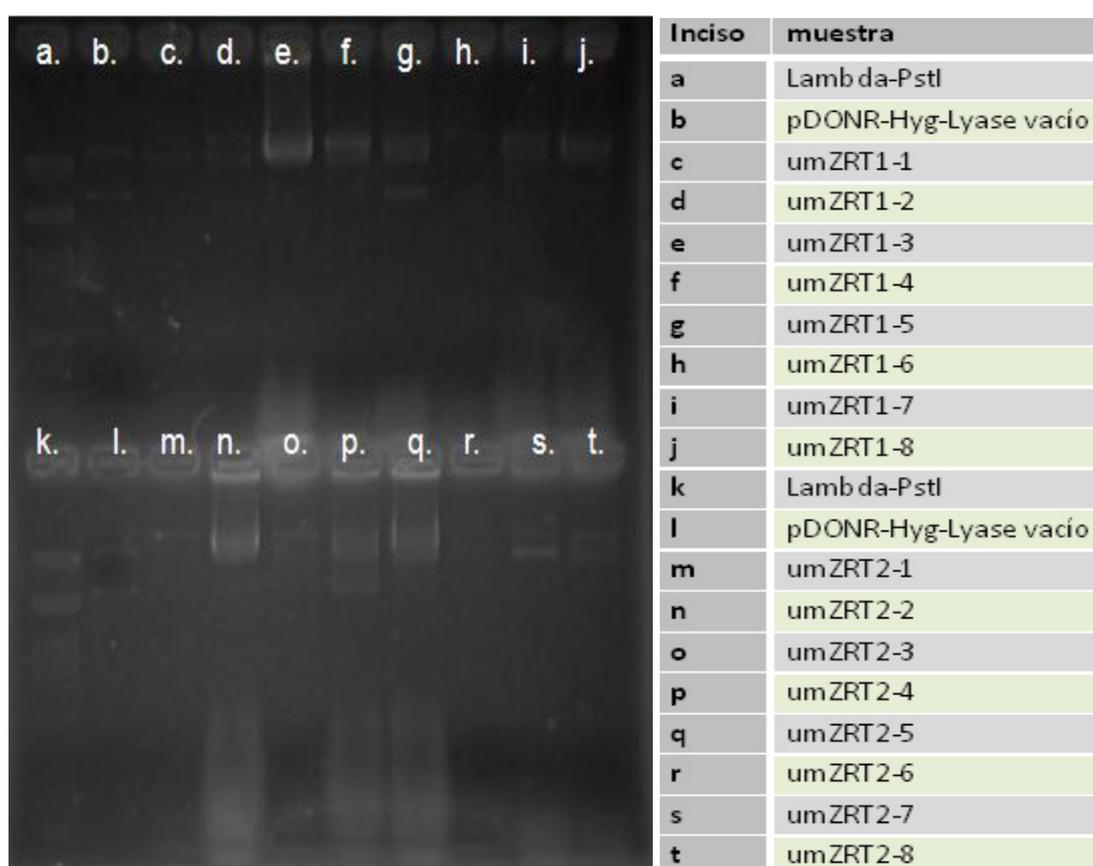


**Figura 41. Electroforesis de las reacciones correspondientes a la estandarización de la amplificación de los promotores y terminadores de umZRT1 y umZRT2.** En la tabla adjunta se describe la información de cada muestra en los carriles, la letra "P" se refiere a promotor y la letra "T" a terminador. Se describe el tamaño de amplicón esperado, aunque en el inciso p. no se obtuvo amplificación.

### 6.5.2. Recombinación de genes umZRT1 y umZRT2 con el plásmido pDONR-Hyg-Lyase.

Una vez amplificados los fragmentos correspondientes a promotor y terminador de cada gen, estos fueron purificados a partir de gel de agarosa al 1%, según se describe en materiales y métodos. Posteriormente se realizó la reacción de recombinación utilizando el plásmido pDONR-Hyg- Lyase, el cual contiene los sitios attP, la enzima BP clonase™ II y los insertos purificados (ver materiales y métodos), en la figura 9 se describe la manera en que se lleva a cabo el proceso de recombinación mediante la técnica DelsGate (García-Pedrajas *et al.*, 2008).

Posterior a la recombinación *in vitro*, se procedió a transformar a la cepa quimiocompetente de *E. coli* DH5 $\alpha$ , con las reacciones procesadas (ver materiales y métodos). Se realizó extracción de DNA plasmídico de las transformantes obtenidas en placas con kanamicina, obteniendo varias construcciones que probablemente contienen los insertos (Fig 42). El siguiente paso es la caracterización de dichas construcciones, pero no fue realizado dentro de este estudio.



**Figura 42. Electroforesis de DNA plasmídico obtenido mediante recombinación de insertos (Promotor y terminador) con el plásmido pDONR-Hyg-Lyase con la técnica DelsGate.** En la tabla adjunta se enlistan las muestras corridas por carril, se identifican como umZRT1 las construcciones de interrupción de dicho gen y umZRT2 las correspondientes a él mismo.

## 7. DISCUSIÓN:

En el presente estudio se demostró que *Ustilago maydis* posee diferentes estrategias de adaptación a las variaciones del pH, entre alguna de estas, observamos que es capaz de modificar el pH externo, tendiendo a neutralizarlo a partir de medios ácidos (pH 4.0) y alcalinos (pH 9.0), mientras que las condiciones neutras de los medios cuyo pH inicial fue 7.0 se mantuvieron estables, durante doce horas. Esta capacidad se conserva tanto en la cepa silvestre, FB2 y la mutante de RIM101, BMA2, se obtuvieron resultados muy similares, lo cual indica que el factor de transcripción, no se ve involucrado en este mecanismo de adaptación en particular. Más bien, pudieran estar relacionados con el metabolismo de los nutrientes, este fenómeno se ha reportado ya en otros hongos como *Candida albicans*, donde la neutralización del medio externo se ve influenciado por la falta de fuentes de carbono, como la glucosa, por el consecuente metabolismo de aminoácidos o por la adición de nitratos como fuente de nitrógeno a los medios; al excretarse el grupo amino como amonio, incrementando así el pH del entorno (Vylkova *et al.*, 2011), por otra parte se ha descrito que algunos hongos capaces de formar asociaciones simbióticas con plantas y que se ven inmersos en ambientes alcalinos, como el hongo formador de ectomicorrizas *Piloderma*, incrementan la producción y liberación de ácidos orgánicos, como el oxálico y cítrico, disminuyendo así el pH lo cual genera una mayor disponibilidad de minerales (Ahonen-Jonnarth *et al.*, 2000; van Hees *et al.*, 2000; Rosling and Rosenstock, 2008).

La homeostasis de las concentraciones intracelulares de iones es fundamental para la fisiología de las células vivientes, por lo que los organismos presentan diferentes tipos de estrategias para lograrla, una de ellas es la expresión de transportadores de diferentes metales a través de los cuales son llevados al citoplasma, a organelos o al espacio extracelular. Mediante análisis bioinformáticos

llevados a cabo por nosotros, fueron identificados por búsqueda de similitud con otros transportadores reportados, 2 sistemas de toma de  $Zn^{+2}$  en *U. maydis* correspondientes a los marcos de lectura abierto um00096 (umZRT1) y um03110 (umZRT2). Su similitud con otros transportadores de zinc de la familia ZIP (*Zrt-, Irt-like Proteins*), como lo son Zrt1p y Zrt2p, se comprobó tras diversos análisis mediante los cuales se observó la presencia de dominios ZIP en ambas proteínas y se determinó mediante análisis de estructuras *in silico*, que al igual que dichos transportadores, los identificados en *U. maydis* contienen 8 dominios transmembranales presentes en la membrana plasmática, mediante los cuales se lleva a cabo el transporte de zinc y/o hierro en diversos organismos (Eide, 2009).

Nuestros análisis demostraron que el gen umZRT1 es ortólogo a ZRT1 de *Saccharomyces cerevisiae*, ya que codifica para un transportador de alta afinidad a  $Zn^{+2}$ . Dicho gen fue capaz de restablecer el transporte del metal en la cepa mutante de los genes ZRT1 y ZRT2 de *S. cerevisiae* ZHY3, presentando un crecimiento similar al de ZHY3/pMC5, que contiene una copia de librería del gen ZRT1, en LZM con diferentes concentraciones de  $ZnCl_2$  (1, 10, 100 y 1000  $\mu M$ ). Mediante el análisis estadístico, realizado a través de la prueba de Tukey se confirmó la similitud funcional del gen umZRT1 con ZRT1 de *S. cerevisiae*, con un nivel de significancia  $\alpha=.05$ . Por otro lado se encontró que el gen umZRT2 codifica para un transportador con una afinidad menor por  $Zn^{+2}$  y se sugiere que es capaz de transportar otro metal, ya que al transformar a la cepa ZHY3 con pDR195umZRT2, se presentaron niveles de crecimiento un poco mayores al control negativo (ZHY3/pDR195) en las concentraciones 1 y 10  $\mu M$  de  $ZnCl_2$ , elevándose su tasa de crecimiento solo en los medios con una concentración de 100 y 1000  $\mu M$  del compuesto. Al parecer el otro metal al cual es capaz de transportar, pudiera competir por los sitios de unión contra el zinc inhibiendo su crecimiento, elevándose el mismo, hasta que fueron incrementadas las concentraciones de zinc, de esa manera, el metal fue capaz de ganar los sitios de unión a través de los cuales se lleva a cabo su transporte hacia el interior de la célula. Por lo que puede ser un transportador tipo Zrt2p, capaz de

transportar  $Zn^{+2}$  y otro metal. Tras un análisis estadístico con la prueba de Tukey, se demostró con un  $\alpha=.05$ , que la función de umZRT2 es significativamente diferente a la de umZRT1 y se observó una marcada disimilitud con el crecimiento de la cepa ZHY3/pDR195.

Los transportadores de tipo Zrt1p y Zrt2p han sido descritos en organismos pertenecientes a toda división (Gaither and Eide, 2001; Eide, 2005), pero su estudio es limitado en hongos basidiomicetos, siendo dichos transportadores estudiados principalmente en ascomicetos (Wilson *et al.*, 2012). Por medio del análisis de secuencias aminoacídicas de transportadores de zinc correspondientes a la familia ZIP, principalmente de Zrt1p y Zrt2, previamente caracterizadas en otros organismos, y de las proteínas umZrt1p y umZrt2p mediante los métodos Neighbor-Joining (NJ) y de máxima verosimilitud (ML) fueron creados árboles filogenéticos a partir de los cuales se observó que la proteína umZrt1p parece estar más relacionada evolutivamente con los hongos ascomicetos, mientras que umZrt2p es más similar y evolutivamente cercana a organismos correspondientes a basidiomicetos de la familia *Ustilaginaceae* dentro de la cual es clasificado *U. maydis*, por otra parte, según el análisis, comparten cenancestro con los transportadores de plantas.

Se ha descrito que la expresión de ZRT1 es altamente regulada por la cantidad de zinc, expresándose ante concentraciones bajas del metal, mientras que la de ZRT2 no es tan regulada por el nivel del ion en *Saccharomyces cerevisiae* (Zhao and Eide, 1996a, b). En el presente estudio se identificó mediante RT-PCR punto final que umZRT1 es expresado invariablemente ante bajas concentraciones de zinc, independientemente del pH del medio, tanto en la cepa silvestre de *Ustilago maydis* FB<sub>2</sub>, como en la mutante de RIM101 (BMA2), en contraste con umZRT2 cuya expresión se ve influenciada por el pH, ya que se presentaron variaciones de su expresión dependiendo del mencionado factor. Si bien, era esperado que umZRT2 presentara una menor expresión que umZRT1 ante bajas concentraciones de zinc en ambientes ácidos, debido a que Zrt1p es el sistema primario para la adquisición de

Zn<sup>+2</sup> ante bajas concentraciones del metal, donde ha sido reportado que su expresión se eleva aproximadamente 100 veces (Zhao and Eide, 1996b) y Zrt2p al ser de baja afinidad, decrece a niveles bajos ante severa deficiencia de zinc (Bird *et al.*, 2004), llamó nuestra atención que umZRT2 en pH 4 presentó una menor expresión que umZRT1 en la cepa FB<sub>2</sub>, mientras que en BMA2, mutante de RIM101, se obtuvo igual nivel de expresión que en umZRT1 bajo las mismas condiciones. Rim101 regula la expresión genética en ambientes alcalinos (Tilburn *et al.*, 1995) y se ha reportado la función de este en ambientes ácidos, de manera indirecta al reprimir la expresión de NRG1, el cual es descrito a su vez como represor, siendo responsable de la activación de genes en pH ácido, en *S. cerevisiae* (Lamb and Mitchel, 2003; Peñalva *et al.*, 2008). En este estudio el gen RIM101 fue expresado en todas las condiciones en FB<sub>2</sub>, mientras NRG1 fue expresado tanto en FB<sub>2</sub> como en BMA2 independientemente de la condición ensayada. Lo que indica que el gen umZRT2 es reprimido por el factor de transcripción Rim101p en pH 4.0 ante bajas concentraciones de zinc en la cepa silvestre de *U. maydis*, independientemente de Nrg1p, lo cual resulta interesante ya que en numerosos estudios se ha descrito la función de Rim101p solo ante pH alcalino, debido a los cortes proteolíticos necesarios para llegar a la forma activa del factor de transcripción (Orejas *et al.*, 1995; Tilburn *et al.*, 1995, Mingot *et al.*, 1999, Díez *et al.*, 2002; You & Chung, 2007; Peñalva *et al.*, 2008). Contrario a ello, nuestros resultados muestran que de alguna manera Rim101p puede ser funcional a pH ácido, reprimiendo ya sea directa o indirectamente la expresión de umZRT2, lo que coincide con lo reportado en algunos estudios con el paso del tiempo (Tilburn *et al.*, 1995; Lamb *et al.*, 2001; Nobile *et al.*, 2003; Aréchiga and Ruíz, 2005) y recientemente se reportó la probable actividad de Rim101p en condiciones ácidas en el hongo *Trichoderma viridens* (Trushina *et al.*, 2013). Por otra parte a pH 7 se observó la sobreexpresión de umZRT2 por influencia de Rim101p en la cepa FB<sub>2</sub>, ya que en la cepa mutante BMA2 se presentó represión del mismo, si se comparan dichos resultados con los obtenidos en pH 4.0, la variaciones podrían explicarse por la probable función de

rim101<sup>53</sup> como represor en ambientes ácidos y rim101<sup>27</sup> como activador en neutros, tal como se ha reportado en *Saccharomyces cerevisiae* (Lamb and Mitchel, 2003).

El zinc es un metal fundamental para la fisiología celular, y con las presentes aportaciones se muestran algunas estrategias de *Ustilago maydis* para su adquisición, logrando la homeostasis del metal dentro de la célula, permitiendo su adaptación ante variaciones de pH así como de zinc a las que se enfrenta.

Al existir pocos estudios en hongos basidiomicetos, los resultados aquí presentados son un aporte importante, que puede ser extrapolado a los demás integrantes del filo.

## 8. CONCLUSIONES:

1. Los genes umZRT1 y umZRT2 de *Ustilago maydis* codifican para transportadores de zinc de la familia ZIP; umZRT1 es un transportador de alta afinidad a  $Zn^{+2}$  mientras que umZRT2 es capaz de transportar al ion con menor afinidad y probablemente con mayor a otro metal aun no identificado.
2. El análisis filogenético demostró que umZRT1 es evolutivamente mas relacionado con hongos ascomicetos, mientras que umZRT2 lo es con basidiomicetos, compartiendo ambos como cenancestro transportadores de zinc en plantas.
3. El gen umZRT1 se expresa ante concentraciones bajas de zinc, independientemente del pH ácido o neutro del medio.
4. El gen umZRT2 se reprime en ambientes con pH ácido y se sobreexpresa en ambientes con pH neutro.
5. El gen umZRT1 no es regulado por Rim101p en pH ácido y en neutro, mientras que umZRT2 es regulado directa o indirectamente por el factor de transcripción ante dichas condiciones, lo que indica la probable existencia de una forma activa de Rim101p en ambientes ácidos, ya que la expresión de NRG1 no participa en la regulación de estos transportadores.
6. En *U. maydis* el factor de transcripción Rim101p no regula el mecanismo de adaptación de excreción de ácidos y amonio para lograr variaciones externas de pH.

## 9. LITERATURA CITADA

Agrios, GN. 2005. Plant Pathology. Fifth Edition. Ed. Elsevier Academic Press. USA, pp. 922.

Ahonen-Jonnarth U, Van Hees P, Lundström U, Finlay RD. 2000. Production of organic acids by mycorrhizal and nonmycorrhizal *Pinus sylvestris* L. seedlings exposed to elevated concentrations of aluminium and heavy metals. *New Phytol.* 146: 557–567.

Amich E. 2010. Homeostasis del zinc a pH alcalino y su relevancia en la virulencia de *Aspergillus fumigatus*. Tesis doctoral, Universidad de Salamanca.

Andrade R, Mata G; Sánchez J. 2012. La producción Iberoamericana de hongos comestibles en el contexto internacional. Hongos comestibles y medicinales en Iberoamérica. Investigación y desarrollo en un entorno multicultural, México, 2012, pp. 9-16.

Aréchiga E, Ruiz-Herrera J. 2005. The RIM101/PacC homologue from the basidiomycete *Ustilago maydis* is functional in multiple pH-sensitive phenomena. *Eukaryot Cell* 4, 999–1008.

Arst H Jr, Bignell E, Tilburn J. 1994. Two new genes involved in signalling ambient pH in *Aspergillus nidulans*. *Mol. & Gen. Genet.* 245: 787-790.

Auld D. 2001. Zinc coordination sphere in biochemical zinc sites. *Biometals.*, Sep-Dec; 14(3-4):271-313.

Balaji R, Colvin R. 2005. A proton-dependent zinc uptake in PC12 cells. *Neurochem Res* 30: 171-176.

Banuett, F. 1992. *Ustilago maydis*, the delightful blight. *Trends in Genetics* 8: 174-180.

Banuett F. 1995. Genetics of *Ustilago maydis*, a fungal pathogen that induces tumors in maize. *Annual Reviews Genetics* 29: 179-208.

Banuett F, Herkowitz I. 1989. Different alleles of *Ustilago maydis* are necessary for maintenance of filamentous growth but not for meiosis. *Proceedings of the National Academy of Science* 86: 5878-5882.

Barret A, Cantor C, Liebecq C, Moss G, Saenger W, Sharon N, Tipton K, Venetianer P, Vliegenthart G. 1992. *Enzyme nomenclature*. Academic Press, New York, pp. 5-22.

Bird, A, Blankman E, Stillman D, Eide D, Winge R. 2004. The Zap1 transcriptional activator also acts as a repressor by binding downstream of the TATA box in ZRT2. *EMBO J.* 23, 1123–1132.

Bird A, Swierczek S, Qiao W, Eide D, Winge D. 2006. Zinc metalloregulation of the zinc finger pair domain. *J. Biol. Chem.* 281, 25326–25335.

Bird A, Zhao H, Luo H., Jensen L, Srinivasan C, Evans-Galea M, Winge D, Eide D. 2000. A dual role for zinc fingers in both DNA binding and zinc sensing by the Zap1 transcriptional activator *EMBO J.* 19, 3704–3713.

Birnboim HC, Doly J. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 1979 Nov 24;7(6):1513-23.

Brachmann CB, Davies A, Cost GJ, Caputo E, Li J, Hieter P, Boeke JD. 1998. Designer deletion strains derived from *Saccharomyces cerevisiae* S288C: a useful set of strains and plasmids for PCR-mediated gene disruption and other applications. *Yeast Chichester Engl.* 14, 115–132.

Brefort T, Doehlemann G, Mendoza-Mendoza A, Reissmann S, Djamei A, Kahmann R. 2009. *Ustilago maydis* as a pathogen. *Annu. Rev. Phytopathol.* 47:423–445.

Bölker M. 2001. *Ustilago maydis* a valuable model system for the study of fungal dimorphism and virulence. *Microbiology* 147: 1395–1401.

Bun-Ya M, Nishimura M, Harashima S, Oshima Y. 1991. The PHO84 gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes an inorganic phosphate transporter, *Mol. Cell. Biol.* 11: 3229–3238.

Burdette S, Walkup G, Spingler B, Tsien R, Lippard S. 2001. Fluorescent sensors for Zn (2+) based on a fluorescein platform: synthesis, properties and intracellular distribution, *J. Am. Chem. Soc.* 123:7831–7841.

Caddick MX, Brownlee AG, Arst HN Jr. 1986. Regulation of gene expression by pH of the growth medium in *Aspergillus nidulans*. *Mol Gen Genet*, 203:346-53.

Caracuel Z, Roncero MI, Espeso EA, González CI, García FI, Di Pietro A. 2003. The pH signalling transcription factor PacC controls virulence in the plant pathogen *Fusarium oxysporum*. *Mol. Microbiol.* 48:765–79.

Cario E, Jung S, Harder D'Heureuse J, Schulte C, Sturm A, Wiedenmann B, Goebell H, Dignass AU. 2000. Effects of exogenous zinc supplementation on intestinal epithelial repair in vitro. *Eur J Clin Invest*, 30(5):419–428.

Cervantes-Chavez J, Ortiz-Castellanos L, Tejeda Sartorius M, Gold S, Ruiz-Herrera J. 2010. Functional analysis of the pH responsive pathway Pal/Rim in the phytopathogenic basidiomycete *Ustilago maydis*. *Fungal Genet Biol* 47, 446–457.

Chao Y, Fu D. 2004. Kinetic study of the antiport mechanism of an *Escherichia coli* zinc transporter, ZitB, *J. Biol. Chem* 279:12043–12050.

Chavan S, Smith S. 2013. A rapid and efficient method for assessing pathogenicity of *Ustilago maydis* on maize and teosinte lines. *J Vis Exp.* 2014 Jan 3;(83):e50712.

Coleman J. 1992. Zinc proteins: enzymes, storage proteins, transcription factors, and replication proteins. *Annual Review of Biochemistry.* 61:897-946.

Colvin R, Davis N, Nipper R, Carter P. 2000 Evidence for a zinc/proton antiporter in rat brain. *Neurochem Int* 36: 539-547.

Conklin D, Culbertson M, Kung C. 1994. Interactions between gene products involved in divalent cation transport in *Saccharomyces cerevisiae*, *Mol. Gen. Genet.* 244: 303–311.

Coyle P, Philcox JC, Carey LC, Rofe AM. 2002. Metallothionein: the multipurpose protein. *Cell Mol Life Sci* 59: 627–647.

Coyle P, Zalewski P, Philcox J, Forbes I, Ward A, Lincoln S, Mahadevan, I, Rofe A. 1994. Measurement of zinc in hepatocytes by using a fluorescent probe, zinquin: relationship to metallothionein and intracellular zinc, *Biochem. J.* 303:781–786.

Denison SH, Negrete S, Mingot JM, Tilburn J, Mayer WA, *et al* . 1998. Putative membrane components of signal transduction pathways for ambient pH regulation in *Aspergillus* and meiosis in *Saccharomyces* are homologous. *Mol. Microbiol.* 30:259–64.

Devirgiliis C, Murgia C, Danscher G, Perozzi G. 2004. Exchangeable zinc ions transiently accumulate in a vesicular compartment in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 323:58–64.

Denison SH, Orejas M, Arst HN Jr. 1995. Signaling of ambient pH in *Aspergillus* involves a cysteine protease. *J. Biol. Chem.* 270:28519–22.

Díez E, Alvaro J, Espeso EA, Rainbow L, Suárez T, Tilburn J, Arst HN Jr, Peñalva MA. 2002. Activation of the *Aspergillus* PacC zinc finger transcription factor requires two proteolytic steps. *EMBO J*, 21:1350-9.

Eide D. 2003. Multiple regulatory mechanisms maintain zinc homeostasis in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Nutr* 133: 1532S-1535S.

Eide D. 2004. The SLC39 family of metal ion transporters, *Pflugers Arch.* 447: 796–800.

Eide D. 2005. The Zip Family of Zinc Transporters. *Molecular Biology Intelligence Unit*, pp. 261-264.

Eide D. 2006. Zinc transporters and the cellular trafficking of zinc. *Biochim Biophys*, 1763: 711-722.

Eide D. 2009. Homeostatic and adaptive responses to zinc deficiency in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 284: 18565-18569.

Ellis C, MacDiarmid C, Eide D. 2005. Heteromeric protein complexes mediate zinc transport into the secretory pathway of eukaryotic cells. *J. Biol. Chem.* 280, 28811–28818).

Ellis C, Wang F, MacDiarmid C, Clark S, Lyons T, Eide D. 2004. Zinc and the Msc2 zinc transporter protein are required for endoplasmic reticulum function, *J. Cell Biol.* 166 (2004) 325–335.

Espeso E, Roncal T, Díez E, Rainbow L, Bignell E, *et al.* 2000. On how a transcription factor can avoid its proteolytic activation in the absence of signal transduction. *EMBO J.* 19:719–28

Espeso E, Tilburn J, Sánchez L, Brown C, Valencia A, Arst H Jr, Peñalva M. 1997. Specific DNA recognition by the *Aspergillus nidulans* three zinc finger transcription factor PacC. *J Mol Biol* 274: 466-480.

Finn RD, Bateman A, Clements J, Coghill P, Eberhardt RY, Eddy SR, Heger A, Hetherington K, Holm L, Mistry J, Sonnhammer ELL, Tate J, Punta M. 2014. Nucleic Acids Research, Database Issue 42:D222-D230.

Flaherty JE, Pirttilä AM, Bluhm BH, Woloshuk CP. 2003. *PAC1*, a pHregulatory gene from *Fusarium verticillioides*. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:5222–27.

Fukunaka A, Suzuki T, Kurokawa Y, Yamazaki T, Fujiwara N, Ishihara K, Migaki H, Okumura K, Masuda S, Yamaguchi-Iwai Y, Nagao M, Kambe T. 2009. Demonstration and characterization of the heterodimerization of ZnT5 and ZnT6 in the early secretory pathway. *J. Biol. Chem.* 284, 30798–30806).

Gaither L, Eide D. 2001. Eukaryotic zinc transporters and their regulation, *BioMetals*, 14: 251–270.

García-Pedrajas MD, Nadal M, Kapa LB, Perlin MH, Andrews DL, Gold SE. 2008. DelsGate, a robust and rapid gene deletion construction method. *Fungal Genet Biol.* Apr;45(4):379-88.

Gietz RD, Schiestl RH, Willems AR, Woods RA. 1995. Studies on the transformation of intact yeast cells by the LiAc/SSDNA/PEG procedure. *Yeast* 11: 355±360.

Gitan R, Eide D. 2000. Zinc-regulated ubiquitin conjugation signals endocytosis of the yeast ZRT1 zinc transporter. *Biochem J* 346, 329–336.

Gitan R, Lou H, Rodgers J, Broderius M, Eide D. 1998. Zinc induced inactivation of the yeast ZRT1 zinc transporter occurs through endocytosis and vacuolar degradation. *J Biol Chem* 273, 28617–28624.

Gregory D, Martin A, Cheetham J, Rees A. 1993. The prediction and characterization of metal binding sites in proteins. *Prot. Eng.* 6:29–35.

Guerra, S. 2005. Caracterización bioquímica de la H<sup>+</sup>ATPasa de membrana plasmática de *Ustilago maydis* en la forma micelial en condiciones de estrés nutricional. Memorias del XIV Congreso de Bioenergética y Biomembranas. Oaxaca, México.

Hall TA. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41:95-98).

Hamer DH. 1986. Metallothionein. *Annu Rev Biochem* 55, 913–951.

Hanahan D. 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* 166,557-580.

Hänsch R. y, Mendel R. 2009. Physiological functions of mineral micronutrients (Cu, Zn, Mn, Fe, Ni, Mo, B, Cl). *Plant biology*. Elsevier.

Hegart H, Margaritis A, Pilkington H, Stewart R, Dowhanick T, Russell I. 1999. Factors Affecting Yeast Viability and Vitality Characteristics: A Review. *Technical Quarter*, Vol. 36 No 4, pp. 383-406.

Herbig A, Bird A, Swierczek S, McCall K, Mooney M, Wu C, Winge D, Eide D. 2005. Zap1 activation domain 1 and its role in controlling gene expression in response to cellular zinc status. *Mol Microbiol* 57: 834-846.

Hervás A, Rodríguez JM, Tilburn J, Arst HN Jr, Peñalva MA. 2007. Evidence for the direct involvement of the proteasome in the proteolytic processing of the *Aspergillus nidulans* zinc finger transcription factor PacC. *J Biol Chem*, 282:34735-47.

Ho L, Ratnaik R, Zalewski P. 2000. Involvement of intracellular labile zinc in suppression of DEVD-caspase activity in human neuroblastoma cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 268:148–154.

Holliday R. 1961. Induced Mitotic Crossing-Over in *Ustilago maydis*. *Genetics Research*, 2, 231-248.

Institute of Medicine (U.S.). 2001. DRI: Dietary Reference Intakes for Vitamin A, Vitamin K, Arsenic, Boron, Chromium, Copper, Iodine, Iron, Manganese, Molybdenum, Nickel, Silicon, Vanadium, and Zinc. Washington, DC: National Academy Press.

Iwata M, Takebayashi T, Ohta H, Alcalde RE, Itano Y, Matsumura T. 1999. Zinc accumulation and metallothionein gene expression in the proliferating epidermis during wound healing in mouse skin. *Histochem Cell Biol*, 112(4):283–290.

James T, Kauff F, Schoch C, Matheny P, Hofstetter V, Cox C, Celio G, Gueidan C, Fraker E, Miadlikowska J, Lumbsch H, Rauhut , Reeb V, Arnold A, Amtoft A, Stajich J, Hosaka K, Sung G, Johnson D, O'Rourke B, Crockett M, Binder M, Curtis J, Slot J, Wang Z, Wilson AW, Schüssler A, Longcore J, O'Donnell K, Mozley-Standridge S, Porter D, Letcher PM, Powell MJ, Taylor JW, White MM, Griffith GW, Davies DR, Humber RA, Morton JB, Sugiyama J, , Rossman A, Rogers J, Pfister D, Hewitt D, Hansen K, Hambleton S, Shoemaker R, Kohlmeyer J, Volkmann-Kohlmeyer B, Spotts R, Serdani M, Crous P, Hughes K, Matsuura K, Langer E, Langer G, Untereiner W, Lücking R, Büdel B, Geiser D, Aptroot A, Diederich P, Schmitt I, Schultz M, Yahr R, Hibbett D, Lutzoni F, McLaughlin D, Spatafora J, Vilgalys R. 2006. Reconstructing the early evolution of Fungi using a six-gene phylogeny. *Nature*. 19; 443(7113):818-22.

Jensen L, Ajua-Alemanji M, Culotta V. 2003. The *Saccharomyces cerevisiae* high affinity phosphate transporter encoded by PHO84 also functions in manganese homeostasis. *J. Biol. Chem.* 278:42036–42040.

Jones P, Binns D, Chang H, Fraser M, Li W, McAnulla C, McWilliam H, Maslen J, Mitchell A, Nuka G, Pesseat S, Quinn A, Sangrador-Vegas A, Scheremetjew M, Yong S, Lopez R, Hunter S. 2014. InterProScan 5: genome-scale protein function classification. *Bioinformatics*, Jan 2014.

Kahmann R, Kämper J. 2004. *Ustilago maydis*: how its biology relates to pathogenic development. *New Phytologist* 164: 31-42.

Kamizono A, Nishizawa M, Teranishi Y, Murata K, Kimura A. 1989. Identification of a gene conferring resistance to zinc and cadmium ions in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, *Mol. Gen. Genet.* 219:161–167.

Kämper J, Kahmann R, Bölker M, Ma L, Brefort T, Saville B, Banuett F, Kronstad J, Gold S, Müller O, Perlin M, Wösten H, de Vries R, Ruíz J, Reynaga C; Snetselaar K, McCann M, Pérez J, Feldbrügge M, Basse C, Steinberg G, Ibeas J, Holloman W, Guzmán P, Farman M, Stajich J, Sentandreu R, González J, Kennell J, Molina L, Schirawski J, Mendoza A, Greilinger D, Munich K, Rössel N, Scherer M, Vranes M, Ladendorf O, Vincon V, Fuchs U, Sandrock B, Meng S, Ho E, Cahill M, Boyce K, Klose J, Klosterman S, Deelstra H, Ortiz L, Li W, Sánchez P, Schreier P, Häuser I, Vaupel M, Koopmann E, Friedrich G, Voss H, Schlüter T, Margolis J, Platt D, Swimmer C, Gnirke A, Chen F, Vysotskaia V, Mannhaupt G, Güldener U, Münsterkötter M, Haase D, Oesterheld M, Mewes W, Mauceli E, DeCaprio D, Wade C, Butler J, Young S, Jaffe D, Calvo S, Nusbaum C, Galagan J, Birren B. 2006. Insights from the genome of the biotrophic fungal plant pathogen *Ustilago maydis*. *Nature* 44: 97-101.

King JC. 2006. Modern Nutrition in Health and Disease. Zinc In: Shils, ME.; Shike, M., editors. Philadelphia, Pa: Lippincott Williams & Wilkins, pp. 271-285.

Klosterman S.J. 2007. Genetics of Morphogenesis and Pathogenic Development of *Ustilago maydis*. *Advances in Genetics* 57: 1-24.

Koh J, Suh SW, Gwag BJ, He YY, Hsu CY, Choi DW. 1996. The role of zinc in selective neuronal death after transient global cerebral ischemia. *Science* 272, 1013–1016.

Kramer U, Clemens S. 2005. Function and homeostasis of zinc, copper, and nickel in plants. *Topics Curr Genet*, 14:215- 271.

Kumanovics A, Poruk K, Osborn K, Ward D, Kaplan J. 2006. *YKE4* (YIL023C) encodes a bidirectional zinc transporter in the endoplasmic reticulum of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 281: 22566-22574.

Lamb TM, Mitchell AP. 2003. The transcription factor Rim101p governs ion tolerance and cell differentiation by direct repression of the regulatory genes *NRG1* and *SMP1* in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 23:677-86.

Lamb TM, Xu W, Diamond A, Mitchell AP. 2001. Alkaline response genes of *Saccharomyces cerevisiae* and their relationship to the RIM101 pathway. *J Biol Chem*, 276:1850-6.

León C, Sánchez J, Ruiz-Herrera J. 2014. *Ustilago maydis*, a Delicacy of the Aztec Cuisine and a Model for Research. *Natural Resources*, 5:256-267.

Li L, Kaplan J. 1998. Defects in the yeast high affinity iron transport system result in increased metal sensitivity because of the increased expression of transporters with a broad transition metal specificity. *J. Biol. Chem.*, 273, 22181–22187.

Li L, Kaplan J. 2000. The yeast gene *MSC2*, a member of the cation diffusion facilitator family, affects the cellular distribution of zinc, *J. Biol. Chem.* 276:5036–5043.

Li W, Mitchell A. 1997. Proteolytic activation of *Rim1p*, a positive regulator of yeast sporulation and invasive growth. *Genetics* 145:63-73.

Lyons T, Gasch A, Gaither L, Botstein D, Brown P, Eide D. 2000. Genome-wide characterization of the *Zap1p* zinc-responsive regulon in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:7957-7962.

Ma J, Ueno D, Zhao F, McGrath S. 2005. Subcellular localization of Cd and Zn in the leaves of a Cd-hyperaccumulating ecotype of *Thlaspi caerulescens*, *Planta* 220:731–736.

MacDiarmid C, Gaither L, Eide D. 2000. Zinc transporters that regulate vacuolar zinc storage in *Saccharomyces cerevisiae*, *EMBO J.* 19: 2845–2855.

MacDiarmid C, Milanick M, Eide D. 2002. Biochemical properties of vacuolar zinc transport systems of *Saccharomyces cerevisiae*, *J. Biol. Chem.* 277:39187–39194.

MacDiarmid C, Milanick M, Eide D. 2003. Induction of the *ZRC1* metal tolerance gene in zinc-limited yeast confers resistance to zinc shock, *J. Biol. Chem.* 278: 15065–15072

Maret W, Chem L. 2009. Coordination dynamics of zinc in proteins. *Chemical Reviews.* 109:4682–4707.

Maret W, Yetman C, Jiang L. 2001. Enzyme regulation by reversible zinc inhibition: glycerol phosphate dehydrogenase as an example. *Chem Biol Interact* 130-132: 891-901.

Martínez-Espinoza A, García-Pedrejas M, Gold S. 2002. The Ustilaginales as Plant pests and Model Systems. *Fungal Genetics and Biology* 35: 1-20.

McCall K, Huang C, Fierke C. 2000. Function and Mechanism of Zinc Metalloenzymes. *Zinc and Health: Current Status and Future Directions*. Journal of nutrition, vol. 130 no. 5 1437S-1446S.

Michalczyk A, Allen J, Blomeley R, Ackland M. 2002. Constitutive expression of hZnT4 zinc transporter in human breast epithelial cells, *Biochem. J.* 364:105–113

Mingot, JM., Kostka, S., Kraft, R., Hartmann, E., and Gorlich, D. 2001. Importin 13: A novel mediator of nuclear import and export. *EMBO J.* 20: 3685–3694.

Mingot JM, Tilburn J, Díez E, Bignell E, Orejas M, *et al.*, 1999. Specificity determinants of proteolytic processing of *Aspergillus* PacC transcription factor are remote from the processing site, and processing occurs in yeast if pH signalling is bypassed. *Mol. Cell. Biol.* 19:1390–400.

Montanini B, Blaudez D, Jeandroz S, Sanders D, Chalot M. 2007. Phylogenetic and functional analysis of the Cation Diffusion Facilitator (CDF) family: improved signature and prediction of substrate specificity. *BMC genomics* 8: 107.

Mühlbachová G., Šimon T., Pechová M. 2005. The availability of Cd, Pb and Zn and their relationships with soil pH and microbial biomass in soils amended by natural clinoptilolite. *Plant, Soil Environ.*, 51 (1): 26-33.

Nasir M, Fahrni C, Suhy D, Kolodsick K, Singer C, O'Halloran T, 1999. The chemical cell biology of zinc: structure and intracellular fluorescence of a zinc–quinolinesulfonamide complex, *J. Biol. Inorg. Chem.* 4:775–783.

Negrete S, Reiter W, Díez E, Denison SH, Tilburn J, *et al.* 1999. Ambient pH signal transduction in *Aspergillus*: completion of gene characterization. *Mol. Microbiol.* 33:994–1003.

Nobile C, Bruno V, Richard M, Davis D, Mitchell A. 2003. Genetic control of chlamydospore formation in *Candida albicans*. *Microbiology* 149:3629-3637.

Ohana E, Hoch E, Keasar C, Kambe T, Yifrach O, Hershfinkel M, Sekler I. 2009. Identification of the Zn<sup>2+</sup> binding site and mode of operation of a mammalian Zn<sup>2+</sup> transporter. *J Biol Chem* 284: 17677-17686.

O'Meara, T, Norton, D, Price M, Hay C, Clements M, Nichols C, Alspaugh J. 2010. Interaction of *Cryptococcus neoformans* Rim101 and protein kinase A regulates capsule. PLoS Pathog 6, e1000776.

Orejas M, Espeso EA, Tilburn J, Sarkar S, Arst HN Jr, Peñalva MA. 1995. Activation of the *Aspergillus* PacC transcription factor in response to alkaline ambient pH requires proteolysis of the carboxyterminal moiety. *Genes Dev.* 9:1622–32.

Outten C, O'Halloran T. 2001. Femtomolar sensitivity of metalloregulatory proteins controlling zinc homeostasis, *Science* 292: 2488–2492.

Palmiter R, Cole T, Findley S. 1996. ZnT-2, a mammalian protein that confers resistance to zinc by facilitating vesicular sequestration, *EMBO J.* 15:1784–1791.

Palmiter R, Findley S. 1995. Cloning and functional characterization of a mammalian zinc transporter that confers resistance to zinc, *EMBO J.* 14: 639–649.

Palmiter R, Huang L, 2004. Efflux and compartmentalization of zinc by members of the SLC30 family of solute carriers. *Pflugers Arch.* 447: 744–751.

Paulsen I, Saier M. 1997. A novel family of ubiquitous heavy metal ion transport proteins. *J. Membr. Biol.*, 156, 99–103.

Peñalva MA, Tilburn J, Bignell E, Arst HN Jr. 2008. Ambient pH gene regulation in fungi: making connections. *Trends Microbiol*, 16:291-300.

Pérez-Moreno J. 2012. Los hongos comestibles ectomicorrizicos y su biotecnología, hongos comestibles y medicinales en Iberoamérica: Investigación y desarrollo en un entorno multicultural, México, pp. 19-28.

Prasad A. 1993. Essentiality and toxicity of zinc. *Scand J Work Environ Health.* Suppl 1: 134-136.

Prasad MNV, and Hagemeyer J. 1999. Heavy metal stress in plants - From molecules to ecosystems. Springer-Verlag, Heidelberg, Berlin, New York. pp. 401.

Qiao W, Mooney M, Bird A, Winge D, Eide D. 2006. Zinc binding to a regulatory zinc-sensing domain monitored in vivo by using FRET. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 6; 103(23):8674-9.

Ramsay L, Gadd G. 1997. Mutants of *Saccharomyces cerevisiae* defective in vacuolar function confirm a role for the vacuole in toxic metal ion detoxification, *FEMS Microbiol. Lett.* 152:293–298.

Rentsch D, Laloï M, Rouhara I, Schmelzer E, Delrot S, Frommer WB. 1995. *NTRI* encodes a high affinity oligopeptide transporter in *Arabidopsis*. FEBS Lett.370, 264–268.

Rojas-Ramírez L. 2013. Los basidiomicetos: una herramienta biotecnológica promisorio con impacto en la agricultura. Fitosanidad, vol. 17, núm. 1. pp. 49-55.

Rosling A, Rosenstock N. 2008. Ectomycorrhizal fungi in mineral soil. Mineralogical Magazine, February, Vol. 72(1), pp. 127–130.

Ruiz-Herrera J. 2008. *Ustilago maydis*: ascenso de un hongo mexicano de la gastronomía local al mundo científico. Nova Scientia 1: 118-135.

Ruiz-Herrera J, & León-Ramírez C. 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.

Ruiz-Herrera J, Martínez A. 1998. The fungus *Ustilago maydis*, from the aztec cuisine to the research laboratory. International Microbiology 1: 149-158.

Ruiz-Herrera J, León C, Guevara L, Cárabez A. 1995. Yeast-mycelial dimorphism of haploid and diploid strains of *Ustilago maydis*. Microbiology 141: 695-703.

Ruiz-Herrera J, Ortiz L, Martínez A, León C, Sentandreu R. 2008. Analysis of the Proteins Involved in the Structure and Synthesis of the Cell Wall of *Ustilago maydis*. *Fungal Genetics and Biology*, 45, 571-576.

Ruiz-Herrera J, Robledo-Briones M and Martínez-Soto D. 2013. Experimental Pathosystems as a Tool for the Identification of Virulence Factors in Pathogenic Fungi. In: Deshpande, M. and Ruiz-Herrera, J., Eds., *Biotechnology: Beyond Borders*, CSIR-National Chemical Laboratory, Pune, 30-38.

Saitou N, Nei M. 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4:406-425.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 1982. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbour Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.

Sambrook J, Russell D. 2001. Molecular Cloning: a Laboratory Manual, 3rd edn. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory.

Selvig K and Alspaugh J. 2011. pH Response Pathways in Fungi: Adapting to Host-derived and Environmental Signals. *Mycobiology*, 39(4): 249-256.

Sharma G, Sharma N. 2013. Cytology as an Important Tool for Solving Evolutionary Problems in Angiosperms. *Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences*. Volume 84, Issue 1, pp 1-7

Simm C, Lahner B, Salt D, LeFurgey A, Ingram P, Yandell B, Eide D. 2007. *Saccharomyces cerevisiae* vacuole in zinc storage and intracellular zinc distribution. *Eukaryot cell* 6: 1166-1177.

St Croix C, Wasserloos K, Dineley K, Reynolds I, Levitan E, Pitt B. 2002. Nitric oxide-induced changes in intracellular zinc homeostasis are mediated by metallothionein/thionein, *Am. J. Physiol.* 282:L185–L192.

Su S, Mitchell A. 1993. Identification of functionally related genes that stimulate early meiotic gene expression in yeast. *Genetics* 133, 67–77.

Suhy D, O'Halloran TV. 1995. Metal responsive gene regulation and the zinc metalloregulatory model. In: Sigel H, ed. *Metal Ions in Biological Systems*. Marcel Dekker, New York; Vol. 32, pp. 557–578.

Suhy D, Simon K, Linzer D, O'Halloran T. 1999. Metallothionein is part of a zinc-scavenging mechanism for cell survival under conditions of extreme zinc deprivation, *J. Biol. Chem.* 274:9183–9192.

The UniProt consortium, UniProt a hub for protein information. 2015. *Nucleic Acids Res.* 43: D204-D212.

Tilburn J, Sarkar S, Widdick D, Espeso E, Orejas M, Mungroo J, Peñalva M, Arst H. Jr .1995. The *Aspergillus* PacC zinc finger transcription factor mediates regulation of both acid and alkaline-expressed genes by ambient pH. *EMBO J* 14, 779–790.

Trushina N, Levin M, Mukherjee K, Horwitz B. 2013. PacC and pH-dependent transcriptome of the mycotrophic fungus *Trichoderma virens*. *BMC Genomics* 14:138.

Valdés-Santiago L, Cervantes-Chávez J, Winkler R, León-Ramírez C, Ruiz-Herrera J. 2012. Phenotypic comparison of *samdc* and *spe* mutants reveals complex relationships of polyamine metabolism in *Ustilago maydis*. *Microbiology Mar*; 158(Pt 3):674-84.

Van Hees PAW, Lundstrom US, Giesler R. 2000. Low molecular weight organic acids and their Al-complexes in soil solution composition, distribution and seasonal variation in three podzolized soils. *Geoderma*, 94, 173:200.

Vasak M, Hasler D. 2000. Metallothioneins: new structural and functional insights. *Curr Opin Chem Biol* 4:177–183.

Vasak M, Kagi J. 1994. Metallothioneins. In: *Encyclopedia of Inorganic Chemistry*, vol. 4 (King, R. B., ed.), pp. 2229–2241. Wiley, New York.

Vicente-franqueira R, Moreno A, Leal F, Calera J. 2005 The *zrfA* and *zrfB* genes of *Aspergillus fumigatus* encode the zinc transporter proteins of a zinc uptake system induced in an acid, zinc-depleted environment. *Eukaryot cell* 4: 837-848.

Villanueva C. 1997. “Huitlacoche” (*Ustilago maydis*) as a food in Mexico. *Micología Neotropical Aplicada* 10:73-81.

Villanueva C, Sánchez E, Villanueva E. 2007. El huitlacoche y su cultivo. Ed. Mundi-Prensa México, S.A. de C.V. México, D.F. pp. 96.

Villanueva-Verduzco C, Sánchez-Ramírez E, Villanueva-Sánchez E. 2007. El huitlacoche y su cultivo. Ed. Mundi-Prensa México, S.A. de C.V. México, D.F. 96 p.

Vollmeister E, Schipper K, Baumann S, Haag C, Pohlmann T, Stock J, Feldbrügge M. 2011. Fungal development of the plant pathogen *Ustilago maydis*. *FEMS Microbiol Rev* 36 59–77.

Vyas V, Berkey C, Miyao T, Carlson M. 2005. Repressors Nrg1 and Nrg2 Regulate a Set of Stress-Responsive Genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryotic Cell* November 2005 vol. 4 no. 11 1882-1891.

Vylkova S, Carman A, Danhof, H, Collette J, Zhou H, Lorenz M. 2011. The Fungal Pathogen *Candida albicans* Autoinduces Hyphal Morphogenesis by Raising Extracellular pH. 17 May *mBio* vol. 2 no. 3e00055-11

You B, Chung K. 2007. Phenotypic characterization of mutants of the citrus pathogen *Colletotrichum acutatum* defective in a PacC-mediated pH regulatory pathway. *FEMS Microbiol Lett* 277, 107–114.

Wang Z, Feng L, Matskevich S, Venkataraman V, Parasuram K, Laity P. 2006. Solution structure of a Zap1 zinc-responsive domain provides insights into metalloregulatory transcriptional repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Mol. Biol.* 357, 1167–1183.

Waters BM and Eide D. 2002. Combinatorial control of yeast FET4 gene expression by iron, zinc, and oxygen. *J Biol Chem* 277(37):33749-57.

Williams R. 1987. The biochemistry of zinc. *Polyhedron* 6: 61–69.

Wilson D, Citiulo F, Hube B. 2012. Zinc exploitation by pathogenic fungi, *PLoS Pathog*,8,e1003034.

Zhao H, Butler E, Rodgers J, Spizzo T, Duesterhoeft S, Eide D. 1998. Regulation of zinc homeostasis in yeast by binding of the ZAP1 transcriptional activator to zinc-responsive promoter elements. *J. Biol. Chem.* 273, 28713–28720.

Zhao H, Eide D. 1996a. The yeast ZRT1 gene encodes the zinc transporter protein of a high-affinity uptake system induced by zinc limitation, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93:2454–2458.

Zhao H, Eide D. 1996b. The ZRT2 gene encodes the low affinity zinc transporter in *Saccharomyces cerevisiae*, *J. Biol. Chem.* 271:23203–23210.

Zhao H, Eide D. 1997. Zap1p, a metalloregulatory protein involved in zinc responsive transcriptional regulation in *Saccharomyces cerevisiae*, *Mol. Cell. Biol.* 17: 5044–5052.

Zhao, KL, Liu XM, Xu JM, Selim HM. 2010. Heavy metal contaminations in a soil-rice system: identification of spatial dependence in relation to soil properties of paddy fields. *Journal of Hazardous Materials* 181, 778e787.

Zhu J. 2003. Regulation of ion homeostasis under salt stress. *Opinion in Plant Biology*, 6:441–445.

## 10. ANEXOS

### 10.1. Secuencias de genes umZRT1 y umZRT2.

#### 10.1.1. Marco de lectura abierto gen Um00096 (umZRT1).

- **Secuencia nucleotídica:**

ATGGCTGACGAAATTCAGTGCACCTGGTCCCGTCGACAACGGCAGTGG  
ATCGATCGGTCTGCGTATCGGTGCCATCTTTATCATTTGGGCATCGTC  
CACGGCCTTGACCCTTTTCCCTATCGTTACACGTCGTATTCCGCGACTC  
TCCATCAACCGCGAAGCTTTCGATTTTGCCAAATACTTCGGTTCTGGT  
GTCATTATCGCCACTGCTTTCATCCATCTCTTAGCACCTGCCGCGAGT  
GATGAGGAGCTCGGATCGCCATGTCTTAGCAGCGATTTCCAGAACTAT  
CCCTTCGCTTTTGCATTTGCCATGATCGCCATGTTTCGCTGTTTTTGTCTG  
TCGAGGTGCTCGCCTTCCGGGTTGGAAGCCAATACGCCAATAAGCTC  
GCCTACGACTCCCATGCTGGTGGTCACCATCACGCCATGGAGCATGGC  
GGCAACCCCAACCTCGCTCAAGAAGAAGCAGCACAACCACAACGCAAT  
CAAGTCAGTCTCTTCGGACGACGTTGAAAACGCTGCTGCTGTTTCCTGG  
TGCCGACTCAGCCGCCGAGGCCAAAATGGTCGCTGACTCGAGTTCAA  
CCGCTTCTACCAAACCTTGATCTCACTACCCAAGCATCTGAAATCCTCG  
GCGTCATGATCCTAGAGTTTGGCGTCGTGTTCCATTCGATCATCATCG  
GTATCACCTCGGCACCACCTCCGACTTTACCGTCCTCTTTATCGTCAT  
CATTTTCCACCAAATGTTTCGAGGGTCTCGGTCTGGGTACCCGTCTCGC  
ATTCCTTCTCTCGGCATGAAGTCGTGGATTCCAACACTGGGAGCTAT  
CCTCTACGGTCTCGTCACTCCCATCGGTATCGCTATTGGTCTCGGTGTA  
CGTCACACTTACAACGGCGACTCGGCCACCGCCGCCTACGTCACCGGT  
ATCTTTGACTCGGTCTCGGCGGGTATCCTCCTCTACACGGGTACTGTT  
GAACTGCTTGACACACGAGTTCATCTTCAACGACAAGATGCGCAACGC  
GCCTCTCAAGAAGGTTGTCATCAGCATTCTCGAGATGCTCACCGGCCG  
TGGTCTCATGGCGCTGCTCGGACGATGGGCATGA

- **Secuencia aminoacídica:**

MADEIQCTGP VDNNGSGSIGL RIGAIIFIWA SSTALTLFPI VTRRIPRLSI  
NREAFDFAKY FGSGVIIATA FIHLLAPAAS DEELGSPCLSSDFQNYPFAP  
AFAMIAMFAV FVVEVLAFRV GSQYANKLAY DSHAGGHHHA  
MEHGGNPPLA QEEQHNHNAI KSVSSDDVEN

AAAVPGADSAAEAKMVADSS STASTKLDLT TQASEILGVM  
ILEFGVVFHS IIIGITLGTT SDFTVLFIVI IFHQMFEGLG LGTRLAFLPL  
GMKSWIPTLGAILYGLVTPI GIAIGLGVRH TYNGDSATAA YVTGIFDSVS  
AGILLYTGTV ELLAHEFIFN DKMRNAPLKK VVISILEMLT  
GAGLMALLGRWA

### 10.1.2. Marco de lectura abierto gen Um03110 (umZRT2).

- **Secuencia nucleotídica:**

ATGTTGGGGATCAATGTTAAGAGCAAGCCAGCGAAAGCAGCCGCTCT  
GCTGCTTCTCGCTGGAGCACCGCTTGTAGCCTCGCAATCGATCACCAC  
CGCCGTCACCGTGAATGGCACTCCGACTACCACGGTGATTTTCGCCATC  
TCCCACGGGTCGAGGCTACTGCGAATTCTTCATCGACCACTGGGACTG  
TGATCCGACGCGTTCTGAGGCGGCGTCTGGCCCAAGTGGTGCATCTGC  
GTCTGCGCCGAGTATCCAGCCTTCGCCGGTGGGTCAGAGCTGCACGTT  
GCATGGCGATCACTACCACTGCGATGGTCCTACTACAGCAACCGCGG  
CGGCAGCGGCTGCACAGGCCAGCCCTACCGGACAGGGCGAGTGTGTT  
TTCCACATCAACCACTGGGATTGCGAAGGCGGAGACCACTCAGACCA  
CGACCACTCAGGCCACGACCATTTCGGGACATTCGCACGCCGGCCATT  
CGCACGCCGGTCATAGCCACGGACCCTCGGAACTGTACGGCTGCGGT  
CTGGCGCCGCTCGAAGATTACAATCTGCCACTTCACATTGGCACAGTC  
TTTATTCTGCTCGTCTCGTTCGGCTATTGGTGCCTTCCATCCTGG  
TCTACACGGCAGGTGGTGCAACCTCGCAGAACAAAAGAGGCCGATGG  
GCAGACGAGGTGTTCTTCAATTTGCCGACACTTTGGTACTGGTGTGCTA  
ATCAGTACTGCTTTTGTGCACTTGCTGAGCCACGCGATGATGTACTAC  
TCGAACGAGTGTATTGGAGAGCTCAAGTACGAAGCTACTGCACCGGC  
TATCGCGATGGGTGCCGTGTGGCTGGTGTTCATTGTGCGACTTCTTCT  
GCTTCGTGCGTTGAGGAAGAAGAGTTCGCAGCAGATGCTACAGGCAC  
ACGAGAGCCACCACGATGTGCACGGCGTCACGAAACGCGAATCGAGC  
TCGACACTTGATCGCACCCACTCGCCTGCCACGGAAGAGGATGCAGC  
AACCGGAATGTACGGCGGTCTCACCTACGCCCAAGCCAAAGTCGCCG  
AATGGGACGTGTTTCGCCGTCGAAGCAGGTATCATCTTCCACTCGATCC  
TCATTGGCGTCACACTCGGCGTCGCCACAGGTTCCGGCTTCGTAGCGC  
TGCTCATCGCCATTCTTCCACCAGCTCTTCGAAGGTCTCGCTCTCGG  
CTCGCGTCTCTCCCTGCTAAGGTGGAAGAGCACCGCGTACAAGATGCT  
CATGGCCTCCGCGTTCGTCTTACCACCCCGATCGGCGTAGCTATCGG  
TATCGGTGTCAGGAAGAGCTTCAACGGAAACAGCTCGGGTACGCTGA  
TCACTTTGGGAACGTTCCACGCTCTCAGCGCCGGTATCCTGCTCTACA  
CGGCGCTCGTCAACTGCTCAGTGGTGAATTCATTACAACAGGCAG

ATGCAGAAGAGCTCCTTGATCAGAGCCATCGCTGCTGTAGCCGCGTTG  
ACCGTAGGTATCATGGCTATGTCCGTGCTCGCTCTGTGGGCCTAA

- **Secuencia aminoacídica um03110 (umZRT2):**

MLGINVKSHPAKAAALLLAGAPLVSQSITTA VTVNGTPTTTTVISPSPTG  
RGYCEFFIDHWDCDPTREAAASGPSGASASAPSIQSPVQGQCTLHGDHY  
HCDGPTTATAAAAAA QASPTGQGECVFHINHWDCGGDHS DHDHSGHD  
HSGHSHAGHSHAGHSHGPELYGCGLAPLEDYNLPLHIGTVFILLVSSAIG  
AFLPILVYTAGGATSQNKRGRWADEVFFICRHFVGTGVLSTAFVHLLSHA  
MMYYSNECIGELKYEATAPAIAMGAVWL VFIVDFLLRALKKSSQQML  
QAHESHHDVHGVTKRESSSTLDRTHSPATEEDAATGMYGGLTYAQAKV  
AEWDVFAVEAGIIFHSILIGVTLGVATGSGFVALLIILFHQLFEGLALGSR  
LSLLRWKSTAYKMLMASAFVLTTPIGVAIGIGVRKSFNGNSSGTLITLGT  
HALSAGILLYTALVELLSGDFIHNRMQKSSLIRAI AAVAALTVGIMAMS  
VLALWA

## 10.2. Secuencias de Plásmidos.

### 10.2.1. pDR195.

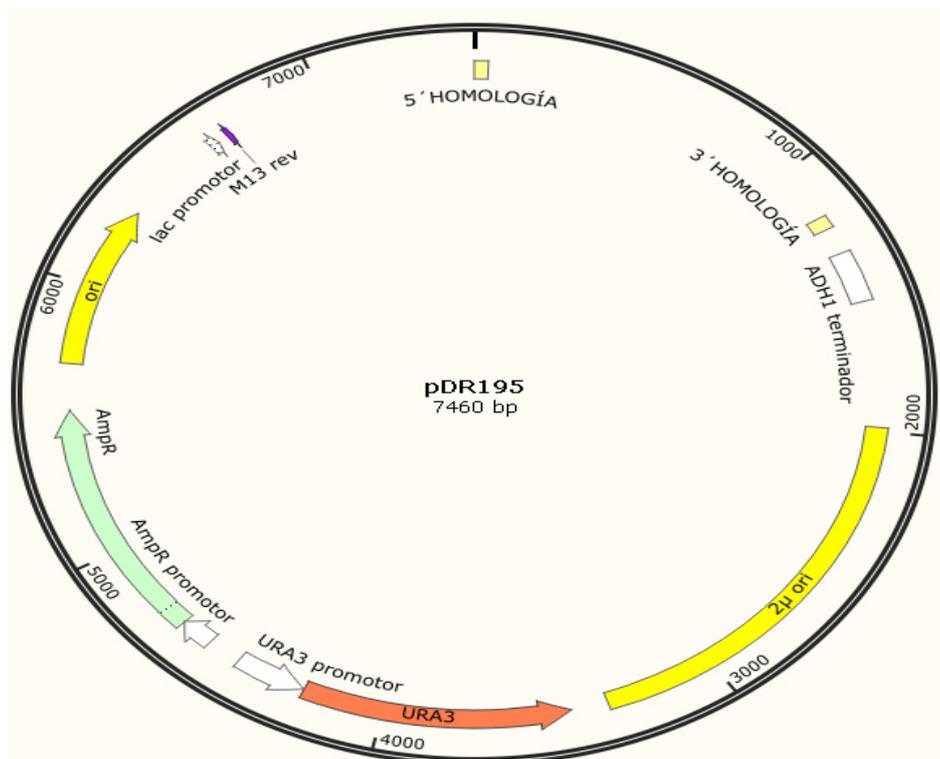
- **Secuencia:**

cccagcctcgagcggccgcggatccagcttggacttctgccagaggttggcaagtctccaatcaaggtt  
cggcttgtctacctgccagaaattacgaaaagatgaaaagggtcaaatcgttgtagatacgttgtagacttct  
aaataagcgaatttctatgatttatgattttattattaataaagtataaaaaaataagtatacaaatttaagtact  
cttaggtttaaaacgaaattcttattcttgagtaactcttctgtaggtcaggttcttctcaggtatagcatgaggtc  
ctctattgaccacacctaccggcatgccaattcactggcgtcgtttacaacgtcgtgactgggaaaacctggc  
gttaccacaaactaatgccttgagcacatcccccttccagctggcgtaatagcgaagaggcccgaccgatcg  
ccctccaacagttgcgcagcctgaatggcgaatggcgcctgatgcggtatttctccttacgcatctgtgcggtatt  
cacaccgataatcgatcgtactgttaccatcattgaattttgaacatccgaacctgggagtttccctgaaacaga  
tagtatattgaaacctgtataataatataatagctagcgtttacggaagacaatgtatgtattcgggtcctggagaaact  
attgcatctattgcataggtaatcttgacgtcgcacatccccgggtcatttctgcgtttccatctgcaactcaatagcatat  
ctttgttaacgaagcatctgtgcttctttttagaacaataatgcaacgcgagagcgtcaattttcaacaagaatc  
tgagctgcattttacagaacagaaatgcaacgcgaaagcgtattttaccaacgaagaatctgtgcttctttttaa  
aacaataatgcaacgcgagagcgtcaattttcaacaagaatctgagctgcaattttacagaacagaaatgcaacg  
cgagagcgtattttaccaacaagaatctatacttctttttgtctacaaaaatgcatcccagagagcgtattttctaa  
caaagcatcttagattactttttctccttggcgcctataatgcagctctctgataacttttgcactgtaggtccgttaa  
gggtagaagaaggctactttgtgtctatttctctccataaaaaagcctgactccactcccgcgttactgattacta  
gcgaagctgcgggtgcatttttcaagataaaggcatccccgattatattctataaccgatgtggattgcgcatacttgt  
gaacagaaagtgatagcgttgatgattcttattggtcagaaaattatgaacggttctctattttgtctctataactacg

tataggaaatgttacatttctgattgtttcgattcactctatgaatagttcttactacaatTTTTGTCTAAAGAGTAATACT  
agagataaacataaaaaatgtagaggcaggttttagatgcaagttcaaggagcgaagggtggatgggtaggttatat  
agggatatagcacagagatatagcaaaagagatactttgagcaatgtttgtggaagcggattcgaatatttagta  
gctcgttacagtcgggtgcgttttggTTTTGAAAGTGCgtcttcagagcgctttggTTTTCAAAAGCGCTCTGAAGT  
cctatactttctagctagagaataggaacttcggaataggaactcaaaagcgtttccgaaaacgagcgctccgaaaa  
tgcaacgcgagctgcgcacatacagctcactgttcacgtcgcacctatatctgcgtgttgcctgtatatatatatcatg  
agaagaacggcatagtgcgtgtttatgctaaatgcgtacttatatgcgtctatttatgtaggatgaaaggtagtctagta  
cctctgtgatattatcccattccatgcggggatcgtatgcttccttcagcactacccttagctgttctatatgctcca  
ctcctcaattggattagtctcatcctcaatgctatcattcctttgatattggatcgatccgatgataagctgcaaacatg  
agaattgggtaataactgatataattaaattgaagctctaattgtgagtttagtatacatgcaatttataataacagTTTT  
tagTTTTGCTGCGCATcttctcaaatatgctccagcctgcttttctgtaacgttcaccctctaccttagcatccctcc  
ctttgcaaatagctccttccaacaataataatgctcagatcctgtagagaccacatcatccacggttctatactgttgacc  
caatgcgtctccctgtcatctaaacccacaccgggtgcataatcaaccaatcgtaaccttcatctctccaccatgt  
ctctttgagcaataaaagccgataacaaaatctttgctccttcgcaatgcaacagtacccttagtatattctccagtag  
atagggagcccttgcataaattctgtaacatcaaaaggcctctaggtcctttgttactcttctgccgctgcttca  
aacgctaacaatacctgggcccaccacaccgtgtcattcgtaatgtctgccattctgtattctgtatacaccgc  
agagtactgcaattgactgtattaccaatgtcagcaatttctgtcttcgaagagtaaaaaattgacttggcggataa  
tgcttttagcggcctaactgtgccctccatggaaaaatcagtcagatccacatgtgttttagtaacaaaatttggg  
acctaattgctcaactaactccagtaattccttgggtgacgaacatccaatgaagcacacaagtttgttcttctg  
catgatataaatagcttggcagcaacaggactaggtagtagcagcacgttccttatatgtagcttgcacatgatt  
atcttcgttctcgtatgttttgtctgtcagttgggttaagaatactgggcaattcattgttcttcaactacatatgc  
gtatatataccaatctaagtctgtgctcctccttcttcttcttctgttcggagattaccgaatcaaaaaattcaagga  
aacggaatcaaaaaagaataaaaaaaatgatgaattgaaaagctaattctgaagacgaaaggcctcgtg  
atacgcctattttataggttaattgcatgataataatggttcttagacgtcaggtggcactttcggggaaatgtg  
ggaaccctatttgttttttctaaatacattcaaatatgtatccgctcatgagacaataaccctgataaatgctcaata  
atattgaaaaggaagagtatgattcaacatttccgtgcgccctattcccttttgcggcattttgccttctctgttt  
tctcaccagaaaacgctggtgaaagtaaaagatgctgaagatcagttgggtgcacgagtggttacatcgaactg  
gatctcaacagcggtaagatccttgagagtttcgccccgaagaacgtttccaatgatgagcactttaaagtctgct  
atgtggcgcggtattatcccgtattgacgccgggcaagagcaactcggcgcgcacatacattctcagaatgactt  
ggttgagtactcaccagtcacagaaaagcatcttacggatggcatgacagtaagagaattatgacgtgctgcataa  
ccatgagtataactgcggccaacttacttctgacaacgatcggaggaccgaaggagctaaccgctttttgcac  
aacatgggggatcatgtaactgccttgatcgttgggaaccggagctgaatgaagccatacacaacgacgagcgtg  
acaccacgatgcctgtagcaatggcaacaacgttgcgcaactattaactggcgaactacttactctagctcccggc  
aacaattaatagactggatggaggcggataaagtgcaggaccacttctgcgctcggccctccggctggctggtt  
attgctgataaatctggagccggtgagcgtgggtctcgcggatcattgcagcactggggccagatggtgagccctc  
ccgtatcgtatctacacgacggggagtcaggcaactatggatgaacgaaatagacagatcgtgagataggt  
gcctcactgattaagcattgtaactgtcagaccaagttactcatatatactttagattgatttaaaacttattttaatta  
aaaggatctaggtgaagatccttttgataatcctgacaaaaatccctaacgtgagtttctccactgagcgtcag  
acccgtagaaaagatcaaggatcttctgagatcctttttctgcgcgtaatctgctgcttcaacaaaaaacca

ccgctaccagcgggtggttgttccgggatcaagagctaccaactctttccgaaggtaactggcttcagcagagcg  
cagatacacaactgttcttctagtgtagccgtagtagccaccactcaagaactctgtagcaccgcctacatacc  
tcgctctgctaactctgttaccagtggtgctgccagtgggcgataagtcgtgtcttaccgggttgactcaagacgata  
gttaccggataagggcgagcggctgggctgaacggggggtcgtgcacacagcccagcttgagcgaacgacct  
acaccgaactgagatacctacagcgtgagctatgagaaagcgccacgctcccgaaggagaaaggcggacag  
gtatccggtaagcggcagggctggaacaggagagcgcacgaggagctccaggggaaacgcctggtatcttt  
atagtcctgtcgggttcgccacctctgacttgagcgtcgattttgtgatgctcgtcagggggcggagcctatggaa  
aaacgccagcaacgcggccttttacggctcctggccttttctggccttttctcatatgttcttctgcgtatccct  
gattctgtggataaccgtattaccgctttgagtgagctgataccgctcggcgagccgaacgaccgagcgcagcg  
agtcaagtgagcaggaagcgggaagagcggcaatacgaacccgctctccccgcggtggccgattcattaat  
gcagctggcacgacaggttcccgactggaaagcgggagtgagcgaacgaattaatgtgagttagctactca  
ttaggcaccccaggtttactttatgcttccggctcgtatgtgtggaattgtgagcggataacaattcacacag  
gaaacagctatgacatgattacgccaagcttctgaaacggagaaacataaacaggcattgctgggatcacccat  
acatcactctgtttgcctgacctttccgtaattgaaaacaaaccggctcgaagcggagatccggcgataatta  
ccgcagaataaacccatacacgagacgtagaacagccgcacatggccggagaaactcctgcgagaattcgtga  
aactcgcgcgattgcatctgtatttctaatacggcactccaggcctcgategagaccgtttatccattgctttttgtt  
gtcttttccctcgttcacagaaagtctgaagaagctatagtagaactatgagctttttgttctgtttccttttttttt  
acctctgtgaaattgttactctcacactctttagtctgtttgtttgtttattccaattatgaccggtgacgaaacgtg  
gtcgatggtgggtaccgcttatgctcccctcattagttcgtttatataaaaaggccaaatattgtatttttcaaatgct  
ctatcattatcgttaacatctaatcttcttaattttctctttcttataaacaccaatagtgaaaatctttttctctat  
atctacaaaaacttttttctatcaacctcgttgataaattttctttaacaatcgttaataattaattaattgaaaataac  
catttttctcttttatacacacattcaaaagaaagaaaaaaatataccccagcctcga

### 10.2.1.1. Mapa del plásmido pDR195.



### 10.2.2. Plásmido pDONR-HYG-LYASE.

- **Secuencia:**

```

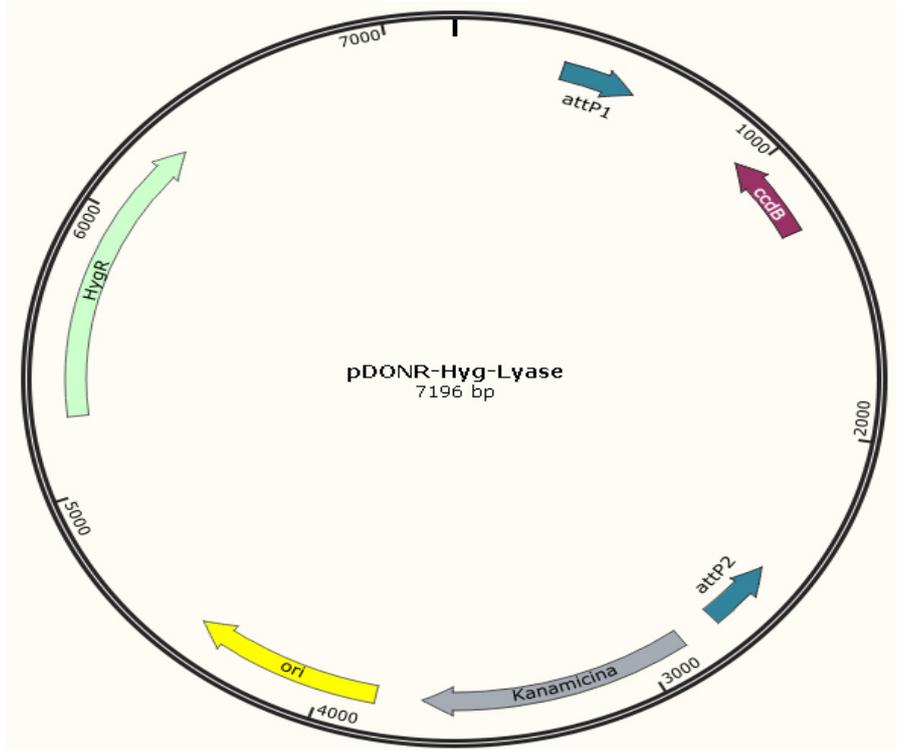
cttctcggttatcccctgattctgtggataaccgattaccgctagccaggaagagttgtagaacgaaaaaggc
catcegtcaggatggccttctgcttagttgatgcctggcagttatggcgggcgtcctgccgccacctccggggc
ggtgctcacaacgtcaaatccgctcccggcggattgtcctactcaggagagcgttcaccgacaaacaacagataa
aacgaaaggcccagcttccgactgagccttctgtttatttgatgcctggcagttccctactctcgcgtaacgctagc
atggatctcgggccccaaataatgattttatttgactgatagtgacctgttcggtgcaacaaattgatgagcaatgcttt
ttataatgccactttgtacaaaaagctgaacgagaacgtaaatgatataaatcaatatattaatagattttgc
ataaaaaacagactacataactgtaaacacacatatccagtcactatgaatcaactacttagatggtattagtgac
ctgtagtcgaccgacagccttccaatgttcttgggtgatgctgccaacttagtcgaccgacagccttccaatgtt
ttctcaacggaatcgtcgatccagcctactcgtattgtcctcaatgccgtattaaatcataaaaagaaataagaaaa
agaggtgcgagcctctttttgtgtgacaaaataaaaacatctacctattcatatacgctagtgatagctctgaaatc
atctgcatcaagaacaattcacaactcttatactttctcttacaagtcgttcggcttcatctggatttcagcctctatact
    
```

tactaaacgtgataaagtttctgtaatttctactgtatcgacctgcagactggctgtgtataaggagcctgacatttatat  
tccccagaacatcaggtaatggcgttttgatgcttttcgcggtggctgagatcagccacttctccccgataacgg  
agaccggcacactggccatcgggtggcatcatgcgccagcttccatccccgatatgcaccaccgggtaaagtca  
cgggagactttatctgacagcagacgtgcactggccagggggatccatccgtcggccggcgtgtcaataat  
cactctgtacatccaaaacagacgataacggctctctctttataggtgtaaaccttaaaactgacttccaccagtcct  
gttctctcagcaaaagagccgttcattcaataaacggggcgacctcagccatccctcctgatttccgcttccagc  
gttcggcacgcagacgacgggcttcattctgcatggtgtgcttaccagaccggagatattgacatcatatgccttg  
agcaactgatagctgctgctgcaactgctactgtaatacgtcttcatagcacacctcttttgacatactcgggtat  
acatatcagtatatacttataccgcaaaaatcagcgcgcaatacgcatactgttatctggcttttagtaagccggatc  
cacgcgattacccccgccctgccactatcgcagtactgttaattcattaagcattctgccgacatggaagccat  
cacagacggcatgatgaacctgaatcggcagcggcatcagcacctgtcgccttgcgtataatattgccatgggta  
aaacggggggaagaagttgtccatattggccacgtttaaataaaaactgggaaactcaccagggattggctga  
gacgaaaaacatatttcaataaaccttttagggaaataggccaggtttaccgtaaacgccacatcttgcgaatat  
atgtgtagaaactgccggaatcgtcgtggtattcactccagagcgcgatgaaaacgtttagttgctcatggaaaacg  
gtgtaacaagggtgaacactatccatatacaccagtcaccgtcttccattgccatacgggaattccggatgagcattca  
tcaggcgggcaagaatgtgaataaaggccggataaaaactgtgcttattttctttacggctttaaaggccgtaata  
tccagctgaacggctgtggtataggtacattgagcaactgactgaaatgcctcaaaaatgttctttacgatgccattggg  
atatacaacgggtgtatataccagtattttttctccattttagcttcccttagctcctgaaaatctcgataactcaaaaaata  
cgccccgtagtgatcttatttcattatgggtaaagttggaacctttacgtgccgatcaacgtctcattttcgccaaaagt  
tggcccagggttccccggatcaacaggacaccaggttatttattctgcgaagtgatcttccgtcacaggtattat  
tcggcgcaaaagtcgctgggtgatgctgccaacttagtcgactacaggtcactaataccatctaagtagttgattcata  
gtgactggatattgtgttttacagtattatgtagtctgtttttatgcaaaaatctaatttaatatattgatatttatcattta  
cgtttctcgttcagcttctgtacaaagttggcattataagaaagcattgcttatcaattgttgaacgaacaggtcact  
atcagtcaaaaataaaatcattatttccatccagctgcagctctggcccgtgtctcaaaaatctctgatgttacattgcaca  
agataaaaatatacatcatgaacaataaaactgtctgcttacataaacagtaatacaaggggtgttatgagccatattc  
aacgggaaacgtcagggccgcgattaaattccaacatggatgctgatttatatgggtataaatgggctcgcgataatg  
tcgggcaatcaggtcgcacaatctatcgttgtatgggaagcccgatgcgccagagttgttctgaaacatggcaaaa  
ggtagcgttccaatgatgttacagatgagatggcagactaaactggctgacggaatttatgcctctccgaccatca  
agcattttatccgtactcctgatgatgcatggttactcaccactgcgatccccggaaaaacagcattccaggtattaga  
agaatatcctgattcaggtgaaaatattgtgatgcgctggcaggttctcctgcgccggttgcattcctgattctgttaa  
ttgtcctttaacagcgatecgtatttctcgtcgtcagggcgaatcacgaatgaataacggtttggtgatgagagtg  
atttgatgacgagcgtaatggctggcctgttgaacaagctggaagaaatgcataaactttgccattctcaccgga  
ttcagtcgctactcatggtgatttctcactgataaccttattttgacgaggggaaattaataggttgattgatgttgac  
gagtcggaatcgcagaccgataccaggatcttgcacatcctatggaactgcctcgggtgagttttccttcattacagaa  
acggcttttcaaaaatattggtattgataatcctgatatgaataaattgcagtttcatttgatgcgctggcctttgtcact  
cgtgatgatttttaatacagaattggttaattggtgtaaacactggcagagcattacgctgactgacgggacggcgca  
agctcatgacaaaaatccctaacgtgagtttctgtccactgagcgtcagaccccgtagaaaagatcaaaggatctt  
cttgagatcctttttctgcgcgtaactctgctgcttgcacaacaaaaaacaccgctaccagcgggtgtttgttccg  
gatcaagagctaccaactcttttccgaagtaactggcttcagcagagcgcagataccaataactgtccttctagtgt

agccgtagttagccaccacttcaagaactctgtagcaccgcctacatacctcgtctgctaactctgtfaccagtgg  
ctgctgccagtgggcagataagtcgtgtcttaccgggtggactcaagacgatagttaccggataaggcgcagcggtc  
gggctgaacgggggggttcgtgcacacagcccagcttggagcgaacgacctacaccgaactgagatacctacagc  
gtgagctatgagaaagcggcagcctcccgaaggggagaaaggcggacaggtatccggtaagcggcagggctgg  
aacaggagagcgcacgagggagcttccagggggaaacgcctgtatctttatagctctgctgggttcgccacctct  
gacttgagcgtcgatcttctgtatgctcgtcagggggggcggagcctatggaaaaacgccagcaacgcggcctttta  
cggttctcggccttttctgctgacctttgctcacatgtagatctcgagtggcggcagatgtgagtcgtgtctacaaaac  
gtgaatcgacacgcgcagggcggaacaaaaaaacccccaccccgctgcaagttgacaaatcaacacatttgtt  
ccaagttcaatcgggaaaatcaaaaattagggccagatcagcgtcaggaatggaatcgggtaacagaggtc  
gcaaaatcgtctagaaaatggaagaagaacgtggaactaccagcgagttctgcaacttcaaaaaaaatctgg  
gcacgatgaaaagttgagtaacgtgacgctcacaatggcgtggctaaagggaagcgcagacaatcgaaaattgtt  
ctctcgggcaccacaaagctgtttagtcgctgaagaacaattccaactgattccgcccttctctattgctcagcc  
ttgtacctaaagctgccgagtaacgtcactcaacctctctttcagactgctttgctccgcgaatactttctctatgcgt  
caagaaaatgacacagcacaccaagctctgcaactttctcctaactctgacgcgaaatgtgagccatttctctcgc  
ctgcaatggcaatgcgtctgtcggcgatgagaatcacgatgcggaatgggtggctggaagttcatagagatgctg  
agttgttgagcgcacatggtacataagcatgagctgtcctgattttccacctcccgtctttcatcaactttctcgtct  
gacctttccggtgccagatcccggggggcaatgagatatgaaaagcctgaaactaccgcgacgtctgctgagaa  
gtttctgatcgaaggttcgacagcgtctccgacctgatgcagctctcggagggcgaagaatctcgtctttcagctt  
cgatgtaggagggcgtggatgtctcgcgggtaaatagctgcgccgatggtttctacaaagatcgttatgtttatcgg  
cactttgcatcggccgcgtcccattccggaagtgttgacattggggaattcagcgcagagcctgacctattgcatc  
tcccgcgtgcacaggggtgcacgttgcaagacctgcctgaaaccgaactgcccgtgttctgcagccggtcgagg  
aggccatggatgcgatcgtcgcggccgatcttagccagacgagcgggttcggccattcggaccgcaaggaatc  
ggtcaatacactacatggcgtgattcatatgcgcgattgctgatccccatgtgatcactggcaactgtgatggacg  
acaccgtcagtcgtccgtcgcgcaggctctcgtatgagctgatgctttggccgaggactgccccgaagtccggc  
acctgctgacgcggattcggctccaacaatgtcctgacggacaatggccgataacagcggcattgactggag  
cgaggcgatgttcggggattcccacaaatcagaggtcgaacatcttcttggaggccgtggttgcttctgtagc  
agcagacgcgctacttcgagcggagcatccggagcttgacagatcggcggctccgggcttatatgctccgc  
attggtcttgaccaactctatcagagcttggtgacggcaattcgtatgacgcttggcgcagggctgatgcgac  
gcaatcgtccgatccggagccgggactgtcgggctacacaaaatcggcgcagaagcggcggcgtctggaccg  
atggctgtgtagaagctcggcagatggaaccgacggccagcactcgtccgagggcaaggaatagagta  
gatgccgaccgggatctgggcagcaccacagacggaaactcaacagtcgtgagttaggtggtgatctgcatgct  
caaatcgtgaaacgtgaaatcacgaaaccacgaaatcgtgaaatagccatttgcgcgaaaatcactgaaatccg  
ccaaaccgacgcgacgcgagttgcgtgaagtattcgtgattcacattcacgattgacgattgtgagttggtcgcgac  
attcgctagccagaccaactcagaaacttttgaagagcgttgacggctgagccaactttctccctactctttgctt  
tcttccatcagctcattccttttaagtgttcatccggatcattagcactatatcatagtgaaactgcacaaccgggt  
cttcgtcgcgaaagcaacctccatcgtctgctccttgcagtgaaaccgccaccatgcagctacgcagtcgaag  
acctacacgtccagttcgtccattctggtcctacacattgtatccacgcaccaagtctgccaacgtggagtaagt  
aaccttttttctcgtcgcaggtcaacgtagatcacaggtgatccacactcttctacattttgacattacgcagtc  
gactttttacaggagagatgactacctcgtccgaatcttaccacctgcctctctccgacgtagagccgcagcttat

cgaagacgccactgaagcggtagacctcgctcgatgctgacggccgcttctctcgtcaccgcttccgaagatggctc  
 tgtacgcctctaccgacaccaccaatcgacgcggaaggcaaccagcatcaccaactgtgctcaatcgctgctg  
 cgccgcgaagcttggctgcaggtcgacggatctacatg

### 10.2.2.1. Mapa de pDONR-Hyg-Lyase.



### 10.2.3. Plásmido pDR195umZRT1.

- **Secuencia:**

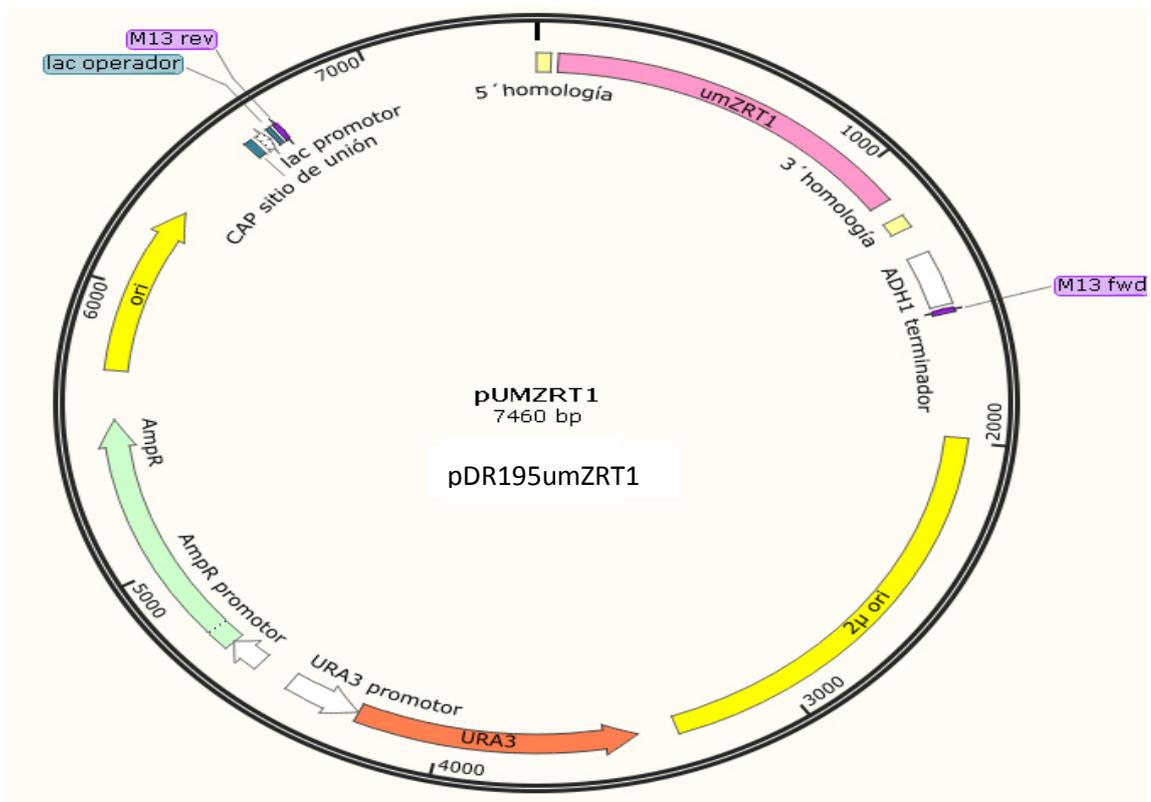
gaaagaaaaaaaaatatacccagcctcgaccagcctcgagATGGCTGACGAAATTCAGTGC  
 ACTGGTCCCGTCGACAACGGCAGTGGATCGATCGGTCTGCGTATCGGT  
 GCCATCTTTATCATTGGGCATCGTCCACGGCCTTGACCCTTTTCCCTA  
 TCGTTACACGTCGTATTCCGCGACTCTCCATCAACCGCGAAGCTTTCG  
 ATTTTGCCAAATACTTCGGTTCTGGTGTCAATTATCGCCACTGCTTTCAT  
 CCATCTCTTAGCACCTGCCGCGAGTGATGAGGAGCTCGGATCGCCATG  
 TCTTAGCAGCGATTTCCAGAACTATCCCTTCGCTTTTGCATTTGCCATG  
 ATCGCCATGTTTCGCTGTTTTTGTCTGTCGAGGTGCTCGCCTTCCGGGTTG  
 GAAGCCAATACGCCAATAAGCTCGCCTACGACTCCCATGCTGGTGGT  
 CACCATCACGCCATGGAGCATGGCGGCAACCCCAACCTCGCTCAAGA  
 AGAACAGCACAAACCACAACGCAATCAAGTCAGTCTCTTCCGGACGACG  
 TTGAAAACGCTGCTGCTGTTTCTGGTGCCGACTCAGCCGCCGAGGCCA

AAATGGTCGCTGACTCGAGTTCAACCGCTTCTACCAAACCTTGATCTCA  
CTACCCAAGCATCTGAAATCCTCGGCGTCATGATCCTAGAGTTTGGCG  
TCGTGTTCCATTCGATCATCATCGGTATCACCTCGGCACCACCTCCG  
ACTTTACCGTCCTCTTTATCGTCATATTTTCCACCAAATGTTTCGAGGG  
TCTCGGTCTGGGTACCCGTCTCGCATTCTTCTCTCGGCATGAAGTC  
GTGGATTCCAACACTGGGAGCTATCCTCTACGGTCTCGTCACTCCCAT  
CGGTATCGCTATTGGTCTCGGTGTACGTCACACTTACAACGGCGACTC  
GGCCACCGCCGCCTACGTCACCGGTATCTTTGACTCGGTCTCGGCGGG  
TATCCTCCTCTACACGGGTACTGTTGAACTGCTTGCACACGAGTTCAT  
CTTCAACGACAAGATGCGCAACGCGCCTCTCAAGAAGGTTGTCATCA  
GCATTCTCGAGATGCTCACCGGCGCTGGTCTCATGGCGCTGCTCGGAC  
GATGGGCATGAGCGTTTTCTTTCTGTCTTTCTGCTTCGCCCTCGCTTCG  
GACCTCGATTCTTTCTCTCTACAGggatccagcttggacttctgccagaggttggtaa  
gtctcaatcaaggtgtcggctgtctacctgccagaaatttacgaaaagatggaaaagggtcaaatcgttggtaga  
tacgttgtgacacttctaaataagcgaatttctatgatttatgattttattataaataagttataaaaaaataagtgtat  
acaaatftaaagtgactcttaggtttaaaacgaaattcttattcttgagtaactttctctgtaggtcaggttcttctca  
ggtatagcatgaggtcgtcttattgaccacacctaccggcatgccaattcactggccgtcgtttacaacgtcgtg  
actgggaaaacctggcgttaccacacttaategccttgacgacatcccccttccagctggcgtaatagcgaa  
gaggccccaccgatcgccttcccaacagttgcgcagcctgaatggcgaatggcgcctgatgcggtattttctct  
tacgcatctgtgcggtatttcacaccgcataatcggatcgtactgttaccatcattgaatftgaaatccgaacctgg  
gagttttccctgaaacagatagatattgaaactgtataataatataatagctagcgtttacggaagacaatgatgat  
ttcggttcctggagaaactattgcatctattgcataggtaatcttgacgtcgcacccccgggtcattttctgcgttccat  
cttgacactcaatagcatatctttgtaacgaagcatctgtgctcattttgtagaacaanaatgcaacgcgagagcgct  
aatftttcaacaanaaatctgagctgcattttacagaacagaaatgcaacgcgaaagcgctattttaccaacgaaga  
atctgtgctcattttgtaaaacaaaatgcaacgcgagagcgctaatftttcaacaanaaatctgagctgcattttta  
cagaacagaaatgcaacgcgagagcgctattttaccaacaanaaatctatacttctttttgttctacaaaatgcatcc  
cgagagcgctatttttaacaanaagcatcttagacttttttctctttgtgcgctctataatgcagtctcttgataactttt  
tgcactgtaggtccgtaaggttagaagaaggctactttgggtgtctattttcttccataaaaaagcctgactccactt  
cccgcgttactgattactagcgaagctgcgggtgcatttttcaagataaaggcatccccgattatattctataccgat  
gtggattgcgatactttgtgaacagaaagtgatagcgttgatgattcttcattgtcagaaaattatgaacggttctct  
atfttctctataactacgtataggaatgtttacatttctgattgttttgattcactctatgaatagttctactacaatftt  
ttgtctaaagagtaatactagagataaacataaaaaatgtagaggtcagtttagatgcaagtcaaggagcgaaag  
gtggatgggttaggttatataggatatagcacagagatataagcaaagagatactttgagcaatgtttgtggaagc  
ggtattcgaatatttagtagctcgttacagtccgggtgcgtttttggtttttgaaagtgcgcttcagagcgcttttggtt  
tcaaaagcgctcgaagtctatactttctagctagagaataggaacttcggaataggaacttcaaaagcgtttccgaa  
aacgagcgcttccgaaaatgcaacgcgagctgcgcacatacagctcactgttcacgtcgcacctatatctgcgtgtt  
gcctgtatataatatacatgagaagaacggcatagtgcgtgtttatgcttaaatgcgtacttatatgcgtctatttatga  
ggatgaaaggtagctagctacctctgtgatattatcccattccatgcgggggtatcgtatgcttctcagcactaccctt  
tagctgttctatatctgccactcctcaattggattagctctcatctcaatgctatcatttctttgatattggatcgtatccg

atgataagctgtcaaacatgagaattgggtaataactgatataattaaattgaagctctaatttgtgagtttagtatacatg  
catttactataatacagtttttagtttctggccgcactcttcaaatatgcttcccagcctgcttttctgtaacgttcacc  
ctctaccttagcatcccttcccttggcaaatagctcttccaacaataaatgacagatcctgtagagaccacatc  
cacggttctatactgttgacccaatgcgtctcccttgcactctaaaccacaccgggtgcataatcaaccaatcgtaac  
cttcatctctccaccatgtctcttggagcaataaagccgataacaaaatcttgcgtcttcgcaatgtaacagtac  
ccttagtatattctccagtagataggagcccttgcacgacaattctgtaacatcaaaaggcctctaggttcccttgtta  
cttcttctgccgctgcttcaaacgctaacaatcctgggcccaccacaccgtgcatcgaatgctgccattct  
gctattctgtatacaccgcagagtactgcaattgactgtattaccaatgacagcaaatcttctgcttcgaagagtaa  
aaattgacttggcggataatgccttagcggcttaactgtgccctccatggaaaaatcagcaagatatccacatgtgt  
tttagtaacaaatttgggacctaatgcttcaactaactccagtaattccttgggtgacgaacatccaatgaagcaca  
caagttgttcttctgcatgatattaatagcttggcagcaacaggactaggatgagtagcagcacgttccctata  
ttagcttgcacatgattatcttctgttctgcatgttttgtctgtgcagttgggtaagaactgggcaattcatggt  
tctcaacactacatagcgtatataccaatctaagtctgtgctccttctcttcttcttctgctcggagattaccga  
atcaaaaaatccaaggaaccgaaatcaaaaaaagaataaaaaaaatgatgaattgaaaagctaattctttaa  
gacgaaaggcctcgtgatacgcctatttataggtaatgcatgataataatggttcttagacgtcaggtggcactt  
ttcggggaaatgtgcgcggaaccctatgtttattttcaatacattcaaatatgatatccgctcatgagacaataacc  
ctgataaatgctcaataatattgaaaaggaagagtagatattcaacattccgtgctgcccttattccctttttgcg  
gcatttgccttctgttttctcaccagaaacgctggtgaaagtaaaagatgctgaagatcagttgggtgcacgag  
tgggttacatgaactggatcacaacgcgtaagatcctgagagtttcccccgaagaacgtttccaatgatgag  
cactttaaagtctgctatgtggcgcggtattatcccgtattgacgccgggcaagagcaactcggctgccgcataca  
ctattctcagaatgactggtgagtagtaccagtcacagaaaagcatcttacggatggcatgacagtaagagaatta  
tgcagtgtgccataaccatgagtgataacactgcggccaacttctgacaacgatcggaggaccgaaggagc  
taaccgctttttgacaacatgggggatcatgtaactcgccttgcctggttgggaaccggagctgaatgaagccatac  
caaacgacgagcgtgacaccacgatgcctgtgcaatggcaacaacgttgcgcaactattaactggcgaactact  
tactctagctcccggcaacaattaatagactggatggaggcggataaagttgcaggaccacttctgcctcggccc  
ttccggctggctggttattgctgataaatctggagccggtagcgtgggtctcgcggatcattgcagcactggggc  
cagatgtaagccctcccgtatcgtatctacacgacgggagtcaggcaactatggatgaacgaaatagaca  
gatcgtgagataggtgcctcactgattaagcattgtaactgtcagaccaagttactcatatatactttagattgatta  
aaacttcaattttaaaaggatctaggtgaagatccttttgataatctcatgacaaaaacccttaactgagttttc  
gttccactgagcgtcagaccccgtagaaaagatcaaggatcttctttagatcctttttctgcgcgtaactgctgctt  
gcaacaaaaaaaccaccgctaccagcgggtggtttgttggcgatcaagagctaccaactcttttccgaagtaac  
tgcttcagcagagcgcagataccaataactgttcttctagttagccgtagtttagccaccacttcaagaactctgta  
gcaccgctacatacctcgtctgtaactctgttaccagtggctgctgccagtggcgataagtcgtgttaccgggt  
tggactcaagacgatagttaccggataaggcgcagcggctgggctgaacgggggggtcgtgcacacagcccagc  
ttggagcgaacgacctacaccgaactgagatacctacagcgtgagctatgagaaagcggcaccgctcccgaaggg  
agaaaggcggacaggtatccgtaagcggcagggcggaaacaggagagcgcacgagggaactccagggggg  
aaacgcctggtatcttatagtcctgtcgggttccaccctctgacttgagcgtcgattttgtgatgctcgcagggg  
ggcggagcctatggaaaaacgccagcaacgcggccttttacgggtctggttctggttctggttctgctcacatggt  
cttctctcgttatccctgattctgtgataaccgtattaccgctttgagtgagctgataccgctcggcgcagccgaa

cgaccgagcgcagcgagtcagtgagcggaggaagcggaaagcggccaatacgc aaaccgcctctccccgcgc  
gttggccgattcattaatgcagctggcacgacaggttcccgactggaaagcgggcagtgagcgaacgcaattaa  
tgtgagttagctcactcattaggcaccacaggcttacactttatgcttccggctcgtatgttggtggaattgtgagcgg  
ataacaatttcacacaggaacagctatgacatgattacgccaagcttctgaaacggagaaacataaacaggcat  
tgetgggatcaccatacatcactctgtttgcctgacctttccggtaatttgaaaacaaacccggctcgaagcggga  
gatccggcgataattaccgcagaaataaacccatacacgagacgtagaaccagccgcacatggccggagaaactc  
ctgcgagaatttcgtaaactcgcgcgcattgcatctgtatttccaatgcggcacttccaggcctcgatecagaccggtt  
atccattgctttttgtgtcttttccctcgttcacagaaagtctgaagaagctatagtagaactatgagctttttgtttctg  
tttctcttttttttttacctctgtggaaattgttactctcacactcttagttcgtttgtttgtttattccaattatgaccg  
gtgacgaaacgtggtcgtatggtgggtaccgcttatgctcccctccattagtttcgattatataaaaaggccaaatattgt  
attattttcaaatgtcctatcattatcgtctaactctaatttctttaaatttttcttttcttataacaccaatagtgaaa  
atcttttttctctatatactacaaaaacttttttctatcaacctcgttgataaatttttctttaaacaatcgttaataatta  
attgaaaataaccatttttctcttttatacacacattcaaaa

### 10.2.3.1. Mapa de plásmido pDR195umZRT1.



#### 10.2.4. pDR195umZRT2.

gaaagaaaaaaaaatataccccagcctcgaccagcctcgagATGTTGGGGATCAATGTTAAGAG  
CAAGCCAGCGAAAGCAGCCGCTCTGCTGCTTCTCGCTGGAGCACCGCTTG  
TAGCCTCGCAATCGATCACCACCGCCGTCACCGTGAATGGCACTCCGACT  
ACCACGGTGATTTTCGCCATCTCCCACGGGTCGAGGCTACTGCGAATTCTT  
CATCGACCACTGGGACTGTGATCCGACGCGTTCTGAGGGCGGCGTCTGGCC  
CAAGTGGTGCATCTGCGTCTGCGCCGAGTATCCAGCCTTCGCCGGTGGGT  
CAGAGCTGCACGTTGCATGGCGATCACTACCACTGCGATGGTCCCTACTAC  
AGCAACCGCGGGCGGACGCGGCTGCACAGGCCAGCCCTACCGGACAGGGC  
GAGTGTGTTTTCCACATCAACCACTGGGATTGCGAAGGCGGAGACCACTC  
AGACCACGACCACTCAGGCCACGACCATTCGGGACATTCGCACGCCGGC  
CATTCGCACGCCGGTCATAGCCACGGACCCTCGGAACTGTACGGCTGCGG  
TCTGGCGCCGCTCGAAGATTACAATCTGCCACTTCACATTGGCACAGTCT  
TTATTCTGCTCGTCTCGTCCGGCTATTGGTGCGTTCCTTCCAATCCTGGTCT  
ACACGGCAGGTGGTGCAACCTCGCAGAACAAAAGAGGCCGATGGGCAG  
ACGAGGTGTTCTTCATTTGCCGACACTTTGGTACTGGTGTGCTAATCAGT  
ACTGCTTTTGTGCACTTGCTGAGCCACGCGATGATGTACTACTCGAACGA  
GTGTATTGGAGAGCTCAAGTACGAAGCTACTGCACCCGGCTATCGCGATG  
GGTGCCGTGTGGCTGGTGTTCATTGTGCGACTTCTTCCCTGCTTCGTGCGTTG  
AGGAAGAAGAGTTCGCAGCAGATGCTACAGGCCACACGAGAGCCACCACG  
ATGTGCACGGCGTCACGAAACGCGAATCGAGCTCGACACTTGATCGCAC  
CCACTCGCCTGCCACGGAAGAGGATGCAGCAACCGGAATGTACGGCGGT  
CTCACCTACGCCAAGCCAAAGTCGCCGAATGGGACGTGTTTCGCCGTCGA  
AGCAGGTATCATCTTCCACTCGATCCTCATTGGCGTCACACTCGGCGTCG  
CCACAGGTTCCGGCTTCGTAGCGCTGCTCATCGCCATTCTCTTCCACCAGC  
TCTTCGAAGGTCTCGCTCTCGGCTCGCGTCTCTCCCTGCTAAGGTGGAAG  
AGCACCGCGTACAAGATGCTCATGGCCTCCGCGTTCGTCCCTTACCACCCC  
GATCGGCGTAGCTATCGGTATCGGTGTCAGGAAGAGCTTCAACGGAAC  
AGCTCGGGTACGCTGATCACTTTGGGAACGTTCCACGCTCTCAGCGCCGG  
TATCCTGCTCTACACGGCGCTCGTCGAACTGCTCAGTGGTGACTTCATTC  
ACAACAGGCAGATGCAGAAGAGCTCCTTGATCAGAGCCATCGCTGCTGT  
AGCCGCGTTGACCGTAGGTATCATGGCTATGTCCGTGCTCGCTCTGTGGG  
CCTAAGGTCTGGCATAAGCAACCggatccagcttggacttctcgccagaggttggtaagtcca  
atcaaggttgctgcttacctgccagaaattacgaaaagatgaaaaagggtcaaatcgttgtagatacgttgta  
cacttctaaataagcgaatttctatgatttatgattttattataaataagttataaaaaataagtgtatacaattttaaagt  
actcttaggttttaaacgaaattctattcttgagtaactttcctgtaggtcaggttcttctcaggtatagcatgaggtcgc  
tcttattgaccacacctaccggcatgccaatcactggcctgcttttacaacgtcgtgactgggaaaacctggcgttac  
ccaacttaategccttgacacatcccccttcgccagctggcgttaatagcgaagaggccccgaccgatgccttccc  
aacagttgcgcagcctgaatggcgaatggcgcctgatgcggtatcttctcttacgcatctgtgcggtatcttcaaccgcata

atcggatcgtacttggtaccatcattgaatfttgaacatccgaacctgggagtttccctgaaacagatagtatattgaaacct  
gtataataatataatagctagcgtttacggaagacaatgatgtatttcgggtcctggagaaactattgcatctattgcataggt  
aatcttgacgctgcacccccggttcattttctgcgtttccatctgcacttcaatagcatatctttgtaacgaagcatctgtgct  
tcattttgtagaacaaaatgcaacgcgagagcgtctaatfttcaacaagaatctgagctgcattttacagaacagaaat  
gcaacgcgaaagcgtattttaccaacgaagaatctgtgcttattttgtaaaacaaaatgcaacgcgagagcgtctaat  
ttcaacaagaatctgagctgcattttacagaacagaaatgcaacgcgagagcgtattttaccaacaagaatctatac  
ttctttttgtctacaaaatgcatcccgagagcgtatttttaacaaagcatcttagattactttttctcctttgtgcgctcta  
taatgcagctcttgataacttttgcactgtaggtccgtaaggttagaagaaggctactttgggtctattttctctccataaa  
aaaagcctgactccactcccgcgttactgattactagcgaagctgcgggtgcatttttcaagataaaggcatccccgatt  
atattctataccgatgtggattgcgcatactttgtgaacagaaagtgatagcgttgatgattctcattggctcagaaaattatga  
acggtttctctattttgtctctataactacgtataggaatgtttacatttctgattgtttcgttactctatgaatagttctact  
acaatftttgtctaaagagtaataactagagataaacataaaaaatgtagaggtcagtttagatgcaagttcaaggagcga  
aaggtggatgggtaggttatatagggatagcacagagatatagcaaaagatacttttagcaatgtttgtggaagcgc  
gtattcgaatatttttagtagctcgttacagtcgggtgcgtttttggtttttgaaagtgcgtcttcagagcgttttggtttcaa  
agcgtctgaagttctatactttctagcttagagaataggaacttcggaataggaacttcaaagcgtttccgaaaacgagcg  
ctccgaaaatgcaacgcgagctgcgcacatacagctcactgttcacgtcgcacctatctgcgtgttgcctgtatataat  
atacatgagaagaacggcatagtcgtgtttatgcttaaatgcgtacttatatgcgtctatttatgtaggatgaaaggtagtct  
agtacctctgtgatattatcccattccatgcgggtatcgtatgcttctcagcactaccttttagctgttctatagctgcca  
ctctcaattggattagctcctcctcaatgctatcatttctttgatattggatcgcgatgataagctgtcaaacatgaga  
attgggtaataactgatataaattgaagctctaattgtgagtttagtatacatgcatttactataatcacgtttttagtttg  
ctggccgatcttctcaaatatgcttcccagcctgttttctgtaacgttcacctctaccttagcactcccttccctttgcaata  
gtcctcttcaacaataataatgtagatcctgtagagaccacatcaccacggttctatactgttgaccaatgcgtctcct  
tgtcatctaaaccacaccgggtgcataatcaaccaatcgaaccttcatcttccacctatgctctttgagcaataaagc  
cgataacaaaatctttgctcttcgcaatgtcaacagtagccttagtatatttccagtagatagggagcccttgcagaca  
attctgtaacatcaaaaggcctctaggttctttgttacttcttctgccgctgttcaaacgctacaataactgggcca  
ccacaccgtgtgcatcgtatgtctgcccattctgctattctgtatacaccgcagagtagtcaatttactgtattaccaat  
gtcagcaaatfttctgtcttgaagagtaaaaaattgacttggcgataatgcttttagcggcttaactgtgcctccatgga  
aaaatcagtcagatccacatgtgttttagtaacaaaatfttgggacctaatgcttcaactaactccagtaattccttgggtg  
gtacgaacatccaatgaagcacacaagttgtttgctttcgtgcagatgataaataagcttggcagcaacaggactaggatg  
agtagcagcagttccttatatgtagcttgcacatgattatcttctgttctcgtatggtttgtctgtgcagttgggttaagaat  
actgggcaatttcatgttcttcaactacatatgcgtatataaccaatctaagtctgtgctccttctcgttcttctctgttc  
ggagattaccgaatcaaaaaatfttcaaggaaaccgaaatcaaaaaaaagaataaaaaaaatgatgaattgaaaagct  
aattctgaagacgaaagggcctcgtgatacgcctattttataggttaatgcatgataataatggtttcttagacgtcaggtg  
gcactttcggggaaatgtgcgcggaaccctattgtttatttttaataacattcaaatatgatccgctcatgagacaataa  
ccctgataaatgcttcaataatattgaaaaggaagagtagatgattcaacatttccgtgctgcccttattccctttttgcggc  
atfttgccttctgttttctcaccagaaacgctgggtgaaagtaaaagatgctgaagatcagttgggtgcacaggtgggtt  
acatcgaactggatctcaacagcggtaagatccttgagagtttcccccgaagaacgttttcaatgatgagcacttttaa  
gttctgtatgtggcgggtattatcccgtattgacggggcaaggaactcggctgccgcatacactattctcagaatg  
actgtgtgagtactaccagtcacagaaaagcatcttacggatggcatgacagtaagagaattatgcagtgctgccataa

ccatgagtataaactgcccacttacttctgacaacgatcggaggaccgaaggagctaaccgctttttgcacaaca  
tgggggatcatgtaactgccttgatcgttgggaaccggagctgaatgaagccataccaaacgacgagcgtgacaccac  
gatgcctgtagcaatggcaacaacgttgcgcaactattaactggcgaactacttactctagcttcccggcaacaattaata  
gactggatggaggcggataaagtgcaggaccacttctgcgctcggccctccggctggctggtttattgctgataaatctg  
gagccggtgagcgtgggtctcgcggtatcattgcagcactggggccagatggtgaagccctccgctatcgtatctac  
acgacggggagtcaggcaactatggatgaacgaaatagacagatcgtgagataggtgcctcactgattaagcattggta  
actgtcagaccaagtttactatatactttagattgatttaaaacttcattttaatttaaaaggatctaggtgaagatccttttg  
ataatctcatgacaaaatccctaacgtgagtttctgtccactgagcgtcagaccccgtagaaaagatcaaaggatcttct  
tgagatcctttttctgcgctaatctgctgcttgcacaacaaaaaccaccgctaccagcgggtggttggccgatcaa  
gagctaccaactcttttccgaaggaactggttcagcagagcgcagataccaaatactgttctctagttagccgtagtt  
aggccaccactcaagaactctgtgcaccgctacatactcgtctgtaacctgttaccagtggtgctgccagtggc  
gataagtcgtgttaccgggttgactcaagacgatagttaccggataaggcgcagcggctgggtgaacgggggggt  
cgtgcacacagcccacttggagcgaacgacctacaccgaactgagatacctacagcgtgagctatgaaaagcgcga  
cgctcccgaaggagaaaaggcggacaggtatccggaagcggcagggctcgaacaggagcgcacgaggggagc  
ttccagggggaacgcctggatctttatagctctgcgggttcgccacctctgactgagcgtcgattttgtgatgctcgtc  
agggggggcggagcctatggaaaaacgccagcaacgcggccttttacggtcctggccttttctggtcctttgtcacat  
gttttctctgcttatcccctgattctgtggataaccgtattaccgctttgagtgagctgataccgctcggcgcagccgaac  
gaccgagcgcagcagtgagtgagcgggaagcggaaagcgcaccaatacgaacccctcctcccgcgcttgg  
ccgattcattaatgcagctggcacgacaggttcccactggaaagcgggcagtgagcgaacgcaattaatgtgagtta  
gctcactcattagcaccaggctttacactttatgcttccggctcgtatggtgtggaattgtgagcggataacaattca  
cacaggaaacagctatgaccatgattacgccaagcttctgaaacggagaacataaacaggcattgctgggatcacc  
atacatcactctgtttgctgacctttccgtaattgaaaacaaaccggctcgaagcggagatccggcgataattacc  
gcagaaataaacccatacagacgtagaaccagccgcacatggccggagaaactcctgcgagaattcgtaaactcg  
cgcgattgcatctgtatttctaactgcgcaactccaggcctcagcagaccgtttatccattgctttttgttcttttccct  
cgttcacagaaagtctgaagaagctatagtagaactatgagcttttttctgttttcttttttttttacctctgtgaaatt  
gttactcactcctttagttcgtttgtttgtttattccaattatgaccggtgacgaaacgtggctgatggtgggtaccgc  
ttatgctcccctccattagttcgattatataaaaaggccaaatattgtatttttcaaatgtcctatcattatcgtctaacatctaa  
ttctctaaatttttcttttcttctataacaccaatagtgaatcttttttcttatactacaaaacttttttctatcaac  
ctcgttgataaatttttcttaacaatcgttaataattaattggaataaacatttttctcttttatacacacattcaaaa

### 10.2.4.1. Mapa de plásmido pDR195umZRT2.

