



**INSTITUTO POTOSINO DE INVESTIGACIÓN
CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA, A.C.**

POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOLOGIA MOLECULAR

**“Caracterización bioquímica, molecular y funcional de las mutantes
nulas del gen *UmRrm75* de *Ustilago maydis*”**

Tesis que presenta

M.C. Alma Laura Rodríguez Piña

Para obtener el grado de

Doctorado en Ciencias en Biología Molecular

Director de la Tesis:

Dr. Juan Francisco Jiménez Bremont

San Luis Potosí, S.L.P., Noviembre de 2020



Constancia de aprobación de la tesis

La tesis “**(Caracterización bioquímica, molecular y funcional de las mutantes nulas del gen *UmRrm75* de *Ustilago maydis*)**” presentada para obtener el Grado de Doctora en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por la **M.C. Alma Laura Rodríguez Piña** aprobada el **26 de noviembre del 2020** por los suscritos, designados por el Colegio de Profesores de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Dr. Juan Francisco Jiménez Bremont
Director de la tesis

Dr. Samuel Lara González
Miembro del Comité Tutorial

Dr. Martha Leticia Santos Martínez
Miembro del Comité Tutorial

Dr. Enrique Castaño de la Serna
Miembro del Comité Tutorial

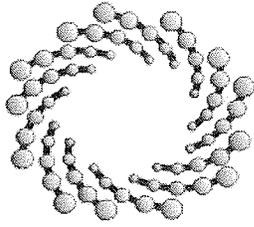


Créditos Institucionales

Esta tesis fue elaborada en el Laboratorio de Biología molecular de hongos y plantas de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., bajo la dirección del Dr. Juan Francisco Jiménez Bremont.

Durante la realización del trabajo el autor recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología con número de registro 265342, y del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C.

Durante la realización de la tesis el autor recibió apoyo del proyecto de Problemas Nacionales. Número de proyecto: 2015-01-414. "Identificación y caracterización de genes involucrados en la respuesta al estrés por frío para generar plantas tolerantes al cambio climático".



IPICYT

Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Acta de Examen de Grado

El Secretario Académico del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., certifica que en el Acta 115 del Libro Segundo de Actas de Exámenes de Grado del Programa de Doctorado en Ciencias en Biología Molecular está asentado lo siguiente:

En la ciudad de San Luis Potosí a los 26 días del mes de noviembre del año 2020, se reunió a las 10:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

Dr. Samuel Lara González	Presidente	IPICYT
Dra. Martha Leticia Santos Martínez	Secretaria	IPICYT
Dr. Juan Francisco Jiménez Bremont	Sinodal	IPICYT

a fin de efectuar el examen, que para obtener el Grado de:

DOCTORA EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

sustentó la C.

Alma Laura Rodríguez Piña

sobre la Tesis intitulada:

Caracterización bioquímica, molecular y funcional de las mutantes nulas del gen UmRrm75 de Ustilago maydis

que se desarrolló bajo la dirección de

Dr. Juan Francisco Jiménez Bremont

El Jurado, después de deliberar, determinó

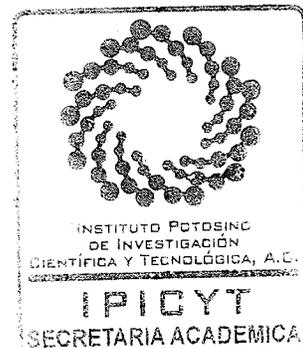
APROBARLA

Dándose por terminado el acto a las 12:40 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fe el Secretario Académico del Instituto.

A petición de la interesada y para los fines que a la misma convengan, se extiende el presente documento en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P., México, a los 26 días del mes de noviembre de 2020.

Mtra. Ivonne Lizette Cuevas Vélez
Jefa del Departamento del Posgrado

Dr. Marcial Bonilla Marín
Secretario Académico



Dedicatorias

A lo largo de mi vida he conocido muchas personas que de alguna forma han contribuido de manera significativa en mi desarrollo personal y como científico. Desde las que todavía están oxidándose, hasta aquellas que su ciclo terminó, les agradezco infinitamente pasar por mi vida y mejorarla.

Por otro lado, existen esos seres que se quedan eternamente en la memoria y el corazón y, que nunca podrás olvidar ni dejar de agradecer, algunos de ellos:

Mi San, te agradezco todo el esfuerzo que hace para ser mi mamá, yo siempre lo he hecho muy difícil. Mi Fer, te agradezco todo el apoyo y confianza que me demuestras, yo siempre estoy y estaré más orgullosa de ti. La Flaca, mi hermana, por ser siempre un apoyo incondicional y demostrarme todos los días que no hay obstáculo que no podamos vencer. Todo pasa! El Gordo, mi hermano, porque a pesar de ser el más pequeño ha sido el que más ha luchado. Te amo! Mi Emi, la razón de mi vida. Mi mejor amigo y la persona por la que debo ser mejor cada día. Dios bendiga esas orejas llenas de amor, amén! Y por último, pero nunca menos importante, a Ofe mi abuela, que desde el inicio y el final de mi camino le agradeceré eternamente.

A mi Nat, no necesito mencionarlo, lo sabes y los sé. Amigos del doctorado mexicanos, colombianos, argentinos, españoles, brasileños y alemanes, gracias!

A mi asesor, Dr. Juan Francisco Jiménez-Bremont por creer en mí y en mi *Ustilago maydis*, aun cuando no parecía ser la mejor opción.

Finalmente, en cierto momento de la vida te encuentras personas nuevas y especiales que deseas se queden junto a ti, por siempre. Encontré una y espero que se quede toda la vida. Manuel, gracias por coincidir en el camino. Te amo, siempre!

Agradecimientos

Al Dr. Juan Francisco Jiménez-Bremont, por dirigir mi trabajo de tesis, por compartir sus conocimientos y dejarme trabajar y ser parte de su grupo de investigación.

Al Dr. Samuel Lara González y la Dra. Martha Leticia Santos Martínez, por aceptar ser parte de mi comité tutorial, así como sus comentarios y observaciones para la elaboración de esta tesis.

Al Dr. Enrique Castaño de la Serna, por aceptar ser parte de mi comité tutorial, sus consejos y buenos deseos.

A la M. en C., Alicia Becerra Flora, por su apoyo técnico en el laboratorio.

A la Dra. Aida Araceli Rodríguez Hernández, por su apoyo técnico en el laboratorio, así como su amistad incondicional.

A la Dra. María Azucena Ortega Amaro, por su apoyo técnico en el laboratorio, así como su amistad.

A la Universidad de Düsseldorf en Alemania y sus docentes investigadores, por permitirme realizar una estancia de investigación.

Al Prof. Dr. Michael Feldbrügge, por recibirme en el laboratorio de microbiología molecular de la Universidad de Düsseldorf.

Al asistente técnico del laboratorio de microbiología molecular en Alemania, Ute Gengenbacher, por todos sus conocimientos y apoyo técnico en el laboratorio

Al CONACYT, por el apoyo económico otorgado durante la realización de esta investigación con el número de becario 265342.

Al Proyecto de Problemas Nacionales **Número de proyecto: 2015-01-414**. "Identificación y caracterización de genes involucrados en la respuesta al estrés por frío para generar plantas tolerantes al cambio climático", por el apoyo otorgado para la realización de este trabajo

Al IPICYT por permitirme hacer uso de sus instalaciones.

Contenido

Constancia de aprobación de la tesis	ii
Créditos institucionales	iii
Acta de examen	iv
Dedicatorias	v
Agradecimientos	vi
Lista de figuras	viii
Anexos	lx
Resumen	x
Abstract	xi
1. Introducción	1
1.1. Ciclo de vida del hongo <i>Ustilago maydis</i>	
1.2. Proteínas de unión a ARN	
1. 2.1 Proteínas de unión a ARN de tipo SR	
1.3. Proteínas de unión a ARN relacionadas con la respuesta a estrés	
1.4. Estrés oxidativo en hongos	
2. Antecedentes	18
3. Justificación	20
4. Objetivos	21
Capítulo 1	23
La interrupción en <i>Ustilago maydis</i> del gen <i>UmRrm75</i> que codifica para una proteína de unión a ARN provoca una mayor acumulación de H ₂ O ₂ , peroxisomas y melanina.	
Capítulo 2	25
UmRrm75 una proteína de unión a ARN de <i>Ustilago maydis</i> complementa funcionalmente a la proteína ScHrb1 de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	
5. Resultados	26
6. Discusión General	39
7. Conclusiones	44
8. Bibliografía	45

Lista de figuras

Introducción:

Figura 1. Ciclo de vida de <i>Ustilago maydis</i>	2
Figura 2. Diferentes dominios de unión al ARN en las RBPs	5
Figura 3. Estructuras de dominio de proteínas de unión a ARN (RBP) de tipo PUM, KHD, DSRM y RRM en el hongo <i>Ustilago maydis</i>	7
Figura 4. Disposición e interacción de las láminas alfa y beta de los motivos RNP1 y RNP2	8
Figura 5. Estructura y diferentes dominios presentes en las proteínas SR.	11
Figura 6. Organización genómica del gen <i>UmRrm75</i> y fenotipo de las mutantes nulas $\Delta UmRrm75$ en <i>Ustilago maydis</i> .	19

Capítulo 2

Figure 1. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de la proteína UmRrm75 y de sus ortólogos en otros Ustilaginales	28
Figure 2. Alineamiento de las secuencias de la proteína UmRrm75 con proteínas de tipo SR de <i>S. cerevisiae</i>	29
Figure 3. Ensayo de sensibilidad con ácido bórico en la mutante $\Delta UmRrm75$ de <i>U. maydis</i>	30
Figure 4. Ensayo de sensibilidad a boro en la cepa mutante $\Delta ScHrb1$ de <i>S. cerevisiae</i> complementada con el gen <i>UmRrm75</i> de <i>U. maydis</i>	32
Figure 5. Ensayo de sensibilidad H ₂ O ₂ en la cepa mutante $\Delta ScHrb1$ y las cepas complementantes con el gen <i>UmRrm75</i> .	33
Figure 6. Expresión de la fusión de la proteína UmRrm75-GFP en extractos de células de la cepa FB2.	36
Figure 7. Localización sub-celular de la proteína UmRrm75 en <i>U. maydis</i>	37

Anexos

Figura suplementaria 1. Ensayo de sensibilidad a boro en la cepa mutante $\Delta ScHrb1$ de <i>S. cerevisiae</i> complementada con gen <i>UmRrm75</i> de <i>U. maydis</i>	56
Publicaciones	57

Resumen

Caracterización bioquímica, molecular y funcional de las mutantes nulas del gen *UmRrm75* de *Ustilago maydis*

Las proteínas de unión a ARN (RBPs) participan en la regulación post-transcripcional, incluyendo el procesamiento, exportación, localización, degradación y control de la traducción del ARN. Nuestro laboratorio reportó el gen *UmRrm75* que codifica para una RBP del hongo fitopatógeno *Ustilago maydis*. *UmRrm75* presenta tres motivos del tipo RRM separados por regiones ricas en glicinas, y un motivo SR en el extremo N-terminal. Mutantes nulas del gen *UmRrm75* mostraron crecimiento lento y una reducción en la virulencia en plantas de maíz. En este estudio, nos enfocamos a la caracterización molecular, bioquímica y funcional de la mutante $\Delta UmRrm75$. Determinamos que la proteína *UmRrm75* presenta una actividad de chaperona de ARN en un sistema heterólogo de *E. coli*. Nosotros reportamos que a las temperaturas de 15°C y 37°C, el gen *UmRrm75* se induce y las cepas mutantes $\Delta UmRrm75$ presentan un menor crecimiento en comparación a las cepas parentales. Interesantemente, las mutantes $\Delta UmRrm75$ acumulan H₂O₂ y melanina, y presentan un mayor número de peroxisomas. Para contrarrestar esta acumulación de H₂O₂, las mutantes $\Delta UmRrm75$ inducen la expresión del gen *UmYap1*, y presenta una mayor actividad de catalasa. Por otro lado, descubrimos que la $\Delta UmRrm75$ presenta una mayor sensibilidad a boro que la cepa parental, tal como se reportó para la mutante $\Delta Schrb1$ de *Saccharomyces cerevisiae*. Además, encontramos que la $\Delta Schrb1$ presenta una mayor sensibilidad a H₂O₂, como la $\Delta UmRrm75$. Mediante una complementación funcional en la mutante $\Delta Schrb1$, en donde se expresó el gen *UmRrm75*, logramos reducir la sensibilidad a boro y H₂O₂ a los niveles de la parental de *S. cerevisiae*. Por último, mostramos que la proteína *UmRrm75* fue localizada en el núcleo de células de levadura como de micelio del hongo *U. maydis*. En conjunto, nuestros datos contribuyen a comprender el papel de la proteína *UmRrm75*, postulándola como un ortólogo funcional de la proteína *Schrb1* de *S. cerevisiae*, que podría estar involucrada en el procesamiento del ARN.

Palabras clave: PROTEÍNAS DE UNIÓN A ARN, *USTILAGO MAYDIS*, $\Delta UMRM75$, MELANINA, ESTRÉS OXIDATIVO, $\Delta SCHRB1$, BORO, LOCALIZACIÓN SUB-CELULAR, ORTÓLOGO FUNCIONAL.

Abstract

Biochemical, molecular and functional characterization of the null mutants of the *Ustilago maydis* gene *UmRrm75*

RNA-binding proteins (RBPs) participate in post-transcriptional regulation including RNA processing, export, localization, degradation, and control of translation. Our laboratory reported the *UmRrm75* gene encoding an RBP in phytopathogenic fungus *Ustilago maydis*. UmRrm75 has three RRM-like motifs separated by glycine-rich regions, and an SR motif at the N-terminus. Null mutants of the *UmRrm75* gene showed slow growth and a reduction in virulence in maize plants. In this study, we focus on the molecular, biochemical and functional characterization of the $\Delta UmRrm75$ mutants. We determined that the UmRrm75 protein exhibits RNA chaperone activity in a heterologous *E. coli* system. We reported that at temperatures of 15°C and 37°C, the *UmRrm75* gene is induced, and the $\Delta UmRrm75$ mutant strains showed less growth compared to the parental strains. Interestingly, the $\Delta UmRrm75$ mutants accumulate H₂O₂ and melanin, and present a greater number of peroxisomes. To counteract this accumulation of H₂O₂, the $\Delta UmRrm75$ mutants induce the expression of the *UmYap1* gene, and show greater catalase activity. On the other hand, we discovered that $\Delta UmRrm75$ has a higher sensitivity to boron than the parental strain, as reported for the $\Delta ScHrb1$ mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. Furthermore, we found that $\Delta ScHrb1$ has a higher sensitivity to H₂O₂, as same the $\Delta UmRrm75$ mutant strain. Through a functional complementation in the $\Delta ScHrb1$ mutant, where the *UmRrm75* gene was expressed, we were able to reduce the sensitivity to boron and H₂O₂ in the same way as the *S. cerevisiae* parental strain. Finally, we showed that the UmRrm75 protein was located in the nucleus of yeast and mycelium cells of the smut fungus *U. maydis*. Taken together, our data contribute to understanding the role of the UmRrm75 protein, postulating it as a functional orthologue of the *S. cerevisiae* ScHrb1 protein, which could be involved in RNA processing.

Key words: RNA BINDING PROTEINS (RBPS), *USTILAGO MAYDIS*, $\Delta UMRM75$, MELANIN, OXIDATIVE STRESS, $\Delta SCHRB1$, BORON, SUB-CELLULAR LOCALIZATION, FUNCTIONAL ORTHOLOG.

1. Introducción

Ciclo de vida del hongo *Ustilago maydis*

Ustilago maydis es un basidiomiceto de tipo biotrófico que infecta al maíz (*Zea mays*) y al teosinte (*Zae perennis*), y se encuentra dentro de la familia de los Ustilagomicetes. Como características específicas de la infección, este hongo produce una especie de agallas o tumores, los cuales son comúnmente llamados huitlacoche o cuitlacoche. En cuanto a su ciclo de vida, *U. maydis* presenta un ciclo de vida dimórfico (Basse, C. y Steinberg, G., 2004; Dean et al., 2012), el cual consiste en una fase en forma de levadura o fase haploide no infectiva, considerado este como un estado saprofito y propagativo. Por otro lado, en la fase filamentosa o infectiva del hongo, se observan la formación del filamento dicariótico y del apresorio. En esta etapa, da comienzo la infección, cuando dos células sexualmente compatibles del hongo se fusionan (Banuett y Herskowitz, 1996; Banuett, 2002; Ruiz Herrera y Martínez Espinosa, 1998). En la segunda fase, el hongo se considera ya un parásito y sus filamentos comienzan a proliferar dentro de las células vegetales (Banuett, F. 1995). Una vez que el micelio dicariótico está formado, *U. maydis* se vuelve un parásito obligado, ya que solo dentro de la planta de maíz, este podrá completar su ciclo infeccioso y sexual (**Figura 1**).

Cuando se produce la infección del hongo *U. maydis* en jilotes de plantas de maíz se generan mazorcas con granos inflados que contienen micelio y teliosporas del hongo. Durante los tiempos precolombinos estas mazorcas infectadas con el hongo fueron utilizadas por las civilizaciones de nuestro país como alimento al cual le llamaron “huitlacoche”. Actualmente en América Latina el “huitlacoche” o “cuitlacoche” es conocido como un alimento gourmet, por su sabor, y además es un alimento nutraceutico, debido a su alto contenido de minerales, carbohidratos, proteínas y vitaminas (Valdez-Morales, et al., 2010; Juárez-Montiel et. al., 2011; Patel, 2016; Abbas, et al., 2017).

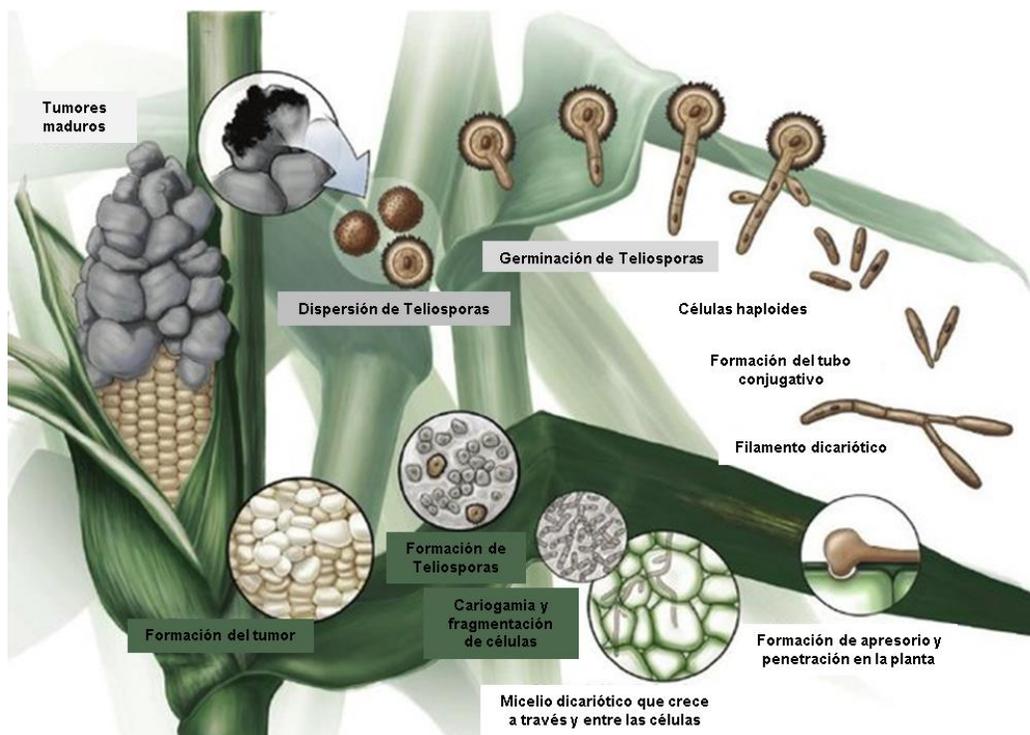


Figura 1. Ciclo de vida de *Ustilago maydis*.

El ciclo de vida de *Ustilago maydis* comienza justo cuando se da la germinación de las teliosporas. Durante el proceso de meiosis se generan células haploides (basidiosporas), las cuales cuando son sexualmente compatibles, se fusionan para dar paso a la formación del micelio dicariótico, este prolifera y se introduce en la planta mediante una estructura denominada apresorio. Finalmente, el hongo se desarrolla dentro de la planta hasta la formación de tumores característicos de la infección. La imagen fue tomada de Meiosis: Molecular Mechanisms and Cytogenetic Diversity, A. Swan, ed (New York: InTech), 411-460.

El hongo *U. maydis* presenta uno de los genomas de menor tamaño secuenciado hasta el momento, entre los genomas de hongos patógenos de plantas. El genoma de *U. maydis* consta de 6902 genes, distribuidos en 23 cromosomas aproximadamente en 20.5 Mb (Kämper, J., et al., 2006). En el genoma de *U. maydis*, se identificó un grupo de 12 clusters de genes que codifican para enzimas intra y extra celulares relacionados a la patogenicidad, como por ejemplo enzimas que degradan la pared celular de la planta (Kämper, J., et al., 2006). Los

análisis genómicos y transcriptómicos de este Basidiomycete, evidencian que sus genes contienen un número reducido de intrones y que en promedio sus intrones son cortos, características por las cuales se podría explicar parcialmente el por qué tiene un genoma de tamaño pequeño (Kämper, J., et al., 2006). El 30% de los genes de *U. maydis* contiene intrones, y el promedio de intrones por gen es de 0.46 (Kämper, J., et al., 2006). Otro Basidiomycete con el genoma secuenciado es el hongo *Cryptococcus neoformans*, el cual presenta un promedio mayor con 5.3 intrones por gen (Loftus et al., 2005). En el caso de la levadura *S. cerevisiae* presenta un menor número de genes que contienen intrones, solo el 4% de los genes presenta intrones, con un tamaño promedio de 300 nucleótidos (Bon. E., 2003). A diferencia de otras levaduras como *Schizosaccharomyces pombe* y *S. cerevisiae*, *U. maydis* tiene un eficiente sistema de recombinación homóloga, característica que aporta una explicación al bajo porcentaje de intrones presentes en el genoma (Holliday, R. 2004; Kämper, J., et al., 2006). En el ámbito científico, *U. maydis* es considerado como un organismo modelo, debido a que ha sido utilizado ampliamente como una herramienta para el entendimiento de la biología molecular y celular, y de la fisiología de los hongos, así como de la bioquímica y de las vías metabólicas esenciales durante la infección a la célula vegetal. Por otro lado, siendo un hongo biotrófico que infecta maíz, una planta de interés comercial, este hongo es considerado un excelente modelo para el estudio de la interacción planta-patógeno. Además de ser considerado una herramienta para el conocimiento de la recombinación y reparación de ADN, el tráfico o transporte de vesículas a través de los micro túbulos, y de la biología del ARN (Basse, C & Steinberg, G. 2004; Feldbrügge, M et al., 2008).

Estudios relacionados al análisis y comparación del genoma de *U. maydis* con otros modelos de eucariotas inferiores como *S. cerevisiae* y eucariotas superiores como el del humano, evidenciaron la posibilidad de utilizar al hongo *U. maydis* como sistema modelo para el citoesqueleto de microtúbulos en el crecimiento polar y la mitosis debido a que estos procesos son altamente importantes y conservados entre *U. maydis* y los mamíferos (Münsterkötter, M., & Steinberg, G., 2007). Debido a esta característica, algunos genes del hongo que están

relacionados con procesos post-transcripcionales han sido estudiados y comparados con sus genes ortólogos en humanos; incluso el genoma de *U. maydis* contiene tres de las cuatro proteínas centrales para el proceso de empalme de exones, así mismo para el transporte de ARNm de núcleo al citosol (Zarnack, K., & Feldbrügge, M 2007). Debido a estas características *U. maydis* se ha vuelto un excelente modelo para el estudio de la biología del ARN, así como el estudio de la regulación post-transcripcional (Bölker, M. 2001; Becht, P. et al., 2005; Holloman.W, et al., 2007; Steinberg, G. 2007).

1.2 Proteínas de unión a ARN

En los organismos eucarióticos, el proceso de expresión génica inicia con la transcripción de los genes para producir el pre-ARNm en el núcleo, para después ser procesados y poliadenilados y así dar paso a los ARNm maduros que posteriormente serán exportados al citoplasma para ser traducidos (Moore, M. 2005). De tal forma que los eventos moleculares de los ARNm se llevan a cabo después de haber sido transcritos por componentes específicos de la maquinaria post-transcripcional. Estos eventos son llevados a cabo por las proteínas de unión a ARN (por sus siglas en inglés RBPs, RNA-binding proteins), las cuales interactúan con los ARNm y forman complejos llamados ribonucleoproteínas o RNP por sus siglas en inglés (ribonucleoprotein complexes) (Kishore, S., et al., 2010).

Las RBPs se encuentran formadas por varios motivos, dominios y firmas de aminoácidos repetidos. Las RBPs pueden ser clasificadas dentro de diferentes familias basándose en sus dominios de unión, tales como: el motivo (RRM) o motivo de reconocimiento a ARN; el dominio K Homologus (KH), el dominio de doble cadena de unión a ARN (dsRBD), y los motivos de dedos de zinc (Chen, Y., & Varani, G. 2005). Basándose en el primer borrador del genoma humano, se estimó que existían alrededor de 1,000 RBPs, las cuales presentaban motivos de unión a ARN del tipo RRM. Se calcula que este número de RBPs se incremente drásticamente cuando se consideren todas aquellas proteínas que presenten

identificados en *U. maydis*, así como los diferentes dominios de unión a ARNm (Becht et al., 2005). Específicamente el motivo de reconocimiento tipo RRM, es por mucho, el motivo más común y mejor caracterizado de las RBPs (Afroz, T., et al., 2015). Los dominios RRM están compuestos aproximadamente por 80 a 90 aminoácidos con una topología típica $\beta_1\alpha_1\beta_2\beta_3\alpha_2\beta_4$, esta estructura forma una lámina β de cuatro hebras empaquetada contra dos hélices α (Cléry, A. et. al., 2008). El reconocimiento del ARNm comúnmente sucede en la parte superior de la lámina β y su unión está mediada en la mayoría de los casos por tres residuos conservados de Arginina/Lisina, los cuales siguen la cadena principal de fosfatos del ARN unido, los cuales forman un enlace de par iónico con las bases nitrogenadas del ARN monocatenario (Oubridge, C, et al., 1994). Estos aminoácidos aromáticos se encuentran localizados en dos motivos altamente conservados, denominados motivos de ribonucleoproteína 1 y 2 (RNP1 y RNP2). Estos motivos se definen por una secuencia consenso (RNP1 K/R-G-F/Y-G/A-F/Y-V/I/L-X-F/Y) y RNP2 (V/I/L-F/Y-V/I/L-X-N/L) y están ubicados en las dos cadenas β centrales de la proteína. En la **Figura 4**, se describe de forma detallada la estructura de tipo $\beta\alpha$ del dominio RRM y la localización de los motivos RNP1 y RNP2. Por lo tanto, estos motivos RNP conservados permiten el reconocimiento de dos nucleótidos en el centro de dos láminas β y dos nucleótidos adicionales a cada lado. Sin embargo, un solo RRM puede reconocer en cualquier lugar de 4 a 8 nucleótidos mediante el uso de bucles adicionales expuestos (Auweter, S. D., et. al., 2006, Cléry, A. et. al., 2008).

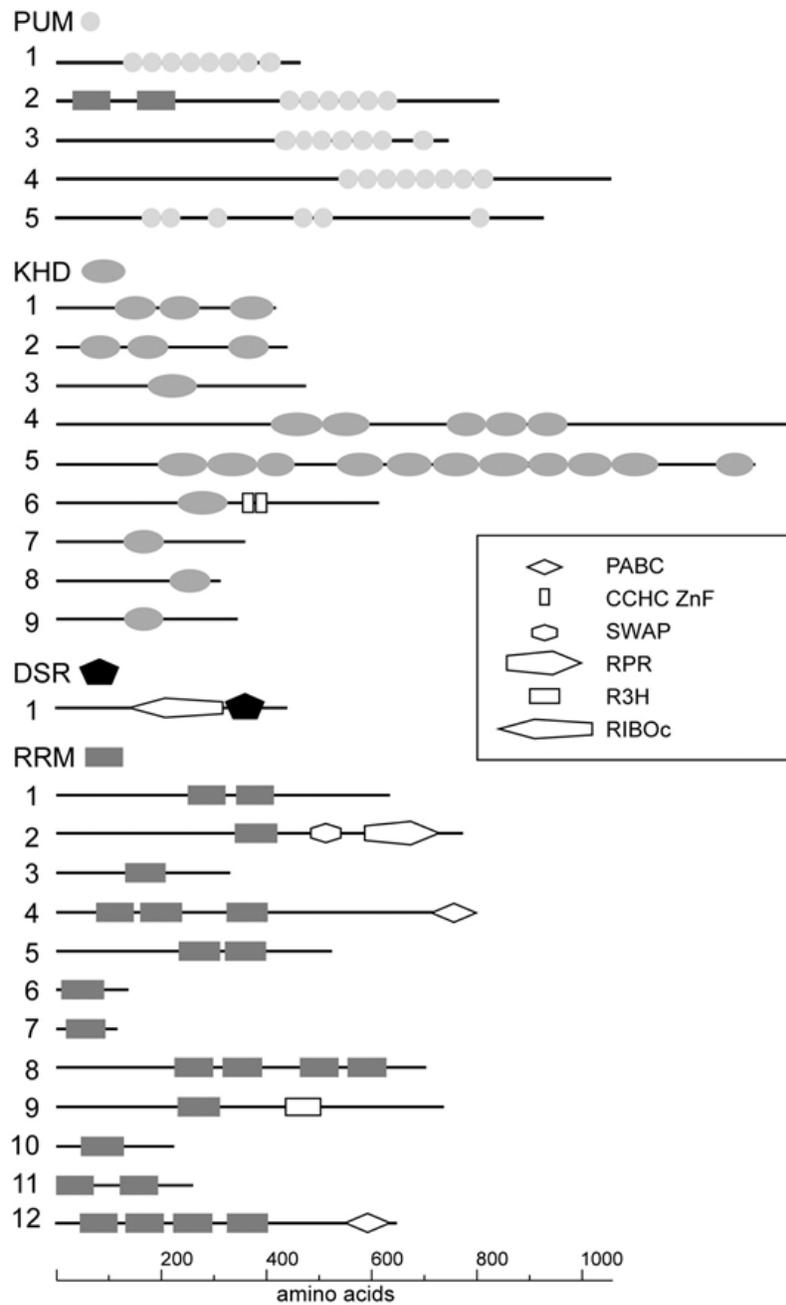


Figura 3. Estructuras de dominio de proteínas de unión a ARN (RBP) de tipo PUM, KHD, DSRM y RRM en el hongo *Ustilago maydis*. La imagen fue tomada de Philip Becht et al. Eukaryotic Cell 2005; doi:10.1128/EC.4.1.121-133.2005.

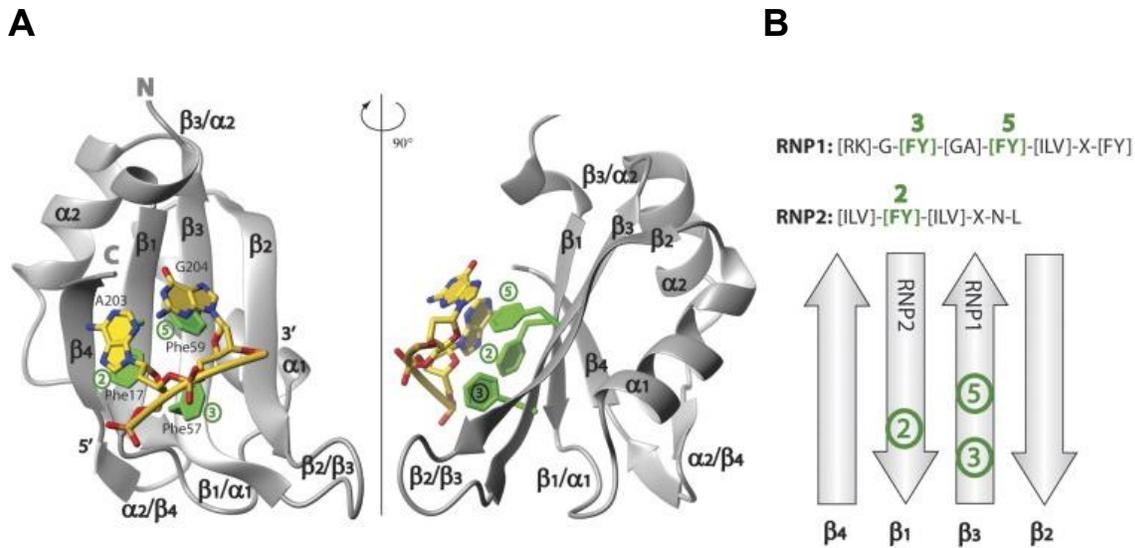


Figura 4. Disposición e interacción de las láminas alfa y beta de los motivos RNP1 y RNP2. **A)** Estructura y disposición espacial de las láminas beta y alfa de la proteína hnRNP A1 de humano y su interacción con ARN. **B)** Posición de los residuos aromáticos conservados en la secuencia de los motivos RNP1 y RNP2 (color verde). Secuencias consenso para los motivos RNP1 y RNP2 en proteínas de tipo RRM (la “X” representa cualquier aminoácido). La imagen fue tomada de Cléry, A. et. al., 2008: DOI: 10.1016/j.sbi.2008.04.002.

En general, el mecanismo de reconocimiento de las moléculas de ARN se encuentra descrito para muchas proteínas del tipo RRM, y se sabe que algunos de los dominios de tipo RRM son capaces de interactuar con otras proteínas y no precisamente solo con moléculas de ARN. Por lo tanto y debido a la versatilidad de estas proteínas y sus dominios, algunas RBPs con solo un dominio RRM no serían capaces de unir moléculas de ARNm por si solas, y se necesitaría de la interacción con otros RBPs; por lo que la presencia de más dominios RRM en una RBP podría garantizar una mayor especificidad en la unión al ARNm (Auweter, S. et al., 2006).

En *U. maydis* se han identificado proteínas de unión a RNA con los diversos dominios descritos para las RBPs (Becht, P. et al 2005). Tal es el caso del gen *Rrm4* que codifica para una RBP del tipo RRM y con un dominio MLLE

(Mademoiselle) en el extremo carboxilo, este dominio se ha visto altamente conservado en las proteínas de unión a poli (A) (PABP) de todos los organismos eucariotas (Xie, J., et al., 2014). La proteína RRM4 transporta ARNs desde el núcleo a los polos celulares a través de los microtúbulos, y es esencial para la polaridad de las hifas infecciosas del hongo *U. maydis*. Se sabe que RRM4 se une *in vivo* a diversos ARNm con motivos ricos en ribonucleótidos **CACA** que codifican a factores de polaridad, factores de traducción (Becht, P., et al., (2006). Es importante destacar que mutantes nulas del gen *Rrm4* evidenciaron afectaciones fenotípicas, como crecimiento bipolar de la hifa, así como incapacidad de formar el septo de retención, y una menor virulencia (Vollmeister, E., y Feldbrügge, M., 2010). De igual forma se caracterizó a la proteína Khd4 de tipo KH; esta proteína Khd4 tiene 5 dominios KH y un dominio Q en el extremo carboxilo rico en arginina. Por medio de un ensayo de tres híbridos pudieron identificar la secuencia AUACCC, la cual es reconocida por el dominio KHd de Khd4. Esta proteína mostró un papel en el control post-transcripcional, participando en la estabilidad del ARNm en *U. maydis* (Vollmeister, E., et al., 2009). Mutantes nulas del gen *khd4*, evidenciaron afectaciones en el crecimiento, en la filamentación y en la morfología celular, así como deficiencias en la citocinesis y pared celular (Vollmeister, E., y Feldbrügge, M., 2010).

1. 2.1 Proteínas de unión a ARN (RBP) de tipo SR

Debido a que procesos como el crecimiento, el desarrollo, y la patogenicidad resultan vitales para el hongo, es necesario que los patrones de expresión sean constantes y precisos. Para que esto suceda se necesita la ayuda de moduladores específicos de regulación post-transcripcional para cada ARNm. En este sentido las RBPs están implicadas en la regulación post-transcripcional del ARNm, dado que estas proteínas se unen a los ARNs por medio de secuencias consenso y/o estructuras específicas, y esta unión es clave para que las RBPs hagan su función, ya sea de chaperonas, transporte, y degradación de ARNs. También es importante señalar que la localización sub-celular de las RBPs es importante tanto para la interacción con los ARNs blancos, como para su actividad de estas

proteínas (Hogan, D. J., et al 2008; Ray, D., et al., 2013). Una familia de RBPs son las proteínas SR, las cuales participan en el empalme de ARN “splicing”, y se caracterizan por la presencia de un dominio RS rico en Arginina (R) y Serina (S) en el C-terminal y un dominio de reconocimiento de ARN de tipo RRM en el extremo amino terminal (Shepard, P. J., y Hertel, K. J., 2009).

Se ha reportado que las RBPs del tipo SR presentan diversas funciones en el procesamiento post-transcripcional, las cuales van desde la eliminación de intrones del pre-ARNm, tanto “splicing” constitutivo o alternativo, hasta diversas actividades posteriores al “splicing”, incluida la exportación nuclear del ARNm, y la traducción de ARNm (Graveley 2001 y Krainer 2000). Debido a esta participación, se ha reportado que las proteínas SR están localizadas en el núcleo, aunque existen evidencias de que las proteínas SR también han sido ubicadas tanto en el núcleo como en el citoplasma (Caceres et al., 1998; Bourgeois et al., 2004; Long y Caceres, 2009; Jeong, S., 2017). Asimismo, su localización puede ser modulada por fosforilación mediante cinasas específicas de SR. Tal es el caso de la proteína ScNpl3 de *S. cerevisiae*, la cual es fosforilada por la proteína Sky1 regulando así su localización sub-celular (Siebel, C. W., et al., 1999). En la levadura *Schizosaccharomyces pombe* se encontró que Dsk1p la cual es el ortólogo de la proteína SRPK1 de humano, y ambas son una proteína cinasa serina/arginina. En *S. pombe*, Dsk1p es necesario para la fosforilación de Srp2p y Prp2p y su localización en los “speckles” en el núcleo (Tang, Z., et al., 2007). Los “speckles” son estructuras de almacenamiento en el núcleo de muchas proteínas necesarias para el ensamblaje y almacenamiento de la maquinaria del splicing, incluyendo a las proteínas de tipo SR que posteriormente serán reclutadas para la transcripción (Misteli et al., 1997; Misteli y Spector, 1999). En la **Figura 5** se ejemplifican los diversos dominios que se han identificado en las proteínas de tipo SR, como los dominios RRM se unen al ARNm, y los dominios ricos en serina/arginina RS participan en diversas interacciones proteína-proteína y proteína-ARN (Jeong, S., 2017).

En el modelo *S. cerevisiae* se han identificaron RBPs que se asocian con conjuntos específicos de ARNm que codifican a proteínas que presentan propiedades de función relacionada (Riordan, D. et al., 2011), sugiriendo que este tipo de especificidad está dada por una secuencia específica “firma” del mensajero que será reconocido por la RBP, de esta manera la RBP dirigirá el destino del ARN como su procesamiento “splicing”, su localización, su traducción y su degradación (Hogan, D. et al., 2008; Hieronymus, H., y Silver, P. A. 2003).

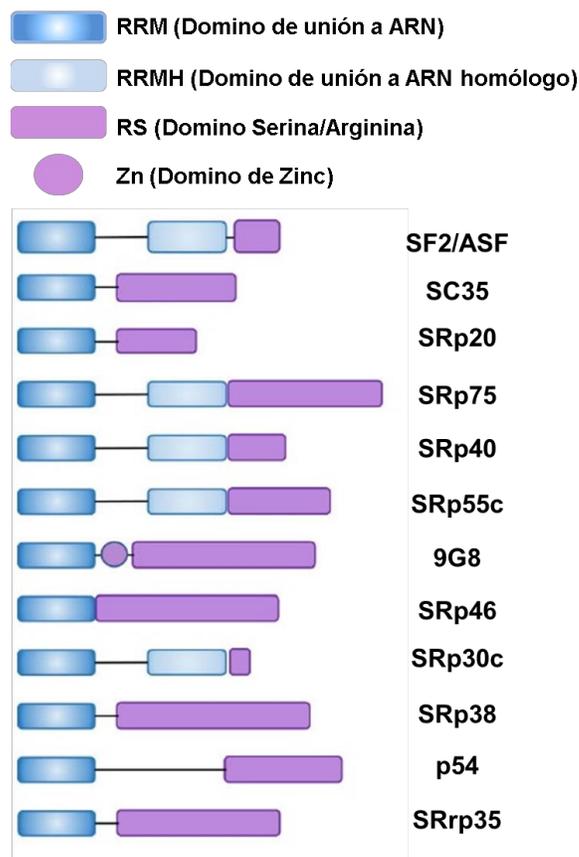


Figura 5. Estructura y los dominios presentes en las proteínas SR. Dominios de unión a ARN de tipo RRM, dominios de unión a RNA homólogo o RRMH, dominio rico en serina/arginina o SR, y dominios de dedos de Zinc. Figura tomada y modificada de Jeong, S. (2017). Mol Cells. 2017 Jan 31; 40(1): 1-9. DOI:10.14348/molcells.2017.2319.

En la levadura *Candida albicans* se han identificado proteínas SR como la proteína CaSlr1, la cual presenta un dominio de unión a ARN de tipo RRM y un repetido rico en arginina (R-rich) en el extremo carboxilo (Ariyachet, C., et al., 2013). La

mutante nula de *CaSlr1* en *C. albicans* reveló una reducción en su tasa de crecimiento y en la filamentación, así como una disminución en la capacidad para dañar las células epiteliales y endoteliales (Ariyachet, C., et al., 2013). La sustitución del aminoácido serina por alanina en el dominio serina/arginina ubicado en el extremo carboxilo de la proteína *CaSlr1* bloqueó la fosforilación de esta proteína SR, ocasionando que la proteína *CaSlr1* se acumulara en el citoplasma de las células de levadura e hifa (Ariyachet, C., et al., 2017).

En la planta *Arabidopsis thaliana* se identificó a la proteína SR denominada *AtSR45a*, la cual presenta un dominio rico en serina y serina/arginina en el extremo amino, y un dominio rico arginina/serina en el extremo carboxilo y, entre estos dominios, un dominio de unión a ARN de tipo RRM, (Zhang, X. N., y Mount, S. M., 2009; Tanabe, N., et al., 2009). Se ha reportado que *AtSR45a* interactúan con la proteína *U1-70K*, componente esencial para la definición inicial de los sitios de corte y empalme en la región 5' de los intrones en el pre-ARNm (Tanabe, N., et al., 2007). Mutantes del gen *Atsr45-1* presentan anomalías en el desarrollo de *Arabidopsis* que incluyen floración tardía, hojas y pétalos angostos, y un números alterados de pétalos y estambres (Ali, G. S., et al., 2007).

En *S. cerevisiae*, las proteínas de tipo SR *ScHrb1* y *ScGbp2*, son dos factores de control de calidad para el “splicing” de los ARNm. Ambas proteínas, *ScHrb1* y *ScGbp2*, están constituidas por un dominio N-terminal rico en repetidos serina/arginina (SR) y arginina/glicina/glicina (RGG), seguidos de tres dominios de reconocimiento de ARN de tipo RRM (Häcker, S. y Krebber, H., 2004; Windgassen, M., y Krebber, H. 2003; Windgassen, M., et al., 2004). Estas proteínas SR retienen el pre-ARNm a través del complejo THO, un complejo tetramérico que consta de 5 proteínas, *Hpr1*, *Tho2*, *Mft1* y *Thp2*, complejo que ha sido reportado como necesario para una elongación eficaz de la transcripción (Hurt, E., et al., 2004). Mutantes de *ScHrb1* y *ScGbp2* evidenciaron ser esenciales para el crecimiento celular bajo condiciones normales, además de evidenciar una retención de intrones en los ARNm exportados al citoplasma. Debido a esto, la función principal de *ScHrb1* y *ScGbp2* es evitar la exportación de ARNm

aberrantes (Hackmann, A., et al 2014). Sin embargo, la sobreexpresión de *ScGbp2* provoca una retención tóxica de ARNm en el núcleo, evidenciando una restricción durante la exportación en lugar de promoverla (Windgassen y Krebber, 2003). En el caso de la proteína ScNpl3 está constituida por dos dominios de reconocimiento de ARN de tipo RRM, un dominio rico en serina/arginina (SR) y un dominio rico en Arginina/Glicina/Glicina (RGG) en su extremo carboxilo-terminal y un dominio APQE en el extremo amino-terminal (Häcker, S. y Krebber, H., 2004). Se demostró que ScNpl3 modula la eficiencia del empalme en el “splicing”, así como un papel en el transporte de mensajeros fuera del núcleo (Kress, T. L., et al., 2008; Singleton, D. R., et al., 1995). Mutantes de ScNpl3 presentaron una sensibilidad de crecimiento a una temperatura de 37°C pero no presentan un defecto en la localización de las proteínas nucleares (Henry, M., et al., 1996).

1.3 Proteínas de unión a ARN relacionadas con la respuesta a estrés en eucariontes

Las RBPs son claves reguladores de la expresión génica, y están involucradas en procesos vitales de la célula, como en la respuesta al estrés, en la diferenciación celular y muerte celular. Como se describió anteriormente, durante este tipo de procesos, las RBPs forman enlaces con moléculas de ARNm, además de otras proteínas, con el objetivo de generar complejos de ribonucleoproteínas. De tal forma que estos complejos protegen a los mensajeros que fueron transcritos para una condición específica, con el objetivo de ser protegidos durante todos los procesos post-transcripcionales hasta llegar al ribosoma para ser traducidos (Sesma, A. 2016 y Lorković, Z. J. 2009).

Por tal motivo, para que la célula sobreviva al estrés, es necesario que la maquinaria celular genere una respuesta rápida, en el momento en que la célula detecta el estrés, la respuesta se active inmediatamente, y así el metabolismo celular es capaz de adaptarse de una forma dinámica al ambiente. Esta respuesta dinámica desencadena una modulación en la expresión génica, y activa factores tales como las RBPs (Lorković, Z. J., 2009; Oliveira, C., et al., 2017)

En este sentido, la estabilidad del ARNm durante los diferentes procesos de la célula, puede verse alterado como por ejemplo en la respuesta al estrés, y dichos transcritos son secuestrados en gránulos de ARN que serán finalmente regulados para la biodisponibilidad ante la maquinaria de traducción, almacenamiento o degradación, lo cual dependerá de las proteínas asociadas a ellos. Para su degradación, los ARNm se encuentran asociados a los cuerpos de procesamiento o “P-bodys”, los cuales son agregados multiproteicos de ribonucleoproteínas unidos a ARNm que no están siendo traducidos, y que además están asociados a proteínas de la vía de degradación del ARNm y los diferentes factores de inhibición de la traducción (Luo, Y., et al., 2018).

En organismos como los hongos, las RBPs están altamente implicadas en procesos del desarrollo, el crecimiento, la morfología, la respuesta a estrés, y en la patogenicidad (Kim, H. J. 2014); incluso se sabe que en diferentes hongos las RBPs juegan un papel muy importante en la adaptabilidad a diferentes tipos de estrés ambiental (Fang, W. & St Leger, R. J. 2010, Maggi, O., et. al., 2013).

En plantas se han descrito proteínas ricas en glicina que contienen dominios RRM, las cuales están relacionadas a la tolerancia a estrés por bajas temperaturas en plantas modelo, como *Arabidopsis thaliana* (Kim, Y.O., et al., 2005 - 2006). Para el caso de bacterias, se han reportado la existencia de proteínas de choque térmico o cold shock proteins (CSP's), las cuales presentan en su estructura un dominio de unión a ARN del tipo RRM, así como una actividad de chaperona durante condiciones de estrés (Jones, P. G., y Inouye, M., 1994 y Phadtare, S., 2012). Además, se ha reportado que este tipo de proteínas de bacterias se encuentran implicadas en la tolerancia a bajas temperaturas, adaptación, supervivencia y regulación en los procesos post-transcripcionales (Chaikam, V. y Karlson, D., 2008).

1.4 Estrés oxidativo en Hongos

En eucariontes superiores como vertebrados, plantas y hongos la respuesta de la célula al estrés oxidativo resulta de gran importancia, ya que si se acumulan altos niveles de especies reactivas (ROS) pondrían a la célula en peligro. Tal es el caso que en mamíferos, la acumulación de ROS se han asociado a diferentes tipos de enfermedades de tipo cardiovascular, neurodegenerativas y cáncer (Jenner, P., 2003; Kowalska, M. et al., 2020).

Los hongos filamentosos como *Aspergillus* presentan diferentes niveles de ROS durante su crecimiento y desarrollo, debido a esto se sabe que existe una fina regulación en el interior de la célula para regular los niveles de ROS (Jayashree, T., y Subramanyam, C., 2000). Existen estudios en los cuales se ha comprobado que la regulación del contenido de ROS en hongos es similar a la de mamíferos y plantas, específicamente en proceso como desarrollo, patogenicidad y mecanismos de defensa (Scandalios, J., 2005; Scott, B., y Eaton, C., 2008).

El estrés oxidativo se caracteriza por un desequilibrio entre la producción de ROS, y las señales de defensa antioxidante en el interior de la célula. Además, se sabe que estas ROS pueden actuar como moléculas señalizadores de procesos fisiológicos y de desarrollo en hongos. Se conoce que la acumulación de ROS en la célula, pueda dar paso a procesos como la proliferación celular, traducción de señales extracelulares y transporte de iones (Droge, W., 2002).

Entre las moléculas de ROS, el peróxido de hidrogeno es considerado uno de los metabolitos más importantes. La acumulación excesiva intracelular de peróxido en *U. maydis*, es capaz de provocar cambios en la transcripción de genes incremento en la expresión de genes relacionados en la biogénesis de carotenoides y promoción en la formación de esporas y filamentos, así como en el desarrollo de la patogenicidad (Leuthner, B, et al., 2005; Rodríguez-Piña, A. L., et al., 2019). Aunado a esto, la acumulación de ROS podría provocar un daño irreversible en el ADN, proteínas y lípidos de la célula (Scandalios, J., 2005). En el caso de los

hongos, estos organismos no solo hacen frente a altas concentraciones de ROS en el interior de sus células, cuando penetran en las células de su hospedero enfrenta la respuesta de este mediante la generación de ROS, por tal motivo es necesario detectar y activar sistemas que ayuden a contrarrestar la concentración excesiva de las ROS (Jacobson, E. S., et al., 1995).

Al igual que *U. maydis*, la levadura *S. cerevisiae* tiene al gen *Yap1*, el cual es un factor de transcripción encargado de detectar altos niveles de peróxido intracelular, para después activar una cascada de señalización de genes involucrados en la vía de desintoxicación para contrarrestar los altos niveles de peróxido (Molina, L. y Kahmann, R., 2007; Rowe, L., et al., 2012). De tal forma que el sistema enzimático de la célula es activado para producir enzimas que rompan las moléculas, tales como la súper oxido dismutasa (SOD), catalasa, glutatión oxidasas, peroxidasas y transferasas (Lazarova, N., et al., 2014).

Adicional a los mecanismos de defensa antes mencionados, los hongos producen un pigmento presente en la pared celular, llamado melanina, el cual actúa como un escudo protector frente a diversos tipos de estreses, incluidos la radiación UV, altas temperaturas y acumulación de radicales libres (ROS), esto debido a que la melanina funciona como un antioxidante (Zhdanova, N., y Vasil'evskaya, A., 1988; Langfelder, K., 2003). La melanina es un biopolímero de pigmentos hidrófobos formados por polimerización oxidativa de compuestos fenólicos o indólicos. Las estructuras exactas de las melaninas no están identificadas, pero existen diversos tipos tales como las eumelaninas (negro o marrón oscuro), feomelaninas (amarillo o rojo) (White, L. P., 1958; Gómez, B. L., y Nosanchuk, J. D., 2003).

En el hongo *Magnaporthe grisea* la acumulación de melanina tiene un papel crucial en la patogenicidad, particularmente debido a que la melanina posee propiedades antioxidantes (Wheeler, M. & Stipanovic, R. 1985). Además, debido a que los hongos deben enfrentar un ambiente hostil, no solo durante su desarrollo y supervivencia, sino también para la defensa contra su hospedero, la generación

de compuestos como la melanina les permite una protección contra este tipo de factores, promoviendo su crecimiento y adaptación al entorno.

2. Antecedente directo

En un trabajo previo (Rodríguez-Kessler, M., et al., 2012), se identificaron genes inducidos en la fase dimórfica del hongo *U. maydis* mediante una biblioteca substractiva. Se aisló al gen *UmRrm75*, el cual presentó una mayor expresión en la fase micelial del hongo. Se encontró que su organización genómica de *UmRrm75* contiene cuatro intrones y cinco exones con un total de 2117 nucleótidos ubicados en el cromosoma 7. El ORF del gen *UmRrm75* está constituido por 1791 nucleótidos, el cual genera una proteína de 596 aminoácidos. Asimismo, se identificó una secuencia de splicing alternativo, la cual presentó una versión más pequeña en su ORF de 1545 nucleótidos, perdiendo un fragmento de 246 nt del tercer exón, que corresponden a 82 aminoácidos del primer dominio RRM de la *UmRrm75*. Cabe señalar que los 82 aminoácidos perdidos representan una región única encontrada en la proteína *UmRrm75* de *U. maydis* (Rodríguez-Kessler, M., et al., 2012). La proteína *UmRrm75* muestra una alta similitud con genes que codifican para proteínas con motivos de reconocimiento de ARN, de tipo RRM. La proteína *UmRrm75* está organizada estructuralmente en cuatro dominios que consisten en una región N-terminal con repeticiones ricas en serina/arginina y repeticiones de arginina/ácido aspártico, seguida de tres motivos de reconocimiento de ARN de tipo RRM. Además, de residuos ricos en glicina los cuales están presentes en repeticiones como GGX y GGGX (**Figura 6A**).

Se generaron cepas mutantes nulas del gen *UmRrm75* en diferentes fondos genéticos del hongo *U. maydis*. Dichas mutantes evidenciaron severas alteraciones fenotípicas, como un crecimiento lento tanto en medio líquido como en sólido, una morfología de la colonia de tipo dona cuando crece en medio sólido, afectaciones en la formación del segundo septo, reducción del “mating” y del crecimiento del filamento post-mating, así como reducción en la virulencia de las mutantes en plantas de maíz (**Figura 6B-C**; Rodríguez-Kessler, M., et al., 2012).

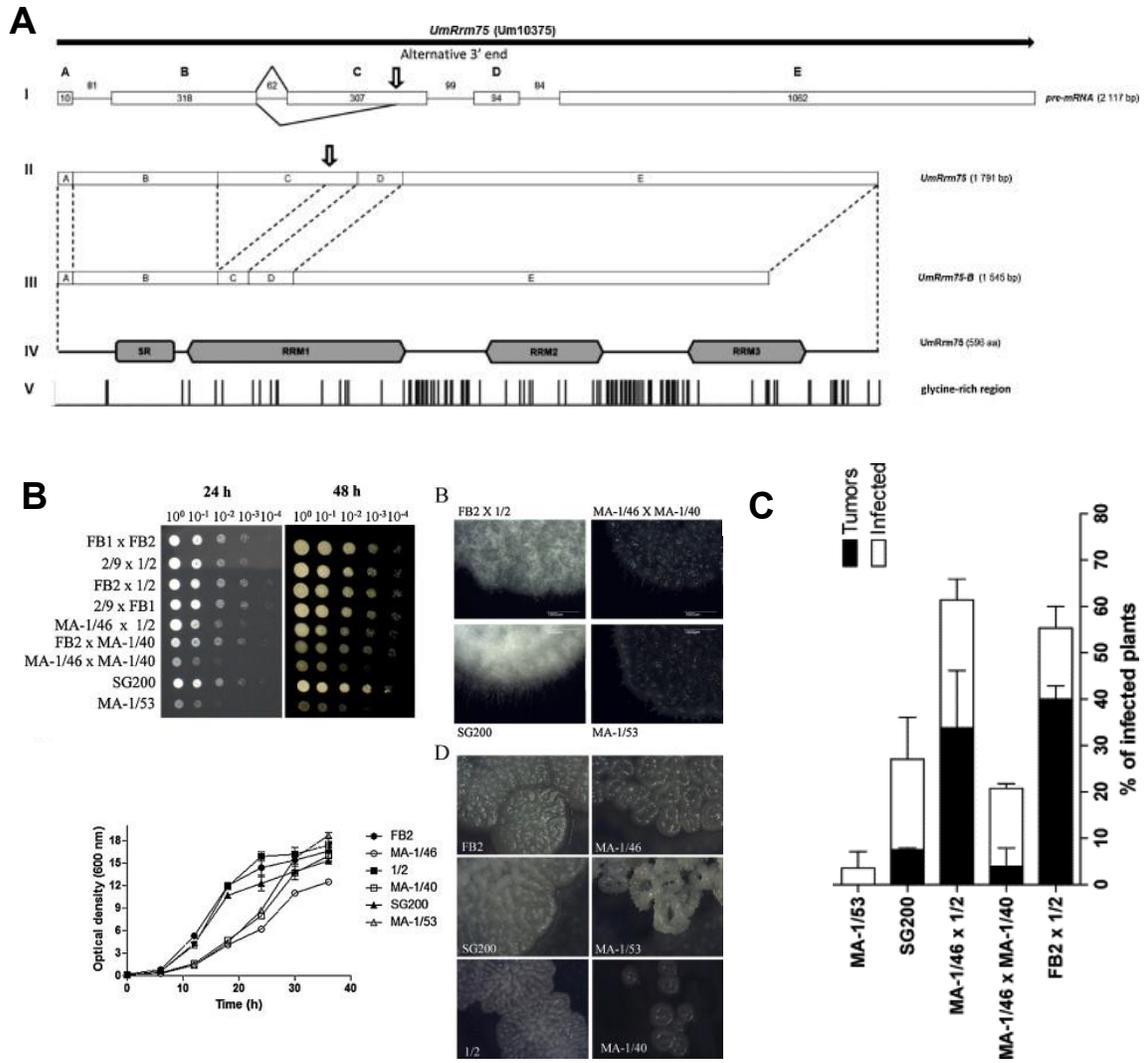


Figura 6. Organización genómica del gen *UmRrm75* y fenotipo de las mutantes nulas $\Delta UmRrm75$ en *Ustilago maydis*.

A) Organización genómica del gen *UmRrm75*. **B)** Afectaciones fenotípicas de las mutantes del gen *UmRrm75* en *U. maydis*. **C)** Reducción del porcentaje de virulencia de las cepas mutantes del gen *UmRrm75*. La imagen fue tomada Microbiol. Res. Volume 167, Issue 5, 20 May 2012, Pages 270-282. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.micres.2011.10.007>

3. Justificación

El proceso de transición morfológica del hongo *Ustilago maydis* de levadura a micelio está implicado en la habilidad de causar la enfermedad característica de tumores en el maíz y teosintle, denominada huitlacoche o carboncillo. Debido a este tipo de vida dimórfico, así como la patogenicidad dependen de la expresión específica de genes involucrados en la diferenciación celular del hongo.

En nuestro grupo de trabajo identificamos en el hongo dimórfico *U. maydis* al gen *UmRrm75*, el cual codifica para una proteína de unión a ARN de tipo RRM y repetidos ricos en serina/arginina. La proteína UmRrm75 presenta características similares a otras proteínas del tipo SR con dominios de unión a ARN de tipo RRM, las cuales están involucradas en la regulación, procesamiento y exportación del ARN. Afectaciones en el crecimiento y patogenicidad fueron observadas en cepas mutantes del gen *UmRrm75*, posicionándolo como un gen relevante para el crecimiento, desarrollo y patogenicidad del hongo. Por tal motivo, nuestro objetivo en este trabajo fue continuar con la caracterización bioquímica, molecular y funcional del gen *UmRrm75* en el hongo *U. maydis*.

4. Objetivo

Objetivo general

Caracterizar bioquímica, molecular y funcionalmente de las mutantes nulas del gen *UmRrm75* de *Ustilago maydis*.

Objetivos específicos

- 1.- Determinar de la actividad de chaperona de ARN de la proteína UmRrm75 en un modelo heterólogo de bacteria.
- 2.- Cuantificar la expresión del gen *UmRrm75* en condiciones de estrés por temperatura.
- 3.- Evaluar del crecimiento de colonia en medio solido de las mutantes nulas $\Delta UmRrm75$ bajo estrés por temperatura.
- 4.- Evaluar el efecto de la aplicación exógena de peróxido de hidrogeno en el crecimiento en medio solido de las cepas mutantes $\Delta UmRrm75$.
- 5.- Cuantificar la producción de peróxido de hidrogeno en las cepas mutantes $\Delta UmRrm75$.
- 6.- Cuantificar la expresión del gen *UmYap1* que codifica para un factor de transcripción en las cepas mutantes $\Delta UmRrm75$.
- 7.- Determinar la actividad enzimática catalasa en las cepas mutantes $\Delta UmRrm75$.
- 8.- Visualizar macroscópicamente los peroxisomas en las cepas mutantes $\Delta UmRrm75$ y parentales de *U. maydis*.

9.- Evaluar el efecto de la aplicación exógena de ácido bórico en el crecimiento en medio sólido de las cepas mutantes $\Delta UmRrm75$.

10.- Evaluar el fenotipo de complementación del gen *UmRrm75* de *U. maydis* en el fondo mutante $\Delta ScHrb1$ de *Saccharomyces cerevisiae*.

11.- Determinar la localización sub-celular de la proteína UmRrm75 en el hongo *U. maydis*.

Capítulo 1

En hongos existen pocos estudios sobre proteínas de unión a ARN (RBPs); sin embargo, en el hongo dimórfico *Ustilago maydis* se han obtenido datos muy interesantes sobre RBPs que están implicadas en el crecimiento, morfología, patogenicidad y respuesta a estrés. Previamente se identificó en el hongo dimórfico *U. maydis* al gen *UmRrm75* que se induce en la forma micelial del hongo. Se encontró que este gen codificaba para una proteína RBP del tipo RRM, con tres motivos de unión a ARN y repetidos de glicina entre cada motivo RRM. La generación de mutantes del gen *UmRrm75* generaron cepas con diversas afectaciones en crecimiento, apareamiento y patogenicidad (Rodríguez-Kessler, M., et al., 2012).

En este estudio, nosotros determinamos que la expresión del gen *UmRrm75* se induce bajo condiciones de estrés por una temperatura, a 15°C y 37°C. Encontramos que las cepas mutantes $\Delta UmRrm75$ fueron más sensibles a las temperaturas de 15°C y 37°C, mostrando un menor crecimiento que la cepa parental. Además, encontramos que la proteína UmRrm75 tiene actividad de chaperona mediante un sistema heterólogo *Escherichia coli*. Las cepas mutantes $\Delta UmRrm75$ acumulan melanina y especies reactivas de oxígeno. Comprobamos mediante el análisis de la expresión del factor de transcripción *UmYap1*, gen involucrado en la activación del sistema de desintoxicación en el hongo, los niveles de transcrito se encontraban altamente expresados en las cepas mutantes $\Delta UmRrm75$. Por tal motivo, se realizó la cuantificación de la enzima catalasa, mostrando una mayor concentración en las cepas mutantes $\Delta UmRrm75$ que en las parentales. Mediante un análisis por microscopia electrónica de transmisión fue posible identificar acumulación de la enzima catalasa en los peroxisomas.

Nosotros observamos en las mutantes $\Delta UmRrm75$ una mayor expresión del gen *UmPex3*, un factor de la biogénesis de peroxisomas, lo que correlaciona con el aumento de peroxisomas en dichas mutantes. En suma, estos resultados muestran que la interrupción del gen *UmRrm75* provoca una acumulación de

H₂O₂, peroxisomas y melanina, lo que podría explicar el porqué de las afectaciones en el crecimiento y patogenicidad reportadas para las mutantes *ΔUmRrm75*.

Este trabajo fue publicado en la revista Scientific Reports como un artículo de investigación original titulado:

“The *Ustilago maydis* null mutant strains of the RNA-binding protein UmRrm75 accumulate hydrogen peroxide and melanin”

Alma Laura Rodríguez-Piña, Margarita Juárez-Montiel, Itzell Eurídice Hernández-Sánchez, Aída Araceli Rodríguez-Hernández, Elihú Bautista, Alicia Becerra-Flora, Edgar Oliver López-Villegas & Juan Francisco Jiménez-Bremont

<https://doi.org/10.1038/s41598-019-47133-4>

Capítulo 2

En eucariotas, el transporte de ARNm del núcleo al citosol podría ejecutarse a través de una gran cantidad de proteínas que participan en este proceso. Para esto, las células regulan la expresión de proteínas en el tiempo y en el espacio específico. Luego, el ARNm se acumula en un sitio específico para una expresión correcta. La familia de proteínas de tipo SR (serina-arginina) con motivos de unión a ARN o RBPs han sido implicadas en muchos pasos del metabolismo del ARNm en eucariotas y se describen como proteínas relacionadas en el empalme, la exportación nuclear y regulación en la traducción (Zhong X. Y., et al., 2009; Shepard, P. J., y Hertel, K. J. 2009).

En trabajos anteriores, aislamos el gen *UmRrm75* de *U. maydis* el cual codifica para una proteína de unión a RNA de tipo RRM (Rodríguez-Kessler, M., et al., 2012). Recientemente demostramos que la mutante del gen $\Delta UmRrm75$ presenta un fenotipo de estrés el cual se refleja en la acumulación de melanina y peróxido (Rodríguez-Piña A. L., et al., 2019). Considerando que la proteína UmRrm75 evidencia un alto porcentaje de identidad con las proteínas del tipo SR del modelo *S. cerevisiae*, decidimos comprobar la posible ortología del gen *UmRrm75*, utilizando como estrategia la complementación de la mutante $\Delta ScHrb1$ de *S. cerevisiae*.

5. Resultados

La proteína UmRrm75 de *Ustilago maydis* presenta homología con la proteína ScHrb1 de *Saccharomyces cerevisiae*

Un análisis BLAST de la secuencia de aminoácidos de la proteína UmRrm75 nos demostró que la proteína se encuentra altamente relacionada a otras proteínas identificadas en las diferentes especies de Ustilaginales, las cuales están relacionadas a la proteína de unión a ARN HRB1-Poly (A+). En la **Figura 1** se muestra un análisis clustal de la proteína UmRrm75 con las proteínas de *Moesziomyces antarcticus*, *Ustilago trichophora*, *Sporisorium reilianum*, *Moesziomyces aphidis*, *Ustilago bromivora* y *Ustilago hordei*. Cada proteína seleccionada ha sido descrita en el NCBI, como proteínas relacionado con la proteína de unión a ARN HRB1-Poly (A+), involucrada en la exportación de ARNm desde el núcleo al citoplasma. Los resultados mostraron que las 6 proteínas de Ustilaginales seleccionadas, incluyendo la UmRrm75 de *U. maydis*, poseen tres dominios de unión a ARN de tipo RRM (**Figura 1**, sombreado amarillo), además de la secuencia consenso WQ-X-LKD (Línea roja). Esta secuencia, WQ-X-LKD, se encuentra altamente conservada en las proteínas de tipo SR y está involucrado en el reconocimiento del ARN (Martínez-Lum., et al., 2016).

Nuestro siguiente análisis fue comparar a la proteína UmRrm75 con las de proteínas SR como ScHrb1, ScGbp2 y ScNlp3 de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* mediante un alineamiento con el programa Cobalt del NCBI. Los resultados mostraron que las tres proteínas ScHrb1, ScGbp2 y UmRrm75 poseen tres dominios de unión a ARN de tipo RRM (**Figura 2A**, sombreado amarillo), así como un dominio rico en serina/arginina (SR) arginina/glicina/glicina (RGG) en el extremo amino (**Figura 2A**, sombreado amarillo). Para el caso de ScNlp3, esta proteína presenta solo dos dominios de tipo RRM conservados con las otras tres proteínas ScHrb1, ScGbp2 y UmRrm75. A diferencia de las proteínas ScHrb1, ScGbp2 y UmRrm75, la proteína ScNlp3 presenta en el extremo carboxilo un dominio serina/arginina arginina/glicina/glicina (SR/RGG) y en el extremo amino

repetidos de alanina/prolina/glutamina/glutámico (APQE). Además, se identificó los motivos RNP1 y RNP2 conservados para cada dominio RRM en las cuatro proteínas (**Figura 2A**, línea verde). Adicionalmente fue posible identificar la secuencia consenso WQ-X-LKD (Línea roja) en las cuatro proteínas, ScHrb1, ScGbp2, ScNpl3 y UmRrm75. En cuanto al porcentaje de identidad, la proteína UmRrm75 de *U. maydis* presentó un 47.35% y un 46.27% con ScHrb1 y ScGbp2 respectivamente, mientras que para la proteína ScNpl3 solo hubo un 26.45% (**Figura 2B**).

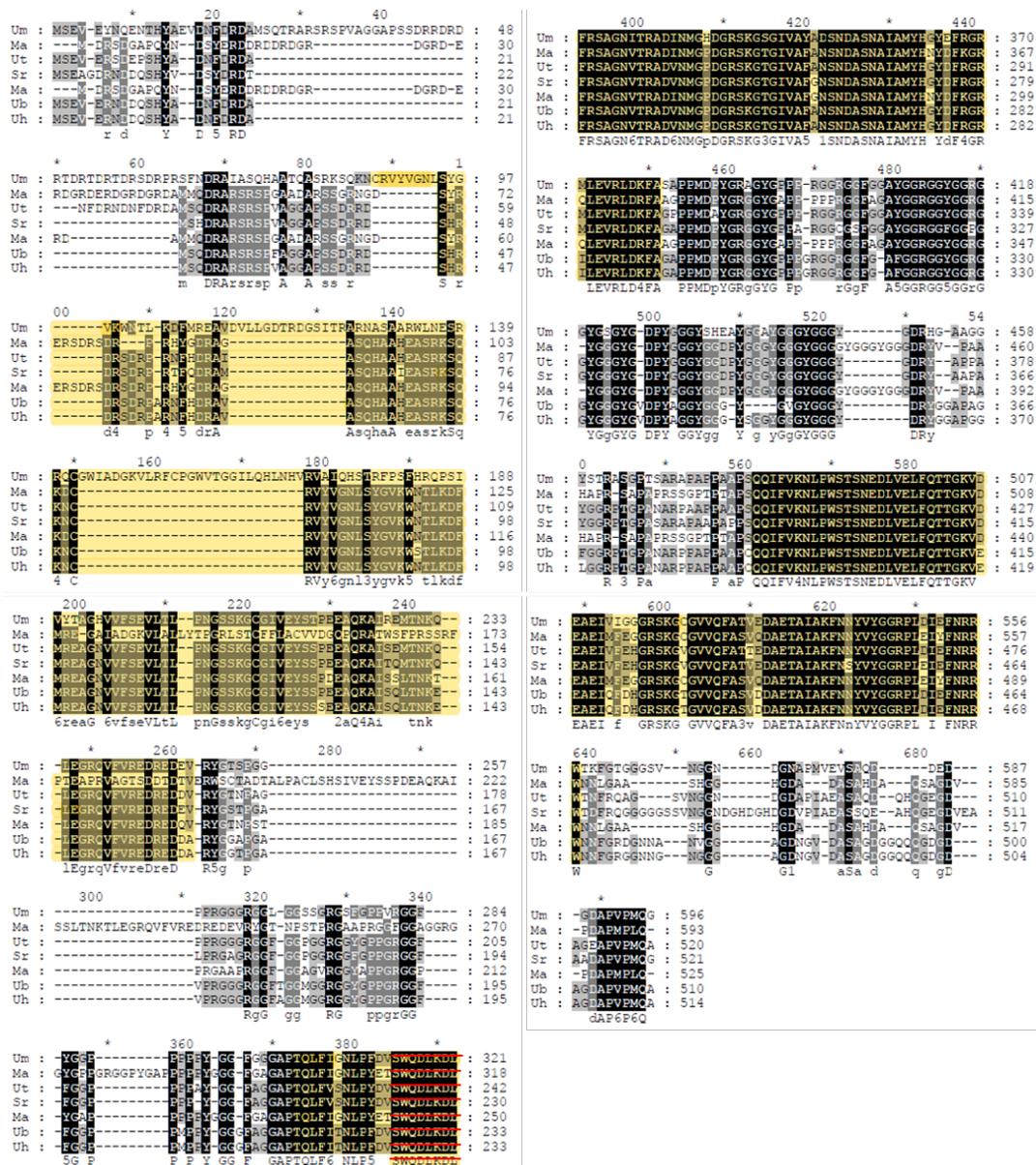


Figura 1. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de la proteína UmRm75 con otras especies de Ustilaginales. Alineamiento de múltiples secuencias de aminoácidos de las proteínas de tipo Hrb1-Poly(A+) RNA-binding protein, identificadas en las diferentes especies de Ustilaginales, incluyendo a la proteína UmRm75. *Ustilago maydis* *Um*, UMAG_10375; *Moesziomyces antarcticus* *Ma*, GAC75925; *Ustilago trichophora* *Ut*, SPO23888; *Sporisorium reilianum* *Sr*, CBQ73484; *Moesziomyces aphidis* *Ma*, ETS61994; *Ustilago bromivora* *Ub*, SAM82195; *Ustilago hordei* *Uh*, CCF52678.

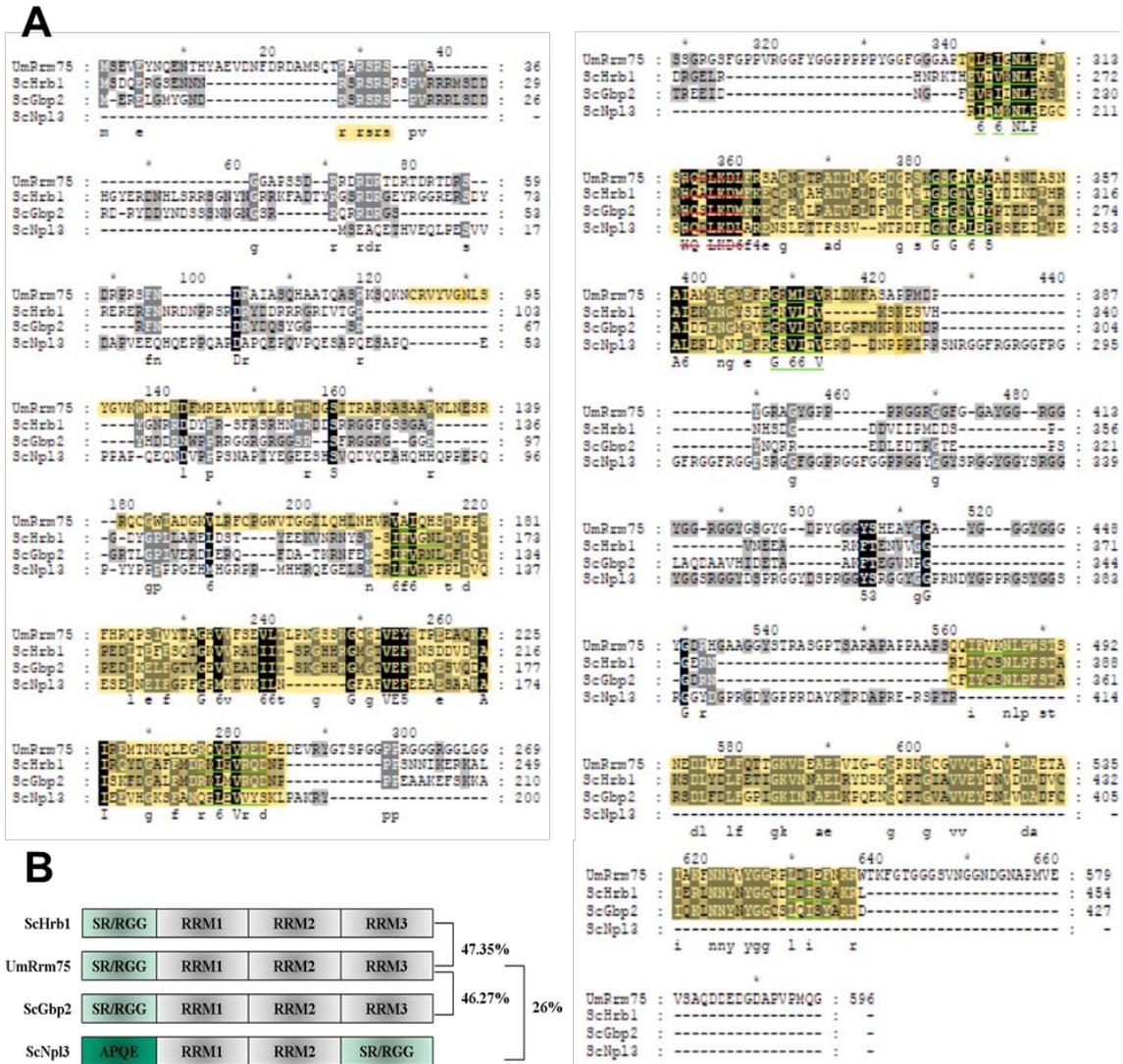


Figura 2. Alineamiento de las secuencias de la proteína UmRrm75 con las secuencias de las proteínas de tipo SR de *Saccharomyces cerevisiae*.

A) El alineamiento de las secuencias fue llevado a cabo mediante el programa Cobalt del NCBI, utilizando los parámetros predeterminados por el programa. Con los siguientes número de acceso para cada secuencia, UmRrm75, UMAG_10375; ScHrb1, YNL004W; ScGbp2, YCL011C y ScNpl3 YDR432W. Se muestra en sombreado amarillo el inicio y termino de cada motivo RRM identificado en las 4 proteínas, así como la región rica en SR (serina/arginina) en el extremo amino terminal. El dominio RNP1 y RNP2 ha sido marcado con una línea color verde al inicio y final de cada dominio RRM de dichas proteínas, y finalmente con una línea roja se ha identificado la secuencia consenso WQ-X-

LKD. **B)** Se muestra el porcentaje de identidad entre cada proteína de tipo SR de *S. cerevisiae* y la proteína UmRrm75 de *U. maydis*.

Ensayo de sensibilidad a boro en la mutante $\Delta UmRrm75$ de *Ustilago maydis*.

Con base a los resultados obtenidos en los análisis de secuencia, dónde encontramos que la proteína UmRrm75 podría ser un ortólogo de la proteína ScHrb1 de *S. cerevisiae*, y a los datos publicados por Nozawa y colaboradores (2006) donde observan que la mutante del gen $\Delta ScHrb1$ presenta sensibilidad a la aplicación exógena de boro, nosotros realizamos un ensayo de sensibilidad al ácido bórico para la mutante $\Delta UmRrm75$. Para ello, pusimos diluciones de las cepas $\Delta UmRrm75$ y FB2 (parental) de *U. maydis* en medio solido con 0 y 90 mM de ácido bórico durante 10 días a una temperatura de 28°C. En la **Figura 3**, nosotros observamos que la cepa mutante $\Delta UmRrm75$ presenta un menor crecimiento en el medio con 90 mM de ácido bórico en comparación al medio sin boro.

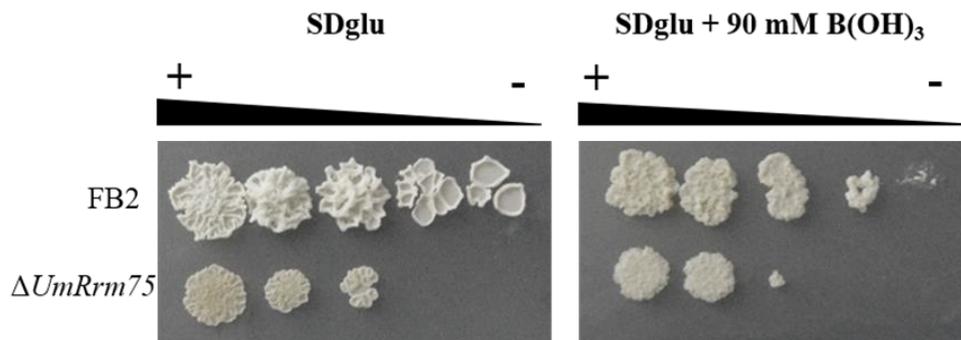


Figura 3. Ensayo de sensibilidad con ácido bórico en la mutante $\Delta UmRrm75$ de *U. maydis*

Cepa parental FB2 y su mutante $\Delta UmRrm75$ de *U. maydis*. Las cepas fueron crecidas en medio líquido CM, hasta llegar a una fase logarítmica y después ajustadas a una OD₆₀₀ de 0.7. Un volumen total de 4μL de cada cepa fueron goteados en placas con medio solido CM suplementado con 90 mM de ácido bórico y sin ácido bórico como placa control. Las placas se incubaron a una temperatura de 28°C por un período de 10 días.

Complementación funcional de la mutante $\Delta ScHrb1$ con el gen $UmRrm75$ de *Ustilago maydis*

Los análisis de la secuencia de la proteína UmRrm75 y el ensayo de sensibilidad a boro en la mutante $\Delta UmRrm75$ de *U. maydis*, nos sugieren que el gen $UmRrm75$ podría revertir el fenotipo de sensibilidad a boro observado en la mutante $\Delta ScHrb1$ de *S. cerevisiae*. Con el objetivo de comprobar esta hipótesis, nosotros generamos el plásmido pYES-UmRrm75, el cual contiene el marco de lectura abierto (ORF) del gen $UmRrm75$ bajo el promotor inducible por galactosa GAL1. El plásmido pYES-UmRrm75 se transformó en la cepa mutante $\Delta ScHrb1$, y como control se transformó el plásmido vacío pYES en la parental BY4741. Para realizar el ensayo de sensibilidad a boro, las cepas complementantes ScHrb1-Rrm75-1 y ScHrb1-Rrm75-2, la mutante $\Delta ScHrb1$ y la cepa parental BY4041 fueron goteadas en diluciones seriadas en placas con medio de selección (SD-ura), suplementadas con galactosa, con y sin 90 mM de ácido bórico a 28°C. Como control, el ensayo de sensibilidad con ácido bórico también se realizó en medio SD-ura suplementado con glucosa (**Figura suplementaria 1**).

En la **Figura 4**, al primer día de incubación se observó un crecimiento lento de la cepa $\Delta ScHrb1$ en el medio control (sin ácido bórico), en comparación con la parental BY4141, e incluso con las cepas complementantes ScHrb1-Rrm75-1 y ScHrb1-Rrm75-2. Para el caso de las placas adicionadas con 90 mM de ácido bórico, después de 5 días de incubación se observó el crecimiento hasta la última dilución de las cepas complementantes ScHrb1-Rrm75-1 y ScHrb1-Rrm75-2 y la parental BY4141, pero no para la mutante $\Delta ScHrb1$. A los 15 días de incubación en el medio adicionado con boro, las cepas complementantes ScHrb1-Rrm75-1 y ScHrb1-Rrm75-2 y parental BY4741, presentaron un crecimiento robusto en todas las diluciones, al contrario de la cepa $\Delta ScHrb1$, la cual, aunque creció hasta su última dilución, evidenció un crecimiento más lento y menor. Estos resultados muestran que el gen $UmRrm75$ de *U. maydis* cura el fenotipo de sensibilidad a boro reportado para la mutante $\Delta ScHrb1$, lo que confirma que el gen $UmRrm75$ es un ortólogo funcional del gen $ScHrb1$ de *S. cerevisiae*.

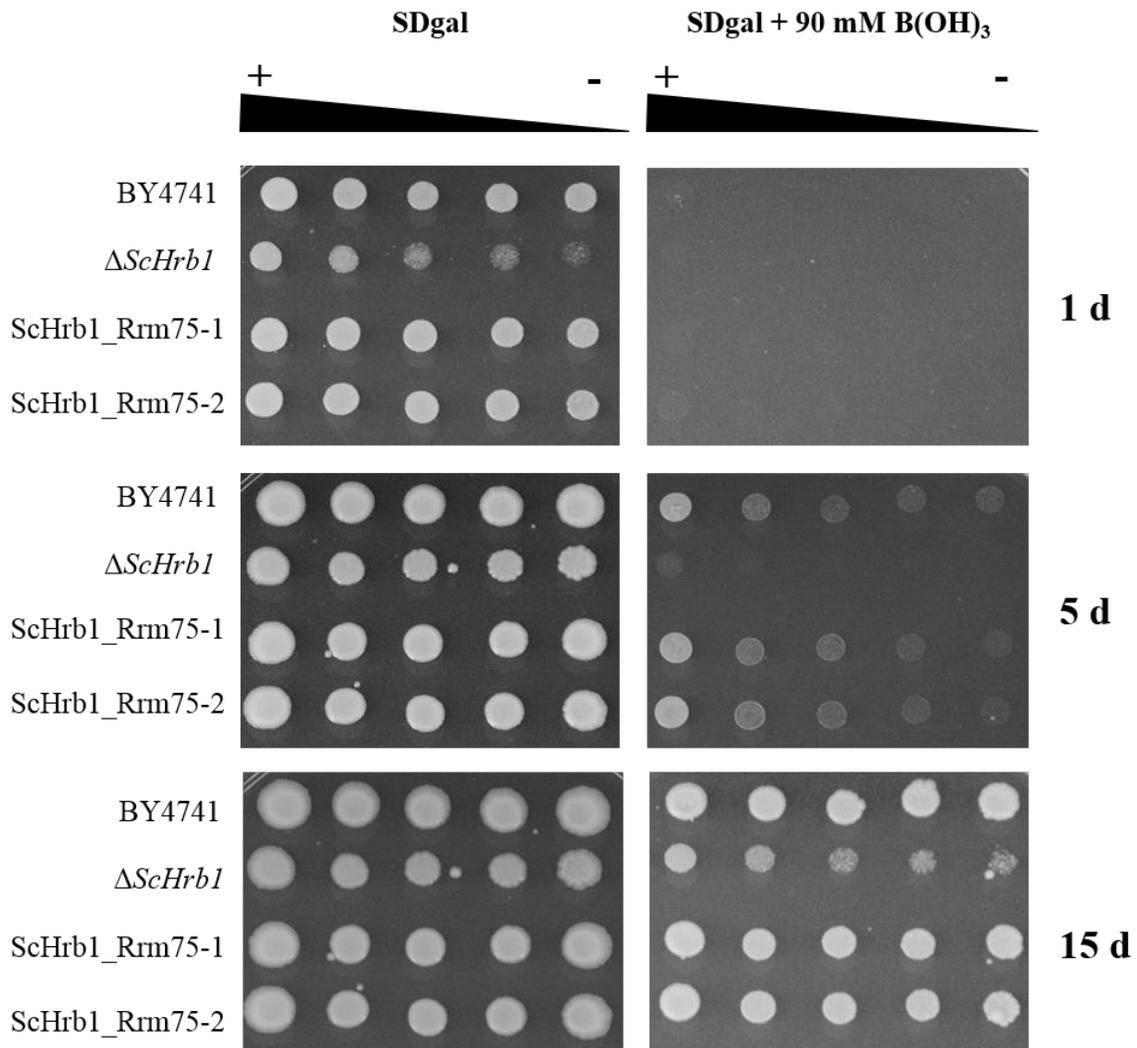


Figura 4. Ensayo de sensibilidad a boro en la cepa mutante $\Delta ScHrb1$ de *S. cerevisiae* complementada con gen *UmRrm75* de *U. maydis*

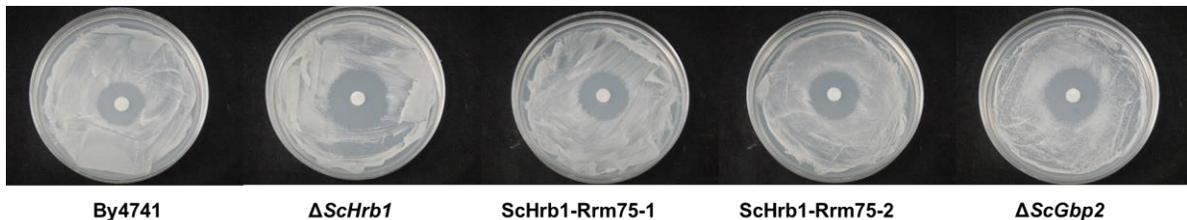
Diluciones seriadas de cada cepa complementada, mutante y parental de *S. cerevisiae* fueron goteadas en medio de selección SD + galactosa y 90 mM de boro. Incubadas a una temperatura de 28°C por un periodo de 15 días. Cada imagen mostrada en esta figura es la representación de tres replicas independientes.

Ensayo de sensibilidad a H₂O₂ en la mutante $\Delta ScHrb1$ de *S. cerevisiae*

Recientemente reportamos que la mutante $\Delta UmRrm75$ de *U. maydis* es sensible a la adición de H₂O₂ en medio sólido (Rodríguez-Piña et al., 2019). Con el objetivo de realizar el mismo ensayo de sensibilidad en la cepa mutante $\Delta ScHrb1$ y

complementantes ScHrb1-Rrm75-1 y ScHrb1-Rrm75-2 de *S. cerevisiae*, crecimos las cepas a 28°C en un medio de selección SD suplementado con galactosa con un disco de difusión con 3 μ L H₂O₂ en el centro de la placa. Después de cuatro días de incubación observamos que la mutante Δ ScHrb1 presentaba un halo de inhibición mayor (30mm), en comparación a la parental (25 mm) y la mutante Δ ScGbp2 (25 mm) (**Figura 5**). Para el caso de las cepas complementantes ScHrb1-Rrm75-1 y ScHrb1-Rrm75-2 encontramos que el halo de inhibición fue 26 mm, evidenciando una tolerancia al H₂O₂ similar a la cepa parental (**Figura 5**). Estos datos nos indican que el fenotipo de sensibilidad al H₂O₂ encontrado en la mutante Δ ScHrb1 pudo ser revertido mediante la complementación con el gen *UmRrm75* de *U. maydis*.

A



B

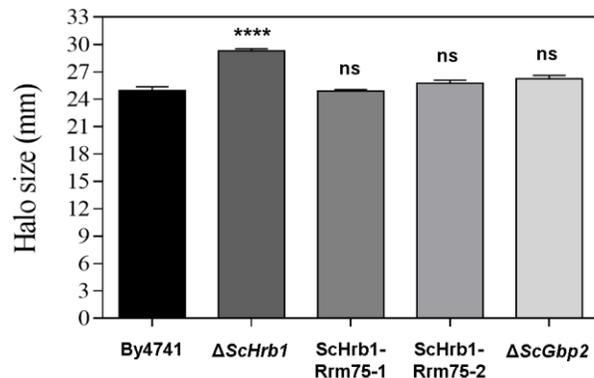


Figura 5. Ensayo de sensibilidad H₂O₂ en la cepa mutante Δ ScHrb1 y las cepas complementantes ScHrb1-Rrm75-1 y ScHrb1-Rrm75-2.

A) El ensayo de sensibilidad se realizó mediante la adición de un disco de difusión mojado con 3 μ L de peróxido de hidrógeno (30% v/v) en placas con medio SD-ura. **B)** Halo de inhibición cuantificado con la medición del diámetro de crecimiento en mm de cada cepa

utilizada en este ensayo. Los datos representan el error estándar de la media de n=20 y se consideraron significativo $P < 0.001$. Los asteriscos indican una diferencia significativa según el Análisis de Varianza Unidireccional (ANOVA).

Localización sub-celular de la proteína UmRrm75 de *Ustilago maydis* en células en forma de levadura y micelio

Para conocer la ubicación sub-celular de la proteína UmRrm75, realizamos una fusión traduccional del gen *UmRrm75* con el gen reportero GFP (proteína verde fluorescente) y un gen de resistencia a Nat. Este vector UmRrm75::GFP_Nat fue transformado en las cepas FB2, AB33 y mutante $\Delta UmRrm75$ mediante una recombinación. Para verificar la inserción de una sola copia de *UmRrm75*::GFP, se realizó un análisis Southern utilizando ADN genómico de tres transformantes *UmRrm75*::GFP-11, -12, -13 y FB2 WT. En la **Figura 6A** se observan los patrones de digestión del DNA de las cepas FB2-Rrm75::GFP (11, 12 y 13) digeridas con las enzimas de restricción Sac1-BamH1. Los fragmentos de 7.8 kb y 3.9 kb indican una única y correcta inserción del gen en cada cepa seleccionada como positiva. Así mismo realizamos un análisis tipo Western, utilizando lisados de células completas de la cepa FB2-Rrm75::GFP-12 y una fusión de la cepa FB2 con la proteína GFP bajo un promotor constitutivo, FB2-Otef-GFP, como control. En la **Figura 6B** se observa que la cepa FB2-Rrm75::GFP-12 hibrida con una banda arriba los 93kDa que corresponde al tamaño de la proteína UmRrm75 (66.26kDa) más la fusión de la GFP (30kDa) tanto en condiciones con y sin H₂O₂.

Una vez seleccionadas las cepas correctamente transformadas, realizamos el análisis de microscopía. La **Figura 7A** muestra el crecimiento de las diluciones seriadas de las cepas mutantes $\Delta UmRrm75$ en los fondos FB2 y AB33, así como las cepas que expresan UmRrm75::GFP en los fondos mutantes $\Delta UmRrm75$ -FB2 y $\Delta UmRrm75$ -AB33. Este experimento se hizo con el objetivo de demostrar que la fusión de la GFP con la UmRrm75 no afectó su actividad, por lo que se observó que la expresión de las fusiones *UmRrm75*::GFP curan el fenotipo de lento crecimiento reportado para las cepas mutantes $\Delta UmRrm75$ (Rodríguez-Kessler et

al., 2012). El análisis de microscopia se llevó a cabo con las cepas FB2-Rrm75::GFP y AB33-Rrm75::GFP, el cual reveló que la señal fluorescente de la fusión *UmRrm75::GFP* se encuentra en el núcleo de las células de levadura (**Figura 7B**). Como control de señal nuclear utilizamos a la cepa FB2 fusionada con el gen *mex67* y la proteína reportera mKate2, FB2-mex6::mKate2. En la **Figura 7C** se muestra las señales de las proteínas *UmRrm75::GFP* y *mex67::mKate2* que co-localizan en el núcleo de las levaduras en el fondo FB2. Finalmente, analizamos a la cepa AB33-Rrm75::GFP durante el crecimiento micelial, encontrando la señal de fluorescencia de GFP en el núcleo de las hifas, lo cual fue corroborado mediante la tinción del núcleo con el reactivo de DAPI (**Figura 7D**). Estos resultados muestran que la proteína *UmRrm75* está localizada en los núcleos de las células de levadura e hifas de *U. maydis*.

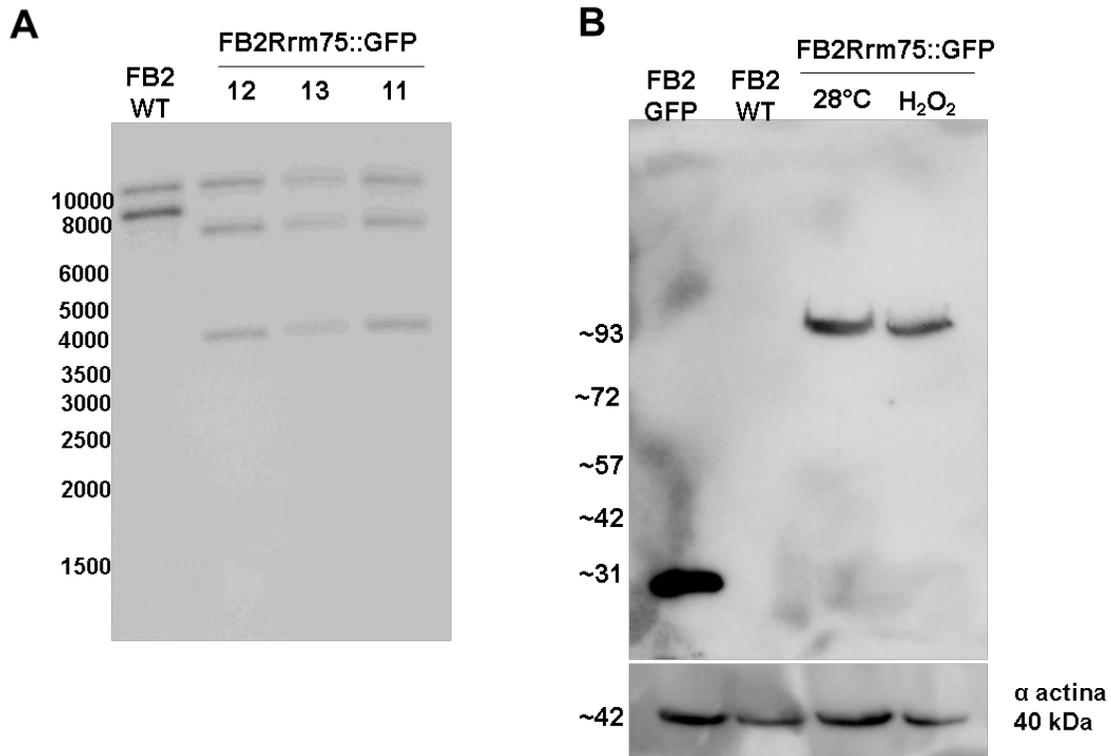


Figure 6. Comprobación de la fusión UmRrm75-GFP en extractos de células de la cepa FB2.

A) Verificación de una solo copia en la cepa FB2 transformada con la fusión *UmRrm75::GFP*, mediante análisis de Southern. El AND genómico fue digerido con las enzimas de restricción Sac1- BamH1 y fraccionado en un gel de agarosa de 0.8 %. Fragmentos esperados FB2 (WT) 9.4 kb; FB2-Rrm75::GFP 7.8 kb y 3.9 kb **B)** Análisis de Western blot de la líneas FB2::GFP y FB2-Rrm75::GFP. Se utilizaron extractos celulares de las cepas FB2 WT, FB2::GFP y FB2-Rrm75-GFP esta última en condiciones con y sin H₂O₂ a 28°C. Cantidades iguales de proteína de cada cepa fueron separadas mediante un gel SDS-PAGE y se detectó a la fusión de *UmRrm75::GFP* usando anticuerpo anti-GFP. El peso molecular esperado es 30 kDa para GFP, 96.26 kDa para *UmRrm75::GFP* y 42 kDa para actina.

Localización sub-celular de la fusión *UmRrm75::GFP* en las cepas FB2 y AB33. La fusión de GFP se observó bajo un microscopio de fluorescencia. Las imágenes muestran una localización nuclear enriquecida de *UmRrm75::GFP*. **C)** Co-localización nuclear de la proteína UmRrm75 y mex67 en la cepa FB2. Las imágenes muestran la co-localización de la señal de las fusiones *UmRrm75::GFP* (verde) y mex67-mKate2 (roja) en el núcleo de lavadura. **D)** Localización nuclear de la proteína UmRrm75 en hifas de la cepa AB33. Las imágenes muestran la fusión *UmRrm75::GFP* en la cepa AB33 co-localizada con DAPI en el núcleo de la hifa.

6. Discusión General

En los hongos, las proteínas de unión al ARN (RBP) están involucradas en el crecimiento, el desarrollo, la morfología, la patogenicidad y la respuesta al estrés (Fang, W., y St. Leger, R. J., 2010; Kim, H. J., 2014). Se ha reportado que los hongos son capaces de adaptarse y superar temperaturas extremas (Magan, N., 2007). Sin embargo, los mecanismos moleculares, y en particular el papel de las proteínas de unión al ARN bajo estrés por temperatura, no se han explorado completamente (Aguilera, J., et al., 2007). En bacterias, existe evidencia de que las RBPs de choque térmico (CSP) tienen una actividad de chaperona de ARN en condiciones de estrés, desempeñando un papel importante en la regulación post-transcripcional de genes que participan en la adaptación y supervivencia en condiciones de estrés por temperatura (Chaikam, V., y Karlson, D, 2008).

Nosotros demostramos que la proteína UmRrm75 de *Ustilago maydis* presenta actividad de chaperona de ARN en un sistema heterólogo de *E. coli*, el cual ha sido utilizado para demostrar la actividad de chaperona para otras RBPs de plantas (Kim, J. Y., et al., 2007; Kwak, K. J., et al., 2011; Melencion, S. M. B., et al., 2017). Con este dato, nosotros proporcionamos evidencia relevante sobre el posible papel de la proteína UmRrm75 de *U. maydis*, como chaperona de ARN en un sistema heterólogo. Asimismo, encontramos que las cepas mutantes $\Delta UmRrm75$ presentaron una mayor sensibilidad bajo las temperaturas de 15°C y 37°C, incluso a la temperatura óptima de 28°C su crecimiento fue más lento que el de las cepas parentales. Lo anterior se refuerza, con la inducción del gen *UmRrm75* en la cepa parental FB2 crecida a las temperaturas 15°C y 37°C. Mediante un análisis espectroscópicos y espectrométricos, UV-Vis, IR y ESI-MS demostramos que la acumulación de pigmento en la cepas mutantes $\Delta UmRrm75$, es melanina, la cual se ha identificado como un compuesto que se acumula en respuesta al estrés en diferentes hongos contribuyendo a la capacidad de supervivencia del hongo en ambientes hostiles, tolerancia a la desecación y temperaturas extremas, así como un protector contra el estrés oxidativo y la

radiación UV. (Jacobson, E. S., et al., 1995; Dadachova, E., y Casadevall, A., 2008; Gonçalves, R. C. R., et al., 2012)

Diferentes estudios en hongos, como en muchos otros organismos aeróbicos, han evidenciado que una de las primeras respuestas de desintoxicación celular contra la acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS), es la activación de enzimas antioxidantes, como la superóxido dismutasa (SOD) y la catalasa (CAT), las cuales juegan un papel clave en la eliminación de ROS (Krumova, E. Z., et al., 2009 y Belozerskaya, T. A., et al., 2012). Nosotros encontramos que la mutante $\Delta UmRrm75$ mostró una mayor actividad de la enzima catalasa (CAT), en comparación con la parental, lo que nos podría estar indicando que los niveles de H_2O_2 podrían ser más altos en las mutantes $\Delta UmRrm75$. Por ello, al aplicar exógenamente la enzima CAT a las cepas mutantes $\Delta UmRrm75$ logramos reducir los niveles de H_2O_2 . En este sentido, también observamos peroxisomas en las cepas mutantes $\Delta UmRrm75$ al ser crecidas a $28^\circ C$, fenotipo que coincidió con la inducción de la expresión del gen *UmPex3* de las cepas mutantes $\Delta UmRrm75$. El gen *UmPex3* codifica para un factor de biogénesis de membrana peroxisomal (Camões, F., et al., 2015), lo que sugiere una mayor generación de peroxisomas de novo en las cepas mutantes $\Delta UmRrm75$. Una tinción con el reactivo DAB evidencio que el H_2O_2 estaba siendo acumulado dentro de los peroxisomas. Schrader y Fahimi (2006) describen que los peroxisomas, participa tanto en la producción como en la acumulación de ROS, particularmente de H_2O_2 . Lo que nos llevó a proponer que la proliferación de peroxisomas en la cepa mutante $\Delta UmRrm75$ es parte de la respuesta de eliminación del ROS por parte del hongo *U. maydis*.

En levaduras como *Saccharomyces cerevisiae* se ha identificado al gen *ScYap1*, un factor de transcripción, el cual controla la vía de desintoxicación en las células, funcionando como sensor redox. En *U. maydis* el gen *UmYap1*, también participa en la destoxificación de las células, y es requerido para la virulencia del hongo (Molina, L., y Kahmann, R., 2007). Los altos niveles de expresión del gen *UmYap1* encontrados en las cepas mutante $\Delta UmRrm75$, nos confirmaron que el sistema

anti-ROS está activo, pero insuficiente para aliviar el fenotipo de estrés encontrado en las cepas mutantes $\Delta UmRrm75$.

En organismos como los hongos, se sabe que componentes específicos de la maquinaria de transcripción, por ejemplo proteínas de unión a ARN (RBPs) de tipo RRM están muy relacionados en procesos fundamentales como el crecimiento, desarrollo, morfología y patogenicidad (Glisovic, T., et al., 2008; Fang, W. y St. Leger, RJ 2010; Oliveira, C., et al., 2017). En el capítulo 2 de esta tesis, nosotros nos enfocamos a la caracterización funcional de la RBP UmRrm75 del basidiomiceto *U. maydis*. La proteína UmRrm75 está constituida por tres dominios RRM y un motivo rico en serina/arginina SR en el extremo amino, así como repetidos ricos en glicina entre cada dominio RRM. En comparación con otros ortólogos de levadura, la proteína UmRrm75 presenta las mismas características estructurales que las proteínas ScHrb1 y ScGbp2 de *S. cerevisiae*, evidenciando un porcentaje de identidad ligeramente mayor con la proteína ScHrb1 (47.35%) que con la proteína ScGbp2 (46.27%). En el caso de la proteína ScNpl3, presentó un menor porcentaje de identidad, solo un 26.45% con la proteína UmRrm75, porcentaje similar al reportado para las proteínas ScHrb1 y ScGbp2 al ser comparadas con la proteína ScNpl3 (Häcker, S., & Krebber, H. 2004).

Diferentes estudios han descrito que las proteínas SR ScHrb1 y ScGbp2 son factores claves involucrados en el control de calidad del “splicing” para la exportación del ARNm nuclear en la levadura *S. cerevisiae* (Häcker, S. y Krebber, H., 2004 y Hackmann et al., 2014). La ausencia de estas proteínas SR conduce a la fuga significativa de pre-ARNm no procesados por “splicing” al citoplasma. Por lo que se requiere un sistema de control de calidad que asegure la exportación de ARNs correctamente procesados, de lo contrario la viabilidad celular estaría comprometida, suceso que en organismos multicelulares se ha relacionado con enfermedades neurodegenerativas y cáncer (Lukong et al, 2008).

En *S. cerevisiae*, las tres proteínas de tipo SR, ScHrb1, ScGbp2 y ScNpl3 son reclutadas por complejos co-transcripcionales, por ejemplo, ScNpl3 es reclutada

de forma tempranamente por la RNA pol II (Kress, T. L., et al., 2008) y por otro lado ScHrb1 y ScGbp2 son reclutadas vía el complejo THO, complejo formado por las proteínas Hpr1, Tho2, Mft1 y Thp2. Dicho complejo está asociado al proceso de elongación de la transcripción y exportación de los ARNm. En particular, las proteínas ScHrb1 y ScGbp2 se unen a los pre-mRNA y e interactúan con el “spliceosoma” durante el “splicing”, reclutando al complejo TRAMP al pre-ARNm, participando así, en los últimos pasos del “splicing” para vigilar el correcto procesamiento de eliminación de intrones. Un ARNm correctamente procesado es atrapado por las proteínas ScHrb1 y ScGbp2, que a su vez son reclutadas por la proteína Mex67 para exportar al ARNm fuera del núcleo (Derrer, C.P., et al 2019; Hackmann et al., 2011; Hackmann, A., et al 2014).

Otro fenotipo muy interesante que encontramos fue la sensibilidad a boro en la mutante $\Delta UmRrm75$, el cual había sido previamente reportado para $\Delta ScHrb1$ de *S. cerevisiae* (Nozawa, et al., 2006). Nozawa y col (2006) proponen que la inhibición de los procesos dependientes del ARN puede presentar un efecto tóxico en altas concentraciones de ácido bórico. Además, se ha descrito que el borato, que se convierte parcialmente del ácido bórico dentro de las células, forma complejos con una variedad de moléculas que contienen enlaces cis-diol, y el ARN es una molécula que forma este tipo de enlaces con otras moléculas (Shomron, N., y Ast, G., 2003). La participación de ScHrb1 en el proceso de splicing y su sensibilidad ácido bórico, refuerzan los datos reportados de que estas proteínas de tipo SR está presente en el procesamiento del pre-ARN. Incluso, los datos en los que nosotros reportamos la actividad de chaperona para la proteína UmRrm75 podrían conectar a esta proteína de tipo SR como una chaperona de ARN en el “splicing” en hongos. Además, que la falta de los genes, *UmRrm75* en *U. maydis* y *ScHrb1* en *S. cerevisiae*, evidencio una mayor sensibilidad a altas concentraciones de ácido bórico, lo cual podría estar afectando la estructura y procesamiento del ARN.

Al igual que la cepa mutante $\Delta UmRrm75$ de *U. maydis*, nosotros demostramos que la cepa mutante $\Delta ScHrb1$ de *S. cerevisiae* presentaba sensibilidad a la

aplicación exógena de H₂O₂ en comparación a su cepa parental BY4741. Por el contrario, la mutante $\Delta ScGbp2$ de *S. cerevisiae* no presentó los fenotipos de sensibilidad ni al H₂O₂ y ni ácido bórico. Estos datos nos sugieren que la eliminación del gen *UmRrm75* en el hongo *U. maydis*, así como la del gen *ScHrb1* en la levadura *S. cerevisiae* estarían afectando el proceso de splicing de algunos ARNs, lo que podría estar ocasionando el fenotipo de sensibilidad al H₂O₂ para ambas cepas mutantes. Mediante la complementación con el gen *UmRrm75* en el fondo mutante $\Delta ScHrb1$, nosotros pudimos curar los fenotipos de sensibilidad al H₂O₂ y ácido bórico de la mutante $\Delta ScHrb1$, en donde las cepas complementantes *ScHrb1-Rrm75-1* y *ScHrb1-Rrm75-2* mostraron un crecimiento similar al de la cepa parental BY4741. Estos resultados nos demuestran que el gen *UmRrm75* es un ortólogo funcional en la mutante $\Delta ScHrb1$ de *S. cerevisiae*. Y por último, nuestro análisis de localización sub-celular de la proteína UmRrm75 en *U. maydis*, en donde ya sea como levadura o hifa se observó una localización nuclear, nos sugiere que la proteína UmRrm75 podría estar participando en algún paso del procesamiento del ARNm en el núcleo.

7. Conclusión

En resumen, este estudio nos ha proporcionado datos novedosos sobre la caracterización bioquímica, molecular y funcional de las mutantes nulas del gen *UmRrm75* que codifica para una proteína de unión a RNA del tipo SR. En donde, mediante un ensayo de anti-terminación de la transcripción se demostró que la proteína UmRrm75 tiene una actividad de chaperona de ARN en un sistema heterólogo de *E. coli*. Encontramos que las cepas mutantes $\Delta UmRrm75$ presentaron una acumulación de melanina y de peroxisomas, además de una mayor actividad enzimática de catalasa, fenotipos que explican el por qué la cepa mutante presentó una mayor acumulación de H₂O₂ y un menor crecimiento. La similitud de dominios entre las proteínas ScHrb1 y ScGbp2 de *S. cerevisiae*, y la proteína UmRrm75 de *U. maydis*, así como la localización nuclear de la proteína UmRrm75; la sensibilidad al H₂O₂ y ácido bórico de ambas mutantes $\Delta UmRrm75$ y $\Delta ScHrb1$, y aún más, la restitución de estos fenotipos de sensibilidad en las cepas que expresan el gen *UmRrm75*, nos llevan a proponer al gen *UmRrm75* de *U. maydis* como un gen ortólogo funcional del gen ScHrb1 de *S. cerevisiae*.

Perspectivas:

- 1.- Identificar los ARNm a los cuales se une la proteína UmRrm75, utilizando la técnica de iClip.
- 2.- Identificar en que paso del procesamiento temprano o tardío del ARN se encuentra participando la proteína UmRrm75, mediante los resultados obtenidos por iClip.

8. Bibliografía:

1. Basse, C. W., & Steinberg, G. (2004). *Ustilago maydis*, model system for analysis of the molecular basis of fungal pathogenicity. *Molecular plant pathology*, 5(2), 83-92.
2. Dean, R., Van Kan, J. A., Pretorius, Z. A., Hammond-Kosack, K. E., Di Pietro, A., Spanu, P. D., ... & Foster, G. D. (2012). The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Molecular plant pathology*, 13(4), 414-430.
3. Banuett, F., & Herskowitz, I. (1996). Discrete developmental stages during teliospore formation in the corn smut fungus, *Ustilago maydis*. *Development*, 122(10), 2965-2976.
4. Banuett, F. (2002). Pathogenic development in *Ustilago maydis*: a progression of morphological transitions that result in tumor formation and teliospore production. *MYCOLOGY SERIES*, 15, 349-398.
5. Ruiz-Herrera, J., & Martínez-Espinoza, A. D. (1998). The fungus *Ustilago maydis*, from the aztec cuisine to the research laboratory. *International Microbiology*, 1(2), 149-158.
6. Banuett, F. (1995). Genetics of *Ustilago maydis*, a fungal pathogen that induces tumors in maize. *Annual review of genetics*, 29(1), 179-208.
7. Valdez-Morales, M., Barry, K., Fahey Jr, G. C., Domínguez, J., de Mejia, E. G., Valverde, M. E., & Paredes-López, O. (2010). Effect of maize genotype, developmental stage, and cooking process on the nutraceutical potential of huitlacoche (*Ustilago maydis*). *Food Chemistry*, 119(2), 689-697.
8. Juárez-Montiel, M., de León, S. R., Chávez-Camarillo, G., Hernández-Rodríguez, C., & Villa-Tanaca, L. (2011). Huitlacoche (corn smut), caused by the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis*, as a functional food. *Revista iberoamericana de micología*, 28(2), 69-73.
9. Patel, S. (2016). Nutrition, safety, market status quo appraisal of emerging functional food corn smut (huitlacoche). *Trends in Food Science & Technology*, 57, 93-102.

10. Abbas, H. K., Shier, W. T., Plasencia, J., Weaver, M. A., Bellaloui, N., Kotowicz, J. K., ... & Zablutowicz, R. M. (2017). Mycotoxin contamination in corn smut (*Ustilago maydis*) galls in the field and in the commercial food products. *Food Control*, 71, 57-63.
11. Saville, B. J., Donaldson, M. E., & Doyle, C. E. (2012). Investigating host induced meiosis in a fungal plant pathogen. *Meiosis: Molecular Mechanisms and Cytogenetic Diversity*, A. Swan, ed (New York: InTech), 411-460.
12. Kämper, J., Kahmann, R., Bölker, M., Ma, L. J., Brefort, T., Saville, B. J., ... & Perlin, M. H. (2006). Insights from the genome of the biotrophic fungal plant pathogen *Ustilago maydis*. *Nature*, 444(7115), 97-101.
13. Loftus, B. J., Fung, E., Roncaglia, P., Rowley, D., Amedeo, P., Bruno, D., ... & Allen, J. E. (2005). The genome of the basidiomycetous yeast and human pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Science*, 307(5713), 1321-1324.
14. Bon, E., Casaregola, S., Blandin, G., Llorente, B., Neuvéglise, C., Munsterkotter, M., ... & Gaillardin, C. (2003). Molecular evolution of eukaryotic genomes: hemiascomycetous yeast spliceosomal introns. *Nucleic acids research*, 31(4), 1121-1135.
15. Holliday, R. (2004). Early studies on recombination and DNA repair in *Ustilago maydis*. *DNA repair*, 3(6), 671-682.
16. Feldbrügge, M., Zarnack, K., Vollmeister, E., Baumann, S., Koepke, J., König, J., ... & Mannhaupt, G. (2008). The posttranscriptional machinery of *Ustilago maydis*. *Fungal genetics and biology*, 45, S40-S46.
17. Münsterkötter, M., & Steinberg, G. (2007). The fungus *Ustilago maydis* and humans share disease-related proteins that are not found in *Saccharomyces cerevisiae*. *BMC genomics*, 8(1), 473.
18. Zarnack, K., & Feldbrügge, M. (2007). mRNA trafficking in fungi. *Molecular Genetics and Genomics*, 278(4), 347-359.
19. Bölker, M. (2001). *Ustilago maydis*—a valuable model system for the study of fungal dimorphism and virulence. *Microbiology*, 147(6), 1395-1401.
20. Becht, P., Vollmeister, E., & Feldbrügge, M. (2005). Role for RNA-binding proteins implicated in pathogenic development of *Ustilago maydis*. *Eukaryotic cell*, 4(1), 121-133.

21. Holloman, W. K., Schirawski, J., & Holliday, R. (2007). Towards understanding the extreme radiation resistance of *Ustilago maydis*. *Trends in microbiology*, 15(12), 525-529.
22. Steinberg, G. (2007). Tracks for traffic: microtubules in the plant pathogen *Ustilago maydis*. *New Phytologist*, 174(4), 721-733.
23. Moore, M. J. (2005). From birth to death: the complex lives of eukaryotic mRNAs. *Science*, 309(5740), 1514-1518.
24. Kishore, S., Lubber, S., & Zavolan, M. (2010). Deciphering the role of RNA-binding proteins in the post-transcriptional control of gene expression. *Briefings in functional genomics*, 9(5-6), 391-404.
25. Chen, Y., & Varani, G. (2005). Protein families and RNA recognition. *The FEBS journal*, 272(9), 2088-2097
26. Burd, C. G., & Dreyfuss, G. (1994). Conserved structures and diversity of functions of RNA-binding proteins. *science*, 265(5172), 615-621.
27. Pérez-Cañadillas, J. M., & Varani, G. (2001). Recent advances in RNA-protein recognition. *Current opinion in structural biology*, 11(1), 53-58.
28. Ku, H. Y., & Lin, H. (2014). PIWI proteins and their interactors in piRNA biogenesis, germline development and gene expression. *National science review*, 1(2), 205-218.
29. Jonas, K., Calin, G. A., & Pichler, M. (2020). RNA-Binding Proteins as Important Regulators of Long Non-Coding RNAs in Cancer. *International journal of molecular sciences*, 21(8), 2969..
30. Glisovic, T., Bachorik, J. L., Yong, J., & Dreyfuss, G. (2008). RNA-binding proteins and post-transcriptional gene regulation. *FEBS letters*, 582(14), 1977-1986.
31. Rodríguez-Kessler, M., Baeza-Montanez, L., García-Pedrajas, M. D., Tapia-Moreno, A., Gold, S., Jiménez-Bremont, J. F., & Ruiz-Herrera, J. (2012). Isolation of UmRrm75, a gene involved in dimorphism and virulence of *Ustilago maydis*. *Microbiological research*, 167(5), 270-282.
32. Afroz, T., Cienikova, Z., Cléry, A., & Allain, F. H. (2015). One, two, three, four! How multiple RRM reads the genome sequence. In *Methods in enzymology* (Vol. 558, pp. 235-278). Academic Press.

33. Cléry, A., Blatter, M., & Allain, F. H. (2008). RNA recognition motifs: boring? Not quite. *Current opinion in structural biology*, 18(3), 290-298.
34. Oubridge, C., Ito, N., Evans, P. R., Teo, C. H., & Nagai, K. (1994). Crystal structure at 1.92 Å resolution of the RNA-binding domain of the U1A spliceosomal protein complexed with an RNA hairpin. *Nature*, 372(6505), 432-438.
35. Auweter, S. D., Oberstrass, F. C., & Allain, F. H. T. (2006). Sequence-specific binding of single-stranded RNA: is there a code for recognition?. *Nucleic acids research*, 34(17), 4943-4959.
36. Xie, J., Kozlov, G., & Gehring, K. (2014). The “tale” of poly (A) binding protein: the MLLE domain and PAM2-containing proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms*, 1839(11), 1062-1068.
37. Becht, P., König, J., & Feldbrügge, M. (2006). The RNA-binding protein Rrm4 is essential for polarity in *Ustilago maydis* and shuttles along microtubules. *Journal of cell science*, 119(23), 4964-4973.
38. Vollmeister, E., & Feldbrügge, M. (2010). Posttranscriptional control of growth and development in *Ustilago maydis*. *Current opinion in microbiology*, 13(6), 693-699.
39. Vollmeister, E., Haag, C., Zarnack, K., Baumann, S., König, J., Mannhaupt, G., & Feldbrügge, M. (2009). Tandem KH domains of Khd4 recognize AUACCC and are essential for regulation of morphology as well as pathogenicity in *Ustilago maydis*. *RNA*, 15(12), 2206-2218.
40. Hogan, D. J., Riordan, D. P., Gerber, A. P., Herschlag, D., & Brown, P. O. (2008). Diverse RNA-binding proteins interact with functionally related sets of RNAs, suggesting an extensive regulatory system. *PLoS Biol*, 6(10), e255.
41. Ray, D., Kazan, H., Cook, K. B., Weirauch, M. T., Najafabadi, H. S., Li, X., ... & Na, H. (2013). A compendium of RNA-binding motifs for decoding gene regulation. *Nature*, 499(7457), 172-177.
42. Graveley, B. R. (2000). Sorting out the complexity of SR protein functions. *Rna*, 6(9), 1197.

43. Shepard, P. J., & Hertel, K. J. (2009). The SR protein family. *Genome biology*, 10(10), 1-9.
44. Long, J. C., & Caceres, J. F. (2009). The SR protein family of splicing factors: master regulators of gene expression. *Biochemical Journal*, 417(1), 15-27.
45. Jeong, S. (2017). SR proteins: binders, regulators, and connectors of RNA. *Molecules and cells*, 40(1), 1.
46. Riordan, D. P., Herschlag, D., & Brown, P. O. (2011). Identification of RNA recognition elements in the *Saccharomyces cerevisiae* transcriptome. *Nucleic acids research*, 39(4), 1501-1509.
47. Hieronymus, H., & Silver, P. A. (2003). Genome-wide analysis of RNA-protein interactions illustrates specificity of the mRNA export machinery. *Nature genetics*, 33(2), 155-161.
48. Birney, E., Kumar, S., & Krainer, A. R. (1993). Analysis of the RNA-recognition motif and RS and RGG domains: conservation in metazoan pre-mRNA splicing factors. *Nucleic acids research*, 21(25), 5803-5816.
49. Graveley, B. R. (2001). Alternative splicing: increasing diversity in the proteomic world. *TRENDS in Genetics*, 17(2), 100-107.
50. Zhu, J., & Krainer, A. R. (2000). Pre-mRNA splicing in the absence of an SR protein RS domain. *Genes & development*, 14(24), 3166-3178.
51. Bourgeois, C. F., Lejeune, F., & Stévenin, J. (2004). Broad specificity of SR (serine/arginine) proteins in the regulation of alternative splicing of pre-messenger RNA. *Progress in nucleic acid research and molecular biology*, 78, 37.
52. Ariyachet, C., Beißel, C., Li, X., Lorrey, S., Mackenzie, O., Martin, P. M., ... & McBride, A. E. (2017). Post-translational modification directs nuclear and hyphal tip localization of *Candida albicans* m RNA-binding protein S Ir1. *Molecular microbiology*, 104(3), 499-519.
53. Ariyachet, C., Solis, N. V., Liu, Y., Prasadarao, N. V., Filler, S. G., & McBride, A. E. (2013). SR-like RNA-binding protein S Ir1 affects *Candida albicans* filamentation and virulence. *Infection and immunity*, 81(4), 1267-1276.

54. Zhang, X. N., & Mount, S. M. (2009). Two alternatively spliced isoforms of the Arabidopsis SR45 protein have distinct roles during normal plant development. *Plant physiology*, 150(3), 1450-1458.
55. Tanabe, N., Kimura, A., Yoshimura, K., & Shigeoka, S. (2009). Plant-specific SR-related protein atSR45a interacts with spliceosomal proteins in plant nucleus. *Plant molecular biology*, 70(3), 241-252.
56. Tanabe, N., Yoshimura, K., Kimura, A., Yabuta, Y., & Shigeoka, S. (2007). Differential expression of alternatively spliced mRNAs of Arabidopsis SR protein homologs, atSR30 and atSR45a, in response to environmental stress. *Plant and Cell Physiology*, 48(7), 1036-1049.
57. Ali, G. S., Palusa, S. G., Golovkin, M., Prasad, J., Manley, J. L., & Reddy, A. S. (2007). Regulation of plant developmental processes by a novel splicing factor. *PLoS One*, 2(5), e471.
58. Häcker, S., & Krebber, H. (2004). Differential export requirements for shuttling serine/arginine-type mRNA-binding proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 279(7), 5049-5052.
59. Windgassen, M., & Krebber, H. (2003). Identification of Gbp2 as a novel poly (A)⁺ RNA-binding protein involved in the cytoplasmic delivery of messenger RNAs in yeast. *EMBO reports*, 4(3), 278-283.
60. Windgassen, M., Sturm, D., Cajigas, I. J., González, C. I., Seedorf, M., Bastians, H., & Krebber, H. (2004). Yeast shuttling SR proteins Npl3p, Gbp2p, and Hrb1p are part of the translating mRNPs, and Npl3p can function as a translational repressor. *Molecular and cellular biology*, 24(23), 10479-10491.
61. Hurt, E., Luo, M. J., Röther, S., Reed, R., & Sträßer, K. (2004). Cotranscriptional recruitment of the serine-arginine-rich (SR)-like proteins Gbp2 and Hrb1 to nascent mRNA via the TREX complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(7), 1858-1862.
62. Hackmann, A., Wu, H., Schneider, U. M., Meyer, K., Jung, K., & Krebber, H. (2014). Quality control of spliced mRNAs requires the shuttling SR proteins Gbp2 and Hrb1. *Nature communications*, 5(1), 1-14.

63. Kress, T. L., Krogan, N. J., & Guthrie, C. (2008). A single SR-like protein, Npl3, promotes pre-mRNA splicing in budding yeast. *Molecular cell*, 32(5), 727-734.
64. Singleton, D. R., Chen, S., Hitomi, M., Kumagai, C., & Tartakoff, A. M. (1995). A yeast protein that bidirectionally affects nucleocytoplasmic transport. *Journal of Cell Science*, 108(1), 265-272.
65. Henry, M., Borland, C. Z., Bossie, M., & Silver, P. A. (1996). Potential RNA binding proteins in *Saccharomyces cerevisiae* identified as suppressors of temperature-sensitive mutations in NPL3. *Genetics*, 142(1), 103-115.
66. Siebel, C. W., Feng, L., Guthrie, C., & Fu, X. D. (1999). Conservation in budding yeast of a kinase specific for SR splicing factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(10), 5440-5445.
67. Sesma, A. (2016, September). RNA metabolism and regulation of virulence programs in fungi. In *Seminars in Cell & Developmental Biology* (Vol. 57, pp. 120-127). Academic Press..
68. Lorković, Z. J. (2009). Role of plant RNA-binding proteins in development, stress response and genome organization. *Trends in plant science*, 14(4), 229-236.
69. Oliveira, C., Faoro, H., Alves, L. R., & Goldenberg, S. (2017). RNA-binding proteins and their role in the regulation of gene expression in *Trypanosoma cruzi* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics and molecular biology*, 40(1), 22-30.
70. Luo, Y., Na, Z., & Slavoff, S. A. (2018). P-bodies: composition, properties, and functions. *Biochemistry*, 57(17), 2424-2431.
71. Kim, H. J. (2014). Exploitation of reactive oxygen species by fungi: roles in host-fungus interaction and fungal development. *J Microbiol Biotechnol*, 24, 1455-1463.
72. Fang, W., & St. Leger, R. J. (2010). RNA binding proteins mediate the ability of a fungus to adapt to the cold. *Environmental microbiology*, 12(3), 810-820.
73. Maggi, O., Tosi, S., Angelova, M., Lagostina, E., Fabbri, A. A., Pecoraro, L., & Turchetti, B. (2013). Adaptation of fungi, including yeasts, to cold

- environments. *Plant Biosystems-An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology*, 147(1), 247-258.
74. Kim, Y. O., Kim, J. S., & Kang, H. (2005). Cold-inducible zinc finger-containing glycine-rich RNA-binding protein contributes to the enhancement of freezing tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 42(6), 890-900.
75. Kim, Y. O., Pan, S., Jung, C. H., & Kang, H. (2007). A zinc finger-containing glycine-rich RNA-binding protein, *atRZ-1a*, has a negative impact on seed germination and seedling growth of *Arabidopsis thaliana* under salt or drought stress conditions. *Plant and Cell Physiology*, 48(8), 1170-1181.
76. Jones, P. G., & Inouye, M. (1994). The cold-shock response—a hot topic. *Molecular microbiology*, 11(5), 811-818.
77. Phadtare, S. (2012). *E. coli* cold-shock gene profiles in response to over-expression/deletion of *CsdA*, *RNase R* and *PNPase* and relevance to low-temperature RNA metabolism. *Genes to Cells*, 17(10), 850-874.
78. Chaikam, V., & Karlson, D. (2008). Functional characterization of two cold shock domain proteins from *Oryza sativa*. *Plant, cell & environment*, 31(7), 995-1006.
79. Jenner, P. (2003). Oxidative stress in Parkinson's disease. *Annals of Neurology: Official Journal of the American Neurological Association and the Child Neurology Society*, 53(S3), S26-S38.
80. Kowalska, M., Wize, K., Predecki, M., Lianeri, M., Kozubski, W., & Dorszewska, J. (2020). Genetic variants and oxidative stress in Alzheimer's disease. *Current Alzheimer Research*, 17(3), 208-223.
81. Jayashree, T., & Subramanyam, C. (2000). Oxidative stress as a prerequisite for aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus*. *Free Radical Biology and Medicine*, 29(10), 981-985.
82. Scandalios, J. G. (2005). Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. *Brazilian journal of medical and biological research*, 38(7), 995-1014.

83. Jacobson, E. S., Hove, E., & Emery, H. S. (1995). Antioxidant function of melanin in black fungi. *Infection and immunity*, 63(12), 4944-4945.
84. Scott, B., & Eaton, C. J. (2008). Role of reactive oxygen species in fungal cellular differentiations. *Current opinion in microbiology*, 11(6), 488-493.
85. Droge, W. (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological reviews*, 82(1), 47-95.
86. Leuthner, B., Aichinger, C., Oehmen, E., Koopmann, E., Müller, O., Mueller, P., ... & Schreier, P. H. (2005). A H₂O₂-producing glyoxal oxidase is required for filamentous growth and pathogenicity in *Ustilago maydis*. *Molecular Genetics and Genomics*, 272(6), 639-650.
87. Rodríguez-Piña, A. L., Juárez-Montiel, M., Hernández-Sánchez, I. E., Rodríguez-Hernández, A. A., Bautista, E., Becerra-Flora, A., ... & Jiménez-Bremont, J. F. (2019). The *Ustilago maydis* null mutant strains of the RNA-binding protein UmRrm75 accumulate hydrogen peroxide and melanin. *Scientific reports*, 9(1), 1-13.
88. Molina, L., & Kahmann, R. (2007). An *Ustilago maydis* gene involved in H₂O₂ detoxification is required for virulence. *The Plant Cell*, 19(7), 2293-2309.
89. Rowe, L. A., Degtyareva, N., & Doetsch, P. W. (2012). Yap1: a DNA damage responder in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mechanisms of ageing and development*, 133(4), 147-156.
90. Lazarova, N., Krumova, E., Stefanova, T., Georgieva, N., & Angelova, M. (2014). The oxidative stress response of the filamentous yeast *Trichosporon cutaneum* R57 to copper, cadmium and chromium exposure. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 28(5), 855-862.
91. Zhdanova, N. N., & Vasil'evskaya, A. I. (1988). Melanin-containing fungi in extreme conditions. Kiev: Naukova Dumka (in Russian), 286.
92. Langfelder, K., Streibel, M., Jahn, B., Haase, G., & Brakhage, A. A. (2003). Biosynthesis of fungal melanins and their importance for human pathogenic fungi. *Fungal Genetics and Biology*, 38(2), 143-158.
93. White, L. P. (1958). Melanin: a naturally occurring cation exchange material. *Nature*, 182(4647), 1427-1428.

94. Gómez, B. L., & Nosanchuk, J. D. (2003). Melanin and fungi. *Current opinion in infectious diseases*, 16(2), 91-96.
95. Wheeler, M. H., & Stipanovic, R. D. (1985). Melanin biosynthesis and the metabolism of flaviolin and 2-hydroxyjuglone in *Wangiella dermatitidis*. *Archives of microbiology*, 142(3), 234-241.
96. Martínez-Lumbreras, S., Taverniti, V., Zorrilla, S., Séraphin, B., & Pérez-Cañadillas, J. M. (2016). Gbp2 interacts with THO/TREX through a novel type of RRM domain. *Nucleic acids research*, 44(1), 437-448.
97. Nozawa, A., Miwa, K., Kobayashi, M., & Fujiwara, T. (2006). Isolation of *Arabidopsis thaliana* cDNAs that confer yeast boric acid tolerance. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 70(7), 1724-1730.
98. Aguilera, J., Randez-Gil, F., & Prieto, J. A. (2007). Cold response in *Saccharomyces cerevisiae*: new functions for old mechanisms. *FEMS microbiology reviews*, 31(3), 327-341.
99. Kwak, K. J., Park, S. J., Han, J. H., Kim, M. K., Oh, S. H., Han, Y. S., & Kang, H. (2011). Structural determinants crucial to the RNA chaperone activity of glycine-rich RNA-binding proteins 4 and 7 in *Arabidopsis thaliana* during the cold adaptation process. *Journal of experimental botany*, 62(11), 4003-4011.
100. Kim, J. Y., Park, S. J., Jang, B., Jung, C. H., Ahn, S. J., Goh, C. H., ... & Kang, H. (2007). Functional characterization of a glycine-rich RNA-binding protein 2 in *Arabidopsis thaliana* under abiotic stress conditions. *The Plant Journal*, 50(3), 439-451.
101. Dadachova, E., & Casadevall, A. (2008). Ionizing radiation: how fungi cope, adapt, and exploit with the help of melanin. *Current opinion in microbiology*, 11(6), 525-531.
102. Gonçalves, R. C. R., Lisboa, H. C. F., & Pombeiro-Sponchiado, S. R. (2012). Characterization of melanin pigment produced by *Aspergillus nidulans*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28(4), 1467-1474.
103. Krumova, E. Z., Pashova, S. B., Dolashka-Angelova, P. A., Stefanova, T., & Angelova, M. B. (2009). Biomarkers of oxidative stress in

- the fungal strain *Humicola lutea* under copper exposure. *Process Biochemistry*, 44(3), 288-295.
104. Belozerskaya, T. A., Gessler, N. N., Isakova, E. P., & Deryabina, Y. I. (2012). *Neurospora crassa* light signal transduction is affected by ROS. *Journal of Signal Transduction*, 2012.
105. Camões, F., Islinger, M., Guimarães, S. C., Kilaru, S., Schuster, M., Godinho, L. F., ... & Schrader, M. (2015). New insights into the peroxisomal protein inventory: Acyl-CoA oxidases and-dehydrogenases are an ancient feature of peroxisomes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1853(1), 111-125.
106. Schrader, M. & Fahimi, H. D. Peroxisomes and oxidative stress. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res.* 1763(12), 1755-1766 (2006).
107. Hackmann, A., Gross, T., Baierlein, C., & Krebber, H. (2011). The mRNA export factor Npl3 mediates the nuclear export of large ribosomal subunits. *EMBO reports*, 12(10), 1024-1031.
108. Lukong, K. E., Chang, K. W., Khandjian, E. W. & Richard, S. RNA-binding proteins in human genetic disease. *Trends Genet.* 24, 416–425 (2008).
109. Derrer, C. P., Mancini, R., Vallotton, P., Huet, S., Weis, K., & Dultz, E. (2019). The RNA export factor Mex67 functions as a mobile nucleoporin. *Journal of Cell Biology*, 218(12), 3967-3976.
110. Shomron, N., & Ast, G. (2003). Boric acid reversibly inhibits the second step of pre-mRNA splicing. *FEBS letters*, 552(2-3), 219-224.

Anexos

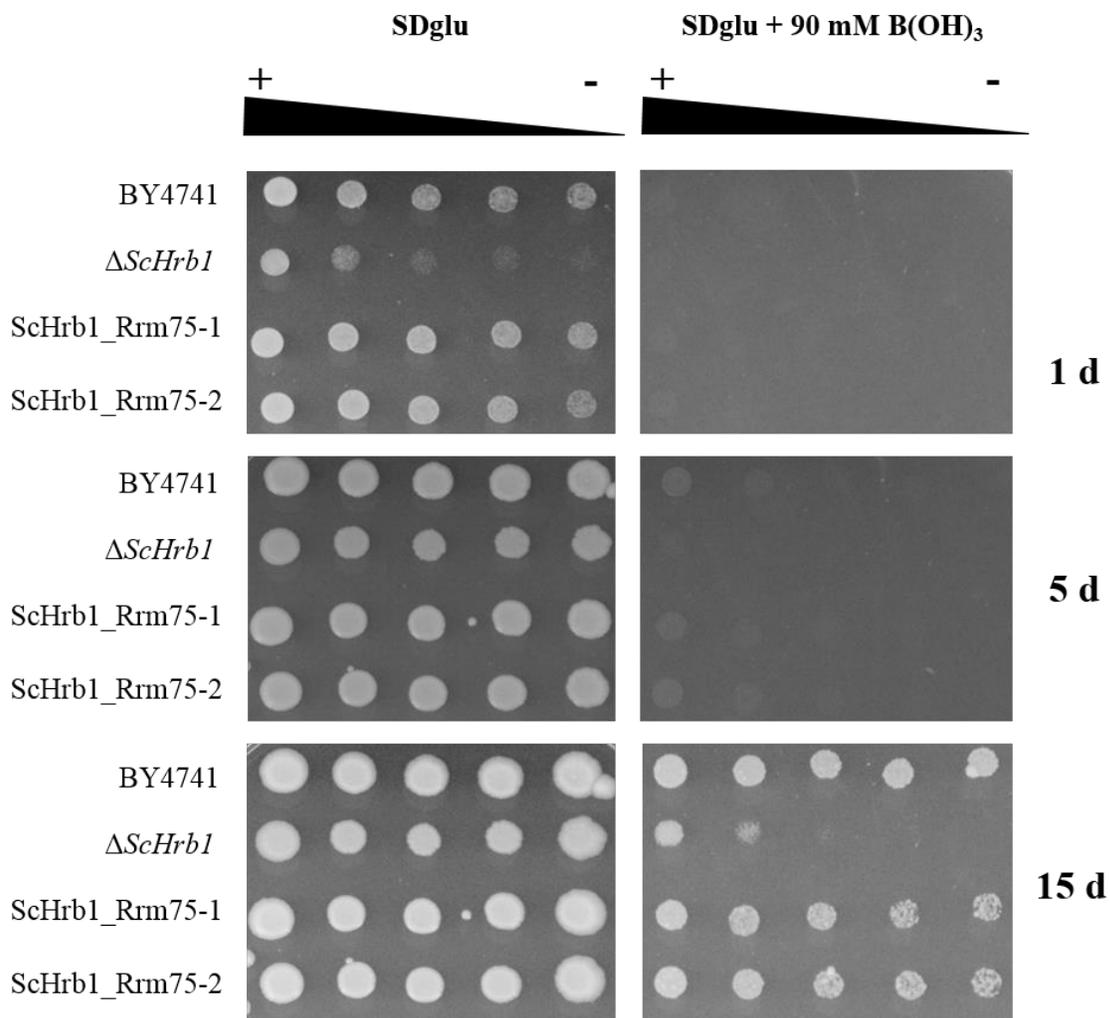


Figura suplementaria 1. Ensayo de sensibilidad a boro en la cepa mutante Δ ScHrb1 de *S. cerevisiae* complementada con el gen *UmRrm75* de *U. maydis*.

Diluciones seriadas de cada cepa complementada, mutante y parental de *S. cerevisiae* fueron goteadas en medio de selección SD + glucosa y 90 mM de boro. Incubadas a una temperatura de 28°C por un periodo de 15 días. Cada imagen mostrada en esta figura es la representación de tres replicas independientes.

Anexos

Publicaciones

Rodríguez-Piña, A. L., Juárez-Montiel, M., Hernández-Sánchez, I. E., Rodríguez-Hernández, A. A., Bautista, E., Becerra-Flora, A., López-Villegas, E. O., & Jiménez-Bremont, J. F. (2019). The *Ustilago maydis* null mutant strains of the RNA-binding protein UmRrm75 accumulate hydrogen peroxide and melanin. *Scientific reports*, 9(1), 1-13.

<https://doi.org/10.1038/s41598-019-47133-4>