



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

POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOLOGIA MOLECULAR

**“Obtención del epigenoma de *Trichoderma
atroviride* en respuesta a la luz azul”**

Tesis que presenta

Tania Muñoz Centeno

Para obtener el grado de

Maestra en Ciencias en Biología Molecular

Director de la Tesis:

Dr. J. Sergio Casas Flores

San Luis Potosí, S.L.P., Septiembre, 2012



Constancia de aprobación de la tesis

La tesis "Obtención del epigenoma de *Trichoderma atroviride* en respuesta a la luz azul" presentada para obtener el Grado de de Maestra en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por **Tania Muñoz Centeno** y aprobada el **20 de 09 de 2012** 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. J. Sergio Casas Flores
(Director de la tesis)

Dr. Braulio Gutiérrez Medina
(Miembro del Comité Tutorial)

Dr. Alejandro De Las Peñas Nava
(Miembro del Comité Tutorial)

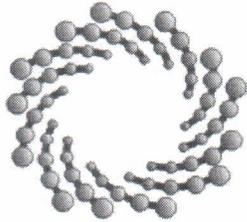


Créditos Institucionales

Esta tesis fue elaborada en el Laboratorio de Genómica Funcional y Comparativa de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., bajo la dirección del Dr. J. Sergio Casas Flores.

Durante la realización del trabajo el autor recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (No. 375809) y del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C.

El presente trabajo fue financiado por el proyecto **No. 83798** CONACyT-Fondos Sectoriales-SEP otorgado a los doctores Alfredo Herrera-Estrella (LANGEBIO CINVESTAV-Irapuato) y J. Sergio Casas Flores (IPICYT).



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 103 del Libro Primero de Actas de Exámenes de Grado del Programa de Maestría en Ciencias en Biología Molecular está asentado lo siguiente:

En la ciudad de San Luis Potosí a los 20 días del mes de septiembre del año 2012, se reunió a las 17:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

Dra. Irene Beatriz Castaño Navarro

Presidenta

IPICYT

Dr. Braulio Gutiérrez Medina

Secretario

IPICYT

Dr. J. Sergio Casas Flores

Sinodal

IPICYT

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

MAESTRA EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

sustentó la C.

Tania Muñoz Centeno

sobre la Tesis intitulada:

Obtención del epigenoma de Trichoderma atroviride en respuesta a la luz azul

que se desarrolló bajo la dirección de

Dr. J. Sergio Casas Flores

El Jurado, después de deliberar, determinó

APROBARLA

Dándose por terminado el acto a las 19:00 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 20 días del mes de septiembre de 2012.

Dr. Marcial Bonilla Marín
Secretario Académico

Mtra. Ivonne Lizette Cuevas Vélez
Jefa del Departamento del Pósgrado



Con dedicatoria a:

Mis papás, Aristeo y Mary. ¡LOS AMO!

Mis hermanas: Jaqueline y Fernanda.

Mi cuñado y mis sobrinos: Hugo David, Regina y Hugo.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco principalmente a mis papás, que siempre me han brindado su apoyo y cariño; a mis hermanas, mi cuñado y mis adorados sobrinos. Han sido y serán la fuerza que me impulsa a lograr mis metas. ¡Son lo más importante que tengo en la vida!

A mi mejor amigo y novio, Chuy. Gracias por tu cariño, por tu apoyo incondicional, y por seguir adelante conmigo. Sabes lo mucho que te quiero.

A mi asesor de tesis, el Dr. Sergio Casas Flores, por su dirección en este trabajo y por la confianza que tuvo en mí. Gracias por su apoyo, por los consejos y sobre todo por su valiosa amistad.

Gracias a los sinodales: Dr. Alejandro De Las Peña Nava y Dr. Braulio Gutiérrez Medina, por sus aportaciones en este trabajo.

A mis amigos del laboratorio: Javier, Gema, Ángel, Claudia, Macario, Paco, Jazmin, y Noemí. Gracias por su ayuda y por hacer agradables y amenas las horas de trabajo. Especialmente gracias a Mayte y Edith, por sus enseñanzas y consejos. Gracias también a Liz Cortez por su amistad. La pasé muy bien en el laboratorio, los voy a extrañar.

A la técnico María Isabel Isordia Jasso por el apoyo técnico brindado. A Claudia Ramos por tener siempre listo el material para poder trabajar. A Emmanuel Orta Zavala y José Ángel Huerta Ocampo por su consejos técnicos.

CONTENIDO

Constancia de aprobación de la tesis	ii
Créditos institucionales	iii
Acta de examen	iv
Dedicatorias	v
Agradecimientos	vi
Índice de figuras	viii
Material suplementario	ix
Resumen	x
Abstract	xi
Introducción	1
Materiales y métodos	7
Cepas y condiciones de cultivo	7
Selección de un péptido inmunogénico y purificación del anticuerpo α BLR-2 (IgG)	7
Ensayos de fotoinducción	7
Extracción de proteínas totales	8
Western Blot	9
Inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP)	10
Resultados	12
Selección de un péptido inmunogénico y generación del anticuerpo α BLR-2	12
Estandarización del método de extracción de proteína total	13
Identificación de las proteínas BLR-2 y GCN5 con los anticuerpos α BLR-2 y α Gcn5 por medio de Western blot	16
Medición cualitativa de la acetilación de la histona H3 por medio de Western blot	18
Estandarización del método de Inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP)	20
Inmunoprecipitación de la cromatina	24
Discusión	28
Referencias	40

ÍNDICE DE FIGURAS

FIG. 1. Regiones de la proteína BLR-2 altamente inmunogénicas y purificación del Ac α BLR-2	14
FIG. 2. Comparación de la calidad de las proteínas extraídas con diferentes buffers	15
FIG. 3. SDS-PAGE de calidad de proteína total	17
FIG. 4. Identificación de las proteínas BLR-2 y GCN5 con sus respectivo anticuerpo	19
FIG. 5. Medición cualitativa de la acetilación en la histona H3 en distintas condiciones de luz.	21
FIG. 6. Determinación del tiempo de entrecruzamiento de la cromatina con formaldehído y estandarización del número de sonicaciones para obtener tamaños de DNA alrededor de los 500 pb	23
FIG. 7. Ensayos de inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP)	25
FIG. 8. Modelo hipotético de las modificaciones e interacciones que suceden en la cromatina de la región promotora del gen <i>phr-1</i> de <i>T. atroviride</i> bajo diferentes condiciones de luz.	36

MATERIAL SUPLEMENTARIO

Tabla S1. Oligonucleótidos utilizados en este trabajo	38
FIG. S1. Amplificación del gen <i>actina</i>	39

RESUMEN

“Obtención del epigenoma de *Trichoderma atroviride* en respuesta a la luz azul”

La luz es uno de los factores ambientales más importantes, no sólo porque es utilizada como fuente de energía, sino porque también, es utilizado como fuente de información para regular el desarrollo, comportamiento y rutas metabólicas en la mayoría de los seres vivos. El hongo *Trichoderma atroviride*, encontrado de manera natural en el suelo, esporula después de un pulso de luz azul. A este proceso se le conoce como fotoconidiación. La mayoría de las respuestas a la luz azul en *T. atroviride* están reguladas por un complejo fotorreceptor, formado por las proteínas BLR-1 y BLR-2 (blue-light regulator). Este mecanismo de respuesta a la luz influye sobre otras rutas que se encuentran río-abajo, como el metabolismo de carbón y azufre, respuesta al estrés oxidativo, crecimiento vegetativo y reproducción. Las modificaciones epigenéticas –metilación de ADN y modificaciones a las histonas– son conocidas por jugar un papel en el control de la expresión de genes. Las modificaciones en las histonas controlan la accesibilidad a la cromatina y la actividad transcripcional. El mecanismo mejor estudiado es la acetilación de las histonas, el cual ha sido asociado con un estado de transcripción activo. Para investigar la influencia de la acetilación de las histonas sobre las vías de respuesta a la luz, utilizamos ensayos de inmunoprecipitación de la cromatina seguida de una secuenciación (ChIP-seq). Nuestros resultados también identificaron regiones blanco del complejo BLR-1/BLR-2, lo que proveerá de información para poder establecer modelos de redes dependientes de la luz.

PALABRAS CLAVE: epigenética, luz azul, *Trichoderma atroviride*,

ABSTRACT

“Epigenome of *Trichoderma atroviride* in response to blue light”

One of the most important environmental factors is light, not only because it is the main source of energy, but also because it regulates development, behavior and metabolic pathways in almost all forms of life. The common soil fungus *Trichoderma atroviride* sporulates after a brief pulse of blue light. This process is known as photocoinitiation. Most blue-light responses in *T. atroviride* are regulated by a photoreceptor complex formed by the blue-light regulator proteins (BLR-1 and BLR-2). This light-response mechanism impacts diverse downstream pathways such as carbon and sulfur metabolism, response to oxidative stress, vegetative growth, and reproduction. Epigenetic modifications –DNA methylation and histone modifications– are known to play a role in controlling gene expression. Histone modifications control the accessibility of the chromatin and transcriptional activities. The best characterized mechanism is histone acetylation, which has been associated with states of transcriptional activation. To investigate the influence of histone acetylation on light signaling pathways, we used chromatin immunoprecipitation sequencing (ChIP-seq). Our findings also uncovered direct targets of the complex BLR-1/BLR-2, which will provide data to establish patterns of light-dependent networks.

KEY WORDS: epigenetics, blue light, *Trichoderma atroviride*

INTRODUCCIÓN

La luz solar es uno de los factores ambientales más importante para los seres vivos, ya que regula diversos procesos fisiológicos y del desarrollo. El efecto de la luz sobre los seres vivos ha sido ampliamente estudiado, tanto en organismos procariontes como en eucariontes. Dependiendo del tipo de radiación y de la cantidad, la luz puede ser benéfica o dañina para los organismos. Los seres vivos tienen la capacidad de percibir señales luminosas de tal manera que les permite adaptarse, ubicar su entorno y responder de manera adecuada a los distintos cambios ambientales (Linden, 2002). Se han descrito una gran variedad de procesos biológicos en respuesta a casi todo el espectro de luz visible, sin embargo, la mayoría de las respuestas son atribuidas a las regiones del rojo/rojo lejano, azul/ UV-A o UV-B (Briggs y Huala, 1999).

Los seres vivos perciben la luz por medio de complejos proteína-cromóforo, llamados fotorreceptores (Chen *et al.*, 2004; Herrera-Estrella y Horwitz, 2007). Los fotorreceptores son las moléculas biológicas que traducen la energía electromagnética de los fotones a señales químicas, indicándole a la célula la intensidad, color y duración de la luz (Briggs y Spudich, 2005). Los cromóforos son pequeñas moléculas de naturaleza no proteica e incluyen principalmente retinoides, tetrapirroles y flavinas (Herrera-Estrella y Horwitz, 2007). El cromóforo al percibir la señal luminosa genera cambios conformacionales en el fotorreceptor, y se inicia así la transducción de una cascada de señalización (Crosson y Moffat, 2001; Schwerdtfeger y Linden, 2003). Los fotorreceptores se clasifican, dependiendo de su estructura química, en seis clases principales: rodopsinas, fitocromos,

xantopsinas, criptocromos, fototropinas y proteínas BLUF, estos 3 últimos fotorreceptores detectan luz a través de flavinas. Además, una característica importante de muchos fotorreceptores es la transferencia intramolecular de un electrón después de la fotoexcitación del cromóforo (van der Horst y Hellingwerf, 2004).

En una amplia variedad organismos, desde cianobacterias hasta mamíferos, la luz regula los ritmos circadianos. El ritmo circadiano es la oscilación de procesos genéticos, metabólicos y fisiológicos basados en un ciclo de 24 h, lo que permite al organismo adaptarse a los cambios de luz-oscuridad y temperatura durante el día (Bunning, 1967; Pittendrigh, 1993). En las plantas de *Arabidopsis* se ha estudiado ampliamente este proceso y se ha reportado que regula el movimiento de las hojas (Bunning, 1967; Millar *et al.*, 1995), la apertura de los estomas (Holmes, 1986; Somers *et al.*, 1998), la defensa contra patógenos (Wang *et al.*, 2011), la absorción de agua (Takase *et al.*, 2011), etc. En los hongos, además de regular el ritmo circadiano, la luz desencadena otros procesos como: el fototropismo, la fotomorfogénesis, el desarrollo sexual y asexual, la síntesis de carotenoides, polisacáridos y carbohidratos, así como la producción de metabolitos secundarios (Rodríguez-Romero *et al.*, 2010; Tisch *et al.*, 2011). Los hongos pueden percibir distintos tipos de luz, desde el ultravioleta hasta el rojo lejano. Se ha promovido a los hongos como modelos “simples” de respuesta a la luz, debido al mayor grado de organización que presentan otros eucariotes “superiores”, sumado a la homología de los sistemas de percepción a la luz entre organismos eucariotes.

Algunas especies del género *Trichoderma* han sido utilizadas ampliamente como agentes de control biológico. Su mecanismo de sobrevivencia y dispersión es a

través del desarrollo de esporas asexuales (conidias). En este hongo la conidiación es desencadenada por diversos factores como el pH, la luz, falta de nutrientes y daño mecánico (Horwitz, 1985; Casa-Flores *et al.*, 2004; Casa-Flores *et al.*, 2006). En completa oscuridad, cuando los nutrientes no están limitados, *T. atroviride* crece indefinidamente como micelio. Bajo estas condiciones, un pulso de luz azul induce una cascada de respuestas que conduce a la conidiación (Horwitz *et al.*, 1985). El proceso completo de conidiación ocurre aproximadamente 24 horas después de la exposición a la luz. Esta capacidad para responder a la luz ha permitido que *T. atroviride* sea utilizado como modelo fotomorfogénico. Además, han sido reportadas otras respuestas fisiológicas tempranas inducidas por la luz, como cambios en los patrones de la fosforilación de proteínas, incremento en la actividad de la adenilato ciclasa, y cambios en el potencial de membrana (Berrocal-Tito *et al.*, 2000). En *T. atroviride* se han identificado dos genes esenciales para la respuesta a la luz (*blr-1* y *blr-2*, acrónimos de blue-light-regulator), cuyos productos actúan en un complejo que regula la fotoconidiación, así como la activación o represión de la transcripción de genes responsivos a la luz azul (Casas-Flores *et al.*, 2004; Rosales-Saavedra *et al.*, 2006). Las proteínas BLR contienen dominios PAS (Per-Arnt-Sim) y dominios GATA tipo dedos de zinc de unión a DNA, lo que les confiere un papel como factores de transcripción. Uno de los tres dominios PAS presentes en BLR-1, pertenece a una subfamilia de dominios especializados en percibir Luz, Oxígeno y Voltaje (LOV). Este dominio LOV le confiere la característica de fotorreceptor (Casas-Flores *et al.*, 2004). Las mutantes sencillas de *blr* son incapaces de conidiar por exposición a la luz y por limitación de carbono, pero sí lo hacen por daño mecánico y por limitación de

nitrógeno (Casas-Flores *et al.*, 2006), lo que indica que existen vías de inducción de la conidiación independientes de la exposición a la luz, y otras muy ligadas a ésta.

Por otro lado, si *T. atroviride* es crecido bajo luz roja, su crecimiento se ve reducido y la regulación transcripcional de algunos genes se ve afectada, sugiriendo la participación de otros fotorreceptores (Casas-Flores *et al.*, 2004). En el genoma de *T. atroviride* se han identificados diferentes genes que codifican para posibles fotorreceptores, tales como CPD (dímero de ciclobutano pirimidina) fotoliasa, criptocromo-DASH, 6-4 fotoliasa, fitocromo, y opsina (Schmoll *et al.*, 2010). Un estudio reciente de pirosecuenciación permitió la identificación de 331 transcritos regulados por luz blanca, y 204 transcritos responsivos a la luz azul, confirmándose así la contribución de varios fotorreceptores (Esquivel-Naranjo *et al.*, resultados sin publicar, citado por Sánchez-Arreguín *et al.*, 2012).

Entre los diferentes niveles de regulación de la expresión génica, uno de los más importantes se lleva a cabo mediante el remodelamiento y modificación de la cromatina, a través de modificaciones covalentes en el DNA y/o en el extremo amino-terminal de las histonas, lo que se conoce como epigenética. Estas modificaciones desencadenan la relajación de la cromatina (eucromatina) o su empaquetamiento (heterocromatina), permitiendo o impidiendo, respectivamente, la transcripción de los genes (Imohf, 2003). Las modificaciones que pueden llevarse a cabo en las histonas son fosforilación, acetilación, ubiquitinación o ADP ribosilación, entre otras. En contraste con las histonas, el DNA sólo puede ser modificado por medio de metilaciones (Reid *et al.*, 2009). Se puede entonces

definir al epigenoma como el conjunto de estas modificaciones en el DNA e histonas.

Son pocos los estudios que se han llevado a cabo para encontrar una relación entre las modificaciones epigenéticas y la respuesta a la luz azul en hongos filamentosos. Por ejemplo, se sabe que el fotorreceptor de luz azul en *Neurospora crassa* (White Collar-1, WC-1, ortólogo al fotorreceptor BLR-1 de *T. atroviride*) es necesario para la acetilación de la lisina 14 de la histona H3 asociada al promotor del gen inducible por luz, *albino-3* (*al-3*). Además, se identificó que dicha acetilación inducida por luz es catalizada por la acetiltransferasas de histonas NGF-1 (homóloga a la de las levaduras, Gcn5p) (Grimaldi *et al.*, 2006). Por otro lado, a través de una inmunoprecipitación de la cromatina seguida de una secuenciación (ChIP-seq), se identificaron en *N. crassa* aquellos genes responsivos a la luz y al ritmo circadiano, que son regulados directamente por uno de los componentes de su sistema fotorreceptor, la proteína White Collar-2 (WC-2). Este análisis reveló nuevos genes blanco del complejo White Collar (WCC, formador por WC-1/-2), entre los que se encuentran principalmente factores de transcripción y genes involucrados en el metabolismo, y ciclo celular (Smith *et al.*, 2010).

Sin embargo, sigue siendo escasa la información que se tiene acerca de la relación entre la respuesta a la luz azul y las modificaciones epigenéticas en hongos, y en *T. atroviride* es casi nula. Por tal motivo nos dimos a la tarea de obtener el epigenoma de *T. atroviride* en respuesta a la luz azul. Para ello, se utilizó el método de inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP), el cual tiene como finalidad obtener fragmentos de DNA que interaccionen con proteínas de interés

bajo ciertas condiciones. En nuestro caso, obtuvimos aquellos fragmentos que interactúan con uno de los componentes del sistema fotorreceptor de *T. atroviride*, la proteína BLR-2. De igual manera, obtuvimos los fragmentos de DNA que bajo las mismas condiciones están asociados a la histona H3 acetilada (H3Ac), marcador de la activación de la transcripción. Los fragmentos, se enviarán a secuenciar para posteriormente hacer un Blastn contra el genoma de *Trichoderma atroviride*, y así poder mapear y validar las regiones del genoma que fueron enriquecidas con los anticuerpos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas y condiciones de cultivo

La cepa silvestre (WT) IMI 206040, y las cepas mutantes $\Delta blr-1$, y $\Delta blr-2$ (Casas-Flores *et al.*, 2004) de *Trichoderma atroviride* fueron crecidas en cajas con PDA (agar papa dextrosa, DIFCO), a 28° C en oscuridad. La mutante $\Delta tgc5$, derivada de la cepa WT (Uresti-Rivera *et al.*, datos sin publicar) se creció en medio líquido PDB (caldo papa dextrosa, DIFCO) a 28° C en oscuridad, en agitación constante, a 250 rpm.

Selección de un péptido inmunogénico y purificación del anticuerpo α BLR-2 (IgG)

Se diseñó un péptido con una alta inmunogenicidad, con la ayuda del programa Peptide Finder (<http://www.proteinlounge.com/biosyn/peptideFind.asp>), con la finalidad de generar un anticuerpo contra la proteína BLR-2. Éste fue sintetizado por Bio-Synthesis Inc. Para purificar las inmunoglobulinas G's (IgG) del suero proporciona por la empresa, se utilizó una columna de agarosa – proteína A, siguiendo las instrucciones del fabricante (Cell Biolabs, INC.).

Ensayos de fotoinducción

Cada una de las cepas fue crecida como preinóculo durante 48 horas en oscuridad. Después, se tomaron pequeños discos de la periferia de la colonia con la ayuda de un sacabocados, y se inocularon en cajas de Petri con PDA cubierto con papel celofán. Para la $\Delta tgc5$, se vertió un poco del preinóculo en PDB sobre

cajas de Petri con PDA cubierto con papel celofán. Los incóculos fueron crecidos a 28° C durante 72 horas; 6 horas antes de cumplirse este tiempo, a las cajas de WT-TSA se les aplicó un inhibidor de desacetilasas de histonas, TSA (tricostatina A), a una concentración final de 100 ng/ml y se incubaron nuevamente a 28° C. En una cámara oscura y sellada, las cajas se expusieron a 1200 $\mu\text{mol m}^{-2}$ de luz fría con un filtro azul (LEE #183; intensidad, 3 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Treinta y 120 minutos después del pulso de luz azul, el micelio fue colectado con un bisturí e inmediatamente congelado en nitrógeno líquido. También, se incluyó como control, micelio que no fue expuesto a la luz azul. Todos los ensayos se llevaron a cabo bajo luz roja de seguridad (filtro rojo de acrílico LEE #106; intensidad, 0.1 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Los micelios congelados se conservaron a -80° C hasta su uso para la extracción de proteína.

Extracción de proteínas totales

El micelio congelado fue molido hasta obtener un polvo fino y después se transfirió a un tubo eppendorf de 1.5 ml hasta el nivel de 0.3 ml. A cada muestra se le adicionaron 400 μl de uno de los siguientes buffers de extracción: **Tris-NaCl** (Tris-HCl 20 mM pH 7.6, NaCl 10 mM, deoxicolato de sodio 0.5 mM); **PBS** (NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Na_2HPO_4 10 mM, KH_2PO_4 2 mM, pH 7.4); **RIPA** (0.5% Triton-X100, 0.1% deoxicolato de sodio, 0.1% SDS, KCl 137 mM, EDTA 1 mM, Hepes 50 mM pH 7.4, Leupeptina 1 mM, pepstatina A 1 mM); **Tris-EDTA** (Tris 50 mM, EDTA 10 mM). También, se agregó a cada muestra PMSF 1 mM (fluoruro de fenilmetilsulfonilo), 20 μl de cóctel inhibidor de proteasas (P 8215, SIGMA) y glicerol (concentración final de 20%). Se mezcló con vórtex hasta obtener una

mezcla homogénea. Las muestras colocadas en agua-hielo fueron sonicadas 4 veces durante 15 segundos con descansos de 30 segundos, utilizando una amplitud de 50 (Sonics & Materials INC., Modelo VC130). Después, se centrifugaron a 13000 rpm por 20 minutos a 4° C. Se recuperó el sobrenadante y la cuantificación de proteínas se llevó a cabo por el método de Bradford (Bradford, 1976). Al sobrenadante de algunas muestras se le adicionó ácido tricloroacético (TCA) al 20% v/v y se precipitaron las proteínas en hielo durante 30 minutos. Éstas fueron resuspendidas en 50 µl de NaOH 0.2 M y 50 µl de buffer de extracción. Las proteínas se conservaron a -20 ° C.

Western Blot

Los geles desnaturizantes de poliacrilamida (SDS-PAGE, por sus siglas en inglés) se hicieron según lo reportado (Bollag y Edelstein, 1991). La transferencia a las membranas de nitrocelulosa (Amersham Hybond ECL, GE Healthcare) se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante. Las membranas fueron teñidas con rojo de ponceau (50% de ácido acético glacial y 0.1% de reactivo de ponceau S) durante 30-45 minutos para comprobar la calidad de la transferencia. Después de ser desteñidas con agua destilada estéril (dH₂O), las membranas fueron bloqueadas en una solución de TBS-T (Tris-HCl 20 mM pH 7.5, NaCl 150 M, 0.1% Tween-20) con leche al 5% (Bio-Rad Laboratories). Los anticuerpos primarios, IgG's de conejo, fueron diluidos en TBS-T: Ac αBLR-2, 1:200; Ac αGcn5 (y-300, Santa Cruz Biotechnology, INC.), 1:1000; Ac αH3Ac (Millipore) 1:10000; e incubados 48 h (Ac αBLR-2), o toda la noche (Ac αGcn5 y Ac αH3Ac) a 4° C con agitación suave. El anticuerpo secundario, IgG anti-conejo producido en cabra,

acoplado a peroxidasa de rábano (Millipore) se incubó durante 2 h a 4° C con agitación suave. El revelado se llevó a cabo según lo reportado por Yakunin y Hallenbeck (1998), con algunas modificaciones. Se utilizaron dos soluciones recién preparadas: A) 9 ml dH₂O + 1 ml Tris-HCl 1 M pH 8.5 + 15 µl ácido cumárico 90 mM + 33 µl luminol 250 mM; B) 9 ml dH₂O + 1 ml Tris-HCl 1 M pH 8.5 + 3 µl peróxido de hidrógeno al 30%. La membrana previamente lavada con TBS-T fue sumergida en la mezcla de estas 2 soluciones durante 2 minutos. Después se colocó en un hipercassette de revelado en donde, bajo condiciones de oscuridad, se expuso una película fotográfica y se reveló manualmente.

Inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP)

Los ensayos de ChIP se realizaron según Uresti-Rivera *et al.*, (manuscrito en preparación). Los micelios de la cepa WT de *T. atroviride*, (oscuridad, 30 y 120 minutos después del pulso de luz azul) fueron colectados bajo luz roja de seguridad. Las muestras fueron fijadas en oscuridad durante 15 minutos a temperatura ambiente, en una solución de entrecruzamiento (Hepes 50 mM pH7.4, KCl 137 mM, EDTA 1 mM), a la cual se le adicionó formaldehído a una concentración final del 1%. La inmunoprecipitación se hizo con Ac αBLR-2, Ac αGcn5, Ac αH3Ac, y Ac αH3 (Millipore). Después de la extracción de DNA con fenol-cloroformo, las pastillas fueron resuspendidas en 50 µl de agua, y analizadas por PCR. Se amplificaron seis regiones a lo largo del promotor del gen que responde a la luz, *phr-1* (Figura 7A). Los pares de oligonucleótidos utilizados se encuentran enlistados en la Tabla S1. Las condiciones de PCR utilizadas fueron: 5 minutos a 94° C, 32 ciclos de 94° C (30 segundos), 52° C (30 segundos), y 72° C

(30 segundos), con una extensión final de 5 minutos a 72° C. Los productos de PCR se resolvieron en geles de agarosa al 2% y la intensidad de las bandas fue cuantificada con el Software Quantity-One (Bio-Rad Laboratories). A cada valor obtenido se le restó el de la muestra tratada sin anticuerpo (No Ac) y después fue normalizado con respecto a su input: $[(\text{muestra} - \text{No Ac})/\text{input}] * 100$.

RESULTADOS

Selección de un péptido inmunogénico y generación del anticuerpo α BLR-2

Los estudios epigenéticos y su relación con la percepción y la transducción de la señal luminosa, han sido en general escasos, mientras que en hongos estos análisis han sido prácticamente nulos. Debido a lo anterior, y considerando que el hongo filamentoso *Trichoderma atroviride* es utilizado como un modelo “simple” de respuesta a la luz, hemos decidido mapear a nivel global en este sistema, los sitios blanco de la proteína BLR-2 (uno de los componente del sistema fotorreceptor, con actividad de factor transcripcional), así como las posibles modificaciones en los patrones de acetilación del aminoácido lisina de la histona H3, asociadas a los sitios blancos de BLR-2, bajo diferentes condiciones de luz. Para llevar a cabo los análisis epigenéticos en respuesta a la luz, es necesario realizar ensayos de inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP, de sus siglas en inglés), y para esto se requiere de anticuerpos que reconozcan específicamente a las proteínas blanco (en este caso BLR-2 y H3Ac), que se sospecha están interactuando con el DNA formando un complejo o complejos. La finalidad de estos anticuerpos, es enriquecer las zonas del DNA dónde se está llevando a cabo la interacción con la proteína de interés, para posteriormente secuenciarlas y mapearlas sobre el genoma de *T. atroviride*.

El anticuerpo dirigido contra la proteína BLR-2 (Ac α BLR-2) no existe comercialmente, por lo que se seleccionó un péptido utilizando el programa Peptide Finder (<http://www.proteinlounge.com/biosyn/peptideFind.asp>). Del análisis de los péptidos, se eligió aquel que presentó mayor antigenicidad (Fig. 1A)

y fue sintetizado por Bio-Synthesis Inc. Este péptido se inyectó en un conejo, se siguieron los protocolos estándar y el suero obtenido nos fue proporcionado por la empresa. Para purificar el anticuerpo se utilizó una columna de agarosa-proteína A, la cual se une a la fracción cristalizante de las inmunoglobulinas IgGs. De dos purificaciones realizadas, las 3 primeras fracciones colectadas se visualizaron en un gel desnaturante de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 12% para determinar su calidad. En el gel, se observaron las bandas correspondientes a las cadenas pesadas (53 kDa) y ligeras (22.5 kDa) que conforman a las inmunoglobulinas de la clase G, lo cual confirmó su purificación (Fig. 1B).

Estandarización del método de extracción de proteína total

Los protocolos que se han reportado para la extracción de proteína de *Trichoderma*, han sido poco eficientes y con bajos rendimientos, motivo por el cual decidimos montar nuestro propio protocolo de extracción. Se crecieron las distintas cepas de *T. atroviride* bajo diferentes condiciones de luz, se colectó el micelio, se congeló con nitrógeno líquido y se molió hasta obtener un polvo fino. Al micelio molido se le trató con diferentes buffers: Tris-EDTA, Tris-NaCl, RIPA (buffer de radioinmunoprecipitación, por sus siglas en inglés), y PBS (buffer de fosfatos salinos, de sus siglas en inglés).

Basándonos en algunos protocolos reportados (Nandakumar, 2003), también se probó el uso de ácido tricloroacético (TCA) para precipitar las proteínas, las cuales después fueron resuspendidas en NaOH 0.2 N. Las proteínas fueron cuantificadas por el método de Bradford y su calidad se visualizó por medio de un SDS-PAGE (Fig. 2).

(A)
 MSHGPPPLHEDLFSFANFDVLPAPFLGGHSHAIPVSTSMADALSTDDGSMAFLDSDIIESFGG
 DLSMSLGSAASVLDGDSGGMGSDMISPEAILNAENQFNPVANDVPGAGPLPAAAFTPGNA
 ASQPNNSNNSL**TEFTKRKNWPAKVVEEL**SDLLQLLDSNGRIKFSSPSITALAGYTVVEEVQDV
 FLKDLIHPDDQGVLVSELHESIATGNSLRMFYRMRKKDGTYAIFEAVGHAAHIAAARFAPNPNN
 QSPFCQAVFMARLYPTKNATLLDSFLEHKIENERLRRRIAELRREEEA**EVEEAQRQWAQS**
RDGRSDITPSEGTGMSLTPLPRMGQEMISSENDD**GALTRKNLEDATSKSRQDSL**RDKMAR
 IEASSADTIALLTGIENGERMATGNRSPT**LIKGDAGIA**IPMDRENRSGEKKKKLKLAAEEYVCT
 DCGTLDSPewRKGPNGPKTLCNACGLRWAKKEKKRN**SIGTPLSKPTATPAAG**

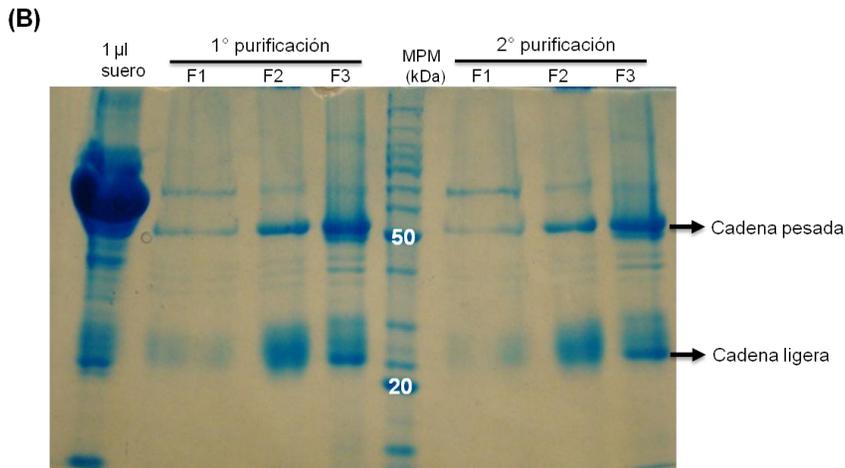


FIG. 1. Regiones de la proteína BLR-2 altamente inmunogénicas y purificación del Ac α BLR-2. (A) Secuencia de aminoácidos de la proteína BLR-2. Se propusieron 5 péptidos (letras en negrita) para la inmunización del conejo y posterior obtención de un anticuerpo policlonal dirigido contra BLR-2. Se escogió aquel que presentó mayor grado de inmunogenicidad (secuencia subrayada). **(B)** Del suero obtenido, el anticuerpo (IgG) que reconoce la proteína BLR-2 se purificó por medio de columnas de agarosa-Proteína A. En un gel desnaturizante de poliacrilamida al 12% se visualizaron 20 μ g de proteína de las primeras fracciones colectadas (F1, F2, F3). Se realizaron dos purificaciones independientes. Las cadenas pesadas y ligeras de las IgG's pesan 53 y 22.5 kDa, respectivamente. MPM – marcador de peso molecular.

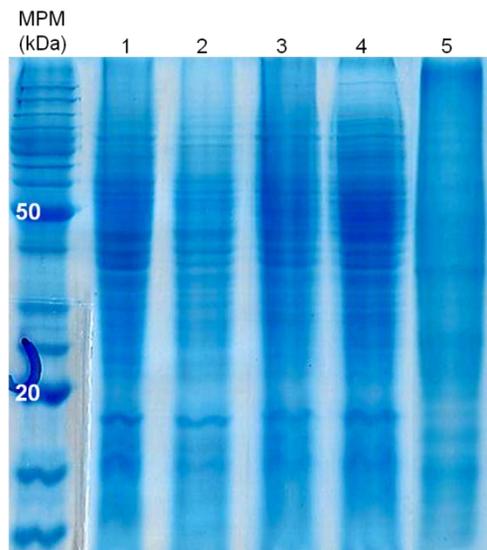


FIG. 2. Comparación de la calidad de las proteínas extraídas con diferentes buffers. SDS-PAGE teñido con azul de coomassie con 20 μ g de proteína total de la fracción soluble, extraída con distintos buffers: línea 1, Tris-NaCl; línea 2, RIPA; línea 3, Tris-EDTA; línea 4, PBS; línea 5, Tris-NaCl seguida de una precipitación con ácido tricloroacético (TCA) y resuspendidas en NaOH 0.2 N. MPM – marcador de peso molecular.

Se obtuvieron bandas mejor definidas en la extracción con PBS sin haber precipitado con TCA. Una vez estandarizado el protocolo, se extrajo proteína de las cepas WT, WT tratada con TSA (tricostatina A), $\Delta blr-1$, $\Delta blr-2$, OEblr2-13, y $\Delta tgcn5$ de *T. atroviride*. Después de cada extracción se corroboró que las proteínas no se encontraran degradadas por medio de un SDS-PAGE, teñido posteriormente con azul de coomassie (Fig. 3).

Identificación de las proteínas BLR-2 y GCN5 con los anticuerpos α BLR-2 y α Gcn5 por medio de Western blot

Habiendo comprobado la integridad de las proteínas, se procedió a realizar los Western blots (WB). Se realizaron WB para la proteína BLR-2 y GCN5, una histona acetiltransferasa (HAT, de sus siglas en inglés). En todos los casos las proteínas extraídas se corrieron en un SDS-PAGE y después se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. La calidad de la transferencia fue verificada por tinción, con rojo de ponceau. Una vez verificada la calidad de la transferencia, se bloqueó cada una de las membranas con una solución al 5% de leche en buffer TBS-T (buffer salino de tris - tween 0.1%). Después, se incubó el anticuerpo primario correspondiente (α BLR-2, α Gcn5) y finalmente el anticuerpo secundario (anti-conejo acoplado a peroxidasa de rábano). Se probaron varias diluciones de los anticuerpos primario y secundario, y diferentes tiempos de incubación para lograr obtener bandas discretas, con el menor fondo posible.

En el WB con el Ac α BLR-2 se usaron hasta 100 μ g de proteína total de la cepa WT, pero no se logró visualizar una banda alrededor de los 52.4 kDa, peso molecular teórico para BLR-2.

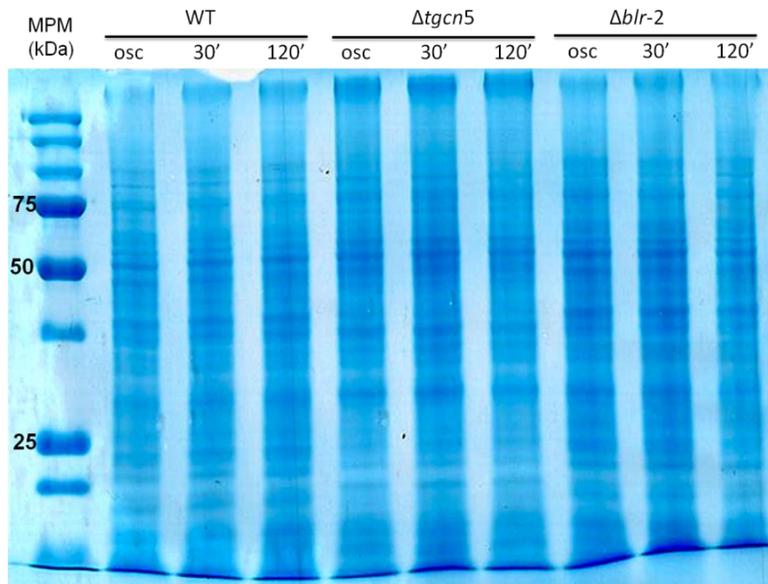


FIG. 3. SDS-PAGE de calidad de proteína total. En la imagen se muestra un gel de calidad representativo de proteínas extraídas con PBS. En cada carril fueron cargados 20 μ g de proteína de la cepa silvestre (WT) y mutantes ($\Delta tgcn5$ y $\Delta blr-2$) de *T. atroviride* bajo condiciones de oscuridad (osc), 30 y 120 minutos después del pulso de luz. MPM – marcador de peso molecular.

Por ello, se repitió el WB utilizando 20 µg de proteína de la cepa sobre-expresante del gen *blr-2*, OEblr2-13 (Esquivel-Naranajo y Herrera-Estrella, 2007). De esta manera se logró observar una banda con un peso molecular entre los 90 y 100 kDa, en el carril de la cepa OEblr2-13, pero no en el de la Δ *blr-2*, (Fig. 4A). La diferencia entre el peso molecular teórico y el obtenido en este experimento puede deberse a las propiedades ácidas de la proteína, tal como fue reportado en *N. crassa* para white collar 2 (WC-2), proteína ortóloga de BLR-2 (Talora *et al.*, 1999). Para el WB α GCN5, se utilizaron 20 µg de proteína de las cepas WT y Δ *tgnc5*. El peso teórico para la proteína Gnc5 en *T. atroviride* es de 46.5 kDa. Como resultado se observó una banda de aproximadamente 45 kDa, en los carriles correspondientes a los extractos de la WT bajo distintas condiciones: oscuridad, 30 y 120 minutos después del pulso de luz azul. Dicha banda no se observó en la mutante nula (Fig. 4B).

Medición cualitativa de la acetilación de la histona H3 por medio de Western Blot

Con la finalidad de comparar los niveles de acetilación en condiciones de oscuridad y después de un pulso de luz azul, se realizó un WB con el Ac α H3Ac. Un primer experimento se realizó con 20 µg de proteína de la cepa WT y se observó un incremento en la acetilación después del pulso de luz (Fig. 5A).



FIG. 4. Identificación de las proteínas BLR-2 y GCN5 con sus respectivos anticuerpos. (A) WB con el Ac α BLR-2 utilizando los extractos de proteína total soluble de las cepas sobre-expresante (OEblr2-13), y mutante nula ($\Delta blr-2$) del gen *blr-2*. **(B)** WB con Ac α Gcn5 utilizado la cepa silvestre (WT) bajo condiciones de oscuridad (osc), 30 y 120 minutos después del pulso de luz, y la mutante nula del gen *gcn5* ($\Delta tgcn5$), el cual codifica para una acetiltransferasa de histonas. Las flechas indican las bandas específicas. MPM – marcador de peso molecular (kDa).

En experimentos posteriores se utilizaron 50 µg de los extractos de las cepas WT, $\Delta blr-1$, y $\Delta tgc5$, y 10µg de proteína de la cepa WT tratada con TSA. La inducción de la acetilación después de la exposición a la luz en el caso de la WT (Fig. 5B), no fue tan claro como en el primer experimento debido a la baja señal obtenida (Fig. 5A). En comparación con las otras extracciones, el de la cepa WT-TSA presentó el mayor grado de acetilación.

Este nivel fue incrementando conforme pasó el tiempo después del pulso de luz azul. En la cepa $\Delta blr-1$, se observó acetilación después de 120 minutos de haber sido expuesta a la luz azul. En los extractos de la cepa $\Delta tgc5$, se observó que el nivel de acetilación disminuyó 30 minutos después del pulso de luz, pero éste volvió a sus niveles basales de oscuridad a los 120 minutos (Fig. 5B).

Estandarización del método de Inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP)

Para establecer un método de inmunoprecipitación de la cromatina adecuado para *T. atroviride*, se analizaron diferentes protocolos reportados (Gendrel *et al.*, 2002; Lawrence *et al.*, 2004; Carey *et al.*, 2009; Shang *et al.*, 2000). Primero, se estandarizó el tiempo de entrecruzamiento DNA-proteína con formaldehído. Muestras por duplicado se entrecruzaron durante 0, 15, 30 y 60 minutos. Después, a un grupo se le trató con RNasa y proteinasa K para revertir el entrecruzamiento. Finalmente, se extrajo el DNA con fenol/cloroformo de las muestras de ambos grupos. Un entrecruzamiento es óptimo, cuando es posible revertirlo para poder extraer DNA del núcleo. Un corto lapso de entrecruzamiento no permitirá que se conserve la unión proteína-DNA y al inmunoprecipitar con un anticuerpo, el enriquecimiento de DNA no será representativo. Por el contrario, un tiempo muy

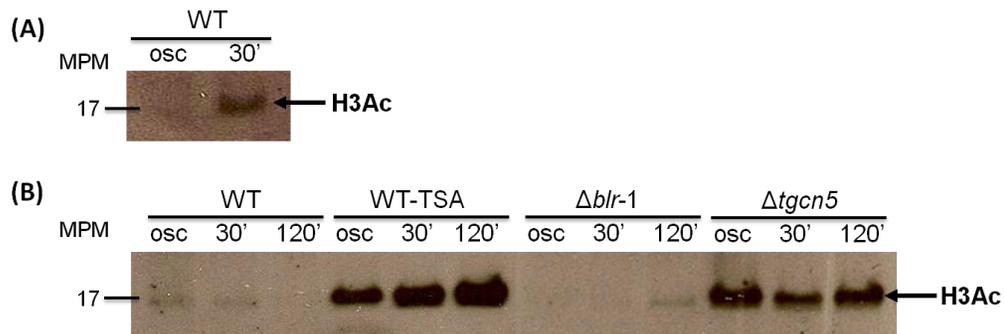


FIG. 5. Medición cualitativa de la acetilación en la histona H3 en distintas condiciones de luz. Western blot realizado con Ac α H3Ac utilizando diferente cepas de *T. atroviride*: **(A)** silvestre (WT), **(B)** silvestre con tratamiento con un inhibidor de desacetilasa de histonas (WT-TSA), mutantes nulas de los genes *blr-1* ($\Delta blr-1$) y *gcn5* ($\Delta tgcn5$). Las proteínas fueron extraídas a partir de micelio colectado antes del pulso de luz (osc) y 30 y 120 minutos después de éste. Las flechas indican las bandas específicas. MPM – marcador de peso molecular (kDa).

largo de entrecruzamiento impedirá la extracción de DNA después de llevar a cabo el tratamiento para revertir el entrecruzamiento. El DNA extraído de cada una de las muestras se corrió en un gel de agarosa (Fig. 6A). Como se esperaba, pudo extraerse DNA de las dos muestras en las que no se llevó a cabo el entrecruzamiento (0 minutos). De las muestras que no fueron tratadas con RNasa y proteinasa K, para revertir el entrecruzamiento, no se logró purificar DNA debido a que éste permaneció unido a las proteínas y en la extracción con fenol/cloroformo no fue soluble en agua, quedando entonces en la parte orgánica. Por su parte, de las muestras en las que sí se revirtió la unión DNA-proteína, se logró purificar DNA. Una mayor cantidad de DNA purificado, significaría un tiempo óptimo de entrecruzamiento. Sin embargo, no se logró observar una diferencia notoria en la cantidad de DNA obtenido entre estas muestras. Esto nos indica que 15 minutos de entrecruzamiento son suficientes.

Por otro lado, el enriquecimiento de regiones inespecíficas de DNA al realizar un CHIP, depende mucho del tamaño de los fragmentos de DNA obtenidos después de sonicar. Para minimizar las inespecificidades, se recomienda sonicar la cromatina hasta obtener fragmentos entre los 250 y 750 pares de bases (Haring *et al.*, 2007). En nuestro caso, establecimos que deben realizarse de 20 a 25 sonicaciones de 30 segundos, con reposos de 30 segundos en hielo entre cada sonicación para lograr obtener fragmentos de DNA alrededor de 500 pb (Fig 6B). Los pasos de pre-lavado, bloqueo de las perlas magnéticas (dynabeads), los lavados finales, y la cantidad necesaria de anticuerpo para la inmunoprecipitación fueron determinados a base de prueba y error.

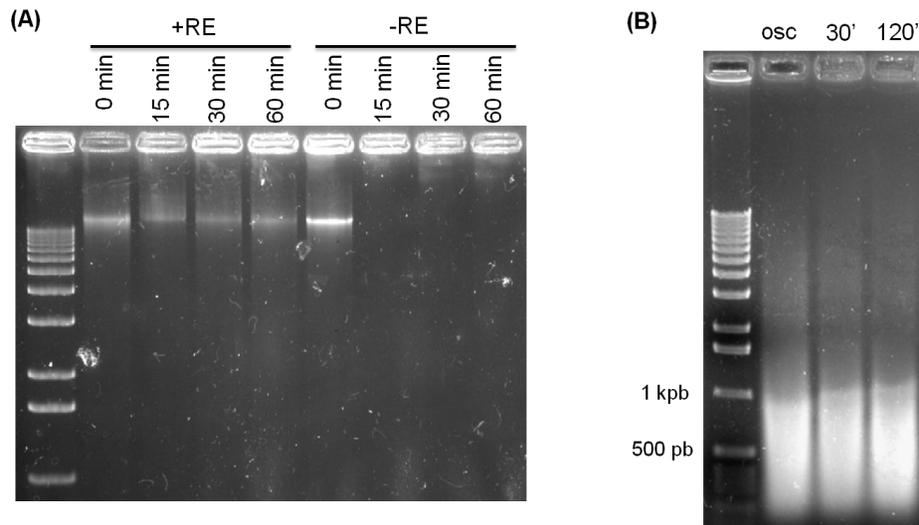


FIG. 6. Determinación del tiempo de entrecruzamiento de la cromatina con formaldehído y estandarización del número de sonicaciones para obtener tamaños de DNA alrededor de los 500 pb. (A) Muestras de micelio fresco fueron entrecruzadas con formaldehido al 1% durante 0, 15, 30 ó 60 minutos. En unas muestras se llevó a cabo la reversión del entrecruzamiento (+RE) con RNasa y proteinasa K, mientras que en otras no (-RE). Se purificó DNA con fenol/cloroformo de todas las muestras y se corrieron en un gel de agarosa. **(B)** Micelio colectado bajo condiciones de oscuridad (osc), 30 y 120 minutos después del pulso de luz fue entrecruzado durante 15 minutos y posteriormente sonificado 23 veces durante 30 segundos, utilizando una amplitud de 75. Los fragmentos de DNA obtenidos se resolvieron en un gel de agarosa al 2%.

Inmunoprecipitación de la cromatina

Los ensayos de ChIP se realizaron según Uresti-Rivera *et al.*, (en preparación). Se hicieron varios ChIP's con el micelio de la cepa silvestre (WT), utilizando los Ac α BLR-2, Ac α H3Ac, Ac α H3, y Ac α Gcn5. Para validar los ChIP's, se amplificaron varias regiones del promotor del gen *phr-1* (Figura 7A), el cual ha sido utilizado como marcador de respuesta a la luz azul (Casas-Flores *et al.*, 2004). Se utilizaron seis pares de oligonucleótidos a lo largo del promotor (Tabla S1).

Las bandas obtenidas de los PCR's (Figura 7B) se cuantificaron y normalizaron con respecto al input correspondiente. Los valores obtenidos fueron graficados (Figura 7C). En el ChIP con el Ac α BLR-2, en condiciones de oscuridad se presentó el mayor enriquecimiento de todas las regiones, a excepción de la 3 (R3). La región 2 (R2) fue la que alcanzó la mayor cuantificación relativa bajo estas condiciones. Río-abajo, junto a la R2, está la región LRE (elementos de respuesta a luz, de sus siglas en inglés). En *N. crassa* se ha reportado que la región LRE es un elemento necesario para la activación de la transcripción de genes que responden a luz azul (Froehlich *et al.*, 2002; He y Liu, 2005). El posicionamiento de BLR-2 a lo largo del promotor de *phr-1* disminuye casi por completo 30 minutos después del pulso de luz, pero al parecer 120 minutos después del pulso de luz vuelve a posicionarse sobre la región LRE.

En base a la cuantificación relativa de cada región obtenida con el Ac α Gcn5, podemos sugerir que, en condiciones de oscuridad GCN5 se encuentra posicionada principalmente en la región UCR (región conservada río-arriba, por sus siglas en inglés) y en la LRE2, aunque también hubo enriquecimiento de la R3 y R2. Treinta minutos después del pulso de luz, GCN5 parece sólo estar presente

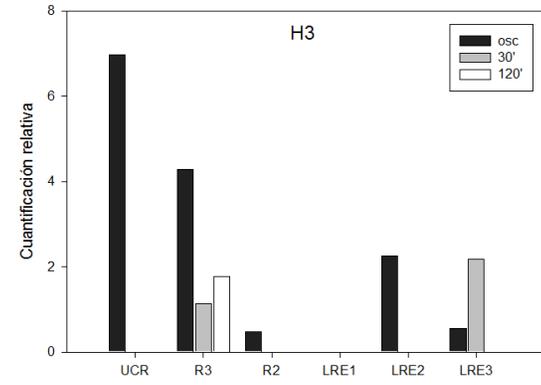
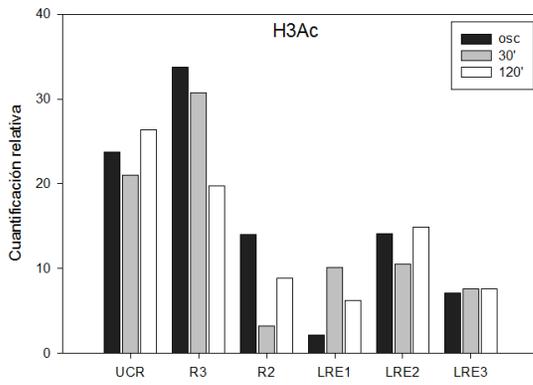
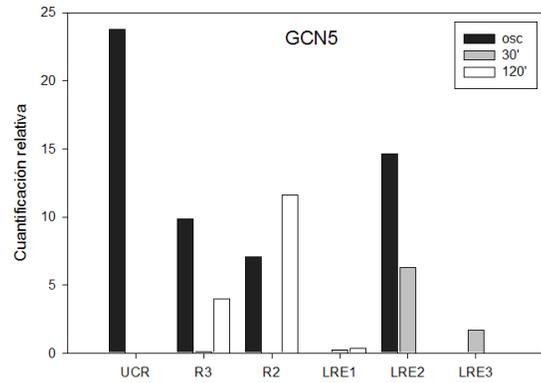
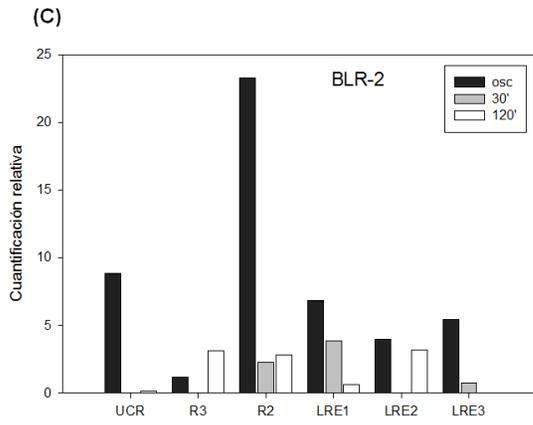
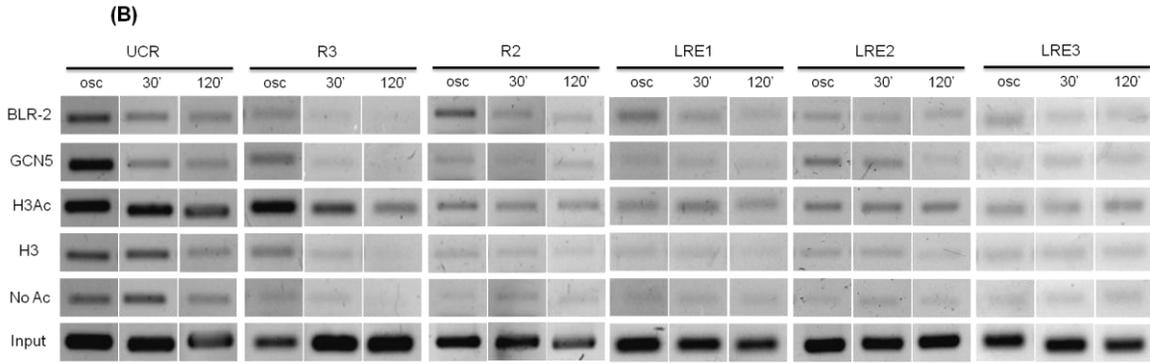
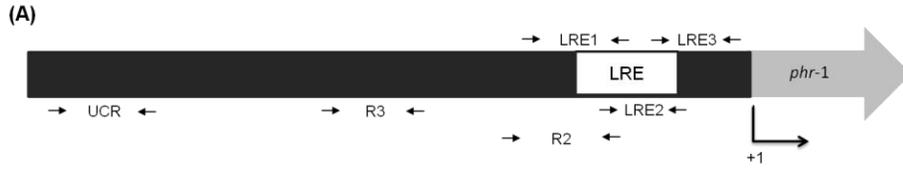


FIG. 7. Ensayos de inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP). (A) Representación esquemática del promotor del gen que responde a la luz, *phr-1*. Seis pares de oligonucleótidos (Tabla S1) fueron diseñados a lo largo del promotor de *phr-1*, para mapear la localización de BLR-2 y GCN5, así como determinar el nivel de acetilación en cada región. Nótese que la amplificación de la región LRE, se hizo por partes, utilizando 3 pares diferentes de oligonucleótidos (LRE1, LRE2 y LRE3). **(B)** Los ensayos de ChIP se realizaron con micelio crecido en oscuridad (osc) y con micelio expuesto a un pulso de luz y colectado 30 y 120 minutos después. El DNA inmunoprecipitado con los anticuerpos α BLR-2, α Gcn5, α H3, α H3Ac fue utilizado para amplificar por PCR las seis regiones del promotor de *phr-1*. No Ac: muestras tratadas sin anticuerpo. Input: muestra de cromatina tomada antes de la inmunoprecipitación. **(C)** Cuantificación relativa con respecto al input de las bandas obtenidas de los PCR's. UCR: región conservada río-arriba; LRE: elementos de respuesta a luz.

en las regiones más cercanas al sitio de inicio de la transcripción, LRE2 y LRE3. Habiendo transcurridos 120 minutos después del pulso de luz azul, GCN5 se encontró posicionada en las regiones R2 y R3.

El ensayo con el Ac α H3Ac fue el que arrojó mayores valores de cuantificación relativa. Las regiones que presentaron mayor acetilación fueron UCR y R3 en las 3 condiciones estudiadas. Las regiones R2 y LRE2 presentaron la misma tendencia de acetilación, disminuyó a los 30 minutos, y aumentó 120 minutos después de la exposición a la luz azul; contrario a lo que se observó en la región LRE1, que presentó una mayor acetilación 30 minutos después del pulso de luz. La región LRE3 presentó niveles de acetilación muy parecidas en los 3 tiempos.

La histona H3 presentó los valores más pequeños de cuantificación en comparación con los otros CHIP's. En oscuridad se observó enriquecimiento principalmente de las regiones UCR, R3, LRE2 y en menor cantidad en la R2 y LRE3. Este enriquecimiento se perdió por completo en las regiones UCR, R2 y LRE2, 30 y 120 minutos después del pulso de luz. No se obtuvo enriquecimiento de la región LRE1 en ninguno de los tiempos.

Como control de la especificidad de la inmunoprecipitación de cada anticuerpo, se amplificó por PCR una región del gen *actina*, el cual se sabe no es inducido por luz azul (Figura S1).

DISCUSIÓN

En los últimos años, ha habido un considerable progreso en el estudio de los sistemas de percepción de la luz, y de las respuestas desencadenadas por ésta en *Trichoderma* spp. El complejo (BLRC) formado por las proteínas BLR-1 y BLR-2, (Cervantes-Badillo *et al.*, en revisión) fue el primer sistema fotorreceptor de luz descrito en este hongo (Casas-Flores *et al.*, 2004). Desde entonces se han realizado análisis genéticos, transcriptómicos y proteómicos en respuesta a la luz azul en *T. atroviride*, sin embargo no se han realizado estudios a nivel epigenético relacionados con la percepción de la señal luminosa. Por ello, fue de nuestro interés realizar ensayos de inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP), con la finalidad de mapear a nivel global los sitios blanco de la proteína BLR-2, así como su posible relación con los patrones de acetilación en la histona H3 de los promotores de genes fotoinducibles bajo diferentes condiciones de luz. Además, se realizaron ensayos de ChIP utilizando un anticuerpo dirigido contra una acetiltransferasa de histonas, GCN5, cuya mutación por delección provoca una desregulación de la transcripción de los genes responsivos a la luz en *T. atroviride* (Uresti-Rivera *et al.*, en preparación).

Para la extracción de proteínas en *Trichoderma* spp., se han reportado varios protocolos, los cuales en nuestras manos han sido poco eficientes en cuanto al rendimiento y la calidad de las proteínas, motivo por el cual, se probaron diferentes protocolos de extracción de proteína total, a los cuales se les realizaron algunas modificaciones. El protocolo que dio un mejor resultado en cuanto a

calidad de las proteínas y en rendimiento, fue el basado en PBS (Figura 2, línea 4), y fue el que se decidió utilizar en los experimentos subsiguientes.

Dado que los experimentos centrales del presente trabajo se basaron en la inmunoprecipitación de la cromatina, y estos ensayos son realizados con anticuerpos dirigidos contra una proteína blanco en particular, lo primero que se realizó fueron análisis tipo WB para identificar con anticuerpos específicos a las proteínas BLR-2, GCN5, y a la histona H3 acetilada (H3Ac).

Para el WB contra la proteína BLR-2, se identificó una banda de 95 kDa en el carril de la cepa sobre-expresante del gen *blr-2* (OE*blr-2*-13), mientras que en el carril correspondiente al de mutante nula del mismo gen (Δ *blr-2*), no se observó la banda (Figura 4A). La banda identificada no corresponde con el peso molecular teórico (52.4 kDa), sin embargo la diferencia presentada puede deberse al alto contenido de residuos ácidos de la proteína. Este mismo patrón se observó con la proteína ortóloga a BLR-2 en *N. crassa*, WC-2 (Talora *et al.*, 1999). La explicación fisicoquímica es que los residuos ácidos pueden ser repelidos por las cargas negativas del SDS, lo que resulta en una relación carga-masa inconsistente, y por ende, una migración inusual. Aunque la banda que detectamos en la cepa OE*blr-2* no aparece en la cepa mutante, la diferencia presentada entre el peso teórico y el experimental es de aproximadamente 30 kDa, por lo cual se propone realizar un análisis por espectrometría de masas para confirmar que la banda catalogada como BLR-2 es la proteína de interés.

Para el caso de GCN5, se logró identificar una banda de aproximadamente 45 kDa en los extractos de proteína de la cepa WT, cuyo peso molecular coincide con el

predicho, además de que dicha banda no se observó en la mutante $\Delta tgc5$ (Figura 4B).

Se tiene bien establecido que la acetilación de las lisinas de la histona H3 que se encuentran posicionadas sobre los promotores, son una marca epigenética de la actividad transcripcional de estos genes (Carrozza *et al.*, 2003). Rosales-Saavedra *et al.* (2006), determinaron por un análisis de microarreglos de cDNA que aproximadamente un 3% del genoma de *T. atroviride* se expresaba en respuesta a la luz azul. Estos datos se confirmaron más tarde con un análisis masivo por pirosecuenciación en *T. atroviride*, el cual permitió la identificación de 204 genes que son regulados por luz azul (Esquivel-Naranjo, *et al.*, resultados sin publicar, citado por Sánchez-Arreguín *et al.*, 2012). Por otra parte, un análisis proteómico mostró el incremento en los niveles de expresión de hasta 150 proteínas después de un pulso de luz (Sánchez-Arreguín *et al.*, 2012). Para determinar si un pulso de luz azul influye en la acetilación global de la histona H3, realizamos un WB utilizando un anticuerpo α H3Ac. Dicho anticuerpo reconoce la región amino terminal de la histona H3 acetilada en los residuos de lisina 9 y 14 (K9 y K14). En el presente trabajo se observó un incremento de los niveles de acetilación de la H3 en la cepa WT, 30 minutos después del pulso de luz (Figura 5A). En conjunto, los resultados mencionados y los nuestros sugieren una regulación epigenética en la transcripción de los genes responsivos a la luz.

Recientemente, se reportó en *N. crassa* que la proteína acetiltransferasa de histonas, NGF-1, (homóloga a GCN5 de *T. atroviride*) requiere del fotorreceptor WC-1 (el ortólogo a BLR-1 de *T. atroviride*) para llevar a cabo la acetilación de H3K14 del gen inducible por luz, *albino-3*. Nuestros resultados de WB con el Ac

α H3Ac, utilizando los extractos de proteína de la cepa silvestre y de la mutante en el gen *blr-1* (Figura 5B), muestran que la acetilación de la histona H3 inducida por luz, depende del fotorreceptor BLR-1, al igual que en *N. crassa*. Dado que el Ac α H3Ac está dirigido contra las lisinas 9 y 14, ensayos con Ac α H3Ac dirigidos contra las lisinas individuales, ayudarán a determinar cuál lisina es la blanco de acetilación en *T. atroviride*. Con respecto a los niveles de acetilación para la histona H3 en la cepa Δ *gcn5*, estos resultaron ser mayores en condiciones de oscuridad, así como 30 y 120 minutos después del pulso de luz azul, en comparación con los obtenidos en la WT (Figura 5B). Estos datos sugieren la participación de proteínas acetiltransferasas de histonas que pudieran estar siendo reguladas negativamente por la acetilación de GCN5 de *T. atroviride*.

El TSA, es un inhibidor de desacetilasas de histonas. Se ha reportado que es capaz de provocar distintos cambios fenotípicos y transcripcionales en varios organismos (Pile *et al.*, 2001; Grewal *et al.*, 1998; Ikegami *et al.*, 1993). En *T. atroviride*, se sabe que el TSA induce la esporulación de la colonia, aun en condiciones de completa oscuridad. También, se observó que la aplicación de TSA y la posterior exposición a un pulso de luz, ocasiona la expresión elevada del gen *phr-1*; en el gen represible *bld-2* la aplicación de TSA resulta en una alta expresión del gen en la oscuridad y una rápida disminución de ésta después del pulso de luz azul, en comparación con la cepa creciendo en ausencia de TSA (Uresti-Rivera *et al.*, en preparación). Concerniente al tratamiento de la cepa WT con TSA, el análisis de WB con el Ac α H3Ac mostró un alto nivel de acetilación en la H3 incluso en la oscuridad. Después del pulso de luz, el nivel de acetilación fue incrementando conforme pasó el tiempo (Figura 5B), lo que soporta nuestros

datos y la hipótesis sobre el papel de las HAT en la transcripción de los genes responsivos a la luz, en particular GCN5.

La organización del genoma en nucleosomas, unidad básica de la cromatina, constituye una barrera para la expresión de los genes. Sabemos que las histonas son substratos de modificaciones enzimáticas (acetilación, metilación, fosforilación, ubiquitinación, etc.) que pueden influir en la expresión de los genes. La acetilación de residuos de lisina en las histonas ha sido considerada como uno de los mecanismos más importantes para la regulación de la accesibilidad de la cromatina a factores de transcripción y a proteínas auxiliares responsables de la expresión génica global (Cheung *et al.*, 2000). Los ensayos de inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP) han sido cada vez más utilizados para mapear modificaciones de las histonas bajo ciertas condiciones y fondos genéticos.

En el presente trabajo, se estableció un protocolo de inmunoprecipitación de la cromatina para *T. atroviride*. Primero se optimizó el tiempo de entrecruzamiento con formaldehído. Este es un paso crítico, debido a que un exceso de entrecruzamiento DNA-proteínas, no podrá ser revertido y esto impedirá la posterior purificación del DNA. Por el contrario, un nivel bajo de entrecruzamiento no permitirá que se conserve la estructura de la cromatina, y las regiones de DNA inmunoprecipitadas con un anticuerpo no serán representativas de la condición estudiada. De los experimentos de entrecruzamiento realizados, se determinó que 15 minutos son suficientes, ya que no se observaron diferencias con respecto a 30 y 60 minutos de entrecruzamiento (Figura 6A). Para disminuir la probabilidad de enriquecer regiones inespecíficas, se recomienda trabajar con fragmentos de

cromatina menores a los 750pb. Por ello, establecimos que para lograr esta condición son necesarias de 20 a 25 sonicaciones de 30 segundos, utilizando una amplitud de 50 (Figura 6B).

En el presente trabajo, se realizaron ChIP utilizando Ac α BLR-2, α H3Ac, α H3, y α Gcn5. Para validar las regiones de DNA obtenidas, se amplificaron por PCR varias regiones del promotor del gen *phr-1* (Figura 7A), cuyo transcrito se sabe no se encuentra en oscuridad, pero se induce después de un pulso de luz azul (Berrocal-Tito *et al.*, 1999).

Los bajos niveles de histona H3 asociados al largo del promotor de *phr-1*, sugieren que hay un constante ensamble-desensable de los nucleosomas en los promotores de genes regulados por luz (Figura 7B y C).

En oscuridad, las proteínas BLR-2 y Gcn5 se encuentran en un complejo posicionado sobre la región promotora, listo para responder al estímulo de luz (Figura 8A). El posicionamiento de GCN5 sobre las regiones UCR (región conservada río-arriba) y R3, correlaciona con altos niveles de acetilación en dichas regiones. Al igual que ocurre en *N. crassa* (Brenna *et al.*, 2012), puede existir en *T. atroviride* una interacción directa entre el complejo fotorreceptor, BLR-1/BLR-2, y la acetiltransferasa de histonas, GCN5. Esta interacción explica el enriquecimiento obtenido de la región R2 y LRE2 con el Ac α Gcn5. Por otro lado, en oscuridad, la proteína BLR-2 está principalmente posicionada sobre la región R2 y LRE (elemento de respuesta a la luz); el enriquecimiento de la región UCR con el Ac α BLR-2 puede deberse a la participación de otra proteína, que interactúa directamente con esta región, como puede ser BLR-1. Esta hipótesis está soportada por los resultados obtenidos en el ensayo de cambio de movilidad

electroforética o EMSA (por sus iniciales en inglés), reportado por nuestro equipo de trabajo (Cervantes-Badillo *et al.*, en revisión, FGB). En dicho ensayo se demostró la capacidad de BLR-1 para unirse a la región UCR y LRE del promotor de *phr-1*. La región LRE, previamente reportada por Froehlich *et al.*, (2002), está conservada en todos los genes que responden a la luz de manera dependiente del complejo BLR en *T. atroviride* (Rosales-Saavedra *et al.*, 2006). El elemento regulatorio LRE, está conformado por cajas GATA, cuya secuencia consenso ha sido descrita en los genes regulados por luz de *N. crassa* (He y Liu, 2005). La región LRE del promotor del gen *phr-1* consta de dos cajas GATA, y se demostró que la caja ubicada río-abajo (GATA1) es suficiente para que se lleve a cabo la inducción del gen por luz (Cervantes-Badillo *et al.*, en preparación). La región UCR, reportada por primera vez por nuestro equipo de trabajo, comprende una caja tipo GATA-like (GATTC).

Treintas minutos después del pulso de luz (Figura 8B), los niveles de acetilación en las regiones UCR y R3 se mantienen, a pesar de la ausencia de GCN5. A este tiempo GCN5 aparece en regiones río-abajo, con respecto al posicionamiento de BLR-2, lo que indica que GCN5 acetila las regiones sobre las que después actuará el complejo BLR.

En la Figura 8C, se indica el posible posicionamiento de GCN5 y BLR-2 sobre el promotor del gen *phr-1*, 120 minutos después del pulso de luz azul. El hecho de que GCN5 vuelva a posicionarse sobre la R3, y el incremento de la acetilación de la histona H3 en la región UCR, parecer indicar que se volverá a formar el mismo complejo que en oscuridad.

Los resultados presentados, son solo una parte del trabajo realizado, pues la mayor información se obtendrá después del análisis de las secuencias obtenidas de cada ChIP-seq.

En conjunto, nuestros resultados sugieren que en la oscuridad las proteínas BLR-2 y GCN5 se encuentran posicionadas en el promotor del gen *phr-1*, listas para ejercer su función como activador y coactivador de la transcripción, respectivamente, después de un pulso de luz azul. De igual manera sugieren, que la acetilación es un proceso epigenético de regulación de la transcripción de genes responsivos a las luz azul en *T. atroviride*. Análisis de las secuencia de los ChIP realizados en el presente trabajo, ayudarán a ampliar el conocimiento sobre la regulación de genes ante un estímulo luminoso.

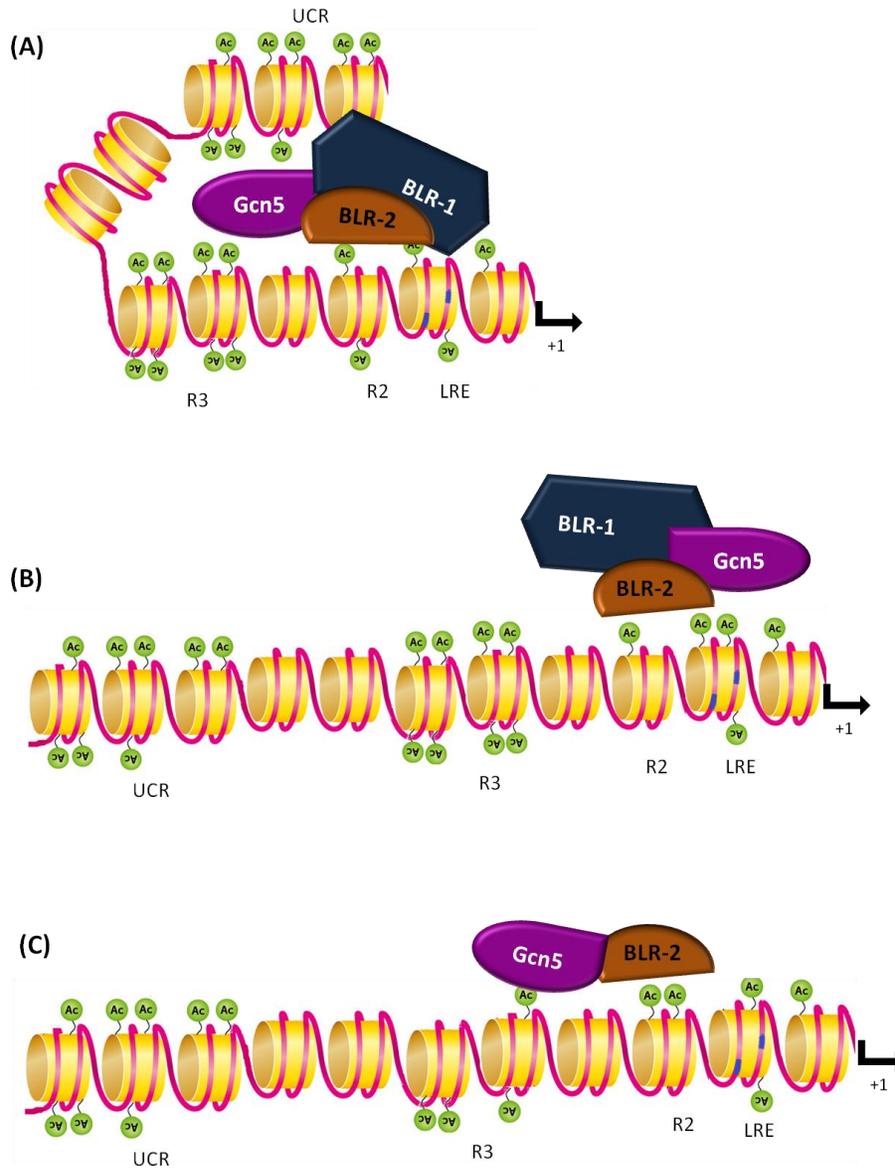


FIG. 8. Modelo hipotético de las modificaciones e interacciones que suceden en la cromatina de la región promotora del gen *phr-1* de *T. atroviride* bajo diferentes condiciones de luz. En base a los resultados obtenidos de los ChIP con la cepa WT, utilizando Ac α BLR-2, α Gcn5 y α H3Ac, se ubicó el posicionamiento de las proteínas BLR-2 y GCN5, así como los niveles de H3Ac a lo largo del promotor del gen inducido por luz, *phr-1*. Condición de oscuridad**(A)**, 30 minutos después del pulso de luz **(B)** y 120 minutos después del pulso **(C)**. UCR: región conservada río-arriba; R3: región 3; R2: región 2; LRE: elementos de respuesta a luz; círculos verdes: H3Ac; figura morada: proteína GCN5; figura café: proteína BLR-2; figura azul: proteína BLR-1; fragmentos de la cromatina en azul sobre la región LRE: cajas GATA.

FIGURAS SUPLEMENTARIAS

Tabla S1. Oligonucleótidos utilizados en este trabajo.

Nombre	Secuencia (5'-3')	Gen que amplifica	Posición⁺
R2 Fw	CGACTGCATTATATGTAGGGTCATC	<i>phr-1</i>	-337
R2 Rv	TGGCTTGGTATCCCTGCGTAAGTAG	<i>phr-1</i>	-177
R3 Fw	ATCCAACACGTCGCTTGCCTCTTTC	<i>phr-1</i>	-550
R3 Rv	GCGGTACCTTGTACCTTTACATAGT	<i>phr-1</i>	-426
LRE1 Fw	TCATCCAGCTGATGGCTTATGC	<i>phr-1</i>	-317
LRE1 Rv	ATTTCAAGTGGCTTGGTATCCC	<i>phr-1</i>	-169
LRE2 Fw	CTCGCTACTTACGCAGGGATAC	<i>phr-1</i>	-205
LRE2 Rv	ATATGGCCTCGATGTGGC	<i>phr-1</i>	-98
LRE3 Fw	ACCAGCCAAAGTCCCGATC	<i>phr-1</i>	-155
LRE3 Rv	GAGGCAAGAAGTGAAGTAC	<i>phr-1</i>	-17
UCR Fw	CTCAGGCTGATTCACATCCAAAAGTGGC	<i>phr-1</i>	-936
UCR Rv	CGTTCTGCCTCATTTCAGAACAAATACG	<i>phr-1</i>	-813
Actina Fw	TCCCGCCTTCTACGTCTCTATCCA	<i>actina</i> [*]	
Actina Rv	CCTTGCGCGAAAATCACTTACCA	<i>actina</i> [*]	

⁺ posición con respecto al inicio de la transcripción

^{*} región del marco de lectura abierto

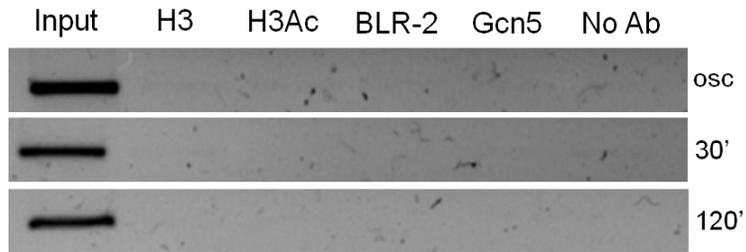


FIG. S1. Amplificación del gen *actina*. Para corroborar que las inmunoprecipitaciones realizadas con cada anticuerpo (H3, H3Ac, BLR-2 y Gcn5) hayan sido de manera específica, se utilizó como control negativo la amplificación de un fragmento del gen *actina*. Se utilizaron las muestras de DNA de los micelios crecidos bajo oscuridad (osc) y los colectados 30 y 120 minutos después de haber recibido un pulso de luz azul. No Ac: muestras tratadas sin anticuerpo. Input: muestra de cromatina tomada antes de la inmunoprecipitación.

REFERENCIAS

1. **Berrocal-Tito GM, Sametz-Baron L, Eichenberg K, Horwitz BA, Herrera-Estrella A.** 1999. Rapid blue light regulation of a *Trichoderma harzianum* photolyase gene. *J. Biol. Chem.* **274**:14288-14294.
2. **Berrocal-Tito GM, Rosales-Saavedra T, Herrera-Estrella A, Horwitz B.** 2000. Characterization of blue-light and developmental regulation of the photolyase gene *phr-1* in *Trichoderma harzianum*. *Photochem. Photobiol.* **71**:662–668.
3. **Bradford M.** 1976. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal. Biochem.* **72**:248-254.
4. **Brenna A, Benedetto G, Filetici P, Ballario P.** 2012. Physical association of the WC-1 photoreceptor and the histone acetyltransferase NGF-1 is required for blue light signal transduction in *Neurospora crassa*. *Mol. Biol. Cell.*
5. **Briggs WR, Huala E.** 1999. Blue-light photoreceptors in higher plants. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* **15**:33-62.
6. **Briggs WR, Spudich JL.** (ed), 2005. *Handbook of Photosensory Receptors*, Wiley. Weinheim, Germany.
7. **Bunning E.** 1967. *The Physiological Clock*. The Heidelberg Science Library, Springer-Verlag, New York.
8. **Carey MF, Peterson CL, Smale ST.** 2009 *Chromatin immunoprecipitation (ChIP)*. Cold Spring Harb. Protoc. NY, USA.

9. **Carrozza MJ, Utley RT, Workman JL, Cote J.** 2003. The diverse functions of histone acetyltransferase complexes. *Trends Genet.* **19**:321–329.
10. **Casas-Flores S, Rios-Momberg M, Bibbins M, Ponce-Noyola P, Herrera-Estrella A.** 2004. BLR-1 and BLR-2, key regulatory elements of photoconidiation and mycelial in *Trichoderma atroviride*. *Microbiology.* **150**:3561-3569.
11. **Casas-Flores S, Rios-Momberg M, Rosales-Saavedra T, Martinez-Hernandez P, Olmedo-Monfil V, Herrera-Estrella A.** 2006. Cross talk between a fungal blue-light perception system and the cyclic AMP signaling pathway. *Eukaryot. Cell.* **5**:499-506.
12. **Chen M, Chory J, Fankhauser C.** 2004. Light signal transduction in higher plants. *Annu. Rev. Genet.* **38**:87–117.
13. **Cheung P, Allis CD, Sassone-Corsi P.** 2000. Signaling to chromatin through histone modifications. *Cell* **103**:263–271.
14. **Crosson S, Moffat K.** 2001. Structure of a flavin-binding plant photoreceptor domain: Insights into light-mediated signal transduction. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **98**:2995-3000.
15. **Esquivel-Naranjo EU, Herrera-Estrella A.** 2007. Enhanced responsiveness and sensitivity to blue light by blr-2 overexpression in *Trichoderma atroviride*. *Microbiology* **153**:3909-3922.
16. **Froehlich AC, Liu Y, Loros JJ, Dunlap JC.** 2002. White Collar-1, a circadian blue light photoreceptor, binding to the frequency promoter. *Science.* **297**:815-819.

17. **Gendrel AV, Lippman Z, Yordan C, Colot V, Martienssen R.** 2002. Dependence of heterochromatic histone H3 methylation patterns on the *Arabidopsis* gene DDM1. *Science*. **20**:1871–1873.
18. **Grimaldi B, Coiro P, Filetici P, Berge E, Dobosy JR, Freitag M, Selker EU, Ballario P.** 2006. The *Neurospora crassa* White Collar-1 dependent blue light response requires acetylation of histone H3 lysine 14 by NGF-1. *Mol. Biol. Cell*. **17**:4576–4583.
19. **Grewal SI, Bonaduce MJ, Klar AJ.** 1998. Histone deacetylase homologs regulate epigenetic inheritance of transcriptional silencing and chromosome segregation in fission yeast. *Genetics*, **150**:563-576.
20. **Haring M, Offermann S, Danker T, Horst I, Peterhansel C, Stam M.** 2007. Chromatin immunoprecipitation: optimization, quantitative analysis and data normalization. *Plant Methods*. **3**:11.
21. **He Q, Liu Y.** 2005. Molecular mechanism of light responses in *Neurospora*: from light-induced transcription to photoadaptation. *Genes Dev*. **19**:2888-2899.
22. **Herrera-Estrella A, Horwitz BA.** 2007. Looking through the eyes of fungi: molecular genetics of photoreception. *Mol. Microbiol*. **64**:5-15.
23. **Holmes MG, Klein WH.** 1986. Photocontrol of dark circadian rhythms in stomata of *Phaseolus vulgaris* L. *Plant Physiol*. **82**:28–33.
24. **Horwitz B, Gressel J, Malkin S.** 1985. Photoreception mutants of *Trichoderma*: Mutants that sporulate in response to stress but not to light. *Curr. Genet*. **9**:605-614.
25. **Ikegami S, Ooe Y, Shimizu T, Kasahara T, Tsuruta T, Kijima M, Yoshida M, Beppu T.** 1993. Accumulation of multiacetylated forms of histones by

- trichostatin A and its developmental consequences in early starfish embryos. Roux. Arch. Dev. Biol. **202**:144–151.
- 26. Imhof A.** 2003. Histone Modifications: An Assembly Line for Active Chromatin. Current Biology. **13**:R22-R24.
- 27. Lawrence RJ, Earley K, Pontes O, Silva M, Chen ZJ, Neves N, Viegas W, Pikaard CS.** 2004. A concerted DNA methylation/histone methylation switch regulates rRNA gene dosage control and nucleolar dominance. Mol. Cell. **113**:599–609
- 28. Linden H.** 2002. A white collar protein senses blue light. *Science*. **297**:777-778.
- 29. Millar AJ, Carre IA, Strayer CA, Chua NH, Kay SA.** 1995. Circadian clock mutants in *Arabidopsis* identified by luciferase imaging. *Science* **267**:1161–1163.
- 30. Nandakumar MP, Shen J, Raman B, Marten MR.** 2003. Solubilization of trichloroacetic acid (TCA) precipitated microbial proteins via NaOH for two-dimensional electrophoresis. J. Proteome Res. **2**:89–93.
- 31. Pile LA, Lee FW, Wassarman DA.** 2001. The histone deacetylase inhibitor trichostatin A influences the development of *Drosophila melanogaster*. Cell. Mol. Life.Sci **58**:1715–1718.
- 32. Pittendrigh CS.** 1993. Temporal organization: reflections of a Darwinian clock-watcher. Annu. Rev. Physiol. **55**:16–54.
- 33. Reid G, Gallais R, Métivier R.** 2009. Marking time: the dynamic role of chromatin and covalent modification in transcription. IJBCB **41**:155–163.

34. **Rodriguez-Romero J, Hedtke M, Kastner C, Müller S, Fischer R.** 2010. Fungi, hidden in soil or up in the air: light makes a difference. *Ann. Rev. Microbiol.* **64**:585-610.
35. **Rosales-Saavedra T, Esquivel-Naranjo EU, Casas-Flores S, Martínez-Hernández P, Ibarra-Laclette E, Cortes-Penagos C, Herrera-Estrella A.** 2006. Novel light-regulated gene in *T. atroviride*: a dissection by cDNA microarrays. *Microbiology.* **152**:3305-3317.
36. **Sánchez-Arreguín A, Pérez-Martínez AS, Herrera-Estrella A.** 2012. Proteomic analysis of *Trichoderma atroviride* reveals independent roles for transcription factors BLR-1 and BLR-2 in light and darkness. *Eukaryot. cell.* **11**:30-41
37. **Schmoll M, Esquivel-Naranjo EU, Herrera-Estrella A.** 2010. *Trichoderma* in the light of day—physiology and development. *Fungal Genet. Biol.* **47**:909–916.
38. **Schwerdtfeger C, Linden H.** 2003. VIVID is a flavoprotein and serves as a fungal blue light photoreceptor for photoadaptation. *EMBO. J.* **22**:4846-4855.
39. **Shang Y, Hu X, DiRenzo J, Lazar MA, Brown M.** 2000. Cofactor dynamics and sufficiency in estrogen receptor-regulated transcription. *Cell.* **103**:843-52.
40. **Smith KM, Sancar G, Dekhang R, Sullivan CM, Li S, Tag AG, Sancar C, Bredeweg EL, Priest HD, McCormick RF, Thomas TL, Carrington JC, Stajich JE, Bell-Pedersen D, Brunner M, Freitag M.** 2010. Transcription factors in light and circadian clock signaling networks revealed by genome-wide mapping of direct targets for *Neurospora* white collar complex. *Eukaryot. cell.* **9**:1549-1556.

41. **Somers DE, Webb AA, Pearson M, Kay SA.** 1998. The short-period mutant, *toc1-1*, alters circadian clock regulation of multiple outputs throughout development in *Arabidopsis thaliana*. *Development*. **125**:485–494.
42. **Takase T, Ishikawa H, Murakami H, Kikuchi J, Sato-Nara K, Suzuki H.** 2011. The circadian clock modulates water dynamics and aquaporin expression in *Arabidopsis* roots. *Plant Cell Physiol*. **52**:373–383.
43. **Talora C, Franchi L, Linden H, Ballario P, Macino G.** 1999. Role of a white collar-1 – white collar-2 complex in blue-light signal transduction. *EMBO. J.* **18**:4961-4968.
44. **Tisch D, Kubicek CP, Schmoll M.** 2011. New insights into the mechanism of light modulated signaling by heterotrimeric G-proteins: ENVOY acts on *gna1* and *gna3* and adjusts cAMP levels in *Trichoderma reesei* (*Hypocrea jecorina*). *Fungal Genet. Biol.* **48**:631-640.
45. **van der Horst MA, Hellingwerf KJ.** 2004. Photoreceptor proteins, “star actors of modern time”: A review of the functional dynamics in the structure of representative members of six different photoreceptor families. *Acc. Chem. Res.* **37**:13-20.
46. **Wang W, Barnaby JY, Tada, Y, Li H, Tor M, Caldelari D, Lee D, Fu XD, Dong X.** 2011. Timing of plant immune responses by a central circadian regulator. *Nature* **470**:110–114.
47. **Yakunin AF, Hallenbeck PC.** 1998. A luminol/iodophenol chemiluminescent detection system for western immunoblots *Anal. Biochem.* **258**:146-149