



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

**POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOLOGIA MOLECULAR**

**El papel de una desacetilasa de histonas ortóloga a  
HD1 de *A. thaliana* en la respuesta a luz azul en  
*Trichoderma atroviride***

Tesis que presenta

**Aída Araceli Rodríguez Hernández**

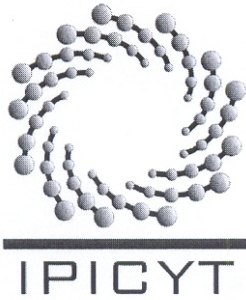
Para obtener el grado de

**Maestra en Ciencias en Biología Molecular**

**Director de la Tesis:**

**Dr. J. Sergio Casas Flores**

San Luis Potosí, S.L.P., Septiembre de 2008



## Constancia de aprobación de la tesis

La tesis “(El papel de una desacetilasa de histonas ortóloga a HD1 de *A. thaliana* en la respuesta a luz azul en *Trichoderma atroviride*)” presentada para obtener el Grado de de Doctor(a) en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por **Aída Araceli Rodríguez Hernández** y aprobada el **05 de Septiembre de 2008** 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 tesis)

Dr. Juan Francisco Jiménez Bremont  
(Asesor de la tesis)

Dr. Ángel Gabriel Alpuche Solís  
(Asesor de la tesis)



## **Créditos Institucionales**

Esta tesis fue elaborada en el Laboratorio de Biología Molecular de Plantas 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. 206038**) y del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C.



**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 056 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 5 días del mes de septiembre del año 2008, se reunió a las 16:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

<b>Dr. Ángel Gabriel Alpuche Solís</b>	<b>Presidente</b>	<b>IPICYT</b>
<b>Dr. J. Sergio Casas Flores</b>	<b>Secretario</b>	<b>IPICYT</b>
<b>Dr. Juan Francisco Jiménez Bremont</b>	<b>Sinodal</b>	<b>IPICYT</b>

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

**MAESTRA EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR**

sustentó la C.

**Aída Araceli Rodríguez Hernández**

sobre la Tesis intitulada:

*El papel de una desacetilasa de histonas ortóloga a HD1 de A. thaliana en la respuesta a luz azul en Trichoderma atroviride*

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 18:20 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fé 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 5 días del mes de septiembre de 2008.

**L.C.C. Ivonne Lizette Cuevas Velez**  
Jefa del Departamento de Asuntos Escolares

**Dr. Marcial Bonilla Marín**  
Secretario Académico



A: Díos, a mí familia, a mí sobrina Miranda y a mí  
esposo Omar.

## **Agradecimientos**

Doy Gracias a Dios por todas las oportunidades que me ha dado y porque me permitió continuar mis estudios, a mi familia por todo el apoyo que me han dado sobre todo a mi mamá que me dio la vida y que gracias a ella hoy he podido terminar una de mis grandes metas profesionales, a mi papá que sin su exigencia por ser cada día mejores no lo hubiera logrado, a mis hermanos que sin su apoyo y amistad no hubiera podido continuar aquellas veces que todo parecía ser muy difícil, a mi cuñada por haberme regalado la mayor alegría mi sobrina y finalmente a mi esposo Omar que sin su incondicional apoyo, paciencia, amor y comprensión no hubiera podido lograr todas mis metas.

A mi asesor de tesis, Dr. J. Sergio Casas Flores por haberme permitido formar parte de su grupo de trabajo, y por haberme enseñado todo lo que sé además me mostro que puedo demostrarme a mi misma que aun cuando uno diga que no puede siempre se puede dar más de sí mismo. Al Dr. Ángel Alpuche Solís por haberme permitido realizar la tesis en el Laboratorio de Biología Molecular de Plantas además de haber sido mi co-asesor en mi tesis, al Dr. Juan Francisco Jiménez Bremont por todo el apoyo y su amistad sincera además de haber sido mi co-asesor en mi tesis de maestría.

A mis compañeros de trabajo Edith, Mayte, Miguel Angel Silva y Zayra por su valiosa amistad y apoyo y de forma muy especial le agradezco a mi amigo Miguel Angel Salas Marina por todos sus consejos y su sincera amistad.

A todos los integrantes del Laboratorio 1 así como a mis compañeros de generación por su amistad y lealtad.

## INDICE

<b>Portada</b>	i
<b>Constancia de aprobación de la tesis</b>	ii
<b>Créditos institucionales</b>	iii
<b>Acta de examen</b>	iv
<b>Dedicatoria</b>	v
<b>Agradecimientos</b>	vi
<b>Índice</b>	vii
<b>Resumen</b>	x

### I. INTRODUCCIÓN

1.1 Importancia de la luz sobre la vida en la tierra	1
1.1.1 Receptores de la luz	2
1.2 Percepción de la señal luminosa en hongos	4
1.2.1 <i>Phycomyces blakesleeanus</i>	5
1.2.2 El complejo White-collar y <i>Neurospora crassa</i>	6
1.2.3 <i>Aspergillus nidulans</i>	8
1.3 <i>Trichoderma atroviride</i> como modelo fotomorfogénico	10
1.3.1 <i>Trichoderma atroviride</i> y el complejo BLR	11
1.3.2 Genes que se expresan después de la fotoinducción en <i>Trichoderma atroviride</i>	12
1.4 La epigenética como un nivel mayor de regulación de la expresión	13
1.4.1 Conformación de la cromatina y su efecto sobre la expresión de genes	15

1.4.2 Aspectos generales de las acetiltransferasas	17
1.4.3 Las desacetilasas de histonas (HDACs) y su clasificación	17
1.4.4 Las HDACs y su papel en la regulación de la expresión	19
1.5 Inhibidores de desacetilasas de histonas	20
1.6 Regulación epigenética de genes que son inducidos por luz	21
1.6.1 HD1 involucrada en respuestas a luz en <i>Arabidopsis thaliana</i>	21
1.6.2 El papel de una acetiltransferasa y la acetilación en <i>Neurospora crassa</i>	23
<b>II. JUSTIFICACIÓN</b>	24
<b>III. OBJETIVOS</b>	25
3.1 Objetivo general	25
3.2 Objetivos específicos	25
<b>IV. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	26
4.1 Cepas y condiciones de cultivo	26
4.1.1 Hongos	26
4.1.2 Bacterias	26
4.2 Extracción y manipulación de ácidos nucleicos	27
4.3 Identificación <i>in silico</i> del gen <i>taho</i> de <i>T. atroviride</i>	27
4.4 Identificación <i>in silico</i> del gen que codifica para la histona H3 de <i>T. atroviride</i>	27
4.5 Interrupción del gen <i>taho</i>	28
4.6 Expresión constitutiva del gen <i>taho</i>	29
4.7 Generación de la construcción para la mutante H3K14Q	29
4.8 Obtención y transformación de protoplastos	30
4.9 Escrutinio para la obtención de la cepa $\Delta$ <i>taho</i>	31



4.10 Ensayos de fotoinducción y tratamiento con apicidina	31
<b>V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	33
5.1 Efecto de la apicidina, un inhibidor de desacetilasas de histonas (HDACs) en la fotoconidiación de <i>Trichoderma atroviride</i> .	33
5.2 Efecto del inhibidor de HDACs (apicidina) sobre la expresión de genes de respuesta a luz azul en <i>T. atroviride</i> .	35
5.3 Identificación del gen <i>taho</i> de <i>T. atroviride</i>	39
5.4 Generación de cepas mutantes y transformantes	42
5.4.1 Interrupción del gen <i>taho</i>	42
5.4.4 Análisis fenotípico de crecimiento y conidiación de la mutante <i>Δtaho</i>	46
5.5 Generación de cepas que sobreexpresen al gen <i>taho</i>	48
5.6 Generación de cepas transformantes con mutaciones puntuales en las lisina 9 y 14 de la histona H3 (H3 <sup>K9Q;K14Q</sup> )	50
5.6.2 Análisis fenotípico de las cepas transformantes H3K9Q;K14Q	52
<b>VI. CONCLUSIONES</b>	56
<b>VII. PERSPECTIVAS</b>	57
<b>VIII. BIBLIOGRAFÍA</b>	58

## Resumen

Los hongos del género *Trichoderma* presentan una gran importancia agrícola debido a que son utilizados como agente de biocontrol de una amplia gama de hongos fitopatógenos que afectan cultivos de importancia alimenticia. Además, este género ha sido utilizado en la producción de antibióticos y enzimas hidrolíticas. *Trichoderma* también ha sido utilizado como modelo fotomorfogénico debido a que después de recibir un estímulo luminoso forma un anillo de conidias en el perímetro de la colonia donde fue recibido el pulso. Se ha propuesto que en *T. atroviride* que las proteínas BLR-1 y BLR-2 son las encargadas de percibir la señal luminosa. Estas proteínas son esenciales para fotoconidiación y la regulación de genes que se inducen y reprimen por la luz azul como *phr-1* y *bld-2* respectivamente. Como sabemos la regulación de la expresión génica esta mediada por una gran cantidad de factores que intervienen como co-activadores y co-represores. Mecanismos epigenéticos como la acetilación y desacetilación de histonas son importantes para la expresión génica para que los organismos respondan de la manera adecuada ante las condiciones del medio como la luz. En organismos como *Arabidopsis thaliana* y *Neurospora crassa* se observó que respuestas a luz azul es mediada por proteínas como las desacetilasas de histonas como HD1 y por acetil transferasas de histonas como GCN5 respectivamente. El uso de inhibidores de HDACs es una herramienta muy útil para determinar las posibles diferencias en los patrones de expresión relacionados con la acetilación y desacetilación de histonas. En nuestro modelo de estudio, el uso de la apicidina nos brindó un panorama general del posible papel de HATs y HDACs en la expresión de genes regulados por la luz azul. Los resultados obtenidos hasta el momento nos indican que puede existir la participación de HATs y HDACs, ya que el patrón de expresión de los genes *phr-1* y *bld-2* prolongan su expresión en presencia de apicidina con respecto a las condiciones control. En base a los resultados obtenidos con el uso de la apicidina y de lo observado en *A. thaliana* en mutantes HD1, se decidió identificar al gen ortólogo a HD1 en el genoma de *T. atroviride* al cual se le denominó *taho* (*Trichoderma atroviride* HD1 Ortólogo). Una vez identificado el gen *taho*, se generó la construcción para obtener a la mutante por doble recombinación homóloga. La mutante mostró un fenotipo de hiperconidiación en comparación con la cepa silvestre, además presentó un crecimiento ligeramente más lento que con respecto a la cepa parental. También se generó la construcción para obtener cepas que expresen constitutivamente el gen *taho*, cuyo fenotipo es el opuesto al de la mutante *taho*, ya que no forma en luz el anillo de conidias en presencia de luz. Finalmente se obtuvieron cepas transformantes de la histona H3 en la lisina 9 y en la lisina 14, cuyos aminoácidos son sustrato de acetilación y desacetilación de HATs y HDACs, para estas transformantes se obtuvieron 3 fenotipos, el primero muy semejante a la silvestre, el segundo forma un anillo concéntrico de conidias grueso y el tercero solo forma micelio hialino. Al realizar un análisis de la transcripción del gen *taho*, pudimos observar que presenta dos posibles transcritos, los cuales se regulan por la luz azul, el de mayor peso molecular presenta una expresión basal en la oscuridad y después de un pulso de luz se reprime, mientras que el transcrito de menor peso también presenta un nivel basal en la oscuridad, pero después de un pulso de luz azul se incrementan los niveles de transcrito. En conclusión podemos decir que pueden existir mecanismos epigenéticos modulando la expresión de genes regulados por la luz en *T. atroviride*.

**PALABRAS CLAVE:** *Trichoderma atroviride*, Luz azul y Desacetilación de histonas.

---

---

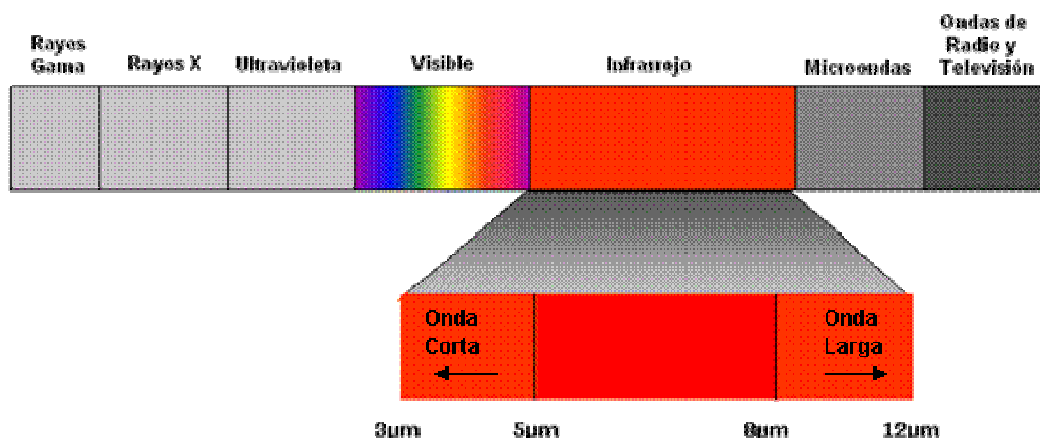
## INTRODUCCIÓN

### 1.1 Importancia de la luz sobre la vida en la tierra

La luz por definición es una onda electromagnética, compuesta por partículas energizadas llamadas fotones, las cuales pueden ser percibidas por la mayoría de los seres vivos y cuya frecuencia o energía determina su color. La luz del sol es fundamental para la vida en la tierra, es usada por algunos seres vivos como una fuente de energía además de ser una de las señales más importantes usadas por algunos organismos para obtener información del medio externo. A la luz se le puede asignar una frecuencia, ya que se manifiesta como un campo electromagnético que emite pulsos de forma regular. Desde una fuente, la luz se desplaza en todas direcciones, y entre cada pulso se recorre una distancia a la que se conoce como “longitud de onda” (Björn, 2008). Las emisiones solares caen en un amplio rango de longitudes de onda como se aprecia en la Fig. 1. Las de menor energía y mayor longitud de onda concuerdan con la energía necesaria para las vibraciones de enlaces moleculares, y al ser adsorbida se transforma en calor; a estas emisiones se les coloca en el rango del “infra-rojo. Las emisiones de mayor energía y menor longitud de onda, se relacionan con la transición entre orbitales para electrones de valencia, y son las que dan inicio a las reacciones fotoquímicas en moléculas de importancia biológica; estas caen en el rango de “ultra-violeta”. (Björn, 2008). La luz solar incide sobre nuestro planeta en periodos de luz/oscuridad que cumplen un ciclo total de 24 horas y los seres vivos están obligados a adaptarse y responder a la variación de la luz en este ciclo. Como parte de esta adaptación los seres vivientes mantienen un registro de este ritmo, y aunque a veces no corresponde exactamente al periodo de 24 horas, es un estímulo que permite preparar anticipadamente la respuesta; a este fenómeno se le denomina “reloj circadiano” o “ritmo

---

circadiano”, y se ha observado que se conserva aun en condiciones artificiales (Ouyang *et al.*, 1998). Dentro de las respuestas biológicas que se pueden observar en la naturaleza se encuentran ejemplos como la fotosíntesis que se presenta en su mayoría en plantas, la fototaxis en bacterias y algunos protozoarios, y finalmente el fototropismo y fotoconidiación que se presenta generalmente en hongos y plantas (Briggs & Huala, 1999). Sin embargo es necesario entender la relación que existe entre la cantidad y calidad de la luz recibida por un organismo y los distintos tipos de respuestas que este tiene según el impulso, lo anterior solo se puede conocer al estudiar de forma más detallada el papel que juega la luz a nivel de la expresión génica en los distintos organismos. Se ha encontrado que en la mayoría de los organismos, se presenta una amplia gama de proteínas que son capaces de percibir la luz, y que responden a la variabilidad espectral de ésta, a los cuales se les conoce con el nombre de fotoreceptores, de los cuales se describen sus características en el siguiente apartado (Cashmore *et al.*, 1999).



**Figura 1: Espectro electromagnético.** Indicando la ubicación de las longitudes de onda corta y larga. (Tomado de [www.zytemp.com.mx/teoria.php](http://www.zytemp.com.mx/teoria.php))

---

### 1.1.1 Receptores de la luz

Los fotoreceptores son moléculas de naturaleza proteica que forman complejos de proteínas asociadas a otras moléculas de naturaleza no proteica llamadas cromóforos que poseen la característica de captar y cosechar la luz en forma de fotones (Herrera-Estrella y Horwitz, 2007). Se han descrito y clasificado en diferentes familias basándose en la estructura química que presenta el cromóforo, ya que la percepción de la señal luminosa provoca cambios conformacionales activándolo y transduciendo la señal para generar una respuesta biológica. De forma interesante se ha observado que los fotoreceptores son muy conservados en todos los organismos implicando la evolución convergente de su función. Existen diferentes tipos de fotoreceptores que perciben luz azul (400nm-500nm) como los criptocromos que usan como cromóforo a la molécula FAD (*Flavin-Adenine Dinucleotide*) y para luz roja cercana (660nm) y luz roja lejana (730nm) son conocidos como fitocromos. Estudios en sistemas eucarióticos han permitido identificar varios tipos de fotoreceptores para la luz azul, los cuales son proteínas unidas a flavinas: los criptocromos, que son similares a las fotoliasas, usan FAD como cofactor, y funcionan como fotoreceptores de la luz para relojes circadianos y otras respuestas asociadas en insectos; y recientemente se ha identificado a una adelinato ciclasa que une FAD, como el fotoreceptor de la luz azul responsable de las respuestas de “fototaxis” en *Euglena gracilis* (Cheng *et al.*, 2003). El auge de la información de las secuencias genómicas ha mostrado que la familia de los fitocromos se extiende desde plantas hasta eubacterias y hongos filamentosos, por mencionar algunos ejemplos. Lo amplio de esta información subraya la importancia de la luz para los organismos fotosintéticos y para los no fotosintéticos, y provee nuevos modelos para descifrar la función de estos receptores (Frohlich *et al.*, 2005).

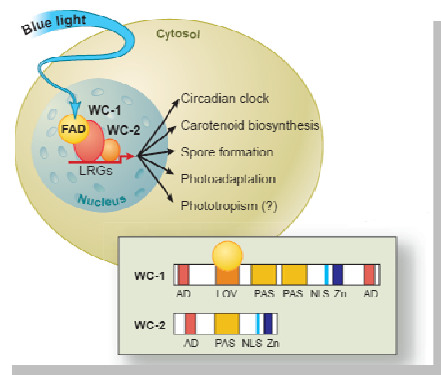
---

---

En hongos, los fotoreceptores que se han descrito son los del complejo White-Collar (WC) para *Neurospora crassa* (Fig. 2), y para *Trichoderma atroviride* el complejo Blue Light Regulator favoreciendo que estos organismos respondan tanto a cantidad como calidad luminosa y permitan que se lleven a cabo las diferentes funciones metabólicas y del desarrollo estimuladas por esta vía (Ballario *et al.*, 1996; Casas-Flores *et al.*, 2004).

## **1.2 Percepción de la señal luminosa en hongos**

La luz regula una amplia variedad de procesos fisiológicos en los hongos. Entre los fenómenos promovidos por la luz en estos organismos se incluyen, entre otros, el fototropismo de *Phycomyces*, la biosíntesis de pigmentos carotenoides en *Neurospora crassa* y la fotoconidiación en *Trichoderma atroviride*, la cual es activada por la formación de un anillo de conidiación en la periferia de la colonia donde fue recibido el estímulo luminoso (Horwitz *et al.*, 1985). Con la fotofisiología fúngica se pueden predecir algunas respuestas por efecto de la luz visible ya que existe una corta lista de cromóforos para una gran diversidad de respuestas, y al mismo tiempo se puede entender cómo funcionan los mecanismos, como la conversión de fotones en la energía necesaria para activar la maquinaria transcripcional de la célula. Los hongos que se han estudiado con más detalle debido a su respuesta a la luz son *Phycomyces blakesleeanus* y *Neurospora crassa*, y recientemente *Aspergillus nidulans* y *Trichoderma sp* (Herrera- Estrella y Horwitz, 2007).



**Figura 2: Modelo de percepción de la luz por medio del factor de transcripción WC-1 en el hongo *Neurospora crassa*.** Las proteínas de respuesta a luz WC-1 y WC-2 forman un complejo heterodimérico que está localizado en el núcleo. La luz azul es percibida por el cromóforo (FAD) el cual se une al dominio LOV de WC-1; la luz genera un cambio conformacional en el complejo resultando en la activación transcripcional de genes que son regulados por luz (LRGs). Estos genes están relacionados con la regulación de procesos metabólicos y del desarrollo. Las proteínas WC se dimerizan por medio del dominio PAS, presentan un dominio de activación, dominio de unión al ADN tipo dedo de zinc, y una señal de localización nuclear conocida como (NLS). La proteína WC-1 presenta dominios LOV (Linden, 2002).

### 1.2.1 *Phycomyces blakesleeanus*

Es un hongo filamentoso que está clasificado dentro de la orden de los mucorales y pertenece a la clase de los zigomicetos. Este hongo tiene como particularidad ser muy sensible a los cambios de la luz. Un gran número de investigadores de fotobiología han tenido interés en estudiarlo. El primero que describió su comportamiento que presentaba con luz fue Max Delbrück en los años 50's. Este hongo responde a varios estímulos externos ya que posee todos los sentidos tradicionales reconocidos en el humano siendo el oído uno de los sentidos que no está presente en este hongo. *Phycomyces* al ser estimulado por luz azul se induce el desarrollo de macróforos así como la acumulación de L-caroteno e inhibe el desarrollo de micróforos. Los macróforos presentan fototropismo respondiendo por tanto a una fuente luminosa que le provea cantidad y calidad. La luz roja y verde modifica el desarrollo y crecimiento de los macróforos (Corrochano & Cerda-Olmedo, 1992).



**Figura 3: Fototropismo de un macróforo de *Phycomyces*.** Se tomó una fotografía cada 2 minutos mientras se encontraba expuesto a luz naranja para observar su respuesta fototrópica (Tomado de Herrera-Estrella & Horwitz, 2007).

### 1.2.2 El complejo White-collar y *Neurospora crassa*

El ascomiceto *Neurospora crassa* originalmente se pensaba que era un hongo tropical, hoy en día se sabe que está presente en todo el mundo. Este se usó a principios de los 50's para estudiar los ritmos circadianos. La formación de hifas aéreas y de macroconidios son estimulados por el ritmo circadiano (Sargent & Briggs, 1967).

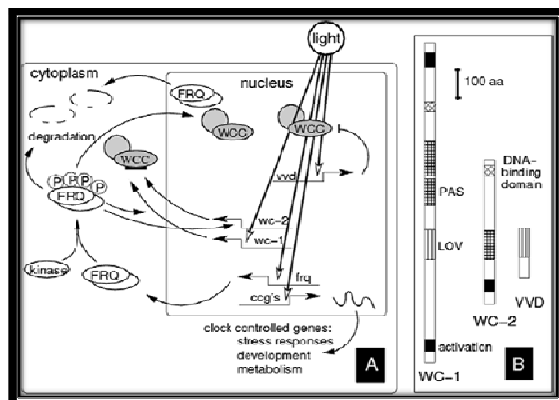
Estudios detallados en *Neurospora crassa* determinaron que esta respuesta esta mediada por dos proteínas denominadas White-Collar 1 y 2 (por sus siglas en ingles: WC-1 y WC-2 respectivamente) que perciben luz azul y que utilizan como cromóforo a un grupo FAD. Las respuestas a luz azul y (UV) en *Neurospora* incluyen la síntesis de carotenoides, la inducción de la formación del protoperitecio y el fototropismo peritecial, el crecimiento de las hifas, la formación de esporas asexuales, cambios en el potencial de membrana, la expresión de genes, modificaciones en proteínas y el encarrilamiento del ritmo circadiano.

Se ha reportado que en *Neurospora* se induce la expresión de genes que son llamados “genes tempranos” ya que su inducción máxima puede ser observada después de 5 minutos



---

de haber recibido el pulso de luz; algunos están relacionados con la biosíntesis de carotenoides y son llamados “genes *albinos*” (*al-1*, *al-2* y *al-3*), ya que la mutación de estos genes genera un fenotipo albino. De igual forma se ha visto la inducción de los genes relacionados con la conidiación y el gen *frq* el cual está relacionado con el ritmo circadiano y los genes tardíos como los genes *clock-controlled genes* (*ccg-1* y *ccg-2*), que fueron estimulados por la expresión de los genes tempranos, éstos se observan después de 15-30 minutos de haber recibido el estímulo luminoso (Linden & Macino, 1997). El análisis de secuencia de las proteínas WC-1 y WC-2 reveló que ambos contenían dominios PAS el cual es un acrónimo de las proteínas que lo conforman PAS (Per-Arnt-Sim) una superfamilia de proteínas que trasduce señales a partir de diversos estímulos biológicos y codifican para factores de transcripción tipo dedos de zinc que se unen preferentemente a cajas GATA. La proteína WC-1 tiene 3 dominios PAS de los cuales uno de ellos es llamado LOV debido a que este dominio está especializado en detectar señales de luz, oxígeno y voltaje, mientras que la proteína WC-2 solo presenta un dominio PAS el cual sirve para unirse a WC-1 y formar el complejo White Collar (WCC) (Ballario *et al.*, 1996). Uno de los genes que responden a luz azul es *vvd*, el cual codifica para una proteína llamada VIVID que contiene un dominio LOV el cual une como cromóforo el FAD (Flavin Adenin Dinucleótido); esta proteína desempeña un papel importante durante la iluminación constante además de detectar cambios de intensidad luminosa (Schwerdtfeger y Linden, 2003).

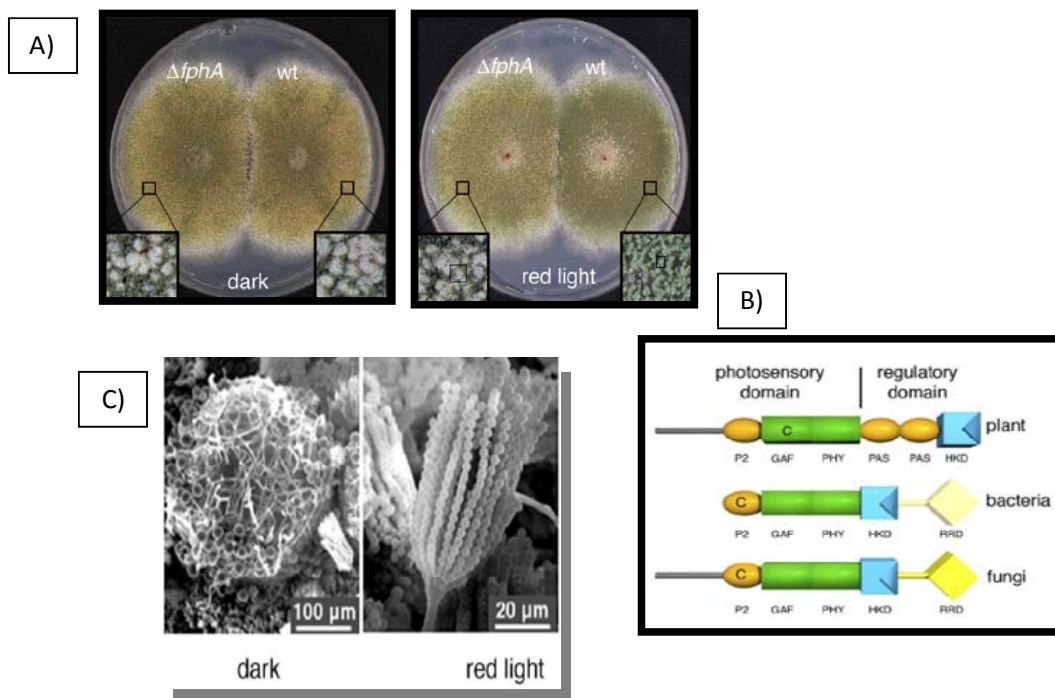


**Figura 4: Mecanismo del ritmo circadiano en *Neurospora*.** (A) modelo molecular de la oscilación circadiana en *Neurospora* y el efecto de la luz sobre ésta. A partir del ARNm se sintetiza a FRQ y reprime a WCC en el núcleo. Bajas concentraciones de fosforilación del promotor de FRQ promueve la fosforilación y la inactivación de WCC. Se incrementa la acumulación de WCC inactivo por elevados niveles de este promotor desfosforilado. FRQppp es progresivamente fosforilado y degradado. Con el decremento de FRQppp las fosfatasas desfosforilan a WCC, el cual se puede unir al promotor de *frq* y activar de nuevo la transcripción. Además de activar la expresión de la *frq* en oscuridad WCC actúa como receptor cuando es estimulado por luz azul. La transferencia de señales luminosas estimula genes como los clock controlled (*ccg*). VVD modula a WCC. (B) dominios funcionales de los fotoreceptores WC1 y WC2 de *Neurospora*. VVD es otro receptor de luz azul el cual modula a WCC y contribuye con procesos de fotoadaptación. (Tomado de Björn, 2008).

### 1.2.3 *Aspergillus nidulans*

En *Aspergillus nidulans* la reproducción es asexual por medio de conidiosporas y de forma sexual por ascosporas. El efecto de la luz sobre una amplia variedad de hongos ha sido documentado, en el caso de *Aspergillus nidulans* la esporulación asexual es estimulada y se afecta su desarrollo sexual por la luz roja. La conidiación es disparada por la exposición del micelio a la luz roja en un rango que va de los 690 a los 710 nm y la respuesta es reprimida por luz roja lejana, lo cual es un fenómeno característico de los fitocromos (Mooney *et al.*, 1990). Un grupo mostró en 1994 que la luz roja también afecta la esporulación sexual, provocando un retardamiento en la formación de los cleistotecios; además, observaron que este retraso es producido por el mismo rango de luz que induce la conidiación asexual (Champe *et al.*, 1994). La respuesta a la luz roja es muy semejante al de un fitocromo. Recientemente, se describió que la proteína responsable de detectar estas

señales es un fitocromo, el cual el cual posee dominios multifuncionales además de tener mayor relación filogenética con proteínas de bacterias que de plantas, esto se observa en la Figura 5. Se realizó una mutante del gen *fphA* para comprobar el papel del fitocromo, responde a la longitud de onda roja lejana generando como respuesta la conidiación (Blumenstein *et al.*, 2005). Con la mutante nula de *fphA* el desarrollo sexual fue reprimido en presencia de luz roja, con luz roja lejana no se observó este comportamiento. Se produjo una proteína heteróloga en *E. coli* la cual se observó que unía una molécula de biliverdina la cual absorbía la luz en el rojo y rojo lejano.



**Figura 5: Respuestas a luz roja de *Aspergillus nidulans*.** A) Se crecieron las cepas  $\Delta fphA$  (mutante del fitocromo) y la silvestre (wt) de *A. nidulans* en oscuridad y luz roja. Se observa que el desarrollo de estructuras sexuales es bloqueado por la luz roja, en un acercamiento que se realizó a las colonias no se observan cleistotecios. B) Con microscopía electrónica de barrido se muestra las estructuras de desarrollo, en la figura de la izquierda se muestra un cleistotecio con células Hülle e hifas. En la derecha se observa un conidióforo. C) Estructura de los dominios que se observan en los fitocromos de plantas, bacterias, y hongos que nos muestra la semejanza de dominios entre los fitocromos de bacterias y hongos. (Blumenstein *et al.*, 2005).

---

### 1.3 *Trichoderma atroviride* como modelo fotomorfogénico

Los hongos filamentosos forman hifas las cuales forman septos, finalmente dando origen a lo que se conoce como micelio. Los hongos filamentosos presentan interesantes formas de esporulación y se han tomado como referencia para algunos modelos de regulación genética principalmente algunos organismos como *Aspergillus nidulans* y *Neurospora crassa* (Springer, 1993). La reproducción asexual por esporulación no solo genera estructuras de resistencia, sino también es una forma de propagación. Las esporas permanecen de forma inanimada por largo tiempo hasta que encuentre condiciones favorables que le permitan crecer y desarrollarse. *Asperigillus* y *Neurospora* se consideran Ascomicetos ya que además de producir conidias presentan estructuras sexuales especializadas conocidas como ascas las cuales producen ascosporas.

*Trichoderma atroviride* hasta hace algunos años no se consideraba dentro del grupo de los ascomicetos debido a que no se le conocía reproducción sexual, pero en los últimos años se ha descrito al ascomiceto teleomorfo de esta especie a *Hypocrea atroviridis* (Dodd *et al.*, 2003). Las primeras descripciones del efecto de la luz sobre *Trichoderma* fueron realizadas por Gressel y Hartman en 1967 en donde se describía que una vez recibido un pulso de luz se inducía la esporulación, formando un anillo de esporas verdes. Para que se lleve a cabo la fotoinducción es necesaria la madurez de la colonia lo cual hará al hongo mas fotocompetente y esto ocurre cuando la colonia haya crecido por más de 16 horas en la oscuridad (Ríos-Momberg, 2004). *Trichoderma atroviride* es usado como modelo fotomorfogénico debido a la habilidad que posee al conidiar una vez que recibió el estímulo luminoso, en total oscuridad este hongo crece indefinidamente como micelio hialino. Después de la exposición a luz azul se presentan cambios en el potencial de la

---

---

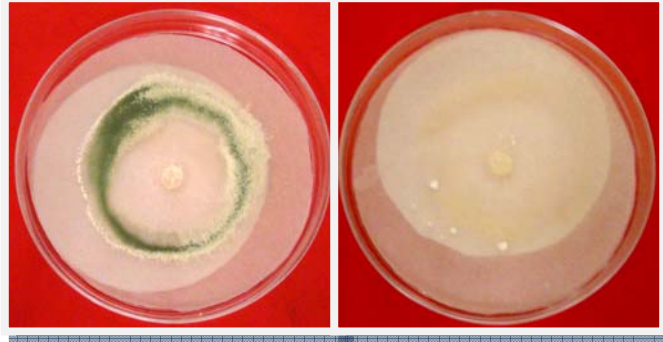
membrana y en los niveles de ATP. Una segunda respuesta en *T. atroviride* es la regulación de la expresión de genes como el de la fotoliasa (*phr-1*) donde son detectables los niveles de ARNm inmediatamente después de haber recibido el pulso de luz (Berrocal-Tito *et al.*, 1999). El principal mecanismo de sobrevivencia de *Trichoderma* es por medio de la producción de esporas asexuales conocidas como conidias. Se ha determinado que el proceso de la conidiación es regulada por diversos factores ambientales tales como la luz y la falta de nutrientes, estos fenómenos morfológicos se ven acompañados de cambios en la expresión génica (Horwitz, 1985).

### **1.3.1 *Trichoderma atroviride* y el complejo BLR**

*Trichoderma atroviride*, es un hongo ascomiceto común del suelo, ampliamente utilizado como agente de control biológico debido a que parasita a una amplia variedad de hongos fitopatógenos que atacan plantas de interés agrícola (Howell 2003; Ezziyyani *et al.*, 2004; Harman 2004). En el caso de *Trichoderma atroviride* las proteínas responsables de la percepción luminosa son BLR-1 y BLR-2 las cuales son esenciales para la respuesta de fotoconidiación y para la inducción transcripcional de los genes de respuesta a luz (Casas *et al.*, 2004). La proteína BLR-1 presenta 3 dominios PAS y BLR-2 presenta solo un dominio PAS y ambas tienen el dominio de unión a ADN tipo GATA dedo de Zinc, además estas proteínas no presentan dominio de activación por lo que se cree que en este complejo hay una tercera proteína involucrada la cual favorecería la formación del mismo (Casas *et al.*, 2004). Los genes *blr* son esenciales para la expresión del gen *phr-1* que codifica para una fotoliasa la cual se cree que está relacionada con la protección del ADN al recibir un

---

estímulo luminoso, también se inducen genes relacionados con la conidiación (Casas *et al.*, 2004).



**Figura 6: Fotoconidiación de *Trichoderma atroviride*.** En la figura de la izquierda se observa un anillo de conidiación el cual se formó después de haber recibido un estímulo luminoso. En la figura de la derecha se observa micelio hialino del control mantenido en la oscuridad.

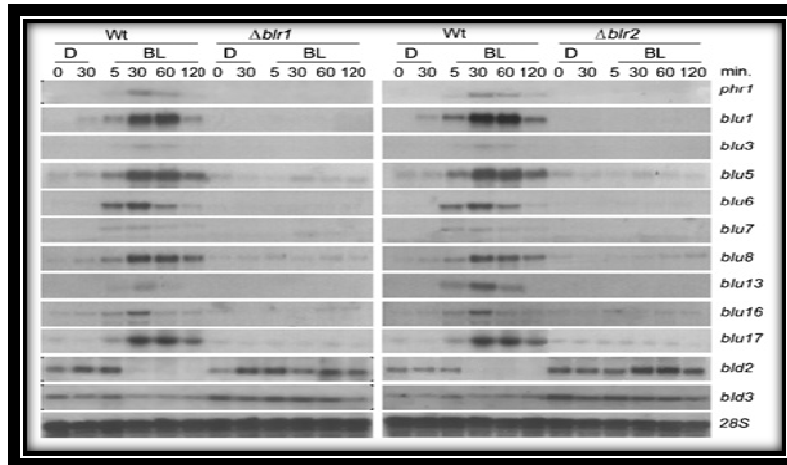
### 1.3.2 Genes que se expresan después de la fotoinducción en *Trichoderma atroviride*

En un análisis por microarreglos de ADN en respuesta a la luz de *T. atroviride*, se identificaron una serie de genes dependientes e independientes de los genes *blr*, así como genes que se reprimen por un estímulo luminoso. A estos se les identificó como genes *blu* y *bld* por blue-light-upregulated y blue-light-downregulated respectivamente, los cuales son regulados por luz azul. Ya que se encontraron genes que se reprimían con luz como *bld-2* y otros que se activaban como *phr-1 (blu-2)* (Fig. 7), se infirió que el complejo BLR tiene un papel dual tanto de activación como de represión transcripcional (Rosales-Saavedra *et al.*, 2006).

Esta diversidad en la expresión de genes influenciados por un estímulo luminoso nos hace plantear que el nivel de regulación de la expresión génica no solo está mediada por factores de transcripción, sino que también existen otros factores que tienen un papel importante en

---

la regulación génica que son independientes de la secuencia de nucleótidos, fenómeno que lleva el nombre de “Epigenética”.



**Figura 7: Análisis tipo Northern Blot de la cepa silvestre de *T. atroviride* y las mutantes *blr*.** El gen *phr-1* está siendo activado y el gen *bld-2* está siendo reprimido en la cepa silvestre; para las mutantes *Δblr-1* y *Δblr-2* se observa que no hay transcrito del gen *phr-1* y el gen *bld-2* no se reprime después del estímulo luminoso de luz azul. El complejo BLR es necesario para regular la expresión de genes inducidos por luz azul (Rosales-Saavedra *et al.*, 2006).

#### 1.4 La epigenética como un nivel mayor de regulación de la expresión

La palabra epigenética fue por primera vez empleada por H. J. Muller en 1941 cuando describió los rearrreglos cromosómicos en *Drosophila* los cuales no estaban asociados a modificaciones a nivel de secuencia. La epigenética por definición involucra todos los mecanismos que dan lugar a una expresión genética diferencial en células especializadas, que no depende directamente de cambios en la secuencia de ADN; está mediada por la complejidad adquirida del genoma eucariota y por el desarrollo de múltiples niveles de regulación, para poder llevar a cabo la expresión genética de manera ordenada y permitir el desarrollo diferencial de un organismo (Goldberg *et al.*, 2007).

---

Existe regulación a todos los niveles, en la replicación, traducción y transcripción. La regulación transcripcional está dividida a su vez en 3 niveles: el primero es a nivel de secuencias nucleotídicas que están en la molécula de ADN. El segundo nivel implica la estructura de la cromatina, donde la regulación de la expresión de un gen no solo dependerá de la información codificada en la secuencia del ADN, sino también de su organización en la cromatina y su regulación epigenética asociada a ésta. La regulación epigenética es considerada como patrones heredables de la expresión de un gen, que no ocurren por cambios en la secuencia del ADN. Finalmente el tercer nivel involucra la organización del genoma en el interior del núcleo (Wolffe & Matzke, 1999).

Por otra parte las características que definen a una célula están dadas por varios componentes siendo las proteínas que la constituyen de los más importantes, las cuales son el resultado de patrones específicos de la expresión de sus genes. De forma general podemos decir que un gen que codifica para un ARN mensajero está involucrado en la síntesis de una proteína, lo cual puede o no tener una relación de un gen-una función, si no que puede cambiar categóricamente a un gen-varias funciones. La determinación de los patrones de expresión, está dado por los factores transcripcionales que reconocen secuencias nucleotídicas en el ADN, como las regiones promotoras de los genes entre otros. La interacción de factores y secuencias reguladoras, libera eventos que tendrán como resultado la activación o la represión de un gen ó bien grupos de genes (Recillas-Targa, 2004).



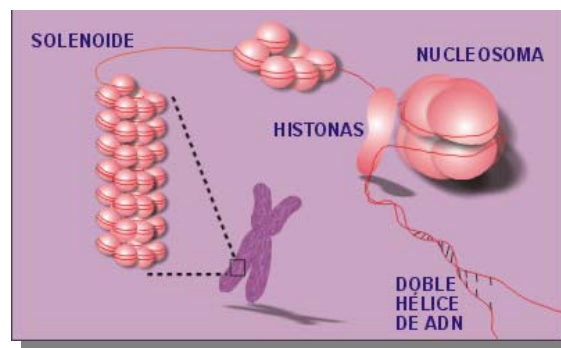
---

### 1.4.1 Conformación de la cromatina y su efecto sobre la expresión de genes

La cromatina se encuentra en dos estados principalmente eucromatina y heterocromatina o bien el estado relajado y compacto, la cromatina activa está formada en su mayoría por regiones codificantes y esto solo representa aproximadamente el 4% del genoma total, el resto de la cromatina se encuentra inactiva la mayor compactación está localizada en las regiones teloméricas (Legube y Trouche, 2003). El término remodelación de la cromatina, generalmente se refiere a cambios en la interacción histona-ADN en el nucleosoma realizada por ciertos factores que ayudan a compactar o descompactar la cromatina. Estos factores positivos remodeladores de la cromatina catalizan la movilización y reordenamiento del nucleosoma dejando libre al ADN lo que facilita el acceso de la maquinaria de la transcripción (Goldberg *et al.*, 2007). La cromatina no solo está involucrada en la compactación del material genético, ya que es una estructura que está formada por asociaciones entre el ADN y proteínas llamadas histonas que poseen un carácter básico debido a su alto contenido de argininas y lisinas; éstas forman un octámero compuesto de 2 moléculas de cada una de las 4 histonas que conforman el núcleo de histonas: H2A, H2B, H3 y H4 (Hays *et al.*, 2001). Es interesante notar que las histonas son las proteínas más conservadas durante la evolución de las células eucarióticas, dándonos una idea de la importancia que tiene la compactación de la cromatina para la vida de la célula (Recillas Targa, 2004). La H1 se ha demostrado que está involucrada en el empaquetamiento externo del ADN. La unidad básica estructural de las histonas es el nucleosoma, que además de ser uno de los constituyentes más dinámicos de la estructura, son blanco de modificaciones post-traduccionales en sus regiones amino terminal. De esta forma se relajan las interacciones electrostáticas que forman los residuos de fosfatos del

---

ADN y los residuos de la proteína. Estas regiones son ricas en residuos de lisina las cuales son blanco de modificaciones covalentes tales como la acetilación, desacetilación, metilación, fosforilación, y recientemente descubiertas la sumoilación y ubiquitinación que marcan a las histonas para regular su función y su degradación (Recillas Targa, 2004). Las posiciones más importantes de acetilación son las Lisinas 9 y 14 en la histona H3 y en la H4 las lisinas 5, 8, 12 y 16. Entre las modificaciones más importantes de la cromatina se encuentra la acetilación y desacetilación de histonas. La acetilación de histonas es catalizada por las acetiltransferasas (HATs) y la desacetilación de histonas por la desacetilasa de histonas (HDACs) (Legube & Trouche 2003). La actividad de acetilación está relacionada con la activación transcripcional, mientras que la desacetilación con la represión transcripcional. El nivel estable de acetilación en las histonas es el resultado del balance que hay entre las actividades opuestas entre las HATs y HDACs (Annemieke, 2003). Debido a lo anterior la estructura de la cromatina es el regulador principal de la expresión de los genes, así como las diferentes modificaciones de las histonas (acetilación, metilación, etc.), que involucran un mayor control para la expresión o represión de un gen.



**Figura 8: Empaquetamiento del ADN.** De forma esquemática se muestra el empaquetamiento del ADN las estructuras básicas que la componen, nucleosoma e histonas para formar estructuras como el solenoide y finalmente forman a un cromosoma (Tomado de [www2.uah.es/.../cienciasvida/cv1.htm](http://www2.uah.es/.../cienciasvida/cv1.htm)).

---

### 1.4.2 Aspectos generales de las acetiltransferasas

Las acetiltransferasas como su nombre lo indica transfiere un grupo acetilo a partir de la acetil-coenzima A, a las lisinas del amino terminal neutralizando la carga. De esta forma está relacionado en la mayoría de los casos con activación transcripcional (Roth *et al.*, 2001). La eucromatina y la heterocromatina exhiben diferentes patrones de acetilación. La acetilación de histonas afecta la transcripción debido a que se afecta el posicionamiento de los nucleosomas, permitiendo el acceso a la maquinaria de transcripción incrementando la expresión de genes (Grunstein, 1997). Dentro de las HATs más estudiadas se encuentra GCN5 la cual fue descrita por primera vez en el protozooario ciliado *Tetrahymena thermophila* (Brownll & Allis, 1995). GCN5 está relacionada con la expresión de una gran variedad de genes, además de estar presente en el complejo SAGA de *S. cerevisiae* (Spt/Ada/Gcn5/acetilasa) que está involucrado en la transcripción normal de genes que están conservados en levaduras y humanos (Larschan & Winston, 2001).

### 1.4.3 Las desacetilasas de histonas (HDACs) y su clasificación

Como se describió antes, la arquitectura de la cromatina es fuertemente influenciada por las modificaciones post-transcripcionales que son llevadas a cabo en el extremo amino terminal donde hay residuos de lisinas. Una de estas modificaciones es llevada a cabo por enzimas conocidas como desacetilasas de histonas (HDACs) las cuales poseen la actividad de remover los grupos acetilo de las lisinas y de esta forma compactar la cromatina e interrumpir la transcripción y por tanto la expresión de genes (Legube & Trouche 2003). La primera vez que se describió la actividad de desacetilasa de histonas fue descrita en 1969 por Inoue en timo de ternera. Tiempo después se logró aislar por primera vez a partir de un

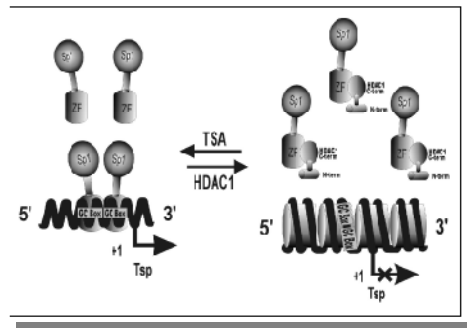
---

extracto en donde se identifico un complemento de ADN que codifica para la subunidad catalítica histona deacetilasa (HD1) y fue clonado a partir de una biblioteca de células T de humano en 1996 por Taunton, la cual fue denominada como HDAC1, la cual es el ortólogo a la proteína ya descrita Rpd3 en *S. cerevisiae*. Dos estudios diferentes confirmaron la multiplicidad de HDACs y con la identificación de HDAC1 dio la idea de que la actividad enzimática podría estar relacionada con corepresores transcripcionales (Yang & Seto, 2008). En el año 2000 fue descubierto otro miembro de la familia dependiente de NAD<sup>+</sup> llamada Sir2 que la incluyeron en la familia de las sirtuinas. Rpd3 en levadura y Hda1 en humano pertenece a la familia clásica de las HDACs, las cuales son dependientes de Zinc. La clasificación está basada en un análisis filogenético y de homología de secuencias. La clasificación está constituida por 3 clases principalmente, la clase I, la clase II y la Clase III; la clase I está compuesta por las HDAC 1, 2, 3, 8 que son las más relacionadas con RPD3 de *S. cerevisiae*. La clase II está conformada por la HDAC 4, 5, 6, 7, 9 y 10, las cuales presentan dominios similares a HDA1, otra desacetilasa encontrada en levadura (Annemieke, 2003). En la clasificación la familia de las sirtuinas corresponden a las de la clase III (Yang & Seto, 2008). Actualmente la HDAC 11 se ubicó en la clase IV debido a que esta HDAC al realizar un análisis filogenético esta se encontró menos relacionada con el resto de las HDACs, se sabe poco de su regulación y función pero su conservación evolutiva implica un papel fundamental en diversos organismos, está presente en *C. elegans*, *D. melanogaster* y humanos (Gregoretta *et al.*, 2004).

---

#### 1.4.4 Las HDACs y su papel en la regulación de la expresión

La regulación de la expresión génica se lleva a cabo a diferentes niveles; control transcripcional, control del procesamiento del ARN, control del transporte de ARN, control traduccional, control de la degradación de los ARNm y finalmente el control de la actividad proteica, siendo el control transcripcional donde tienen un papel trascendental las HDACs que están presentes en núcleo. Las HDACs participan como corepresores de la expresión génica. La disminución de regiones acetiladas de la cromatina favorece la represión de la expresión (Legube & Trouche, 2003). Además las HDACs parecen estar involucradas en interacciones moleculares proteína-proteína con factores transcripcionales a nivel de regiones de unión a ADN y el dominio no catalítico de la HDAC (Kang *et al.*, 2005). Trabajos recientes han identificado una serie de proteínas que actúan como corepresores asociados a complejos sugiriendo una modulación enzimática de la acetilación de histonas como componente integral de la regulación transcripcional (Zhou *et al.*, 2005).



**Figura 9: Modelo de represión de transcripción por HDAC1 sobre Sp1.** El factor de transcripción Sp1 se une a cajas GC cercanas a regiones promotoras activando la transcripción. HDAC1 interactúa con la región dedo de zinc de Sp1 y la región carboxilo de HDAC1. Esta interacción previene la unión de Sp1 al activador transcripcional lo cual genera represión. Con un inhibidor de desacetilasas de histonas como Tricostatina A, se logra inhibir a HDAC1 permitiendo que Sp1 se una a las regiones que activan la transcripción (Kang *et al.*, 2005).

---

## 1.5 Inhibidores de desacetilasas de histonas

Una herramienta para el estudio de modificaciones como la acetilación y desacetilación de histonas, de la estructura y la función de enzimas involucradas es el uso de inhibidores específicos de HDACs. Los inhibidores están agrupados por su naturaleza química dependiendo de su estructura, como los ácidos grasos de cadena corta, compuestos sintéticos, toxinas de hongos, tetrapéptidos cíclicos y benzamidas (Graessle *et al.*, 2001). El primer inhibidor de HDACs encontrado fue el butirato de sodio que es un ácido graso de cadena corta el cual actúa como un potente inhibidor del crecimiento y de la diferenciación para algunas líneas de células tumorales. Otro inhibidor es el N- butirato que se utiliza en concentraciones micromolares esperando un elevado potencial y milimolares con un más bajo potencial. Otros inhibidores de origen natural como la Tricostatina A (TSA) el cual se aisló a partir de cultivos de *Streptomyces hygroscopicus*, es quizás uno de los inhibidores más estudiados debido a su potente acción ya que presenta una  $K_i$  de 3.4nM y éste bloquea por medio de una reacción catalítica de quelación del Zinc en el sitio activo. La deupedicina y la trapoxina son otros ejemplos de inhibidores que se han utilizado con menos frecuencia debido a que es irreversible la reacción de éstos sobre las HDACs (Monneret, 2004). En el 2005 se reportó que al dar un tratamiento previo con TSA a las células se observó que había un claro incremento en la transcripción, en específico de regiones promotoras dependientes del factor transcripcional Sp1 sugiriendo que la inhibición de actividad de la HDAC1 era crítica para la activación transcripcional (Kang *et al.*, 2005).

Otro inhibidor de HDACs utilizado no con tanta frecuencia como el TSA se trata de la apicidina el cual es un tetrapéptido cíclico que fue aislado del hongo *Fusarium spp.* Se

---

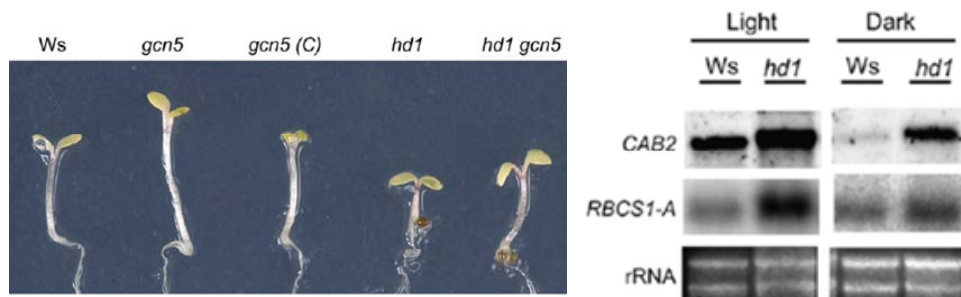
utiliza ampliamente como tratamiento antiparasitario contra *Plasmodium berghei* y *Cryptosporidium parvum* que son los agentes causales de la malaria y la criptosporidiosis. Este inhibidor provoca hiperacetilación de histonas e incrementa como consecuencia la expresión de genes que resultan finalmente en la muerte del parásito provocando un estado de hiperacetilación de las histonas probando un desajuste en la regulación de los genes del parásito. La apicidina posee actividad contra células infectadas con cáncer de cérvix y otros tipos de cáncer. Se piensa que el mecanismo de acción de la apicidina puede ser de dos formas el primero es que bloquee a el sitio catalítico quelando al ion zinc y de esta forma se bloquea la HDAC, el segundo propone que el grupo epoxi cetona sea capaz de alquilar la enzima y de esta forma inhibirla (Furumai *et al.*, 2001). La apicidina contiene un grupo etil cetona que es un potencial ZBG por sus siglas en inglés que es un grupo de unión a zinc y una cadena alquilo que actúa como enlazador este interactúa con la superficie de la HDAC. Este compuesto desarrolla una inusual actividad de ZBG por lo que es relativamente potente (Jones *et al.*, 2006). Es utilizada en concentraciones nanomolares y micromolares

## **1.6 Regulación epigenética de genes que son inducidos por luz**

### **1.6.1 HD1 involucrada en respuestas a luz en *Arabidopsis thaliana***

En *Arabidopsis thaliana* se realizaron mutantes en los genes que codificaban para las proteínas TAF-1, GCN5 (acetiltransferasas) y HD1 (desacetilasas de histonas) para comprobar si estas proteínas están involucradas en la regulación de respuestas y en la inducción de genes inducidos por la luz. Se observó que las mutantes de *gcn5* presentaron un fenotipo donde el hipocotilo era alargado en presencia de luz y se redujo la expresión de genes inducidos por esta última. En la mutación de *hd1* se observó que el hipocotilo era

mucho más corto que el de la planta silvestre aún en la oscuridad y presentó una expresión elevada de los genes que se inducen por la luz. También se observó que el grado de acetilación de la H3K14 disminuía en la mutante de *gcn5* en regiones promotoras de genes inducibles por la luz. En la mutante de *hd-1* el grado de acetilación se incrementó de forma generalizada ya que se presentó en regiones río arriba del promotor, así como en el promotor por lo que *hd-1* actúa en un amplio rango de promotores. La mutación en *hd-1* provocó un incremento en el grado de acetilación tanto en H3 y H4 donde las lisinas que fueron blanco de éstas fueron las K9, K27 para la primera y K5, K8 para la segunda. La regulación de los genes inducidos por luz requiere de la presencia de HD1 y GCN5 (Benhamed *et. al.*, 2006).



**Figura 10: Mutaciones en el gen *hd1* generan fenotipos y patrones de expresión alterados.** En la figura de la izquierda se observan 5 plantas que presentan diferentes fenotipos: la silvestre, la mutante nula de *gcn5* que codifica para una acetiltransferasa, la mutante de *gcn5* complementada, la mutante nula de *hd1* que codifica para desacetilasa de histonas y la doble mutante de *gcn5* y *hd-1*, al evaluar los fenotipos se observaron diferentes tamaños en hipocotilos. En la figura de la derecha se analizó la expresión de genes que son inducidos por luz en la mutante de *hd-1* mostrando un incremento en la expresión de genes inducidos por luz aún en oscuridad (Benhamed *et al.*, 2006).



---

### 1.6.2 El papel de una acetiltransferasa y la acetilación en *Neurospora crassa*

Uno de los modelos más utilizados en fotobiología ha sido *Neurospora crassa* y últimamente se ha utilizado para estudiar procesos epigenéticos mediados por la luz como la acetilación de histonas. Recientemente se generó la mutante llamada *ngf-1* la cual fue llamada de esta forma debido a que codifica para una HAT homóloga a Gcn5 de *Saccharomyces cerevisiae* (Grimaldi *et al.*, 2006). Los mismos autores encontraron que el residuo K14 de la histona H3 está asociado con la acetilación del promotor de un gen conocido como *al-3* el cual es inducido por luz, y esta acetilación fue dependiente de WC-1. Esto lo confirmaron al observar que una mutante en la lisina 14 presentó un fenotipo similar al de una mutante *wc-1* y mostró reducción en la activación transcripcional inducida por luz del gen *al-3* y de *vivid* (otro gen inducido por luz) (Grimaldi *et al.*, 2006).

---

## II. JUSTIFICACIÓN

*Trichoderma atroviride* es utilizado como agente de control biológico debido a que es un hongo micoparásito necrotrofico que además es utilizado como modelo fotomorfogénico (Horwitz, 1985), y gracias a estas características es un excelente modelo para estudiar los procesos epigenéticos que regulan la expresión de genes inducidos por luz azul. En *Trichoderma*, no se han abordado temas sobre los mecanismos que estén implicados con la regulación de genes relacionados con el micoparasitismo, la conidiación y en la percepción de la señal luminosa. Estudiar todos los procesos que regulan las HDACs es un tema muy actual y de gran importancia ya que abre más posibilidades de conocimiento. En relación a este tema se ha realizado poco en hongos filamentosos y no hay reportes sobre el papel que tienen las HDACs en *T. atroviride*. El estudiar a las HDACs nos brinda la posibilidad de desarrollar mejoras que repercutan directamente en el aprovechamiento de *Trichoderma* para su uso potencial dentro de la industria, medicina y la agricultura. Con los antecedentes ya presentados anteriormente nos planteamos el objetivo de analizar el papel que juega la desacetilasa de histonas hd-1 en respuesta a luz azul en *T. atroviride* mediante la generación de mutantes y sobreexpresantes que nos ayuden a comprender los mecanismos moleculares que están implicados en la percepción de la luz azul y la fotoconidiación.

---

### III. OBJETIVOS

**3.1 Objetivo general:** Determinar el papel de la desacetilasa de histonas HD1 en la epigenética de la respuesta a la luz azul en *Trichoderma atroviride*.

**3.2 Objetivos específicos:**

1. Evaluar el efecto de la apicidina, un inhibidor de las HDACs sobre la fotoconidiación y en la transcripción de genes regulados por la luz azul en *T. atroviride*.
2. Clonar y secuenciar el gen ortólogo a *hd-1* de *A. thaliana* en *T. atroviride*.
3. Generar cepas mutantes y que sobreexpresen el gen ortólogo a *hd-1(taho)* de *T. atroviride*.
4. Generar cepas transformantes con mutaciones puntuales en el gen que codifica para la histona H3 en las lisinas 9 y 14.
5. Evaluar la transcripción de genes que responden a luz azul en *T. atroviride* en el fondo genético de las diferentes cepas generadas en este estudio.

---

## IV. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1 Cepas y condiciones de cultivo

#### 4.1.1 Hongos

Durante la realización de este trabajo se utilizó la cepa IMI206040 de *Trichoderma atroviride*. Los cultivos de esta cepa se crecieron a 28°C en cajas con PDA (Papa Dextrosa Agar, DIFCO™). Para los ensayos de inducción por luz se utilizó medio PDYCA (Potato Dextrose Agar 3.9%, extracto de levadura 0.2%, y casaminoácidos 0.12%), medio PDYCB (Caldo, Papa Dextrosa, DIFCO™ 24g/L, extracto de levadura 2g/L y casaminoácidos 1.2g/L). EL inhibidor de desacetilasas de histonas, apicidina, se agregó en 3 concentraciones 800nM, 2µM y 5µM cuando fue necesario. Para la selección de cepas transformantes se utilizó PDA con 100 µg/mL de higromicina cubiertos con medio selectivo con agarosa al 0.8 % (100 µg /mL de higromicina).

#### 4.1.2 Bacterias

Para la manipulación y amplificación de plásmidos se utilizaron las cepas DH5α y JM109 de *Escherichia coli*. Estas cepas fueron crecidas y mantenidas en medio LB (1% de Triptona, DIFCO™, 0.5% de extracto de levadura, DIFCO y 1% de NaCl). Cuando fue necesario se agregó carbenicilina (100 µg/mL). Los plásmidos utilizados fueron: pGFP-Hyg para sobreexpresar el gen de interés ya que posee el promotor de la piruvato cinasa y el terminador de la celobiohidrolasa-2 de *T. reesei* y el vector pBHY70 (Casas *et al.*, 2004) para sustituir el gen silvestre donde se clonaron las regiones 5' y 3' aledañas a *taho* (*Trichoderma atroviride hdl ortólogo*) ambos incluyen el gen de la higromicina fosfotransferasa (*hph*) de *E. coli* bajo el control del promotor *trpC* de *A. nidulans* el cual es inducido pro triptófano.

---

## 4.2 Extracción y manipulación de ácidos nucleicos

Se extrajo ADN total de micelio de *T. atroviride* según el protocolo descrito por Raeder y Broda (1989). El ADN plasmídico se extrajo por el método de lisis alcalina (Sambrook *et al.*, 1989). Se aisló el ARN total del micelio de las diferentes muestras de *T. atroviride* utilizando el protocolo descrito por Jones *et al.* (1989). La síntesis de c-DNA se realizó por medio del Kit de la SuperScrip™ II Reverse Transcriptase (Invitrogen) siguiendo las especificaciones del proveedor.

## 4.3 Identificación *in silico* del gen *taho* de *T. atroviride*

Para identificar a la HDAC de *T. atroviride* ortóloga a HD1 (*taho*) de *Arabidopsis thaliana*, se realizó un análisis tipo n-blast utilizando como sonda la secuencia de nucleótidos del gen Hd1 se buscaron regiones conservadas en las HDACs analizadas, para posteriormente utilizarla como sonda electrónica y hacer una búsqueda con el editor de textos en el genoma de *T. atroviride* (<http://www.jgi.doe.gov>). La sonda hizo blanco con una región, en donde se tomaron aproximadamente 5 Kpb tanto hacia el 5' como hacia el 3' con la finalidad de abarcar al gen completo. Una vez obtenida la secuencia se determinó *in silico* el marco de lectura abierto (ORF) (GEN SCAN, <http://genes.mit.edu/GENSCAN.html>, Burge y Karlin, 1997).

## 4.4 Identificación *in silico* del gen que codifica para la histona H3 de *T. atroviride*

Con la finalidad de identificar y clonar al gen que codifica para la histona H3 de *T. atroviride*, se siguió el mismo procedimiento utilizado para identificar el gen *taho*. Una vez obtenida la secuencia se determinó que en ADN genómico la secuencia era de 1,174 pb y con una secuencia codificante de 510 pb predichas por el programa GENSCAN (Burge y Karlin, 1997).

---

#### 4.5 Interrupción del gen *taho*

A partir del ADN obtenido de la cepa silvestre IMI206040 de *T. atroviride* se amplificó un fragmento de 1,288 pb correspondiente a la región 5' inmediata al ORF del gen *taho* utilizando los oligonucleótidos F5 (5'GGTGCGAGTGGTACCATCCGACG3') y R5 (5'CCGCTCGAGGGAAAAGCTGTAACGCTGGGC3'), las bases subrayadas corresponden a sitios de restricción de las enzimas *KpnI* y *XhoI*, respectivamente. Una región de 1,479 pb correspondiente a la región 3' inmediata al ORF de dicho gen con los oligonucleótidos F3 (5'CGGGATCCATGGAGCAAAGGCACTCC3') y R3 (5'ATGAAGAGCTCGTCCAGGTCCTGGTCCG3'), las bases subrayadas corresponden a sitios de restricción de las enzimas *BamHI* y *SacI*, respectivamente y fueron añadidos a los oligonucleótidos para facilitar su clonación. Los fragmentos amplificados correspondientes al 5' upstream y 3' downstream de *taho*, se clonaron en el plásmido pBHY70; el fragmento 5' se clonó río arriba del cassette de higromicina y el fragmento 3' río abajo del mismo en una misma dirección, siguiendo la polaridad del gen. La construcción generada se digirió con las enzimas de restricción *KpnI* y *SacI* de New England Biolabs siguiendo las especificaciones del fabricante, el fragmento obtenido de 4,206 pb fue utilizado para transformar protoplastos de *T. atroviride*.

Programa de PCR:		Reactivos y concentraciones
5min-94°C	} 25 ciclos	Buffer 10x 2.5µL
45s-94°C		dNTPs 10mM 0.5µL
30s-60°C		ADN polimerasa Platinum 0.125µL
2min-72°C		ADN 1µL
10min-72°C		Oligos 0.5µL c/u
		MgCl 0.75µL

---

#### 4.6 Expresión constitutiva del gen *taho*

Para expresar constitutivamente al gen *taho*, el cADN correspondiente se amplificó utilizando a los oligonucleótidos Fw *SEtaho* (5'TCTAGAAATGTCGGGACTCGGCTCGGT3') y Rv *SEtaho* (5'ATGCATTCAAGCAGGCGGTGTGCTGG3') los cuales incluyen a los sitios de restricción *Xba*I y *Nsi*I, que además están presentes en el plásmido pHYG-GFP (bases subrayadas), quedando bajo el control del promotor de *pki* del gen que codifica para la piruvato cinasa y el terminador *cbh2* del gen que codifica para la celobiohidrolasa 2 de *T. reesei* (Mach *et al.*, 1994). La construcción obtenida se verificó por secuenciación por el método enzimático de Sanger *et al.*, 1987 y fue utilizada para transformar protoplastos de *T. atroviride*.

Programa de PCR:	Reactivos y concentraciones	
5min-94°C	} 30 ciclos	Buffer 10x 2.5µL
45s-94°C		dNTPs 10mM 0.5µL
30s-65°C		ADN polimerasa Platinum 0.125µL
2:30min-72°C		ADN 1µL
10min-72°C		Oligos 0.5µL c/u
	MgCl 0.75µL	

#### 4.7 Generación de la construcción para la mutante H3K14Q

Para realizar la mutagénesis dirigida del gen histona H3, se substituyó las lisinas 9 y 14 por glutaminas, mediante un oligonucleótido mutagénico que portaba las mutaciones puntuales justo en el triplete de bases codificantes para lisinas correspondientes en las posiciones 9 y 14, (AAG reemplazado por CAG en la posición 14), este oligonucleótido junto con el reverso se utilizaron para amplificar a partir de ADN genómico de la IMI

---

206040, la región correspondiente al ORF de la histona H3 de *T. atroviride*. El oligonucleótido mutagénico incluyó adicionalmente el sitio para la enzima de restricción *XbaI* y el reverso el sitio de reconocimiento para la enzima de restricción *NsiI*. El fragmento obtenido de 1,174 pb fue utilizado para clonarlo en fase en los sitios *XbaI* y *NsiI* presentes en el plásmido pHYG-GFP, quedando bajo la dirección del promotor del gen *pki* y del terminador *cbh2* (Mach *et al.*, 1994). La construcción obtenida fue verificada por secuenciación por el método enzimático de Sanger *et al.*, 1987 y fue utilizada para transformar protoplastos de *T. atroviride*.

#### **4.8 Obtención y transformación de protoplastos**

La obtención de protoplastos fue realizada de acuerdo a Baek y Kenerley en 1998 con algunas modificaciones. Se inocularon 10E8 conidias en 100 mL de PDYC y se incubaron por 24 h a 25°C con agitación a 250 rpm. El micelio se colectó por filtración, se lavó con agua y 0.5 g (peso húmedo) fueron resuspendidos en Osmoticum (CaCl<sub>2</sub> 50 mM, manitol 0.5 M y MES pH 5.5, 50 mM) con 15 mg/mL de “Lysing Enzymes from *Trichoderma harzianum*” (LET) (Sigma). La mezcla fue incubada a 25°C con agitación suave por 3.5 h. Se recolectaron los protoplastos filtrándolos a través de una malla estéril con poros de 10 mm. Se agregaron 5 mL de Osmoticum para recuperar los protoplastos, se centrifugaron a 100rpm durante 5 min y se resuspendieron en 20 mL de Osmoticum. Se centrifugó de nuevo y se resuspendieron en el volumen necesario para transformar con respecto al número de construcciones. A 250 µL de protoplastos se les agregó de 10-20 µg de ADN transformante. La mezcla se incubó en hielo por 20 min, posteriormente se agregaron 250 µL de PEG-4000 al 60% en Osmoticum y se incubaron a temperatura ambiente por 20 min. De la mezcla obtenida se tomaron 250µL y se mezclaron con 7 mL de medio de selección



---

con agar suave y se vaciaron a cajas de Petri con medio selectivo. Las cajas se incubaron a 25°C por 72 h y se aislaron las transformantes obtenidas.

#### **4.9 Escrutinio para la obtención de la cepa $\Delta$ taho**

Para comprobar los eventos de doble recombinación homóloga, en donde se reemplazaría el gen silvestre por la construcción mutante, se obtuvo ADN de las colonias transformantes para la amplificación por PCR utilizando oligonucleótidos cuya secuencia se alinea río arriba del gen *taho* genómico F (5'TGTA CTCTGTCTGGGTTCCCTGACC3') y R (5'GTGTGCTGCCTGCTG CTGCTGAC 3') pero no en la construcción. Estos oligonucleótidos se combinaron en una reacción de PCR con los oligonucleótidos localizados en el gen *hph* Fh (5' GATCGACGTAACTGATATTGAAGGAG3') y Rh (5' CTATTCCTTTGCCCTCGGACGAGTGCTG3') de la construcción. A las colonias que dieron amplificación positiva se les indujo la esporulación por luz y se sembraron esporas a la finalidad de obtener cultivos monospóricos. Este procedimiento se realizó tres veces.

#### **4.10 Ensayos de fotoinducción y tratamiento con apicidina**

Con ayuda de un sacabocados, se inoculó micelio de cultivos de las diferentes cepas, previamente crecidos por 48 h a 25°C. Posteriormente, se inocularon fragmentos de la periferia de la colonia en cajas de 9 cm con PDA con un papel filtro Whatman™ No. 50 de 8 cm de diámetro que cubre a un segundo papel filtro Whatman™ No. 1, a su vez cubiertos con un papel celofán y 3 mL de PDYCB. Los cultivos se crecieron 36 h a 28°C en oscuridad, periodo en el cual alcanzaron un diámetro aproximado de 4.5-5.0 cm. Finalizado el tiempo a 4 grupos de muestras a cada una se les aplicó diferente concentración de

---

apicidina las cuales fueron 800 nM, 2  $\mu$ M y 5  $\mu$ M; después se incubaron nuevamente por 24 h a 28°C. Posteriormente, las colonias fueron fotoinducidas exponiéndolas a una fuente de luz azul, con una intensidad de 1,200  $\mu$ mol/m<sup>2</sup> proveniente de un dispositivo que contiene dos lámparas fluorescentes de luz blanca fría y un filtro azul de acrílico (LEE #183; con una intensidad de 3 $\mu$ mol/m<sup>2</sup>s<sup>-1</sup>). El micelio fue colectado con ayuda de un bisturí bajo luz roja de seguridad (filtro LEE #106; con una intensidad de 0.1  $\mu$ mol/m<sup>2</sup>s<sup>-1</sup>) a los tiempos de 0, 5, 15, 30, 60 y 120 min después de la exposición a la luz e inmediatamente se congelaron en nitrógeno líquido. Los ensayos de fotoconidiación no incluyeron el celofán y fueron colocados en la oscuridad por 24-36 h después del pulso de luz y fijados con metanol al 80%.

**Nota:** todos los oligonucleótidos utilizados en este trabajo fueron diseñados en el programa FastPCR

---

---

## V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1 Efecto de la apicidina, un inhibidor de desacetilasas de histonas (HDACs) en la fotoconidiación de *Trichoderma atroviride*.

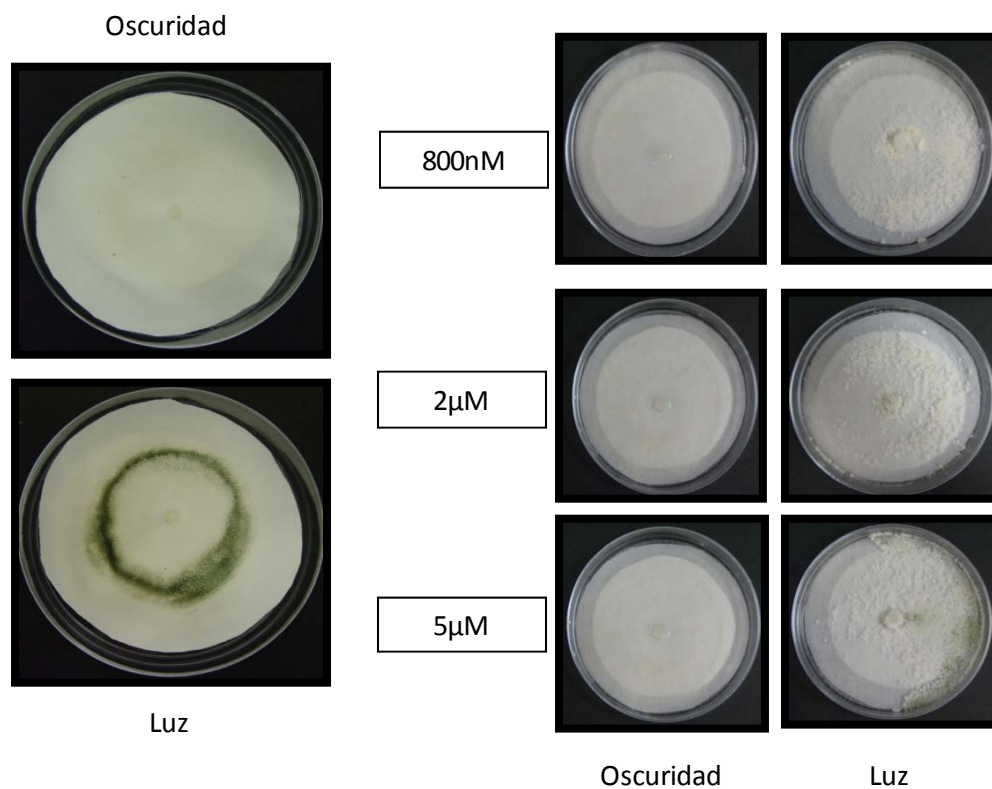
La apicidina es un inhibidor de HDACs que fue descubierto inicialmente como tratamiento contra la malaria. Este inhibidor fue aislado de hongos del género *Fusarium* (Rattray *et al.*, 1996 y Graessle *et al.*, 2001). Se sabe que el mecanismo de inhibición en general, es bloquear el sitio catalítico de la enzima. A nivel de expresión ésta se ve alterada debido a que se pierde el balance entre acetilación y desacetilación, se ha reportado que ocurre debido a que los promotores se encuentran en un estado teóricamente hiperacetilado por lo que se activa la expresión génica (Agalioti *et al.*, 2001; Jenuwein *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2001).

La conidiación en el género *Trichoderma* funciona como un mecanismo de supervivencia, la cual puede ser disparada por una gran variedad de factores como el estrés nutricional, el daño mecánico y la luz (Betina, 1984; Horwitz *et al.*, 1985 Casas-Flores *et al.*, 2004). Los procesos de conidiación se han visto asociados con la expresión génica en varios sistemas fúngicos, por lo cual se proponemos que existen varios niveles de regulación a nivel transcripcional durante estos procesos.

En la actualidad, no existen reportes de estudios sobre los mecanismos epigenéticos que regulan la expresión génica en hongos filamentosos, motivo por el cual, decidimos analizar el efecto de la apicidina sobre el proceso de la fotoconidiación. Con base en reportes sobre concentraciones utilizadas para otros hongos, se decidió realizar un experimento con tres concentraciones de apicidina (800nM, 2µM y 5µM) (Graessle *et al.*,

---

2001 y Hong *et al.*, 2003). Las concentraciones antes mencionadas se aplicaron sobre una colonia fotocompetente de *T. atroviride* por un periodo de 24 h para posteriormente someterla un pulso de luz azul equivalente a 1,200 micromolas. Los resultados mostraron que la conidiación se incrementa al agregar el inhibidor después de un pulso luz, mientras que en oscuridad no se observa este efecto, sin embargo nunca llegamos a observar conidias maduras en comparación con la cepa silvestre (Figura 12).



**Figura 12: Efecto de la aplicación de la apicidina en la fotoconidiación en *T. atroviride*.** Se observa que hay conidiación en las cajas que recibieron pulso de luz azul y tratamiento con apicidina a diferentes concentraciones del inhibidor 800 nM, 2µ M y 5 µM.

---

En *Neurospora crassa* después del estímulo luminoso se activa el complejo WC el cual a su vez enciende la expresión de genes *con*, los cuales son regulados rápidamente y están involucrados en la fotoconidiación (Linden *et al.*, 1997). En nuestro trabajo se observó que al aplicar la apicidina, se lleva a cabo la fotoconidiación, lo que nos hace suponer que la transcripción de algunos de los genes involucrados en este proceso puede estar afectada por la aplicación de este compuesto, simulando un estado de hiperacetilación en la cromatina, al inhibir de manera inespecífica a las HDACs.

## **5.2 Efecto del inhibidor de HDACs (apicidina) sobre la expresión de genes de respuesta a luz azul en *T. atroviride*.**

En un estudio por microarreglos de cDNA se determinó que cerca del 2.8% de los genes de *T. atroviride* responden a luz azul, donde el 2% se activa y el 0.8% se reprime después del estímulo luminoso (Rosales-Saavedra *et al.*, 2006). Como se mencionó, en la mayoría de los reportes se vincula a la acetilación con la activación de la transcripción y la desacetilación con la represión. Recientemente se ha reportado que la combinación de la luz y la acetilación provoca cambios en la expresión de aquellos genes que sean inducidos debido a estos estímulos. En *Arabidopsis thaliana* y *N. crassa* se probó que la acetilación y desacetilación es un proceso que está involucrado con la expresión de genes inducidos por la luz (Benhamed *et al.*, 2006 & Grimaldi *et al.*, 2006).

En *T. atroviride* se sabe que la expresión del gen *phr-1* es activada por un pulso de luz azul, mientras que la expresión de *bld-2* es reprimida. Con base en ésto, nos preguntamos si la regulación transcripcional de estos genes está sujeta a procesos epigenéticos que podrían

---

estar mediando la activación y la represión de la transcripción durante la respuesta a la luz azul.

Por tal motivo realizamos experimentos donde la cepa silvestre de *T. atroviride* estuvo en contacto con el inhibidor de HDACs a diferentes concentraciones. La apicidina se aplicó al medio de cultivo durante 24h para posteriormente aplicar un pulso de luz azul equivalente a  $1,200 \mu\text{mol}/\text{m}^2$ , por 0, 5, 15, 30, 60, 120 min y su control en la oscuridad. Se extrajo ARN de cada tiempo para generar ADNc, para posteriormente realizar el análisis de la expresión de estos genes por RT-PCR punto final. Los resultados mostraron una alteración en la expresión de *bld-2* y *phr-1*, cuando se aplicó la concentración más alta. Para ambos genes se notó que la expresión se prolonga aún después de los 60 min, tiempo a los cuales el transcrito de *phr-1* en los experimentos control está abatido, y los de *bld-2* ya deberían estar recuperando sus niveles de transcripción como cuando el hongo está en la oscuridad (Figura 13 A, B y C).

El gen *phr-1* no se expresa en la oscuridad y después de un estímulo luminoso alcanza sus picos máximos entre los 15 y 30 min (Berrocal-Tito *et al.*, 2000). Cuando *T. atroviride* se expuso a diferentes concentraciones de apicidina (800nM, 2 y 5 $\mu$ M) se observó que la expresión de *phr-1* se incrementó de forma importante y además se vio que este gen no se expresó en los tiempos reportados previamente, sino desde que recibió el pulso de luz azul (0 min), además esta expresión se mantuvo constante hasta los 120 min. Este comportamiento probablemente se deba a la inhibición inespecífica de las HDACs, lo cual simula un estado hiperacetilado de la cromatina, viéndose afectado el promotor del gen *phr-1*. Para el análisis de expresión del gen *bld-2*, el cual es reprimido por la luz azul también se observaron patrones de expresión alterados cuando se aplicaron las 3 concentraciones de

---

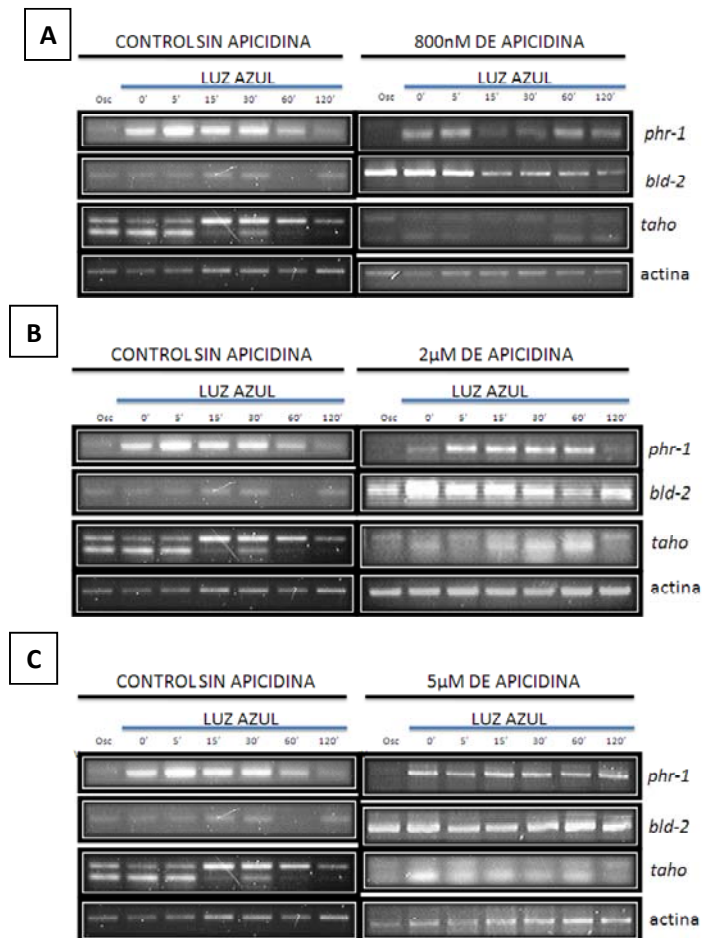
---

apicidina (800nm, 2 y 5 $\mu$ M). En el caso del control sin apicidina se puede ver que no se baja por completo la expresión de este gen y esto se debe a la expresión basal del gen *bld-2*. La expresión de este gen no es reprimida en presencia de apicidina, por el contrario, se mantiene y para la concentración de 5 $\mu$ M se observa una mayor expresión con respecto al control no tratado. Grimaldi y colaboradores (2006), observaron el fenotipo opuesto a *phr-1* para el gen *al-3* en una mutante *gcn-5*, cuyo gen codifica para una acetiltransferasa de histonas. De igual forma, mutantes en el ortólogo a *gcn5* de *A. thaliana* mostraron una represión de genes inducidos por luz azul (Benhamed *et al.*, 2006). Por otro lado, en mutantes en la desacetilasa de histonas HD1 de *A. thaliana*, los genes inducidos por la luz azul se vieron desreprimidos con niveles elevados aún en la oscuridad (Benhamed *et al.*, 2006). Se ha reportado que la acetilación de histonas es un mecanismo importante para que se lleve a cabo la activación transcripcional ya que permite el acceso a la maquinaria de transcripción (Zhang *et al.*, 2001). Sugerimos que al añadir al inhibidor apicidina se está modificando el grado de acetilación de la cromatina de *T. atroviride* dándonos como resultado un estado hiperacetilado, lo cual como se mencionó antes está relacionado con activación transcripcional.

Por lo observado para los genes *phr-1* y *bld-2* tal vez se trate de activación y por tanto están siendo afectados de forma positiva, ya que la expresión se mantuvo encendida en presencia del inhibidor apicidina con respecto al control sin inhibidor. Interesantemente, el gen *bld-2* no disminuyó su expresión después de un pulso de luz azul en presencia de apicidina, lo cual sugiere que la represión después de un pulso de luz azul puede ser debido a la actividad de una HDAC regulada por luz azul, cuya función sería desacetilar las histonas posicionadas en el promotor después del pulso, mientras que en la oscuridad podría ser

---

regulada su expresión por una acetiltransferasa de histonas, cuyo papel sería acetilar las histonas posicionadas en el promotor de *bld-2*, cabe mencionar que estos resultados son previos y faltaría verificarlos realizando un RT-PCR cuantitativo (rt-qPCR).



**Figura 13: Análisis de expresión de los genes *phr-1*, *bld-2* y *taho* bajo diferentes concentraciones de apicidina.** A) Análisis de expresión por medio RT-PCR de los genes *phr-1*, *bld-2* y *taho* en presencia del inhibidor de desacetilasas (apicidina) a una concentración de 800nM con respecto al control sin tratamiento. B) Análisis de expresión de los genes *phr-1* y *bld-2* y *taho* en presencia de 2µM de apicidina. C) Análisis de expresión por medio RT-PCR de los genes *phr-1*, *bld-2* y *taho* en presencia de 5µM de apicidina. Micelios de *T. atroviride* fueron expuestos a diferentes concentraciones de apicidina por 24 h para posteriormente ser expuestos a un pulso de luz azul. Se extrajo ARN total de las muestras y se generó el cDNA para realizar los

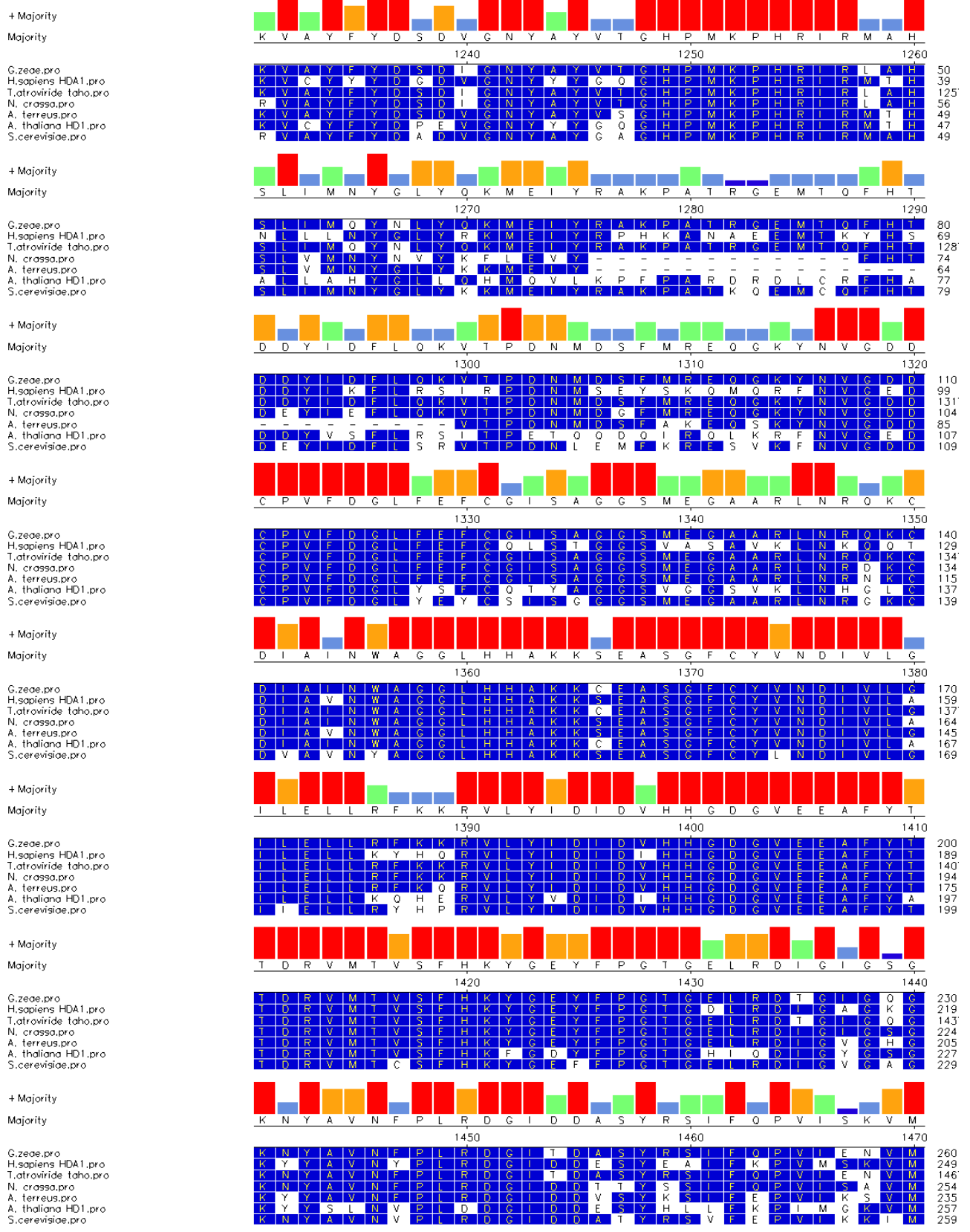


---

análisis de expresión. Los amplicones obtenidos con genes específicos para el gen de actina fueron utilizados como control de carga.

### **5.3 Identificación del gen *taho* de *T. atroviride***

Con base en los resultados obtenidos y los datos reportados en la literatura, decidimos hacer una búsqueda a nivel de secuencias de nucleótidos que fueran idénticas a la secuencia del gen *hd-1* en *A. thaliana*, para posteriormente utilizarla como sonda electrónica y rastrearla en el genoma recientemente obtenido de *T. atroviride* versión 8X. La sonda hizo blanco con una región del genoma y de ahí se tomaron aproximadamente 5 Kpb hacia el 5' y otras hacia el 3' y con ello delimitar la región donde se encontraba el posible ortólogo de *hd-1*. Una vez obtenida la secuencia se analizó *in silico* con el programa GENSCAN para obtener el marco de lectura abierto (ORF) (Burge & Karlin, 1997), obteniendo un ORF de 2,383pb el cual presenta 3 intrones predichos de manera *in silico*. Además, el programa predijo un polipéptido de aproximadamente 688 aminoácidos (a.a). La secuencia de a.a se analizó con el programa blastp de NCBI obteniendo como resultado un alto grado de identidad y similitud con HDACs de humano, levaduras y hongos filamentosos. Con la secuencia predicha de aminoácidos también se realizó un análisis con el programa Clustal W (Thompson *et al.*, 1997) con otras proteínas incluyendo HD1 de *A. thaliana* obteniendo una alta similitud con desacetilasas de histonas (Figura 14). Se obtuvo una región de elevada homología que comprendía la región catalítica. En base a los resultados de la búsqueda y del análisis informático decidimos generar las construcciones para interrumpir y sobreexpresar a este gen y analizar su papel durante la percepción de la señal luminosa en *T. atroviride*.



---

**Figura 14:** Análisis realizado en el programa MegAlign tipo Clustal W de la proteína ortóloga a HD1 de *A. thaliana* (TAHO). Se realizó un alineamiento entre proteínas HDACs de otros organismos como *G. zaeae*, *T. atroviride*, *N. crassa*, *A. terreus*, *A. thaliana*, *S. cerevisiae* y *H. sapiens*. Estas pertenecen a la misma familia de HDACs. En rojo se presenta la más alta identidad de los aminoácidos.

Una vez clonado y secuenciado el gen en cADN, al cual se le denominó *taho* (*Trichoderma atroviride* *hd-1* ortólogo), se procedió a diseñar oligonucleótidos para realizar los análisis de expresión bajo diferentes condiciones de luz. Los oligonucleótidos se diseñaron para que flanquearan el primer intrón de esta secuencia, con la finalidad de diferenciar por peso molecular el ADN genómico del c-ADN al momento del análisis. Como se puede observar en los experimentos con apicidina y control se aprecian 2 transcritos cuya expresión fue diferencial después de un pulso de luz azul (Figura 13 A, B y C), cabe aclarar que se verificó no existiera ADN genómico. Uno de los transcritos corresponde al tamaño esperado para el c-ADN, mientras que la segunda presenta un tamaño ligeramente mayor incluso que el esperado para la amplificación partiendo de ADN genómico, con análisis bioinformáticos podemos sugerir que ocurre un evento de retención de intrón y debido a esto el cADN presenta un tamaño mayor incluso al tamaño esperado para el genómico, este dato resulta bastante interesante ya que es la primera vez que se reportan 2 transcritos inducidos y regulados por la luz para un gen que codifica para HDAC. Como se puede observar en la Figura 13, ambos transcritos se expresan diferencialmente después de un pulso de luz azul, donde el de mayor tamaño se ve inducido, mientras que el más pequeño se reprime. Una vez que observamos este resultado, decidimos llevar a cabo un análisis de las secuencias del ADN genómico y el cADN, del cuyo análisis se obtuvo como resultado la posibilidad de 2 transcritos de este gen. Análisis de clonación y secuenciación, nos ayudarán a dilucidar la naturaleza y origen de estos transcritos, ya que no podemos descartar la posibilidad de que los oligonucleótidos diseñados se estén alineando con

---

transcritos de uno o más genes que codifican para HDACs con un alto grado de identidad a nivel de nucleótidos. En los resultados obtenidos con el inhibidor apicidina, no fueron muy claros para ambas bandas ya que en repetidas ocasiones observamos degradación del transcrito y es difícil concluir que es lo que está pasando en nuestro sistema. Por otro lado, podemos concluir que la desacetilasa de histonas ortólogo a Hd1 de *A. thaliana* en *T. atroviride* (*taho*) presenta dos transcritos que son regulados por luz azul, en los cuales podrían estar implicada la regulación de la expresión de genes inducidos por luz azul. Estudios de expresión de ambos transcritos en cepas mutantes *hd-1* ayudarán a determinar el papel de cada uno durante la percepción de la señal luminosa en *T. atroviride*.

## 5.4 Generación de cepas mutantes y transformantes

### 5.4.1 Interrupción del gen *taho*

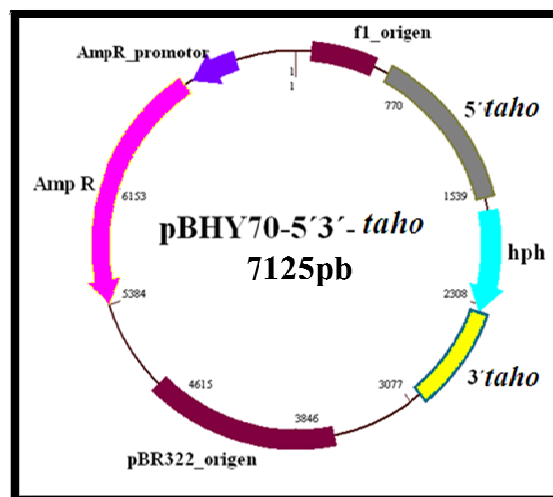
Con el fin de analizar si el gen *taho* que codifica para una HDAC está involucrado en los mecanismos de expresión de genes regulados por luz azul se decidió realizar la interrupción de dicho gen. La Figura 15 muestra una representación esquemática del gen *taho* y las regiones 5' y 3' aledañas.



**Figura 15: Representación esquemática de la región donde está localizado el ORF de *taho*.** La barra de color gris representa la región genómica 5' que tiene un peso de 1,288pb y la barra color amarillo representa la región genómica 3' que tiene un peso de 1,479pb. La barra central azul representa el ORF de *taho* que tiene un peso de 2,383pb.

---

Con la finalidad de generar una construcción para interrumpir el gen *taho* por doble recombinación homóloga se diseñaron oligonucleótidos que incluyeron sitios adecuados (ver Materiales y Métodos) para amplificar aproximadamente 1.5 kb de las regiones 5' y 3' que flanquean al gen *taho* para su posterior clonación. Una vez que se amplificaron las regiones 5' y 3', se clonaron en los sitios correspondientes en el vector pBHY70 flanqueando el cassette de resistencia a higromicina que está dirigido por el promotor *TrpC* de *A. nidulans* y de esta forma se obtuvo el vector pBHY70-5'3'*taho* el cual se muestra en la Figura 16. Con el vector generado se transformaron protoplastos de la cepa silvestre para obtener la mutante nula de *taho* por doble recombinación homóloga.

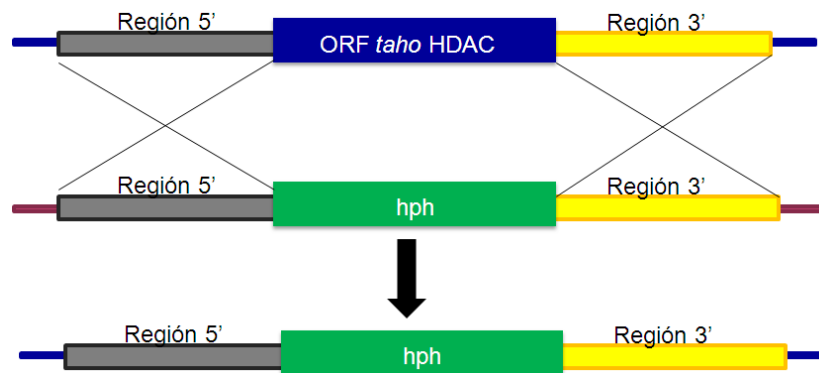


**Figura 16:** Representación esquemática del plásmido pBHY70-5'3'-*taho*. En la barra gris se muestra la región 5' y en amarillo la región 3', en azul el cassette de higromicina.

De la transformación se obtuvieron 40 cepas transformantes, las cuales se crecieron en medio PDA con higromicina en una concentración 100µg/mL, y se llevaron a esporulación, para posteriormente colectar las esporas y sembrarlas en diluciones hasta obtener colonias aisladas, subsecuentemente fueron elegidas varias colonias y se llevaron a esporulación para realizar 3 pases monospóricos adicionales para eliminar posibles núcleos

---

no transformados. Se extrajo ADN genómico de las transformantes y se realizó un PCR con oligonucleótidos que estuvieran flanqueando la construcción sobre el genoma de *Trichoderma* y un par de oligonucleótidos complementarios sobre el casete de higromicina. Los pares de oligonucleótidos amplificaron la región 5' y 3' más un fragmento del cassette de higromicina. Adicionalmente, se realizó una PCR para determinar si la presencia del gen endógeno con oligonucleótidos diseñados sobre el marco de lectura abierto, de este escrutinio se obtuvieron 8 posibles candidatas.

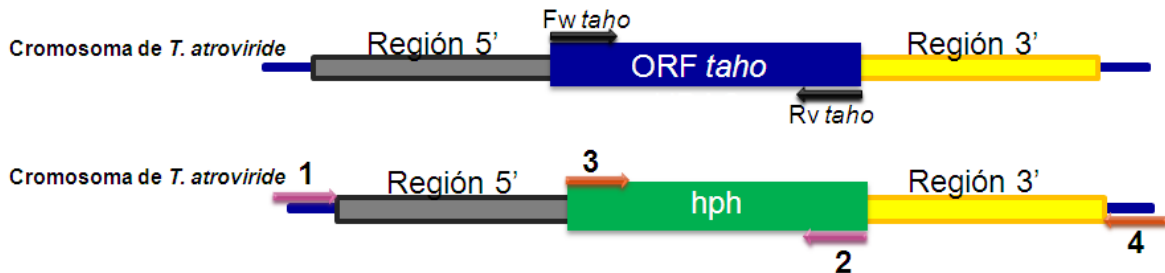


**Figura 17: Representación esquemática del evento de doble recombinación homóloga de la construcción para la interrupción del gen *taho* en *T. atroviride*.** El vector pBHY70-5'3' *taho* se incluye 1.5 kb río arriba del sitio de inicio de la traducción y 1.5 kb río abajo del codón de paro del gen *taho*. En la parte central se muestra el cassette de higromicina, el cual se expresa bajo el influjo del promotor Trp1 de *A. nidulans*, este marcador confiere resistencia a higromicina a las transformantes a hongos filamentosos.

Para la verificación del reemplazo génico, se realizaron 2 reacciones de PCR con los oligonucleótidos 1 y 4, los cuales están localizados fuera de la construcción sobre el genoma de *T. atroviride*, el 2 y 3 están sobre el casete de higromicina y son complementarios al 1 y 4 respectivamente (Figura 18). Los resultados muestran que la construcción se integró muy probablemente en el sitio adecuado, ya que se obtuvo un amplicón de 2,877pb para la región 5' y de 3,079 pb para la región 3'. Adicionalmente, se decidió realizar una PCR con los oligonucleótidos que amplifican el gen endógeno

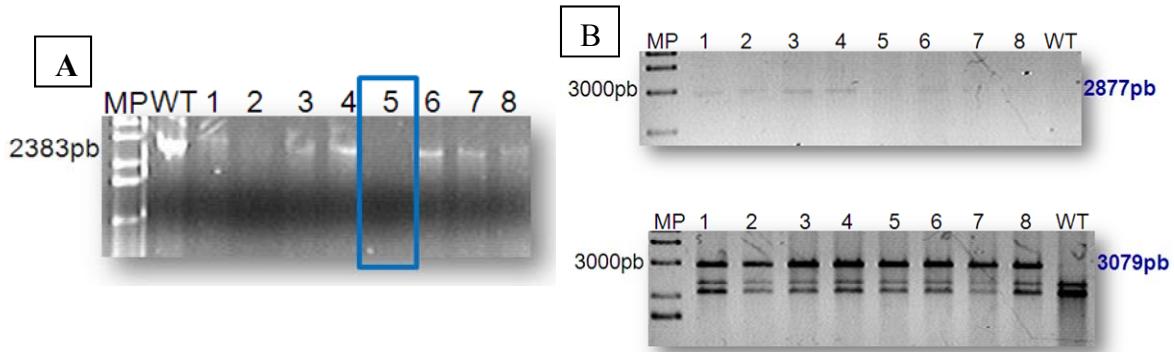
---

(2,383pb) para esto se utilizó la combinación de los oligonucleótidos Fw *taho* y Rv *taho* (Figura 18).



**Figura 18: Ubicación de oligonucleótidos utilizados para el escrutinio de las mutantes *Δtaho*.** La Figura muestra la ubicación de los oligonucleótidos que se utilizaron para realizar los análisis moleculares de las posibles mutantes. La combinación de Fw *taho* y Rv *taho* amplifican al gen silvestre *taho*. El primer 1 y 4 se encuentran flanqueando la región 5' y 3' respectivamente que fueron utilizadas para la construcción, mientras que los primers 2 y 3 se localizan en el casete de higromicina y son complementarios a los primers 1 y 4 respectivamente.

El análisis realizado con las 8 candidatas se muestra en la Figura 19, se utilizó la combinación de los oligonucleótidos (1-2) y (3-4) se observaron los fragmentos esperados de 2,877pb y 3,079pb respectivamente. Al realizar el PCR para amplificar al gen endógeno en la cepa silvestre, la cual se utilizó como control positivo se puede observar el fragmento esperado de aproximadamente 2,383pb, al igual que en 7 de las 8 candidatas, excepto la cepa número 5. Este resultado nos indica que muy probablemente la transformante 5 tenga el reemplazo génico, al igual que las otras 7, solo que estas últimas muy probablemente aún contengan núcleos silvestres, por lo cual nos generan el amplicón esperado para el gen silvestre. Esta última aseveración del resto de las mutantes nos atrevemos a realizarla por los datos obtenidos con los oligonucleótidos ubicados fuera de la construcción en combinación con los oligonucleótidos del cassette de higromicina.



**Figura 19: Análisis por PCR de las 8 posibles mutantes de *Ataho*.** Con el ADN genómico se realizaron reacciones de PCR con las 3 combinaciones de oligonucleótidos señalados. MP= marcador de peso molecular, WT= silvestre, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8 cepas candidatas. A) Se utilizaron oligos que amplifiquen el ORF *taho*. B) amplificación de las regiones 5' y 3' con higromicina.

#### 5.4.4 Análisis fenotípico de crecimiento y conidiación de la mutante *Ataho*

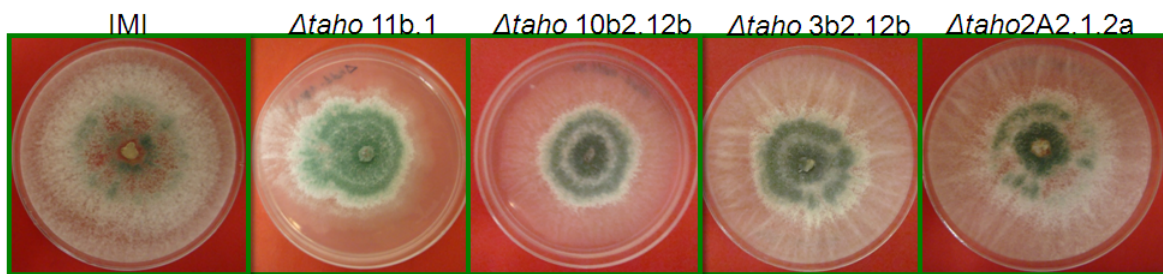
Con base a lo reportado en el trabajo de Uresti *et al.* (2008), el fenotipo que presentó la mutante *Atago-2* de *Trichoderma atroviride* en el ortólogo a *gcn-5* de *S. cerevisiae*, mostraba un fenotipo pleiotrópico ya que presentó crecimiento lento pero exacerbado, la conidiación fue escasa e incluso las conidias no presentaron una madurez completa al no observar el color verde característico de las conidias de la cepa silvestre de *T. atroviride*. Además, la colonia presentó pigmentación amarilla la cual era difundida al medio de cultivo observándose café después de algún tiempo. Con este antecedente y teniendo como referencia el fenotipo de la cepa silvestre de *T. atroviride* nos pusimos a analizar a las mutantes *Ataho*, las cuales presentaron fenotipos diferentes al observado en la mutante *Atago-2*, en algunos aspectos, por ejemplo, *Ataho* aunque también presentó un crecimiento lento, éste solo fue ligeramente más lento que la cepa silvestre, pero no tan marcado como la mutante *tago*. Por el contrario, la conidiación resultó ser considerablemente abundante (Fig. 20), aún en colonias muy jóvenes, de igual forma, la



---

coloración verde de las conidias se observó en colonias jóvenes, a diferencia de la cepa silvestre y contrastando con la mutante *tago*. Por otro lado, el micelio aéreo fue muy abundante a diferencia de la cepa mutante *tago*, donde esta última presenta muy poco o carece por completo. Su patrón de crecimiento fue radial, diferencia de la mutante *tago*, la cual crece en forma arrosetada.

Hasta aquí lo que podemos sugerir es que el gen *taho* que codifica para una HDAC está involucrado en la regulación negativa de genes de conidiación en *T. atroviride* por la abundante cantidad de conidias presentes en la mutante. Los genes implicados en desarrollo pueden estar afectados tomando en consideración que su crecimiento no es como el de la silvestre (Fig. 20). Es posible que un estado hiperacetilado se esté generando a falta de la HDAC *hd-1*. Hasta donde sabemos no hay reportes de HDACs relacionadas con la conidiación en hongos filamentosos lo cual hace este un dato relevante.



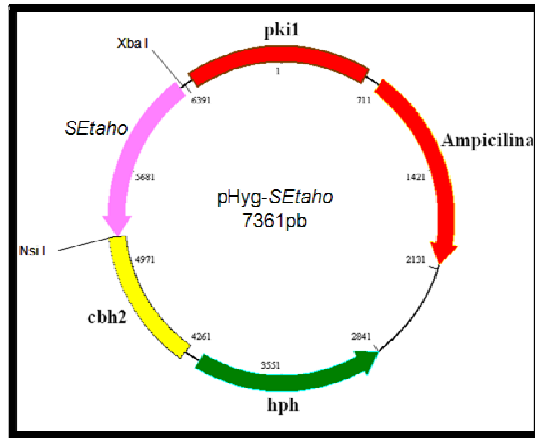
**Figura 20: Fenotipos de las cepas mutantes *Δtaho* y de la cepa silvestre de *T. atroviride* (IMI206040).** La Figura nos muestra que el fenotipo en las cepas mutantes de *Δtaho* y a la cepa silvestre a las 72 horas de crecimiento en medio papa dextrosa agar a 25 C con un fotoperiodo de 16 h luz/8 oscuridad.

---

## 5.5 Generación de cepas que sobreexpresen al gen *taho*

Tomando como antecedente el fenotipo de hiperesporulación de la cepa mutante *taho*, decidimos generar cepas que expresen a este gen a niveles constitutivos superiores al de la cepa silvestre, esto con la finalidad de obtener información complementaria que nos ayude a determinar la función del gen *taho* en *T. atroviride*. Al sobreexpresar una HDAC como *taho* nosotros esperamos que los estados de acetilación de la cromatina se vean afectados llevándola a un estado de hipoacetilación y por tanto una cromatina represora por el grado compactación de la misma.

A partir de una muestra de ARN de *T. atroviride* se generó c-ADN para posteriormente amplificar por PCR el marco de lectura abierta del gen *taho* con la combinación de los oligonucleótidos Fw *SEtaho* (5'TCTAGAAATGTCGGGACTCGGCTCGGT3') y Rv *SEtaho* (5'ATGCATTCAAGCAGGCGGTGTGCTGG3'), los cuales incluyen los sitios de restricción *Xba*I y *Nsi*I respectivamente. El amplicón obtenido de 2,061pb fue verificado por secuenciación y posteriormente se clonó en el vector pHyg-GFP en los sitios *Xba*I y *Nsi*I quedando bajo el control del promotor constitutivo de piruvato cinasa (*pki*) y el terminador de celobiohidrolasa-2 (*cbh-2*) de *T. reesei* (Mach *et al.*, 1994). Una vez obtenida la construcción pHyg-*SEtaho* se linearizó para transformar protoplastos de *T. atroviride*.

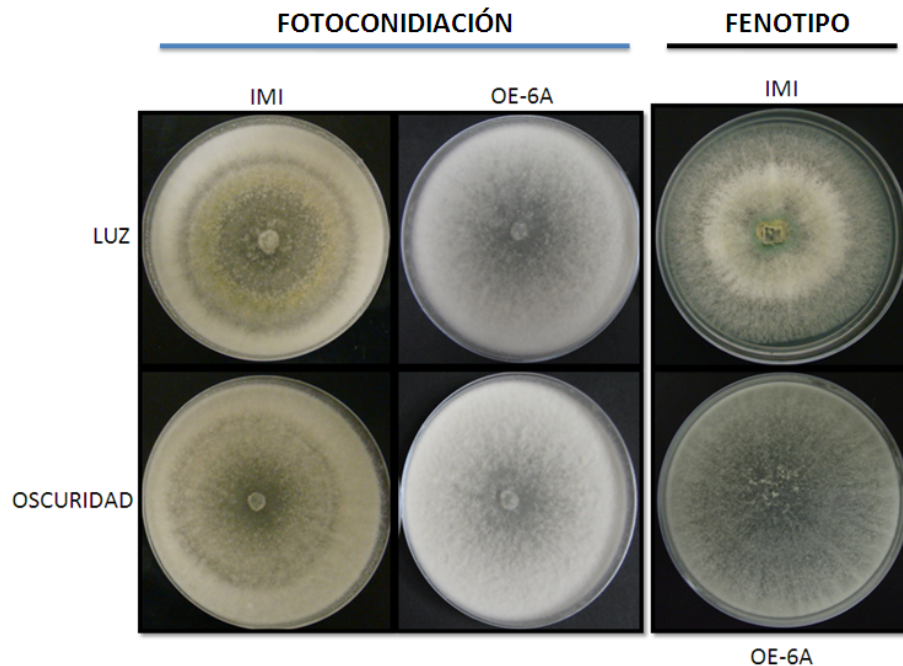


**Figura 21: Representación esquemática del plásmido pHyg-SEtaho.** En rojo se muestra el cassette de resistencia a ampicilina para su selección bacterias, en verde el casete de higromicina para su selección en hongos, en rosa el ORF de *taho* bajo la regulación del promotor constitutivo de *pki* y el terminador *cbh-2* de *T. reesei*.

Para la generación de las transformantes se realizó una digestión de la construcción con la enzima *EcoRI* a fin de linearizarla y facilitar su integración. La transformación se realizó como se describió en el apartado 5.4.3 de Materiales y Métodos. De este proceso de transformación se obtuvieron un total de 30 cepas transformantes seleccionadas por su resistencia a higromicina, de esta forma hicimos pases monospóricos para eliminar aquellos núcleos que no habían integrado la construcción a su genoma, obteniendo finalmente 11 cepas transformantes. Las cepas obtenidas presentaron un crecimiento radial normal, además presentan la formación de micelio aéreo hialino exacerbado, no presentaron conidiación, un fenotipo completamente opuesto al observado en las mutantes nulas de *Ataho*. Con el fin de determinar los efectos de la sobreexpresión del gen *taho* en la conidiación inducida por luz, realizamos experimentos de fotoconidiación (descrito en Materiales y Métodos) y los resultados mostraron que estas cepas no conidian frente al estímulo luminoso (Figura 22). Al ver un único fenotipo y contrario al de la mutante nula, podemos sugerir que muy probablemente el gen *taho* que codifica para una HDAC se

---

encuentra implicado en la regulación negativa de genes de conidiación, al generar un estado hipacetilado de las histonas que conforman los nucleosomas posicionados en los promotores de los genes relacionados con la conidiación.



**Figura 22: Ensayo de fotoconidiación de las cepas OE-6A.** Se realizó un ensayo de fotoconidiación de una de las cepas transformantes de la SE *taho*, no se observa el característico anillo de conidiación presente en la cepa silvestre (IMI). Este ensayo se realiza teniendo a la cepa IMI con respecto a las cepas OE en oscuridad por un periodo de 48h y se les aplica un pulso de luz azul.

### 5.6 Generación de cepas transformantes con mutaciones puntuales en las lisina 9 y 14 de la histona H3 (H3<sup>K9Q;K14Q</sup>)

La acetilación es una modificación postraduccional que sufren los grupos amino terminales de las histonas. Esta modificación es importante para la regulación de la expresión génica. Incluso se habla de un código epigenético en el cual las posiciones de estas modificaciones juegan un papel importante para la activación transcripcional de la

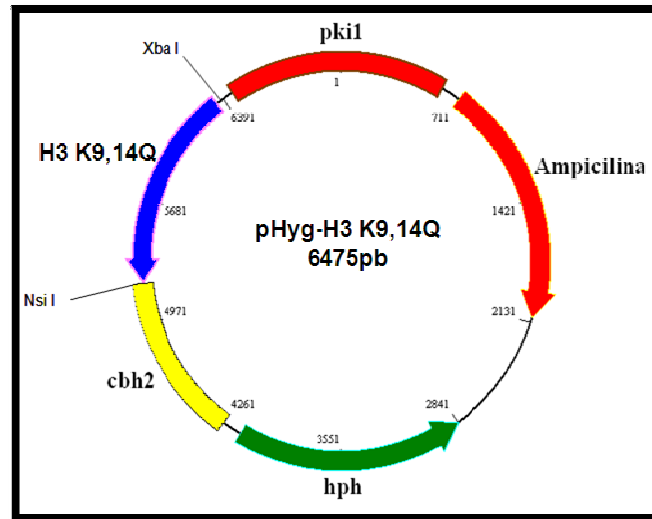
---

cromatina. Se ha reportado en varios sistemas que los principales blancos de acetilación son los residuos 9 y 14 de las lisinas de la histona 3 (H3), además se ha demostrado que ambas posiciones están involucradas con activación transcripcional (Sterner *et al.*, 2000; Jenuwein *et al.*, 2004; Recillas, 2004; Goldberg *et al.*, 2007). Tomando en cuenta lo anterior y pensando que ambas lisinas fueran blanco de modificaciones postraduccionales para la regulación de la expresión de genes regulados por luz azul en *T. atroviride*, se generó una construcción que portara el gen que codifica para la histona H3 en donde ambos residuos fueron reemplazados por glutaminas, ya que este aminoácido presenta características físico-químicas semejantes a la lisina, cuidando de esta manera el no alterar de forma trascendental la estructura de la proteína.

La sustitución doble de las lisinas 9 y 14 se realizaron mediante el uso de un oligonucleótido mutagénico en los codones codificantes para las lisinas, el codón AAG fue reemplazado por CAG en las posiciones 9 y 14. Con los oligonucleótidos mutagénicos (Fw H3 KxQ-9y14OE XbaI (TCTAGAATGGCTCGTACCAAGCAGACTGCCCCGCCAGTCCACCGGTGGCCAGG CTCCCCGCAAGCAG) y Fw H3 OE NsiI (ATGCATTTACACCACATTGTACTGTTTCCGAGG), se realizó una PCR con ADN genómico de la cepa IMI de *T. atroviride* (206040). Como resultado se obtuvo el fragmento esperado de 1,175pb, el cual se clonó en el vector pGEM-Teasy y se verificó por secuenciación para posteriormente subclonarlo entre los sitios XbaI y NsiI del vector de expresión para hongos filamentosos pHyg-GFP. La construcción quedó bajo el control del promotor *pki* y el terminador de *cbh-2* (Mach *et al.*, 1994) (Figura 23). Esta construcción

---

se linearizó y se transformaron protoplastos de *T. atroviride* como se describió previamente.



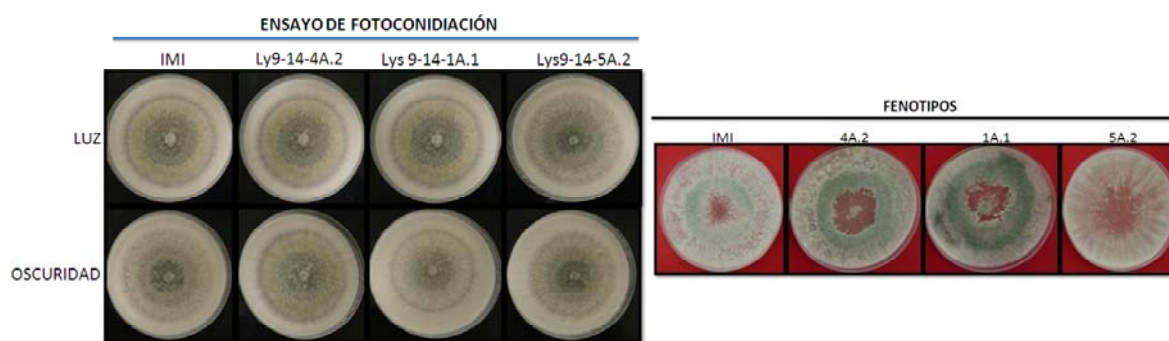
**Figura 23. Representación esquemática del plásmido pHyg-H3K9Q;K14Q.** La barra roja se muestra el cassette de resistencia a ampicilina para su selección bacterias, en verde el casete de higromicina para su selección en hongos, en azul el ORF de H3 con las 2 sustituciones de las lisinas 9 y 14 por glutaminas, quedando bajo la regulación del promotor constitutivo de *pki* y el terminador *cbh-2* de *T. ressei*.

### 5.6.2 Análisis fenotípico de las cepas transformantes H3K9Q;K14Q

Se transformó a *T. atroviride* con la construcción que poseía la secuencia de H3 con ambas sustituciones en las posiciones 9 y 14 de lisinas por glutaminas y se realizó la selección de las cepas transformantes de una forma similar a la ya descrita en los apartados anteriores. En la transformación se obtuvieron 40 cepas resistentes a higromicina pero al realizar los pases monospóricos se redujo el número a 12. De estas se formaron 3 grupos debido a sus características fenotípicas ya que mostraron diferencias en cuanto al crecimiento, capacidad de conidiación y morfología de la colonia. El primer grupo destacó por crecer rápido y la conidiación que presentó fue particular ya que formó un solo anillo de conidiación el cual fue grueso y por tanto más abundante que la silvestre. Para el caso

---

del segundo grupo el crecimiento fue comparable al de silvestre con respecto a la capacidad de crecer y de conidiar. El tercer grupo se caracterizó por crecer de forma comparable a la silvestre pero presentan la particularidad de no conidiar solo forman micelio hialino. Con la finalidad de evaluar su comportamiento ante un pulso de luz azul, se realizó un experimento de fotoconidiación seleccionando cepas representativas de cada grupo, incluyendo a la cepa silvestre como control. Los resultados observados fueron distintos entre ellas ya que las cepas que formaban el anillo de conidiación pronunciado presentaron conidiación en luz y oscuridad, la otra cepa se comportó de forma semejante a la silvestre, aunque en oscuridad se observó mayor formación de micelio aéreo, la última cepa evaluada no mostró conidiación en luz ni en oscuridad (Figura 24). La diversidad de los fenotipos observados se pueden deber a integraciones ectópicas en cualquier parte del genoma de *T. atroviride*, afectando la regulación génica, dando lugar así a los diversos fenotipos.



**Figura 24: Ensayo de fotoconidiación de las cepas transformantes K9Q;K14Q representantes de 3 grupos fenotípicos diferentes.** Cepas representativas de cada grupo se crecieron por 36 h en la oscuridad para posteriormente someterlas a un pulso de luz azul equivalente a  $1,200 \mu\text{l}, 200 \mu\text{mol}/\text{m}^2$ . La fotografía muestra los fenotipos de conidiación 48 h después del pulso de luz azul.

Tomando en conjunto todos los resultados obtenidos en esta tesis, podemos concluir que la aplicación de apicidina afecta de manera positiva la regulación de genes

---

involucrados en la conidiación y aquellos regulados por la luz azul como *phr-1* y *bld-2*. Además, los datos genéticos que presentamos de la mutante *taho*, así como los de sobreexpresión del gen, indican que esta HDAC regula de manera negativa el proceso de conidiación. La presencia de dos formas del transcrito del gen *taho*, indican que puede haber una regulación postranscripcional de este por splicing alternativo, aunque no descartamos la posibilidad de que los oligonucleótidos que se utilizaron estén alineando con genes parálogos de HDACs. El hecho de descubrir dos transcritos que se regulan por luz azul, nos indica que pueden existir niveles de regulación muy fina a nivel epigenético en *T. atroviride*. Con respecto a las mutaciones puntuales en las lisinas 9 y 14 en el gen H3, es complicado en este punto concluir sobre la funcionalidad de estos dos aminoácidos en la regulación epigenética de la percepción de la señal luminosa; el fenotipo que podíamos esperar era la ausencia de conidiación de las cepas que tuvieran las mutaciones puntuales en las lisinas 9 y 14 debido a que se ha sugerido que al no haber estos aminoácidos blanco de dichas modificaciones si no ocurren podríamos ver represión de la expresión de algunos genes en este caso genes que responden a luz como son los genes de conidiación, pero experimentos más detallados como ensayos de CHIP podrían ayudar a evaluar si estas regiones están menos activas debido a la ausencia de acetilaciones en las lisinas 9 y 14 además esto nos ayudara a discernir el posible papel en dicha regulación . Adicionalmente, los análisis moleculares referentes a la expresión y de inmunoprecipitación de la cromatina de genes relacionados con la conidiación, así como de los *phr1* y *bld-2* en las mutantes y sobreexpresantes, ayudarán a responder la serie de preguntas planteadas en un inicio en el análisis de la regulación epigenética durante la percepción de la señal luminosa en *T. atroviride*.

---



---

## VI. CONCLUSIONES

1. La apicidina modifica el patrón de la fotoconidiación después de un pulso de luz azul en *Trichoderma atroviride*.
2. La expresión de algunos genes regulados por la luz azul se ve alterada por la aplicación de la apicidina.
3. El análisis bioinformático del gen *taho* (*Trichoderma atroviride* *hd-1* ortólogo) de *T. atroviride* indica que aislamos a una HDAC de la clase I (RPD3). La luz azul regula de forma diferencial la producción dos transcritos del gen *taho* en *T. atroviride*.
4. La mutante nula del gen *taho* provoca un fenotipo de hiperesporulación en *T. atroviride* lo cual no se había reportado para hongos filamentosos.
5. Cepas sobreexpresantes del gen *taho* *T. atroviride* no esporulan ante un pulso de luz azul.
6. La mutagénesis dirigida de dos lisinas en el gen H3 de *T. atroviride* genera varios fenotipos en respuesta a luz azul.

---

## VII. PERSPECTIVAS

- Clonar y secuenciar los dos transcritos de *taho*.
- Analizar el patrón de expresión de los genes *phr-1* y *bld-2* en la cepa mutante *taho*, SE *taho* y *H3K9,14Q*.
- Realizar análisis tipo Northern blot para comprobar que las cepas SE del gen *taho* son realmente cepas sobreexpresantes.
- Analizar el patrón de acetilación en los promotores de los genes *phr-1* y *bld-2* para la mutante  $\Delta$ *taho*, SE *taho* y *H3K9,14Q*.
- Análisis de patrón de expresión de genes de conidiación de las mutantes y transformantes generadas.
- Realizar tiempo real para el análisis de expresión de los genes *phr-1* y *bld-2* de las mutantes y transformantes generadas.
- Realizar ensayos de confrontación con las mutantes y transformantes generadas con *R. solani* y *S. rolfsii* con el objeto de encontrar una cepa que controle mas eficienteente que la *T. atroviride* silvestre a estos patógenos.

---

## VIII. BIBLIOGRAFÍA

- Agalioti T, Chen G y Thanos D. (2002). Deciphering the transcriptional histone acetylation code for a human gene. *Cell*. **111**:381-392.
- Anemieke J. M, Deruijter A. H, Van Gennip H. N, Caron S. K. y Van Kuilenberg. (2003). Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family. *Biochem. J*. **370**: 737:749.
- Baek J y Kenerley C. (1998). The *arg2* gene of *Trichoderma virens*: cloning and development of a homologous transformation system. *Fungal Genet Biol*. **23**:34-44.
- Ballario P, Vittorioso P, Magrelli A, Talora C, Cabibbo A y Macino G. (1996). White collar-1, a central regulator of blue light responses in *Neurospora*, is a zinc finger protein. *EMBO J*. **15**:1650–1657.
- Benhamed M, Bertrand C, Servet C, y Zhou D. X. (2006). Arabidopsis GCN5, HD1, and TAF1/HAF2 Interact to Regulate Histone Acetylation Required for Light-Responsive Gene Expression. *The Plant Cell*. **18**:2893–2903.
- Berrocal-Tito G, Rosales-Saavedra T, Herrera-Estrella A. y Horwitz A. (2000). Characterization of blue-light and developmental regulation of the photolyase gene *phr-1* in *Trichoderma harzianum*. *Photochem Photobiol* 71, 662–668.
- Berrocal-Tito G, Sametz-Baron L, Eichenberg K, Horwitz y Herrera-Estrella A. (1999). Rapid blue light regulation of a *Trichoderma harzianum* photolyase gene. *J Biol Chem*. **274**:14288–14294.
- Betina V. (1984). Photoinduced conidiation in *Trichoderma viride*. *Int J Microbiol*. **2**:55-68.
- Briggs W. y Huala E. Blue-Light Photoreceptors in Higher Plants. (1999). *Annu. Rev. Cell Dev. Biol*. **15**: 33-62.

- 
- Brownell J. E, Zhou J, Ranalli T, Kobayashi R, Edmondson D. G, Roth S. Y. y Allis C. D. (1996). Tetrahymena histone acetyltransferase A: A homolog to yeast Gcn5 linking histone acetylation to gene activation. *Cell*. **84**: 843-851.
- Blumenstein A, Vienken K, Tasler R, Purschwitz J, Veith D, Frankenberg-Dinkel N. y Fischer R. (2005). The *Aspergillus nidulans* phytochrome *FphA* represses sexual development in red light. *Curr Biol*. **15**:1833–1838.
- Björn O. L. (2008). The Science of Life and Light. *Second edition*. **14**: 339.
- Burge C, y Karlin S. (1997). Prediction of complete gene structures in human genomic DNA. *J Mol Biol* **268**:78-94.
- Carsten Schwerdtfeger and Hartmut Linden (2003). VIVID is a flavoprotein and serves as a fungal blue light photoreceptor for photoadaptation. *The EMBO Journal*. **22**:4846-4855.
- Casas-Flores S, Rios-Momberg M, Bibbins M, Ponce-Noyola P y Herrera-Estrella A. (2004). BLR-1 and BLR-2, key regulatory elements of photoconidiation and mycelial growth in *T. atroviride*. *Microbiology*. **150**:3561–3569.
- Cashmore A. R, Jarillo J. A, Wu Y. J, y Liu D. (1999). Cryptochromes: Blue light receptors for plants and animals. **284**, 760.
- Champe S, Nagle D y Yager L. (1994). Sexual sporulation in *Aspergillus*: 50 Years On, *Progress in Industrial Microbiology*, Vol. 29, edited by S. D. Martinelli and J. R. Kinghorn. Elsevier Science, Amsterdam. 429-454.
- Cheng P, Yang Y, Wang L. y Liu Y. (2003). White collar-1 a multifunctional *Neurospora* protein involved in the circadian feedback loops, light sensing and transcription repression of *wc-2*. *The Journal of Biological Chemistry*, **278**: 3601-3608.
- Corrochano L y Galland P. (2006). Photomorphogenesis and Gravitropism in Fungi. *The Mycota I. Springer-Verlag*. 233-259.

- 
- Dodd L, Lieckfeldt E, Samuels G. J. (2003) *Hypocrea atroviridis* sp. Nov., the teleomorph of *Trichoderma atroviride*. (2003). **95**: 27-40.
- Ezziyyani M., Sánchez Pérez C., Ahmed S. A., Requena E. M. y Candela E. M. (2004). *Trichoderma harzianum* como biofungicida para el biocontrol de *Phytophthora capsici* en plantas de pimiento (*Capsicum annuum* L.). *Anales de Biología*. **26**: 35-45.
- Falciatore A y Bowler C. (2005). The Evolution and Function of Blue and Red Light Photoreceptors. *Current Topics in Developmental Biology*. **68**: 317-350
- Froehlich A. C, Noh B, Vierstra R. D, Loros J. J. y Dunlap J. C. (2005). Genetic and Molecular Analysis of Phytochromes from the Filamentous Fungus *Neurospora crassa*. *Eukarotic cell*. **4**:2140-2152.
- Furumai R, Komatsu Y, Nishino N, Khochbin S, Yoshida M. y Horinouchi S. (2001). Potent histone deacetylase inhibitors built from trichostatin A and cyclic tetrapeptide antibiotics including trapoxin. *PNAS*. **98**: 87-92.
- Graessle S, Loidl P. y Brosh G. (2001). Histone acetylation: plants and fungi as model systems for the investigation of histone deacetylases. *Cell. Mol. Sci*. **58**: 704-720.
- Gressel J. B. y Hartman K. M. (1967). Morphogenesis in *Trichoderma*: action Spectrum of Photoinduced Sporulation. Short communication. **79**: 971-974.
- Gregoretto I. V, Lee Y. M. y Goodson H. V. Molecular evolution of the histone deacetylase family: functional implications of phylogenetic analysis. (2004). *J. Mol. Biol*. **338**: 17-31.
- Grimaldi B, Coiro P, Filetici P, Berge E, Dobosy J. R, Freitag M, Uselker E. U. y Ballario P. (2006). The *Neurospora crassa* White Collar-1 dependent blue light response requires acetylation of histone H3 Lysine 14 by NGF-1. *Molecular Biology of the cell*. **17**: 4576-458.

- 
- Grunstein M. (1997). Histone acetylation in chromatin structure and transcription. *Nature*. **389**: 349-352.
- Galun E, y Gressel J. (1966). Morphogenesis in *Trichoderma*: Supression of Photoinduction by 5- Fluorouacil. *Science*. **151**:696-698.
- Goldberg A, Allis D. C. y Bernstein E. (2007). Epigenetics: A Landscape Takes Shape. *Cell*. **128**:635-638.
- Harman G. E, Howell R. H, Viterbo A, Chet I. y Lorito M. (2004). *Trichoderma* species opportunistic, avirulent plant simbiotics. *Nature Reviews Microbiology*. **2**: 43-56.
- Hayes J. J. y Hansen J. C. (2001). Nucleosomes and the chromatin fiber. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **11**: 124-129.
- He Q, Cheng P, Yang Y, Wang L, Gardner K. H. y Liu Y. (2003). White collar-1, a DNA binding transcription factor and a light sensor. *Science*. **297**:840–843.
- Herrera Estrella A. y Horwitz B. (2007) Looking Through the eyes of fungi: molecular genetics of photoreception. **64**: 5-15.
- Horwitz B, Gressel J. y Malkin S. (1985). Photoperception mutants of *Trichoderma* : Mutants that sporulate in response to stress but not to light. *Curr Genet*. **9**:605-614.
- Howell C. R. (2003). Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: The history and evolution of current concepts. *Plant Disease*. **87**: 4-10.
- Hong J, Ishihara K, Yamaki K, Hiraizumi K, Ohno T, Ahn J. W, Zee O. y Ohuchi K. (2003). Apicidin, a histone deacetylase inhibitor, induces differentiation of HL-60 cells. *Cancer letters* **189**: 197-206.
- Jenuwein T, Allis C. D. (2001). Translating the histone code. *Science*. **293**:1074-1080.
- Jones P, Altamura S, Chakravartv P. K, cecchetti O, De Francesco R, Gallinar P, Ingenito R, Meinke P. T, Petrocchi A, Rowley M, scarpelli R, Serafini S. y Steinkühler C.
-

- 
- (2006). A series of novel, potent, and selective histone deacetylase inhibitors. **16**: 5948-5952.
- Kang J, Kim M, Lee J, Park H, Lee M, Auh C. y Hur M. (2005) Histone Deacetylase-1 represses transcription by interacting with zinc-fingers and interfering with the DNA binding activity of Sp1. *Cell Physiol biochem.* **16**: 23-30.
- Kuo M. H, Brownell J. E, Sobel R. E, Ranalli T. A, Cook R. G, Edmondson D. G, Roth S. Y, y Allis C. D. (1996). Transcription-linked acetylation by Gcn5p of histones H3 and H4 at specific lysines. *Nature.* **383**:269– 272.
- Larschan E. y Winston F. (2001). The *S. cerevisiae* SAGA complex functions in vivo as a coactivator for transcriptional activation by Gal4. *Genes & Dev.* **15**: 1946-1956.
- Lee T. I, Causton H. C, Holstege F. C, Shen W. C, Hannett N, E. Jennings G, Winston F, Green M. R, y Young R. A. (2000). Redundant roles for the TFIID and SAGA complexes in global transcription. *Nature.* **405**:701–704.
- Legube G. y Trouche D. (2003). Regulating histone acetyltransferases and deacetylases. *EMBO Reports.* **4**:944-947.
- Linden H. y Macino G. (1997). *White collar 2*, a partner in blue light signal transduction, controlling expression of light-regulated genes in *Neurospora crassa*. *EMBO J.* **16**:98–109.
- Linden H, Ballario P. y Macino, G. (1997). Blue light regulation in *Neurospora crassa*. *Fungal Genet Biol.* **22**:141–150.
- Linden H. (2002). A White Collar Protein Senses Blue Light. *Science.* **297**:777-778.
- Lorito M, Harman G.E, Hayes C.K, Broadway R.M, Tronsmo A, Woo S. L y Di Pietro A. (1993). Chitinolytic enzymes produced by *Trichoderma harzianum*: Antifungal activity of purified endochitinase and chitobiosidase. *Phytopathology.* **83**: 302-307.
- Ma L, Li J, Qu L, Hager J, Chen Z, Zhao H y Deng X. W. (2001). Light control of *Arabidopsis* development entails coordinated regulation of genome expression and cellular pathways. *Plant Cell.* **13**:2589–2607.
-

- 
- Mach R. L, Schindler M. y Kubicek C. P. (1994). Transformation of *Trichoderma reesei* based on hygromycin B resistance using homologous expression signals. *Curr Genet.* **25**:567–570.
- Mooney J.L, y Yager L.N. (1990). Light is required for condensation in *Aspergillus nidulans*. *Genes Dev.* **4**:1473–1482.
- Monneret C. (2004). Histone deacetylase inhibitors. *European Journal of Medicinal Chemistry.* **40**: 1-13.
- Ouyang Y, Anderson C, R. kondos T, Golden S. S. y Johnson C. H. (1998). Resonating circadian clocks enhance fitness in cyanobacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **95**:8660-8664
- Raeder, U. y Broda P. (1989). Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. *Lett Appl Microbiol.* **1**:17-20.
- Rattray D. S, Gurnet A. M, Myers R. W, Duiski P. M, Crumley T. M, Allocco J. J, Cannova C, Meinke P. T, Colletti S. L, Bednarek M. A, Singh S. B, Goetz A. W, Dombrowski J. D. y Scmatz D. M. (1996). Apicidin: A novel antiprotozoal inhibits parasite histone deacetylase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **93**: 13143-13147.
- Recillas T. F. y Arenal E.M. (2004). Participación de la estructura de la cromatina en la regulación de la expresión génica. *Mensaje Bioquímico.* **XXVIII**: 173-201
- Rios Momberg M. H. (2004). Papel de una proteína homóloga a WC-1 de *Neurospora crassa* en las respuestas a luz de *Trichoderma atroviride*. Tesis doctoral del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional Unidad Irapuato Departamento de Ingeniería Genética.
- Rosales-Saavedra T, Esquivel-Naranjo E.U, Casas- Flores S, Martinez-Hernandez P, Ibarra-Laclette E, Cortes-Penagos C, y Herrera-Estrella A. (2006). Novel light-regulated genes in *Trichoderma atroviride*: a dissection by cDNA microarrays. *Microbiology.* **152**: 3305–3317.
-



- 
- Roth Y. S, Denu J. M. y Allis D. C. (2001). Histone acetyltransferases. *Annu. Rev. Biochem.* **70**: 81-120.
- Sambrook L, Fritsch E. F. y Maniatis T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual* (2nd. edn). Cold Spring Harbor. Laboratory Press. New-York.
- Sanger F, Nicklen S, y Coulson, A. (1987). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA.* **74**:5463.
- Sargent M. L. y Briggs W. R. (1967). The Effects of Light on a Circadian Rhythm of Conidiation in *Neurospora*. *Plant Physiol.* **42**. 1504-1510.
- Schwerdtfeger C. y Linden H. (2003). VIVID is a flavoprotein and serves as a fungal blue light photoreceptor for photoadaptation. *EMBO J.* **22**:4846–4855.
- Springer M. L. (1993). Genetic Control of Fungal Differentiation: The Three Sporulation Pathways of *Neurospora crassa*.. *BioEssays.* **15**: 365-374.
- Sterner D. E. y Berger S. L. (2000). Acetylation of histones and transcription-related factors. *Microbiology and Molecular Biology Reviews.* **64**: 435-439.
- Struhl K (1999). Fundamentally different logic of gene regulation in eukaryotes and prokaryotes. *Cell.* **98**:1–4.
- Jenuwein T. y C. Allis D. (2001). Translating the Histone Code *Science.* **293**:1074-1080.
- Thompson J, Gibson T, Plewniak F, Jeanmougin F. y Higgins D. (1997). The CLUSTAL\_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* **25**:4876-4882.
- Uresti Rivera E. (2007). Epigenética del sistema visual y del fenómeno de micoparasitismo en *Trichoderma atroviride*: Un análisis del gen ortólogo a GCN5. Tesis de maestría del Instituto Potosino de Ciencia y tecnología A. C. división de Biología Molecular.
- Wolffe A. P. y Hayes J. J. (1999). Chromatin disruption and modification. *Nucleic Acids Res.* **27**:711-20.

- 
- Wolffe A. P. y Matzke M. A. (1999) Epigenetics: regulation through repression. *Science*. 286: 481.
- Wu J, Grunstein M. (2000). 25 years after the nucleosome model: chromatin modifications. *Trends Biochem Sci*. **25**:619-623.
- Yang X. J. y Seto E. (2008). The Rpd3/ Hda1 family of lysine deacetylases: from bacteria and yeast to mice and men. *Nature*. **9**: 206-218.
- Zhang Y. y Reinberg D. (2001). Different covalent modifications of the core histone tails transcription regulation by histone methylation: interplay between. *Genes & Dev*. **15**: 2343-2360.
- Zhou C, Zhang L, Duan J, Miki B. y Wu K. (2005). Histone deacetylase19 is involved in jasmonic Acid and ethylene signaling of pathogen response in Arabidopsis. *The Plant Cell*. **17**: 1196-1204