

IPICYT

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

POSGRADO EN CIENCIAS APLICADAS

**Determinación de la función del Dominio LOV de
la proteína BLR-1 de *Trichoderma atroviride***

Tesis que presenta

Sandra Pérez Aguilar

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., Enero del 2007



IPICYT

Constancia de aprobación de la tesis

La tesis “**Determinación de la función del dominio LOV de la proteína BLR-1 de *Trichoderma atroviride***” presentada para obtener el Grado de de Maestro(a) en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por **Sandra Pérez Aguilar** y aprobada el **11 de 01 de 2007** por los suscritos, designados por el Colegio de Profesores de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Dr. J. Sergio Casas Flores
(Director de la tesis)

Dr. Gerardo Rafael Argüello Astorga
(Asesor de la tesis)

Dr. Alejandro de las Peñas Nava
(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. 188814 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 029 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 11 días del mes de enero del año 2007, se reunió a las 10:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

Dr. Gerardo Rafael Argüello Astorga	Presidente	IPICYT
Dr. Alejandro De las Peñas Nava	Secretario	IPICYT
Dr. J. Sergio Casas Flores	Sinodal	IPICYT

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

MAESTRA EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

sustentó la C.

Sandra Pérez Aguilar

sobre la Tesis intitulada:

Determinación de la Función del Dominio LOV de la Proteína BLR-1 de 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 11:50 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 11 días del mes enero de 2007.

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

Dr. Marcial Borjila Marin
Secretario Académico



Agradecimientos y Dedicatorias

A **Dios** Por permitirme realizar algo que pensaba muy complicado.

A mi familia: mi papá **Rafael**, por apoyarme en todos los aspectos al estar fuera de casa, a mi mami **Socorrito**, por dejarme abrir mis alas y disfrutar de esta experiencia conmigo, y a mi hermanita **Clau**, por no permitirme olvidar que sigo siendo hija de familia y que tengo mis responsabilidades para con ellos.

A mi asesor de tesis, **Dr. Sergio Casas Flores**, por empujarme a mejorarme cada vez mas, como persona y como profesionista.

A mis coasesores: **Dr. Gerardo Argüello** y **Dr. Alejandro de las Peñas**, pues gracias a ellos mi tesis maduró y aprendí mas sobre como debe escribirse un trabajo científico.

Al **Dr. John S. Parkinson** por las cepas wt, *aer*⁺ y *aer*⁻ de *E. coli* para los experimentos de aerotaxis y al **Dr. Alejandro de las Peñas** y a la **Dra. Irene Castaño** por proporcionarnos diversas cepas necesarias para la realización de nuestros experimentos.

Al **Dr. Ángel Alpuche** y al **Laboratorio de Biología Molecular de Plantas** y a sus integrantes: **Salvador, Verito, Rosi, Ruth, Luzi, Dra. Viky, Omar, Elvira, Armando, Pablito, Ponchito, Silvia, Aurora**.

Al **Dr. Rogelio Sotelo** y a la **M. C. Karina García** del Laboratorio de Biología Molecular de Organismos Acuáticos del CIAD, Hillo., Sonora. También a **Marthita, Carmen** y **Aldo**; y a todos los compañeros de trabajo de dicho laboratorio.

A mi equipo de trabajo: **Zayrita, Marcelita, Edith, Aída, Memo, Miguel Ángel y Miguel Ángel y Verito**, realmente me encantó trabajar con ustedes Hermanitosiiiiiii.

A mis amigos: **Candy y Josh, May y Alex, Berna, Yadis y Jacinto, Eli y Claudita**.

A dos personas con las que pase cosas muy fuertes: **Lalo y Xavier**.

A tres amigas maravillosas: a mi amiguita **Isabelita**, a mi amiguita **Franny**, y a mi amiguita (y compañera de depa) **Claire**.

A **Doña Coco** y a sus hijas, especialmente a "**Bola**", por aceptar mis visitas.

A dos personas que son mi hada mágica y bruja salada **Saraí** y mi ángel de la guarda **Gilberto**.

Contenido

Constancia de aprobación de la tesis	ii
Créditos institucionales	iii
Acta de examen	iv
Agradecimientos y Dedicatorias	v
Lista de tablas	vii
Lista de figuras	viii
Resumen	ix
Introducción	1
La Luz	1
Receptores de luz	4
Algunas funciones descritas para fotorreceptores	5
Respuestas a la luz en hongos: <i>Phycomyces</i>	6
La luz azul como señal	7
Los dominios PAS y su función como sensores de señales intra y extracelulares	8
Los dominios LOV y la detección de la señal	12
La Cisteína conservada: su papel en los receptores de luz azul en plantas	13
<i>Neurospora crassa</i> como modelo de la percepción de la luz azul	15
Las proteínas BLR-1 y BLR-2 y las respuestas a luz azul en <i>Trichoderma atroviride</i>	22
<i>Escherichia coli</i> y el fenómeno de Aerotaxis	29
Justificación	34
Hipótesis	36
Objetivos	37
Materiales y Métodos	38
Cepas y Condiciones de Cultivo	38
Extracción y manipulación de Ácidos Nucléicos	41
Amplificación de los diferentes fragmentos de los genes que codifican para las proteínas BLR-1 de <i>T. atroviride</i> y Aer de <i>E. coli</i>	41
Obtención de las diferentes construcciones de BLR-1 y Aer	43
Ensayos de aerotaxis para <i>E. coli</i> en platos semisólidos (Swarm Plates)	44
Ensayos de sobreexpresión de las proteínas BLR-1 y BLR-1 mutante (CxA)	45
Ensayos espectrofotométricos a diferentes Longitudes de Onda	50
Resultados	51
Construcciones en los diferentes vectores	51
Ensayos de Complementación de Función del fenotipo de aerotaxis en <i>E. coli</i> con las diferentes construcciones generadas	54
Ensayos de Sobreproducción y Purificación de BLR-1 y BLR-1 CxA	57
Ensayos de Espectrofotometría (Absorbancia) en condiciones de Luz y Oscuridad	59
Discusión	62
Ensayos de complementación del fenotipo de Aerotaxis en <i>Escherichia coli</i>	62
El papel del dominio LOV y de la Cisteína conservada durante la percepción de la luz azul en <i>T. atroviride</i>	68
Conclusiones	72
Bibliografía	73

Lista de tablas

1. Diversos organismos en donde se han identificado dominios PAS	10
2. Respuesta de Aerotaxis de <i>E. coli</i> en diferentes sustratos	31
3. Cepas, vectores y construcciones usadas para los diferentes ensayos	39
4. Fragmentos necesarios para las construcciones	41
5. Mezcla de reacción general para los PCRs	43
6. Programa general para las reacciones de PCR	43
7. Mezcla de reacción general para las ligaciones entre los diferentes fragmentos	43
8. Mezcla de componentes para la fase separadora para geles de poliacrilamida al 12%	47
9. Mezcla de componentes para la fase concentradora de geles de poliacrilamida al 12%	47

Lista de figuras

1. Espectro de la radiación solar	2
2. Algunos ejemplos de flavinas	3
3. Espectro de acción de las flavinas	7
4. Esquema que representa la estructura de un dominio PAS	9
5. Estructuras tridimensionales de centros de tres dominios PAS: PYP, FixL y LOV2	9
6. Esquema del fotociclo de la fototropina	15
7. Respuestas a luz azul en <i>Neurospora crassa</i>	18
8. Estructura de las proteínas WC-1 y WC-2	19
9. Modelo propuesto para la función del complejo WC	21
10. <i>Trichoderma atroviride</i> como agente de biocontrol	22
11. Conidiación producida por luz en <i>T. atroviride</i>	24
12. Estructura de las proteínas BLR-1 y BLR-2	25
13. Alineamientos entre diferentes dominios LOV	26
14. Conidiación y expresión de <i>phr-1</i> de las cepas WT, $\Delta blr-1$ y $\Delta blr-2$ en condiciones de luz y oscuridad	27
15. Estructura de la proteína Aer	30
16. Respuesta de Aerotaxis de <i>E. coli</i> en diferentes sustratos	31
17. Centro del dominio PAS de la proteína Aer de <i>E. coli</i>	33
18. Diagrama general del proceso de purificación de proteínas utilizado durante este trabajo	46
19. Muestra la comparación de la secuencia de nucleótidos y aminoácidos para verificar la mutación	52
20. Genes <i>aer</i> y <i>blr-1</i> (cDNA) en pET32a	53
21. Genes <i>aer</i> y <i>blr-1</i> (cDNA) en pTRC99A	53
22. Construcciones de BLR-1 silvestre y mutante, en pET24a	53
23. Construcciones obtenidas	54
24. Ensayo de aerotaxis en Swarm Plates	55
25. Ensayo de complementación del fenotipo de aerotaxis	56
26. Cromatograma de la purificación de la proteína silvestre	57
27. Cromatograma de la purificación de la proteína mutante	58
28. SDS-PAGE	58
29. BLR-1 y BLR-1 CxA en condiciones de luz y oscuridad	59
30. Comparación de BLR-1 y BLR-1 CxA, proteínas puras y extractos crudos, en condiciones de luz	61
31. Modelo propuesto para las respuestas a la luz azul en <i>T. atroviride</i>	71

Resumen

La luz azul regula varios procesos fisiológicos y del desarrollo en los hongos. En *Trichoderma atroviride* el complejo formado por las proteínas BLR-1 y BLR-2 parece jugar un papel esencial como receptor de luz y como factor transcripcional durante la fotoconidiación. Se ha demostrado recientemente que el complejo BLR es necesario para la inducción de la conidiación por limitación de carbono, aún en ausencia de la luz, indicando la posible existencia de una comunicación cruzada entre la vía de señalización de la luz y la detección de carbono. Las proteínas BLR-1 y BLR-2 de *T. atroviride* contienen dominios PAS/LOV, y es posible que funcionen como detectores del estado redox de la célula. Un desbalance en el estado redox podría ser una señal detectada por éstos dominios, provocando un cambio conformacional y como consecuencia, esto conlleva a la esporulación. En los seres vivos existen varios procesos que involucran proteínas con dominios PAS, entre ellos se encuentra el fenómeno de aerotaxis; en dicho proceso, las bacterias migran hacia las concentraciones más adecuadas de oxígeno. En *Escherichia coli* la proteína Aer es la responsable de monitorear estas concentraciones de oxígeno; esta proteína presenta un dominio PAS y un dominio tsr. Aer ha sido postulada como la molécula responsable de monitorear el estado energético intracelular en *E. coli*. A fin de determinar si el dominio LOV de BLR-1 funciona monitoreando el estado redox intracelular, decidimos examinar la capacidad del mismo para complementar la función de aerotaxis en *E. coli*. Para esto se realizó un intercambio de dominios entre Aer y BLR-1 y los genes quiméricos resultantes se clonaron en el vector de expresión pTRC99a. Con estas construcciones se transformó una cepa Δaer y se realizaron ensayos de aerotaxis en agar semisólido con succinato. La bacteria transformada con la quimera Aer:LOV no presentó desplazamiento, a diferencia de la cepa silvestre. Aunado a este resultado, el gen *blr-1* tampoco complementó el fenotipo de aerotaxis. Estos ensayos preliminares sugieren que el dominio LOV de BLR-1 no es funcionalmente análogo al dominio PAS de Aer. El dominio LOV de BLR-1 tiene en su estructura un residuo de cisteína conservado en fotorreceptores de plantas; mutantes en este residuo son incapaces de percibir el estímulo luminoso. El análisis espectrofotométrico de las proteínas BLR-1 silvestre (pET24a_*blr-1*) y mutante (pET24a_*blr-1* CxA) indica que la proteína BLR-1 mutante tampoco responde al estímulo luminoso, lo cual sugiere que el dominio LOV, y por ende el residuo de cisteína, podrían jugar un papel importante durante la percepción de la señal luminosa.

PALABRAS CLAVE. Luz azul, dominios PAS/LOV, Aer, BLR-1, Cisteína conservada.

INTRODUCCIÓN

La Luz.

Los seres vivos detectan y responden a los cambios en las condiciones de su entorno, y para ello se valen de diversos y complejos mecanismos, los cuales transforman el estímulo recibido en señales que provocan cambios bioquímicos y fisiológicos en la célula (Briggs y Huala, 1999). A lo largo de la evolución, la vida en la tierra ha estado expuesta a radiaciones electromagnéticas internas y externas; y de entre las más importantes, se encuentran las provenientes del Sol. En el Sol se desarrollan reacciones de fusión termonuclear, liberándose grandes cantidades de energía que se encuentra en forma de radiación electromagnética, a la que se le conoce como luz (Ríos-Momberg, 2004).

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” (Ríos-Momberg, 2004).

La luz puede usarse como fuente de energía y como fuente de información; el uso depende de la interacción que tenga con los sistemas electrónico/moleculares. Toda materia con carga eléctrica puede tomar energía de un campo eléctrico; esto es lo que hacen los electrones de átomos y moléculas al interactuar con la luz, pues un electrón puede pasar de un estado basal a uno excitado, absorbiendo la energía de su entorno y liberándola al regresar al estado basal (Ríos-Momberg, 2004).

La energía que un electrón puede obtener de la luz, para la transición de un estado a otro, es una cantidad discreta o “cuanto”, a la que se le denomina: “fotón”. La energía disipada cuando un electrón regresa a su estado basal, puede tomar diferentes caminos: puede disiparse térmicamente (calor), disiparse otra vez como luz (fluorescencia), ó puede iniciar reacciones fotoquímicas; es mediante este proceso como se disparan las respuestas fisiológicas en organismos fotosensibles (Ríos-Momberg, 2004).

Las emisiones solares caen en un amplio rango de longitudes de onda. Las de menor energía y mayor longitud de onda concuerdan con la energía necesaria para las vibraciones de enlaces moleculares, y al ser absorbida se transforma en calor; a estas emisiones se les coloca en el rango de “infra-rojo” (Figura 1). 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; éstas caen en el rango de “ultra-violeta” (Figura 1).

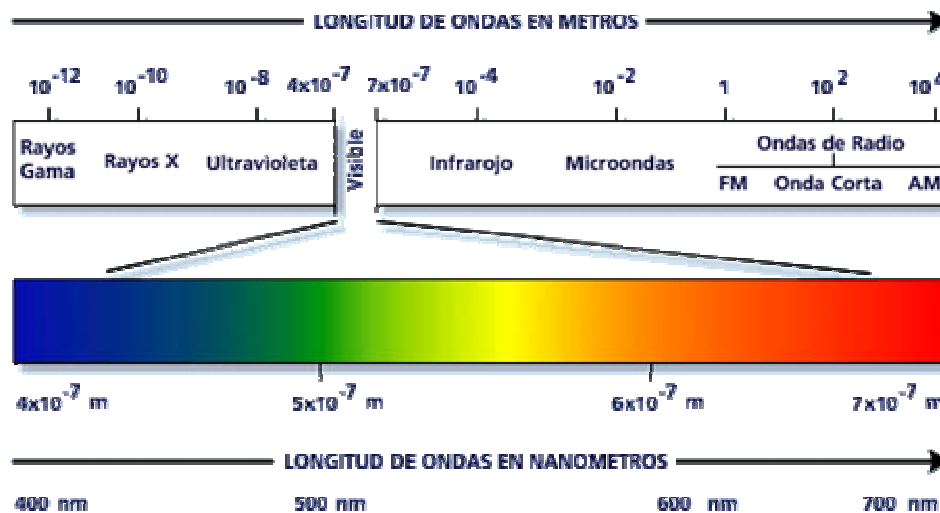


Figura 1. Espectro de la radiación solar. Tomado de: www.puc.cl/sw_educ/qda1106/CAP2/2B/2B1/index.htm

Las reacciones mediante las que se realiza el metabolismo, son reacciones de óxido-reducción, es decir, reacciones que involucran la transferencia de electrones de una molécula donadora a una molécula aceptora. El aceptor terminal para pares de electrones removidos de metabolitos por su oxidación, es el oxígeno molecular (O_2). El oxígeno molecular solo puede aceptar electrones de uno en uno, lo cual se realiza vía el sistema de transporte de electrones. Para la transferencia de los electrones, es necesario el uso de moléculas conjugadas que tienen un estado de oxidación de radical estable y que pueden realizar reacciones de traspaso de uno o de dos electrones; un ejemplo de este tipo de moléculas son las flavinas (Figura 2) (Voet y Voet, 1994).

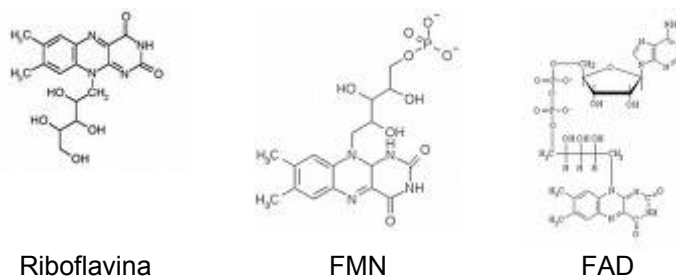


Figura 2. Algunos ejemplos de flavinas. La figura muestra la estructura de las tres flavinas más conocidas. Tomadas de: www.gwu.edu/~mpb/c/fad.gif, www.steve.gb.com/science/molecules.html y it.wikipedia.org/wiki/Riboflavina

La energía absorbida por las flavinas cae en el rango UV cercano/azul. Los metabolitos parcialmente reducidos y altamente reactivos, pueden formarse durante las reacciones de transferencia de electrones, como aquellas en las que interviene la luz; algunos de estos metabolitos incluyen el anión superóxido (O_2^-) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), los cuales se forman debido a que el oxígeno pierde uno ó dos electrones, respectivamente. En presencia de iones de metales de transición, puede formarse el radical hidroxilo (OH) que es más reactivo. Éstos metabolitos parcialmente reducidos, se conocen como especies reactivas de oxígeno (ROS) y son considerados como sub-productos tóxicos del metabolismo; éstas moléculas pueden causar daño a lípidos, proteínas y ADN (Thannical y Fanburg, 2000). Cuando esta situación se presenta, la célula sintetiza toda una batería de enzimas destinadas a controlar a las ROS, ejemplos de estas enzimas son las catalasas, las superóxido dismutasas, las peroxidasas, etc.; además se sintetizan proteínas de reparación como las fotoliasas, que son las encargadas de revertir el daño al ADN causado por la luz UV y péptidos pequeños como glutatín y tioredoxina que soportan cambios redox generados por las ROS (Lledias y Hansberg, 2000).

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 una señal que permite preparar anticipadamente la respuesta; a éste fenómeno se le denomina “reloj circadiano” ó “ritmo circadiano”, y se ha observado que se conserva aún en condiciones artificiales (Ouyang *et al.*, 1998).

El ritmo circadiano se encuentra encarrilado, esto significa que al amanecer la luz acelera el reloj, al medio día la luz casi no tiene efecto sobre el, y al atardecer la luz hace mas lento el reloj; este encarrilamiento permite al organismo preparar las respuestas dependiendo de la cantidad y calidad de luz que recibirá. En la gran mayoría de los organismos que se han estudiado en cuanto a este aspecto, se ha encontrado una estrecha relación entre la luz y el ritmo circadiano; los receptores encargados de la detección de la luz, suelen ser también los encargados de la regulación del ritmo circadiano (Dunlap y Loros, 2004).

Receptores de luz.

Cuando hablamos de fotorreceptores generalmente se trata de complejos proteína/cofactor (proteína/cromóforo) y se han identificado en bacterias, arqueobacterias y eucariotes. Las plantas en particular tienen una compleja red para la percepción de la luz y la trasducción de las señales que permiten detectarla y responder a los cambios de ésta; algunos de los cambios que se detectan son: intensidad, dirección, duración y calidad de la luz. Las plantas emplean al menos tres tipos de fotorreceptores: los criptocromos, las fototropinas (que detectan la región UV cercana/azul del espectro) y los fitocromos (que detectan en la región de luz roja/roja lejana del espectro) (Frohlich *et al.*, 2005).

Estudios en sistemas eucarióticos han permitido identificar varios tipos de fotorreceptores para luz azul, los cuales son proteínas unidas a flavinas: los criptocromos, que son similares a las fotoliasas, usan FAD como cofactor, y funcionan como fotorreceptores de luz azul para relojes circadianos y otras respuestas asociadas en insectos; y recientemente se ha identificado a una adenilato ciclasa que une FAD, como el fotorreceptor de luz azul responsable de las respuestas de “fototaxis” en *Euglena gracilis* (Cheng *et al.*, 2003).

Las fototropinas de plantas son cinasas de proteínas reguladas por la luz, median el fototropismo y otros procesos; éstas contienen dos dominios LOV en el extremo carboxilo terminal de su dominio de serina/treonina. Análisis bioquímicos de los dominios LOV de las fototropinas mostraron que cada dominio LOV une de forma

no covalente una molécula de FMN, la cual realiza un fotociclo totalmente reversible (Cheng *et al.*, 2003).

En la estructura del dominio LOV2 de la fototropina de *Adiantum* (PHY3) se identificaron once residuos que se encuentran en contacto con la molécula de FMN que actúa como cofactor; y ahora se sabe que el mecanismo para la detección de la luz en las fototropinas es mediado por la formación de un enlace covalente (aducto) entre el carbono cuatro (C4) de la flavina y un residuo de cisteína en el dominio LOV (Cheng *et al.*, 2003).

Algunas funciones de los fotorreceptores.

La luz en el rango UV cercano/azul regula una gran variedad de respuestas en plantas superiores; éstas incluyen el fototropismo, la inhibición de la elongación del hipocotilo, la expresión de varios genes, la abertura de los estomas, la relocalización de los cloroplastos. Phot1 (*nph1*) el fotorreceptor de luz azul de plantas, es miembro de la familia de receptores tipo fototropina. Phot1 es una flavoproteína asociada a la membrana plasmática que funciona como fotorreceptor primario mediando el movimiento fototrópico de la planta (Swartz *et al.*, 2001).

El fitocromo genérico (Phy) en plantas superiores es un homodímero soluble consistente de dos polipéptidos de aproximadamente 120 KDa, que portan una bilina (o un tetrapirrol lineal) como cromóforo. La bilina se une covalentemente por un mecanismo autocatalítico a un sitio amino terminal que, una vez ensamblado, sirve como módulo sensor; mediante la interacción entre la bilina y la apoproteína, el fitocromo experimenta una conversión fotoinducida entre dos conformaciones estables: una forma Pr absorbente en luz roja, que es biológicamente inactiva, y una Pfr absorbente en roja lejana que es biológicamente activa; mediante ésta interconversión los fitocromos actúan como “switches” reversibles en la fotopercepción (Frohlich *et al.*, 2005).

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. Se sabe que algunos fitocromos

pueden emplear la conformación Pr como forma activa o de forma invertida, usando Pfr y no Pr como el estado general. 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 pigmentos (Frohlich *et al.*, 2005).

Respuestas a la luz en hongos.

Phycomyces.

En el hongo zygomyceto *Phycomyces blakesleeanus*, se pueden observar comportamientos complejos guiados por los mismos sentidos que poseen los humanos, a excepción de la audición. Este organismo puede percibir y detectar cantidad y calidad de luz (Cerdá-Olmedo, 2001).

En *Phycomyces* ya se han descrito, en gran detalle, las propiedades de las respuestas a la luz y se tienen los primeros mapeos genéticos de vías de trasducción de señales. Sin embargo, en cuanto a la caracterización de las respuestas, se han tenido algunas dificultades desde los primeros pasos de la vía de fotorecepción (Cerdá-Olmedo, 2001).

Para dilucidar la identidad de un cromóforo, presumiblemente unido a una proteína, lo primero que se hace es un espectro de acción, que consiste en el gráfico de la efectividad relativa de diferentes longitudes de onda para provocar una respuesta fisiológica particular. Para dos de las respuestas de *Phycomyces* los espectros son idénticos, inducidos posiblemente por el mismo receptor. Las longitudes de onda efectivas son exclusivamente las que corresponden al UV cercano y al azul. La forma de la gráfica es similar a la de los espectros de absorción en solución acuosa de las flavinas y de algunos carotenos. Esto es consistente ya que en *Phycomyces* se ha mostrado que el cromóforo es una flavina (Cerdá-Olmedo, 2001).

De entre las respuestas que se han descrito para éste zygomyceto se encuentran el fototropismo (orientación hacia la fuente luminosa), mecismo (movimiento), favorecimiento de la macroforogénesis (formación de estructuras de reproducción asexual) y carotenogénesis (síntesis de β -carotenos) (Cerdá-Olmedo, 2001).

La luz azul como señal.

Se ha establecido claramente la relación entre la percepción de la luz y los cromóforos celulares y que la mayoría de estos cromóforos son flavinas. En toda célula existen muchos tipos de flavoproteínas y flavinas libres que absorben fuertemente a 420 nm (banda en el rango UV cercano/azul) (figura 3) y además se han realizado estudios sobre el uso informacional de la luz por parte de las plantas, a diferencia del uso que hacen de esta como fuente de energía. En modalidad informacional, las respuestas a la luz son mayores en número y más complejas, y se pueden describir como inteligentes. Por ejemplo, muchas plantas detectan si están creciendo a la sombra de otra y orientan su crecimiento de modo que encuentran un claro donde reciben directamente la luz del sol. En cuanto a los efectos que la luz azul tiene sobre las plantas, en su gran mayoría tienen que ver con el movimiento (Franklin *et al.*,2003).

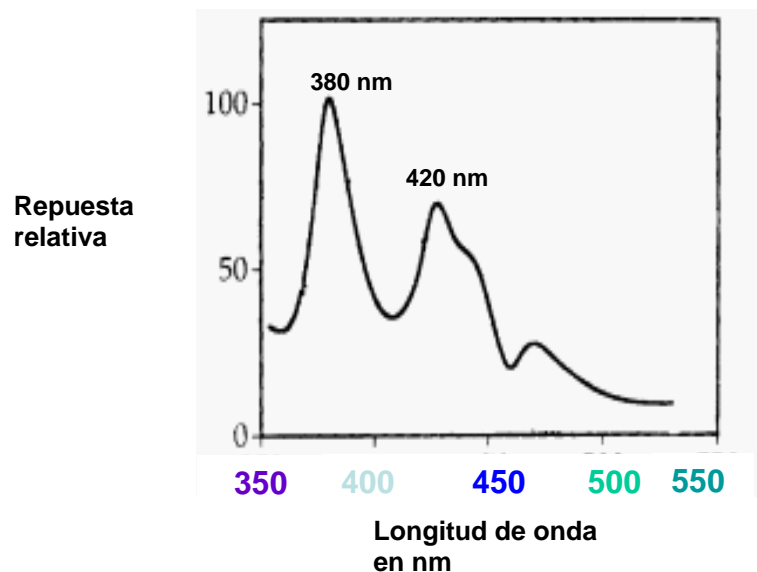


Figura 3. Espectro de acción de las flavinas (Kumagai y Oda, 1969). En la figura se observan los picos característicos de absorción por flavinas, uno en ~ 400 nm y otro en ~ 450 nm.

Es sorprendente la similitud de los espectros de acción para varias respuestas biológicas a la luz azul, como las de *Phycomyces*, el fototropismo en las plantas superiores, y de organismos tan diversos como bacterias, helechos y hongos. En resumen se puede afirmar, que para este rango del espectro, las respuestas son

disparadas por un fotorreceptor, una molécula unida a una flavina (Cerdá-Olmedo, 2001).

Los dominios PAS y su función como sensores de señales intra y extracelulares.

Los dominios PAS son importantes módulos de señalización que monitorean cambios en luz, potencial redox, oxígeno, pequeños ligandos y niveles de energía celular. A diferencia de muchos otros módulos sensores, los dominios PAS se localizan en el citoplasma (Taylor y Zhulin, 1998). El descubrimiento de la proteína Aer de *Escherichia coli* y el progreso en el análisis funcional de la proteína NifL de *Azotobacter vinelandii* han mostrado que dichas proteínas transductoras de señal tienen un dominio PAS, asociado a FAD como cofactor, y que detecta cambios redox en el sistema de transporte de electrones o el estado redox intracelular (Bibikov *et al.*, 1997; Hill *et al.*, 1996). Los dominios PAS pueden detectar factores ambientales que crucen la membrana celular y/o afecten el metabolismo celular, como el oxígeno, luz, potencial redox o fuerza protón-motriz como una vía para monitorear cambios de energía en las células (Taylor y Zhulin, 1998).

Se han identificado dominios PAS en proteínas desde bacterias hasta eucariotes. Éstas proteínas incluyen cinasas de histidina o serina/treonina, quimiorreceptores y fotorreceptores para la taxis y el tropismo, proteínas de ciclo circadiano, canales iónicos activados por voltaje, fosfodiesterasas de nucleótidos cíclicos y reguladores de respuesta a hipoxia y a desarrollo embrionario del sistema nervioso central. Los dominios PAS se conjugan con una gran variedad de módulos regulatorios en proteínas multidominio. Como resultado, una gran mayoría de respuestas celulares a los cambios en el medio ambiente y a las condiciones intracelulares, son controlados vía receptores, transductores y reguladores que contienen dominios PAS. Se han identificado dominios PAS en mas de 200 proteínas de diferentes organismos (Taylor y Zhulin, 1998).

PAS es un acrónimo formado por los nombres de las proteínas en donde por primera vez fue reconocida una secuencia repetida imperfecta: **P**ER, la proteína de periodo de ciclo circadiano de *Drosophila*, **A**RNT, el traslocador de receptores nucleares de aril-hidrocarbonos en vertebrados y **S**IM, la proteína “single-minded” de

Drosophila. Los estudios sugieren que los dominios PAS comprenden una región de aproximadamente 100 a 120 aminoácidos (figuras 4 y 5). Es frecuente encontrar dominios PAS en pares en activadores transcripcionales de eucariotes, mientras que en proteínas microbianas se pueden encontrar desde uno hasta más de seis (Nambu *et al.*, 1991).

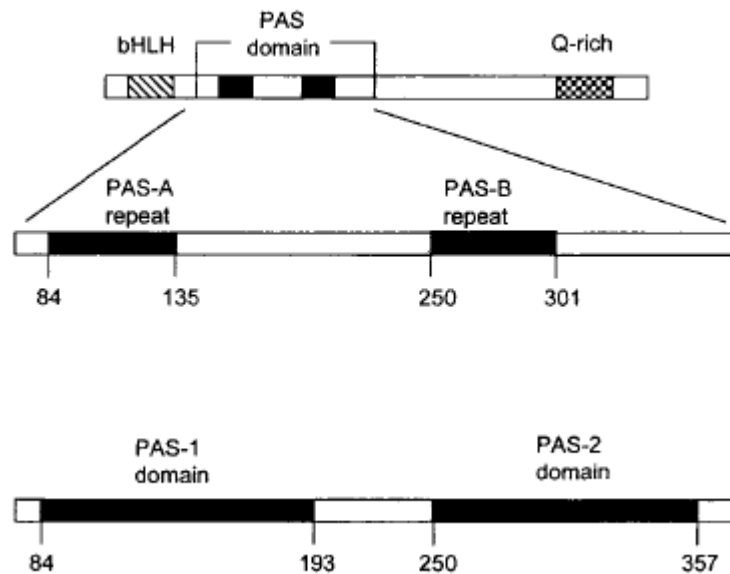


Figura 4. Esquema que muestra la primera representación de un dominio PAS, el de la proteína SIM de *Drosophila* (Taylor y Zhulin, 1998).

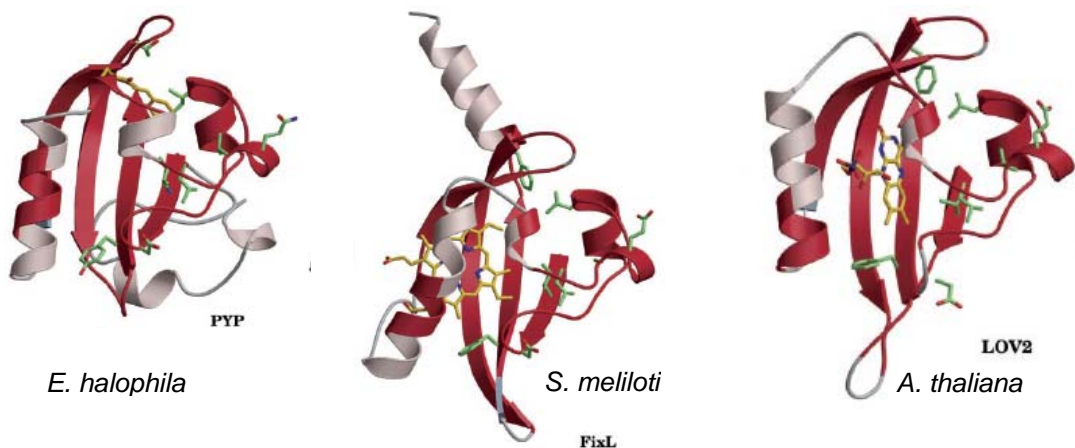


Figura 5. Estructuras tridimensionales de centros de tres dominios PAS: PYP, FixL y LOV2 (Vreede *et al.*, 2003). La figura muestra los core de tres dominios PAS: el de PYP de *Ectothiorhodospira halophila*, la primera proteína de la que se cristalizó la estructura de su dominio PAS; FixL de *Sinorhizobium meliloti* y LOV2 de *Arabidopsis thaliana*.

Los dominios PAS se encuentran de forma predominante en proteínas que están involucradas en transducción de señales. De las más de 200 proteínas en las que se han encontrado dominios PAS, se ha propuesto que la mayoría de ellas funcionan

como receptores, transductores de señales y factores transcripcionales (tabla 1) (Zhulin *et al.*, 1997).

Protein or open reading frame and species	Description	Accession no. ^a
Bacteria		
Proteobacteria		
α-Subdivision		
FixL (<i>Sinorhizobium meliloti</i>)	Sensor kinase, oxygen-dependent regulator of nitrogen fixation	P: S39984
EsxG (<i>Sinorhizobium meliloti</i>)	Sensor kinase controlling succinoglycan synthesis	GB: AJ225561
NtrY (<i>Azorhizobium caulinodans</i>)	Sensor kinase controlling nitrogen level	SP: Q04850
NwsA (<i>Bradyrhizobium japonicum</i>)	Sensor kinase controlling nodulation response	P: S39901
NodV (<i>Bradyrhizobium japonicum</i>)	Sensor kinase controlling nodulation response	SP: P15939
NtrB (<i>Azospirillum brasilense</i>)	Sensor kinase controlling nitrogen assimilation	P: I39493
PpsR (<i>Rhodobacter sphaeroides</i>)	Sensor kinase, redox-dependent regulator of photosynthesis	GB: L37197
DctS (<i>Rhodobacter capsulatus</i>)	Sensor kinase controlling dicarboxylate transport	SP: P37739
PleC (<i>Caulobacter crescentus</i>)	Sensor kinase controlling polar organelle development	P: S27533
McpA (<i>Agrobacterium tumefaciens</i>)	Chemotaxis transducer (?)	GB: AF010180
β-Subdivision		
TutC (<i>Thaueria</i> sp. strain T1)	Sensor kinase controlling toluene degradation	GB: U57900
BvgS (<i>Bordetella bronchiseptica</i>)	Sensor kinase controlling virulence	P: S17944
γ-Subdivision		
Aer (<i>Escherichia coli</i>)	Oxygen (redox) taxis transducer	SP: P50466
ArcB (<i>Escherichia coli</i>)	Sensor kinase, redox-dependent regulator of aerobic metabolism	SP: P22763
PhoR (<i>Escherichia coli</i>)	Sensor kinase controlling phosphate regulon	SP: P08400
ATOS (<i>Escherichia coli</i>)	Sensor kinase controlling ornithine decarboxylase antizyme	SP: Q06067
TodS (<i>Pseudomonas putida</i>)	Sensor kinase controlling toluene degradation	GB: U72354
StyS (<i>Pseudomonas</i> sp.)	Sensor kinase controlling styrene degradation	GB: AJ000330
NifL (<i>Azotobacter vinelandii</i>)	Sensor, redox-dependent regulator of nitrogen fixation	SP: P30663
δ-subdivision		
SdeK (<i>Myxococcus xanthus</i>)	Sensor kinase controlling fruiting-body development	GB: AF031084
DcrA (<i>Desulfovibrio vulgaris</i>)	Oxygen (redox) taxis transducer (?)	SP: P35841
Cyanobacteria		
RcaE (<i>Fremyella diplosiphon</i>)	Sensor kinase, phytochrome/ethylene receptor	GB: U59741
Sll1003 (<i>Synechocystis</i> sp.)	Sensor kinase (?)	GB: D90902
Slr1212 (<i>Synechocystis</i> sp.)	Sensor, ethylene response regulator (?)	GB: D90905
Low G+C Gram-positive bacteria		
KinA (<i>Bacillus subtilis</i>)	Sensor kinase controlling sporulation	SP: P16497
KinC (<i>Bacillus subtilis</i>)	Sensor kinase controlling sporulation	SP: P39764
Aquificales		
HksP2 (<i>Aquifex aeolicus</i>)	Sensor kinase (?)	GB: AE000683
Archaea		
Euryarchaeota		
Bat (<i>Halobacterium salinarum</i>)	Sensor, oxygen-dependent bacterio-opsin activator	SP: P13260
AF0277 (<i>Archaeoglobus fulgidis</i>)	Sensor kinase (?)	GB: AE001086
AF1034 (<i>Archaeoglobus fulgidis</i>)	Chemotaxis transducer (?)	GB: AE001032
MTH174 (<i>Methanobacterium thermoautotrophicum</i>)	Sensor kinase (?)	GB: AE000805
Eucarya		
Dictyosteliida		
DokA (<i>Dictyostelium discoideum</i>)	Sensor kinase controlling osmotic response	GB: X96869
Fungi		
Hemiascomycetes		
YB89 (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)	Transcriptional regulator (?)	SP: P38140
Euscomycetes		
Wc-1 (<i>Neurospora crassa</i>)	Transcriptional regulator of the blue-light response	GB: X94300
Wc-2 (<i>Neurospora crassa</i>)	Phototransducer, clock component	GB: Y09119
PBP (<i>Fusarium solani</i>)	Transcriptional regulator	P: A57506
Viridiplantae		
Charophyta		
Phy1b (<i>Mesotaenium caldariorum</i>)	Phytochrome phototransducer	GB: U31284
Phy (<i>Mougeotia scalaris</i>)	Phytochrome phototransducer	GB: X95550
Embryophyta		
PhyB ^b (<i>Arabidopsis thaliana</i>)	Phytochrome phototransducer	SP: P14713
NPH1 (<i>Arabidopsis thaliana</i>)	Sensor kinase controlling phototropism	GB: AF030864
Metazoa		
Nematoda		
T01D3.2. (<i>Caenorhabditis elegans</i>)	Single-minded protein (SIM) homolog	GB: Z81110
Insecta		
PER (<i>Drosophila melanogaster</i>)	Transcriptional regulator of circadian rhythms	SP: P07663
ARNT (<i>Drosophila melanogaster</i>)	Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator (ARNT)	GB: AF016053

Protein or open reading frame and species	Description	Accession no. ^a
SIM (<i>Drosophila melanogaster</i>)	Global transcriptional regulator	SP: P05709
EAG (<i>Drosophila melanogaster</i>)	Voltage-sensitive potassium channel subunit	SP: Q02280
Actinopterygii		
ARNT (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator (ARNT)	GB: U73840
Mammalia		
CLOCK (<i>Mus musculus</i>)	Transcriptional regulator of circadian rhythms	GB: AF000998
ARNT (<i>Mus musculus</i>)	Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator (ARNT)	GB: U61405
SIM1 (<i>Mus musculus</i>)	Single-minded protein (SIM) homolog	GB: U40575
m-EAG (<i>Mus musculus</i>)	Voltage-sensitive potassium channel subunit	GB: U04294
HIF-1 α (<i>Mus musculus</i>)	Hypoxia-inducible factor 1 α	GB: U59496
Humans		
ARNT (<i>Homo sapiens</i>)	Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator	GB: U61405
h-ERG (<i>Homo sapiens</i>)	Voltage-sensitive potassium channel subunit	GB: U04270
HIF-1 α (<i>Homo sapiens</i>)	Hypoxia-inducible factor 1 α	GB: U22431
HIF-2 β (<i>Homo sapiens</i>)	Hypoxia-inducible factor 2 α	GB: U51626

Tabla 1. Diversos organismos en donde se han identificado dominios PAS (Taylor y Zhulin, 1998).

En eubacterias y arqueobacterias, los dominios PAS se han encontrado exclusivamente en sensores de sistemas reguladores de dos componentes. En eucariotes se han identificado en proteínas de dos tipos generales: factores transcripcionales y canales iónicos sensibles a voltaje. En plantas se han identificado en cinasas de histidina o de serina/treonina. Factores transcripcionales que contienen dominios PAS se han encontrado en hongos y metazoarios (Ponting y Aravind, 1997). La adaptación de la estructura de los dominios PAS para detectar diversos estímulos como oxígeno, ligandos y potencial redox, está presente inclusive en los procariotes más simples. Además existe evidencia de que dominios PAS divergentes en una misma proteína pueden funcionar diferencialmente para detectar diferentes estímulos (Zelzer *et al.*, 1997).

En una vía de señalización típica, el receptor interactúa con el estímulo y traduce una señal que puede ser procesada por la célula. En algunas vías de señalización la señal del receptor es autotransducida a una forma diferente de energía por una segunda proteína, la segunda proteína es llamada transductor para distinguirla del receptor que detecta el estímulo inicial. Por ejemplo, PYP (*E. halophila*) es un receptor en el que la luz azul es capturada por el cromóforo 4-hidroxicinamil en el dominio PAS (Baca *et al.*, 1994), FixL (*S. meliloti*) es un receptor de oxígeno, en el que el oxígeno se une directamente a un grupo hemo que se coordina con un residuo de histidina del dominio PAS (Gilles-Gonzalez *et al.*, 1994; Monson *et al.*, 1995), Aer (*E. coli*) es un transductor que detecta oxígeno indirectamente al detectar cambios redox intracelulares (Rebbapragada *et al.*, 1997; Taylor y Zhulin, 1998).

La transducción de señales es dirigida mediante interacciones proteína-proteína, y la interacción generalmente se realiza por los dominios PAS. El centro del dominio

PAS puede determinar la especificidad de la interacción. Los dominios PAS permiten el aumento de la estabilidad y de la especificidad de los dímeros de proteínas, esto también aumenta la respuesta de unión a DNA cuando los dímeros actúan como factores transcripcionales (Huang *et al.*, 1993; Pongratz *et al.*, 1998). En PYP (*E. halophila*), la fotoactivación (respuesta a luz) y el acomodo resultante del cromóforo en el dominio PAS, induce un cambio conformacional que es transmitido a la superficie de la proteína y que altera el sitio de interacción proteína-cromóforo, activándola (Taylor y Zhulin, 1998).

Los dominios LOV y la detección de la señal.

La ventaja de la supervivencia celular por detectar oxígeno, luz, potencial redox y niveles de energía ha sido bien reconocida. El oxígeno actúa tanto como aceptor terminal de electrones para la fosforilación oxidativa, con un alto rendimiento de ATP, y como un agente tóxico que forma radicales libres altamente reactivos cuando esta parcialmente reducido. Los organismos han desarrollado mecanismos para vivir dentro de un rango específico de concentraciones de oxígeno (Bespelov *et al.*, 1996). La detección de la cantidad y la calidad de la luz dirige respuestas celulares como el fototropismo en plantas y la fototaxis en bacterias.

El tipo específico de dominio PAS que se encarga de la detección de las señales emitidas al detectar los estímulos de la luz, el oxígeno y el voltaje se les ha denominado dominios LOV (Light, Oxygen and Voltaje). Existe evidencia creciente de que el agotamiento de los niveles de energía celular se detecta primero como un decremento en el sistema de transporte de electrones y la fuerza protón-motriz que precede a un cambio notorio en la concentración de ATP. Monitorear el sistema de transporte de electrones o la fuerza protón-motriz puede alertar rápidamente a la célula sobre la pérdida de energía. Los efectos metabólicos del oxígeno, la luz, la fuerza protón-motriz y el potencial redox están relacionados con el nivel en el flujo de equivalentes reducidos a través del sistema de transporte de electrones. Esto permite a la célula, que detectando cualquiera de estos parámetros, pueda detectar los niveles de energía celular. La detección directa del oxígeno puede ser ventajosa en células que tienen reacciones enzimáticas que se inactivan por oxígeno. Detectar la fuerza protón-

motriz o el potencial redox puede proveer una forma mas versátil de medir la energía celular (Taylor y Zhulin, 1998).

La Cisteína conservada: su papel en los receptores de luz azul en plantas.

La fototropina 1 (Phot1) de la avena tiene dentro de su región amino terminal dos dominios de 12.1 KDa que unen flavinas, LOV1 y LOV2, y un dominio típico de cinasa de serina/treonina en la región carboxilo terminal (Christie *et al.*, 1999). Estudios de expresión heterólogos muestran que Phot1 une FMN como cromóforo y realiza autofosforilación en respuesta al tratamiento con luz. El dominio LOV de Phot1 aislado, y luego expresado en *E. coli*, muestra una fotoreacción cíclica sobre la absorción de la luz; LOV1 se recupera del ciclo en 11.5 segundos, mientras que LOV2 lo hace en 27 segundos. Las formas generales de los dominios LOV muestran los mayores picos de absorción a 360 y 450 nm, pero cuando absorben luz, el patrón de absorbancia cambia, presentándose especies que absorben de forma máxima a los 390 nm. Éste intermediario ha sido señalado como el aducto flavina-cisteína entre la proteína y el carbono (C4) del cromóforo (FMN), este aducto se rompe de manera espontánea y la proteína vuelve a su forma (estado) general (Salomón *et al.*, 2000). La estructura indica que la molécula de FMN esta interactuando de forma no covalente, el lugar corresponde al azufre de la cisteína 39 a aproximadamente 4.2 Å del C4a del FMN (Swartz *et al.*, 2001).

Al realizar un análisis cinético global de LOV2 se observó un pico alrededor de los 420 nm para la transición de un estado a otro, lo cual es consistente con la presencia de un sistema de dos estados; esto implica que el primer estado de absorción de luz de LOV (LOV^L_{660}) cae a un estado intermediario (LOV^S_{390}) y regresa al estado general (LOV^D_{447}) simultáneamente:



Lo anterior indica que alrededor del 50% de LOV^L_{660} regresa al estado general LOV^D_{447} y el otro 50% cae en LOV^S_{390} (Swartz *et al.*, 2001).

Se ha interpretado que este cambio en la fluorescencia refleja la protonación de tiolato de la cisteína 39 (Cys³⁹) con un pK aparentemente menor a cuatro. Éste bajo pK explica por que no se observaron perturbaciones en la fluorescencia en el rango de pH de 4 – 9 y sugiere que la Cys³⁹ está ionizada (S⁻) en LOV2 bajo condiciones fisiológicas (Swartz *et al.*, 2001).

Los datos sugieren que el estado general de LOV2 es la Cys³⁹ en forma de tiolato; un tiolato puede ser estabilizado por interacciones directas como formación de pares iónicos con un grupo donador/aceptor de protones, puentes de hidrógeno, y complejos de transferencia de cargas (hacia la flavina) y/o por estabilización indirecta como interacciones hélice/dipolo. La formación de pares de carga por una transferencia parcial o total de protones, con o sin involucrar las interacciones por puentes de hidrógeno, del tiol a los grupos vecinos parece ser la opción más plausible (Kortemme y Creighton, 1995).

Basado en lo anterior, se propone que el intermediario LOV^S₃₉₀ involucra la formación de un enlace covalente entre el LOV2 y el FMN (figura 6). El hecho de que el estado general del pigmento sea el que contiene la Cys³⁹ ionizada, se postula la existencia de un grupo donador/aceptor de protones en la proteína, el cual participa activamente en el mecanismo de reacción. El protón sostenido por este grupo es donado a la flavina N5 durante la formación del aducto entre C4a – tiol. Éste enlace tardío es probablemente formado por ataque nucleofílico del azufre (sulfido) de la Cys³⁹ al C4a del FMN. Esta reacción puede estar fuertemente favorecida por una redistribución de cargas en el doble enlace N5 – C4a en estado de triplete polarizado, en éste proceso el carbono adquiere una carga parcialmente positiva y el nitrógeno una parcialmente negativa incrementando significativamente el pK del N5 (Song, 1968).

El incremento en la basicidad causa que el N5 sea protonado por un grupo donador de protones en la proteína, y con la protonación del N5, el doble enlace N5 – C4a se vuelve enlace sencillo cargando un C4a carbocatión altamente reactivo que experimenta el ataque por el azufre (sulfide) de la cisteína resultando en la formación del intermediario de vida larga LOV^S₃₉₀. El aducto contiene un centro quiral asimétrico (C4a) que puede ser el responsable del gran cambio observado en el dicroísmo

circular, inducido por luz. Por lo tanto, la reacción de transferencia de protón inicia el proceso (Swartz *et al.*, 2001).

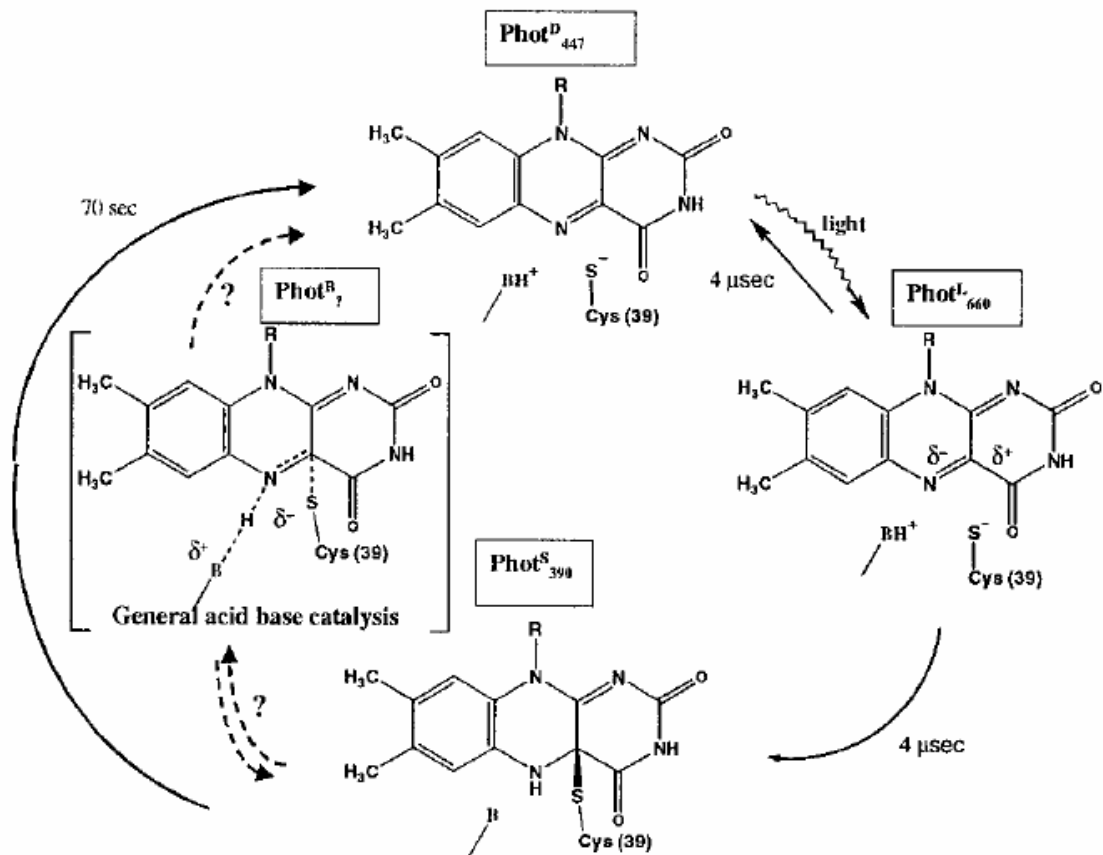


Figura 6. Esquema del fotociclo de la fototropina (Swartz *et al.*, 2001). En la figura se puede observar el esquema propuesto para que se lleve a cabo el fotociclo en las fototropinas

***Neurospora crassa* como modelo de la percepción de la luz azul.**

El ascomiceto *Neurospora crassa* “moho naranja del pan”, es un hongo que responde de muchas maneras a la luz azul. Su pigmentación se debe a que sintetiza grandes cantidades de β-caroteno en las esporas asexuales (conidias) y en las hifas de micelio (Linden *et al.*, 1997). Todas sus respuestas a la luz caen en el rango UV/azul y éstas incluyen: la inducción de síntesis de carotenos, la inducción de los protoperitecios, el fototropismo de los sacos periteciales, la inducción del crecimiento del micelio y la formación de esporas asexuales, cambios en el potencial de membrana, inducción de la expresión génica y modificación protéica, y el encarrilamiento del ciclo circadiano (Lauter, 1996).

El mejor avance para el entendimiento de los mecanismos de señalización disparados por luz en organismos fúngicos, se realizó tras la identificación de dos proteínas “White Collar (WC)”, WC-1 y WC-2, como componentes clave de las respuestas a luz en *Neurospora*. Además, recientemente WC-1 se identificó como el fotorreceptor para ritmo circadiano y otras respuestas a luz en *Neurospora* (Linden y Macino, 1997; Frohlich *et al.*, 2002).

Muchas de las respuestas a la luz azul en *Neurospora* son el resultado de la transcripción de genes involucrados en diferentes procesos fisiológicos, por ejemplo, la biosíntesis de carotenos es consecuencia de la transcripción de los genes albino (*al-1*, *al-2* y *al-3*) (Schmidhauser *et al.*, 1994) (figura 7). La estimulación de la conidiación es de la inducción de los genes *con* (Corrochano *et al.*, 1995; Lauter y Russo, 1991). Uno de los genes inducidos por luz mas estudiados en *Neurospora* es *frq*. En constante oscuridad, los niveles de *frq* y de la proteína FRQ oscilan diariamente, y la regulación por luz de *frq* es la base molecular para el reseteo del ciclo circadiano (Liu *et al.*, 2003).

Métodos tradicionales y análisis de microarreglos de cDNA revelaron que la transcripción de mas de 30 genes en *Neurospora* es inducida por luz (Lewis *et al.*, 2002). Estos genes inducidos por luz pueden agruparse en dos clases: genes de respuesta temprana (inmediata) y genes de respuesta tardía. Para los genes de respuesta inmediata, la inducción de la transcripción se observa cinco minutos después de un pulso de luz y alcanza su pico después de 15-30 min. Ejemplos conocidos de genes de respuesta inmediata son *frq* (ritmo circadiano), *al* (síntesis de carotenos), *con-6* y *con-10* (ambos involucrados en conidiación), los genes *bli* y varios genes *clock-controlled* (ritmo circadiano) (figura 7). La inducción inmediata por luz de estos genes sugiere que son blanco directo en la vía de entrada de luz en *Neurospora* y pueden mostrar elementos de respuesta a luz que actúan en cis, en la zona promotora (Carattoli *et al.*, 1994).

Para los genes de respuesta tardía, como *ccg-1* y *ccg-2* (*clock-controlled*), la inducción de la transcripción se observa hasta pasados 15 minutos a partir del pulso de luz y alcanza su pico 1-2 horas después (figura 7). La regulación de estos genes

parece ser el resultado de la inducción de los genes de respuesta temprana (Arpaia *et al.*, 1995).

Se sabe que la luz azul además puede inducir fosforilación postraduccional en muchas proteínas, incluidas WC-1 y la nucleósido difosfato cinasa (NDK)-1. Estos eventos de fosforilación son rápidos (aproximadamente 15 min después del pulso de luz) y muestran cinéticas similares a aquellas de los genes de respuesta temprana. La luz puede además inducir cambios en el potencial de la membrana provocando transporte de iones, dentro de los primeros minutos del tratamiento, y cambios de conductancia en la membrana en los primeros segundos de exposición a luz. Éstas respuestas a luz que no dependen de la transcripción, sugieren que pueden tener mecanismos de señalización diferentes de los de eventos transcripcionales inducidos por luz (Liu *et al.*, 2003).

Después de la inducción máxima por luz de los genes de respuesta inmediata como *al-1*, *al-2*, *al-3* y los genes *con*, los niveles de RNA disminuyen rápidamente y se vuelven apenas detectables después de dos horas en luz constante. Éste fenómeno de fotoadaptación se observa también en la hiperfosforilación inducida por luz de WC-1. *Neurospora* tiene la habilidad de detectar cambios en la intensidad de la luz, por ejemplo, cuando cultivos de *Neurospora* son cambiados de una baja intensidad de luz a una alta, se observa una segunda inducción (Liu *et al.*, 2003).

Mutantes de *wc-1* y *wc-2* se aislaron inicialmente como mutantes por deficiencia en síntesis de carotenos. Éstos genes fueron propuestos como componentes de la vía de entrada de luz azul en *Neurospora*. Mutantes nulas de *wc-1* y *wc-2*, pierden su capacidad de responder a luz, incluyendo la inducción por luz de *frq* y el encarrilamiento del ciclo circadiano (Lankin-Thomas *et al.*, 1990). Esto indica que los genes *wc-1* y *wc-2* son los dos únicos genes esenciales para las respuestas a la luz azul en *Neurospora*, sin embargo, debido a la existencia de varios fotorreceptores putativos en *Neurospora*, es posible que existan respuestas a la luz desconocidas e independientes de los genes *wc* (Figura 7) (Liu *et al.*, 2003).

Los análisis de secuencia de WC-1 y WC-2 muestran que ambas proteínas contienen en su estructura dominios PAS, elementos de transcripción tipo GATA y dominios tipo “dedo de zinc” de unión a DNA (figura 8). WC-1 tiene tres dominios PAS, el mas cercano al extremo amino terminal es un dominio LOV (perteneciente a la familia de dominios PAS, pero especializado en detectar luz, oxígeno y voltaje). WC-2 tiene solo un dominio PAS. Consistente con su papel de factores de transcripción, las proteínas WC se encuentran en núcleo, e *in vivo* WC-1 y WC-2 forman complejos. El tercer dominio PAS de WC-1 y el único de WC-2 son esenciales para la formación de dímeros de proteínas. En cepas mutantes, donde la interacción WC-1/WC-2 es interrumpida, las funciones de respuesta a luz y a ritmo circadiano son eliminadas. Esto indica que la formación de los complejos WC es esencial para su funcionamiento (Figura 8) (Liu *et al.*, 2003).

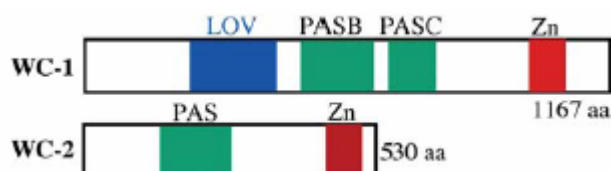


Figura 8. Estructura de las proteínas WC-1 y WC-2. La figura muestra el arreglo de dominios PAS/LOV y dedos de zinc, de las proteínas WC de *N. crassa* (Tomada de Liu *et al.*, 2003).

Las proteínas WC son factores de transcripción que se unen al DNA y activan de la transcripción de una serie de genes después de la exposición a luz. El espectro de acción de varias respuestas a luz en *Neurospora*, incluido el encarrilamiento del ciclo circadiano y la fotoinducción de la biosíntesis de carotenos, son similares a un espectro de absorción típico de flavinas. El hecho de que las mutantes *wc* sean las únicas que han sido repetidamente aisladas en búsquedas genéticas que muestran pérdida de todas las respuestas a luz, sugiere que estas proteínas son los fotorreceptores responsables de las respuestas a luz (Carattoli *et al.*, 1994).

Para demostrar el papel esencial del dominio LOV de WC-1 en las respuestas a luz, se usó una mutante de *Neurospora* que carece de dominio LOV. Como se esperaba, todas las respuestas a luz examinadas fueron eliminadas, incluyendo la inducción por luz de *frq* y *al-3* y la hiperfosforilación inducida por luz de WC-1. Por lo tanto, el dominio LOV de WC-1 es esencial solo para la función en luz, y no para su papel como activador de la transcripción en oscuridad (He *et al.*, 2002).

Al purificar el complejo WC, se encontró que está unido a una flavina, sorprendentemente al cromóforo FAD y no a FMN. WC-1 une FAD estequiométricamente en un radio molar de 1:1. El hecho de que WC-1 se encuentre unido a FAD en vez de a FMN probablemente refleje las diferencias entre los dominios LOV de las fototropinas y el de WC-1 en especial en una de sus regiones de unión, entre dos hélices críticas de éste dominio. Éstos datos demuestran que WC-1, usando FAD como cromóforo, es el receptor de luz azul responsable del “reseteo” del reloj circadiano y otras respuestas a la luz en *Neurospora* (Liu et al., 2003).

Aunque WC-2 no es responsable directo de la detección de la señal luminosa, es un componente esencial en la vía de entrada de luz. Primeramente, la presencia de WC-2 y la formación del complejo WC-1/WC-2 es importante para el mantenimiento del nivel basal de WC-1, segundo, WC-2 y su dominio de unión a DNA son esenciales para la unión al DNA del complejo WC y la posterior activación transcripcional, sin WC-2 es imposible que WC-1 se una al DNA (Linden and Macino, 1997). En oscuridad, WC-1 y WC-2 se unen a los LREs de *frq* como un heterodímero. Como en el dominio LOV de las fototropinas, hay la formación de un aducto entre el FAD y una cisteína altamente conservada del dominio LOV de WC-1, después de la exposición a la luz, el cambio conformacional de WC-1 resultaría en la unión del complejo WC a los LREs de *frq* (figura 9) (Liu et al., 2003).

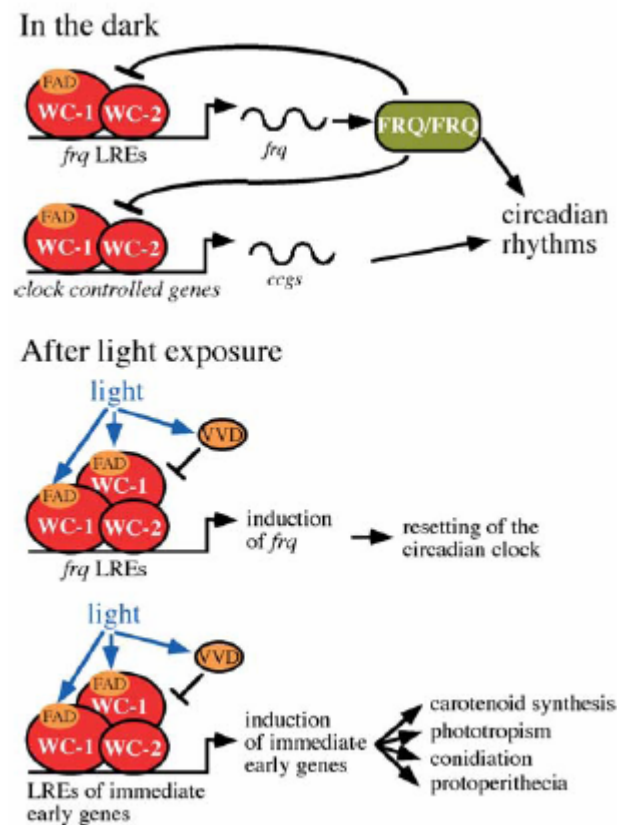


Figura 9. Modelo propuesto para la función del complejo WC. El esquema muestra el funcionamiento del complejo WC-1/WC-2, en condiciones de oscuridad y luz. En la oscuridad el complejo es mas pequeño y consta solo de dos proteínas (una de cada una) y esta encargado de la activación y control del ritmo circadiano; mientras que en luz, el complejo es mayor, dos WC-1 por una WC-2 y su función consta del reseteo del ritmo circadiano y las respuestas a luz azul (Tomado de Liu et al., 2003).

Experimentos *in vivo* sugieren, aunque indirectamente, que WC-1 tiene un fotociclo de periodo largo (mas de una hora). Esto podría ser consecuencia de la formación de un intermediario fotoactivado de vida larga en su dominio LOV (Qiyang y Liu, 2005).

En fechas recientes, se han reportado dos datos interesantes en cuanto al funcionamiento del complejo WC. Se han identificado tres sitios de inicio de la transcripción en el gen *wc-1*. Dos de ellos están localizados a 1222 pb (P_{dist}) y a 924 pb (P_{prox}) río arriba del ORF de *wc-1*, y el tercero (P_{int}) esta localizado dentro del ORF. Se ha confirmado que las proteínas obtenidas a partir de estos inicios de transcripción son funcionales, pues fueron los mensajeros fuerón expresados y las proteínas analizadas en condiciones de luz y oscuridad. (Káldi *et al.*, 2006).

Otro dato reportados es que algunos procesos metabólicos de menor oscilación que el de FRQ, y que son independientes de esta proteína (denominados FLOs),

aparentemente regulan aspectos del crecimiento y desarrollo en *Neurospora*. Sin embargo se ha encontrado una relación entre el feedback loop de FRQ/WC y los FLOs, pues el primero podría estar coordinando el sistema circadiano a través de su actividad como regulador de los genes clock-controlled (respuesta tardía) directamente o indirectamente dirigiendo la regulación de los FLOs (Dunlap y Loros, 2004).

Las proteínas BLR-1 y BLR-2 y las respuestas a luz azul en *Trichoderma atroviride*.

Miembros del género *Trichoderma*, pertenecientes a los *Deuteromycetes*, y para quienes se han ya identificado algunos teleomorfos, que pertenecen a los *Ascomycetes* (como *Hypocrea*), han sido estudiados como agentes de biocontrol. Durante las etapas iniciales de la interacción interfúngica, *Trichoderma atroviride* responde a la presencia del hospedero (patógeno) enrollándose en las hifas del micelio del patógeno. En las etapas tardías de la interacción, el micoparásito produce enzimas hidrolíticas como β -1,3-glucanasas, β -1,6-glucanasas, quitinasas y proteasas para penetrar al patógeno y usar su contenido celular como fuente de nutrientes. El enrollamiento ocurre en respuesta a señales que presumiblemente se originan en el patógeno, en su estructura superficial, o como sub-productos de su degradación inicial por las enzimas secretadas por *Trichoderma* (Figura 10) (Kulling *et al.*, 2000).

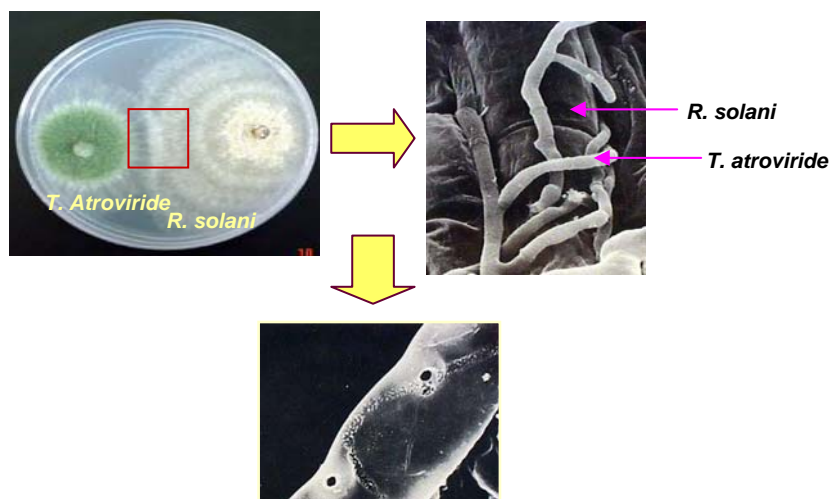


Figura 10. *Trichoderma atroviride* como agente de biocontrol. La figura muestra un ensayo de confrontación entre *T. atroviride* y *R. solani*, en el detalle de la zona de interacción se puede observar como *T. atroviride* invade al de *R. solani* con estructuras tipo apresorio. Una vez retirado mecánicamente el micelio de *T. atroviride*, se pueden observar los orificios y las cicatrices sobre el fitopatógeno producto de la acción de las enzimas líticas secretadas por *T. atroviride*.

El reconocimiento entre el micoparásito y el fitopatógeno parece ser un paso esencial para el éxito del proceso micoparasítico. La expresión de genes que codifican para enzimas que degradan la pared celular, es inducida por una señal soluble del patógeno que aún no ha sido invadido. Moléculas superficiales, como las lecitinas, son buenos candidatos para el proceso de reconocimiento de *Trichoderma* y se sugiere que el evento de reconocimiento mediado por lecitinas, sirve como una señal que dispara una respuesta antifúngica general. (Cortés *et al.*, 1998).

Análisis de mutantes que generan pérdida y ganancia de función en los genes que codifican para las subunidades α y β de la proteína G ($G\alpha$ y $G\beta$ respectivamente), indican que las proteínas G heterodiméricas están involucradas en esporulación, apareamiento, patogenicidad, producción de metabolitos secundarios e incompatibilidad vegetativa en una gran variedad de ascomicetos. El micoparasitismo podría entonces depender de vías de señalización conservadas en eucariotes. En *Trichoderma*, existe evidencia bioquímica de la participación de $G\alpha$ en el enrollamiento sobre el patógeno (Rocha-Ramírez *et al.*, 2002).

En un estudio realizado, se mostró que la proteinasa básica Prb1 de *Trichoderma atroviride*, se expresa altamente en respuesta a la interacción directa con el fitopatógeno hospedero, o en presencia de paredes celulares de éste. La actividad de Prb1 ha sido asociada directamente con el fenómeno de micoparasitismo, y su actividad se basa en adquirir nitrógeno y carbono directamente de las proteínas del fitopatógeno. La limitación de nutrientes, particularmente la limitación de nitrógeno, parece estar altamente relacionada con la patogénesis en otros sistemas fúngicos. La evidencia sugiere, que la expresión del gen *prb1* está regulada a través de mecanismos complejos, capaces de responder a diferentes condiciones ambientales (Olmedo-Monfil *et al.*, 2002).

Además, *Trichoderma atroviride* se usa como modelo fotomorfogénico debido a su capacidad de conidiar después de ser expuesto a la luz. En condiciones de total oscuridad y con todos los nutrientes necesarios, *T. atroviride* crece indefinidamente como micelio; sin embargo, la limitación de nutrientes y la luz disparan el desarrollo de estructuras reproductoras asexuales especializadas (conidias). Un breve pulso de luz

azul (400-480 nm) dado a una colonia en crecimiento radial en una caja Petri, induce la esporulación sincronizada; un anillo de conidióforos, que se vuelven conidias de color verde, se produce en donde había sido la periferia de la colonia al momento del pulso de luz (figura 11) (Horwitz, 1984).

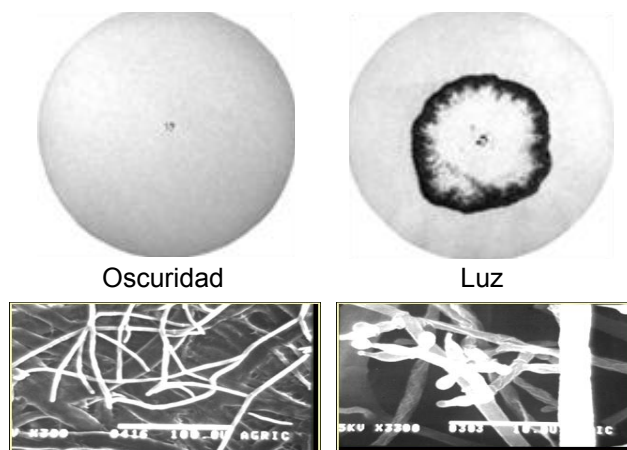


Figura 11. Conidiación producida por luz en *T. atroviride*. En la figura se puede observar la formación del anillo de conidias después del pulso de luz y su control en la oscuridad, en la parte de la micrografía se observan los conidióforos que se forman después del pulso de luz azul.

La fotoinducción se mantiene mientras el cultivo se encuentre en condiciones que no permiten el crecimiento celular (frío o ausencia de oxígeno). Cuando el crecimiento es reiniciado, bajo condiciones óptimas, la colonia conidia. Para la fotoconidiación de *T. atroviride*, los intervalos de reciprocidad para pulsos de luz azul tienen una duración de nanosegundos a minutos, indicando que la fotoconidiación se dispara por un sistema de receptor único. Cuando *T. atroviride* se expone a luz azul, se observan cambios en el potencial de membrana y en los niveles de ATP, además de una oscilación bifásica transiente en los niveles intracelulares de cAMP. El cAMP exógeno promueve la esporulación en la oscuridad, y un pulso de luz azul resulta en la activación de la adenil ciclasa (Horwitz *et al.*, 1990; Gresik *et al.*, 1988; Berrocal-Tito *et al.*, 2000; Kolarova *et al.*, 1992).

Una respuesta secundaria a la luz en *T. atroviride* es la regulación de la expresión del gen *phr-1*, que codifica para una fotoliasa. La luz azul y el desarrollo regulan la expresión de *phr-1*. En oscuridad el RNAm de éste gen no se detecta, pero se vuelve detectable inmediatamente después del pulso de luz. La inducción de *phr-1*

responde de una forma rápida y directa a luz, independientemente de la inducción de la esporulación (Berrocal-Tito *et al.*, 2000).

La forma del espectro de acción de la fotoconidiación es consistente con el espectro de absorción de algunas flavoproteínas. El fototropismo en plantas superiores, la fotocarotenogénesis en *Neurospora crassa*, y muchas otras respuestas biológicas a la luz azul, tienen un espectro de acción similar (Casas-Flores *et al.*, 2004).

Puesto que el espectro de acción de la fotoconidiación era similar al de las respuestas a luz en *Neurospora*, se pensó que dicho fenómeno podría ser dirigido por ortólogos de las proteínas WC-1 y WC-2. La clonación y análisis de dos fragmentos encontrados en *T. atroviride* mostró un alto grado de homología con los genes *wc-1* y *wc-2* de *N. crassa* e indicó que éstas contenían los genes completos para *T. atroviride*, a los que se nombró “blue light regulator” 1 y 2 (*blr-1* y *blr-2*). El análisis indicó que *blr-1* y *blr-2* están presentes como copia única en el genoma de *T. atroviride*. Las proteínas predichas codificadas por estos genes son similares a sus contrapartes de *N. crassa*; BLR-1 tiene 1020 aminoácidos y presenta un 53% de identidad con WC-1, mientras que BLR-2 tiene 484 aminoácidos y es 52% idéntica a WC-2. Ambas proteínas BLR poseen dominios de unión a DNA tipo GATA-dedo de zinc y BLR-1 tiene señales de localización nuclear en la misma posición que WC-1. Este análisis sugiere que las proteínas BLR funcionan como factores de transcripción (Casas-Flores *et al.*, 2004).

La característica mas distintiva de estas proteínas es la presencia de varios dominios PAS, tres en BLR-1 y uno en BLR-2 (figura 12). Los dominios PAS han sido descritos como dominios multifuncionales, como dominios de transducción de señales que monitorean el estado de energía interno de la célula, como dominios para la interacción proteína-proteína y también como detectores de señales ambientales.

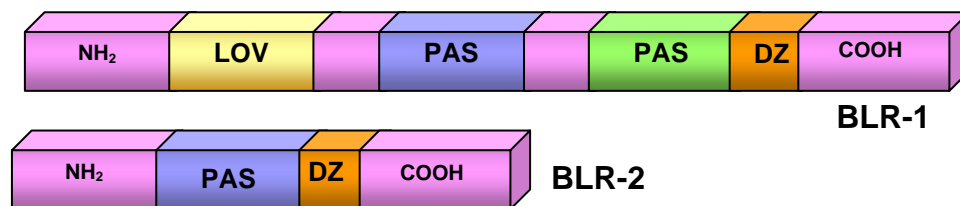


Figura 12. Estructura de las proteínas BLR-1 y BLR-2. En el esquema se muestra el acomodo de los dominios PAS/LOV y del dominio “dedo de zinc”, en las proteínas BLR-1 y BLR-2

El primer dominio PAS de BLR-1 pertenece al subgrupo de dominios LOV que unen flavinas como cromóforo y detectan la luz azul. Este dominio LOV posee todos los residuos necesarios para unir a la flavina, incluyendo la cisteína conservada que participa en la formación del aducto flavina-cisteína de los dominios LOV en plantas (Casas-Flores et al., 2004) (figura 13). El dominio PAS presente en BLR-2 se requiere para la interacción proteína-proteína. La expresión de *blr-1* y *blr-2* es constitutiva y activa transcripcionalmente y que sus transcritos correspondientes no parecen ser afectados significativamente por luz (Casas-Flores et al., 2004).

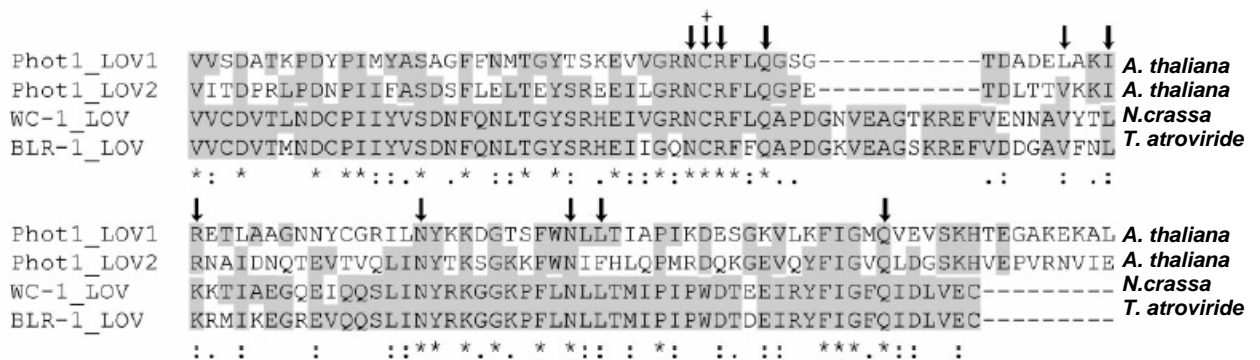


Figura 13. Alineamientos entre diferentes dominios LOV. La figura muestra el alineamiento entre dominios LOV de plantas (phot), *N. crassa* y *T. atroviride*, de proteínas que actúan como fotorreceptores (Casas-Flores et al., 2004).

Ensayos de fotoconidiación con luz azul en las cepas mutantes de *T. atroviride* mutantes $\Delta blr-1$ y $\Delta blr-2$ mostraron que ninguna de las cepas mutantes conidia en respuesta a luz azul. La morfología de las colonias mutantes en presencia de luz es idéntica a la de la cepa silvestre en oscuridad (Casas-Flores et al., 2004).

Se analizó mediante *Northern blot* la inducción de la expresión de *phr-1* por luz, ya que en la zona promotora del gen existen elementos regulatorios a los implicados en la regulación del gen *al* por el complejo WC. El máximo nivel de expresión se alcanza a los 30 minutos después de la exposición al pulso de luz. Interesantemente, esta inducción depende de BLR-1 y BLR-2, ya que en ausencia de estos genes no se observó expresión de *phr-1* (Casas-Flores et al., 2004) (figura 14).

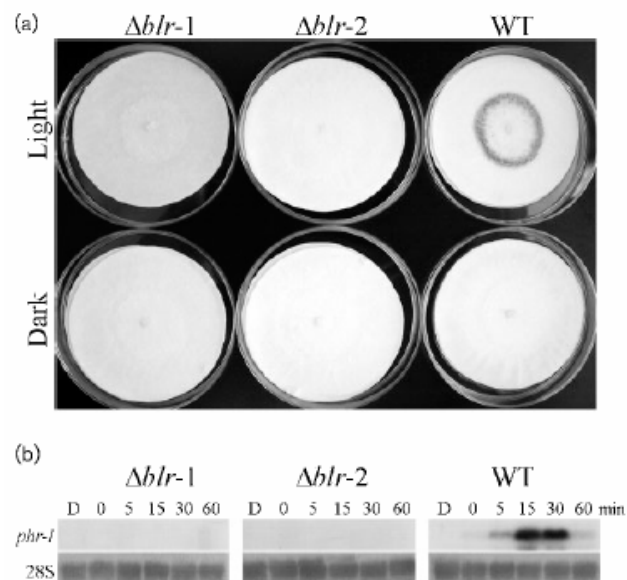


Figura 14. Conidiación y expresión de *phr-1* de las cepas WT, $\Delta blr-1$ y $\Delta blr-2$ en condiciones de luz y oscuridad. La figura muestra los ensayos de fotoconidiación y el Northern blott para el gen *phr-1* en las cepas silvestre, $\Delta blr-1$ y $\Delta blr-2$ de *T. atroviride* (Casas-Flores et al., 2004).

El análisis genético de las mutantes *blr*, de su secuencia de aminoácidos y de la secuencia de ADN del promotor de *phr-1*, indican que BLR-1 y BLR-2 podrían funcionar como un complejo y activar la expresión de genes regulados por luz (Casas-Flores et al., 2004).

Es posible que las proteínas BLR tengan un papel mas general, en la célula, inclusive participando también en condiciones de stress como limitación de nutrientes y alta temperatura, ya que se ha observado un efecto de la luz sobre la tasa de crecimiento en las cepas mutantes $\Delta blr-1$ y $\Delta blr-2$. También podrían participar en un probable ritmo circadiano observado en *T. atroviride*, en el cual se ha reportado una oscilación de aproximadamente 24 horas de sensibilización a luz para la conidiación fotoinducida, en donde un pulso de luz resulta en un desplazamiento del patrón de conidiación en una mutante que esporula en oscuridad (Casas-Flores et al., 2004).

Se ha determinado que al menos diez genes son inducidos y dos reprimidos por luz azul, de una manera dependiente de las proteínas BLR en *T. atroviride* (Rosales-Saavedra et al., 2006). Esto sugiere un papel dual de estas proteínas, como activadores y represores de la expresión génica. Por otro lado, se han identificado varios genes que responden a luz de forma independiente de las proteínas BLR. Esta evidencia apoya la existencia de una vía alterna de detección de la luz, independiente

de las proteínas BLR (Rosales-Saavedra *et al.*, 2006). Existen datos que sugieren que la vía de fotopercepción independiente de las proteínas BLR, puede estar relacionada con la vía de utilización de cAMP, como segundo mensajero (Casas-Flores *et al.*, 2006).

Los dominios PAS podrían ser importantes ya que están involucrados en varias respuestas al medio ambiente y a los estímulos internos, como la detección de cambios en el estado redox o el oxígeno (Spector, 1978). Ya que la limitación de carbono no induce la conidiación en las mutantes $\Delta blr-1$ y $\Delta blr-2$, puede ser que las proteínas BLR están involucradas en la detección de diferentes señales que permiten la esporulación en el hongo. Se ha propuesto que el complejo BLR-1/BLR-2, en si mismo, percibe o traduce la señal originada por la falta de glucosa (Casas-Flores *et al.*, 2006).

El requerimiento de las proteínas BLR-1 y BLR-2 para respuestas de limitación de nutrientes, implica que uno o mas de sus dominios PAS/LOV pueden estar involucrados en la unión de señales específicas derivadas del metabolismo de carbono en *T. atroviride* (Casas-Flores *et al.*, 2006). BLR-1 podría tener la función de unir uno o varios ligandos diferentes y responder a la presencia o ausencia de fuentes de carbono específicas en el medio. De forma alternativa, cualquiera de los dominios PAS encontrados en BLR-1 ó BLR-2 podrían tener capacidades duales de detección, integrando redox (como limitación de carbono) y luz. El hecho de que el complejo BLR-1/BLR-2 esté involucrado en el control de la limitación de carbono en *Trichoderma* representa una nueva conexión entre la detección de luz y de fuentes de carbono (Casas-Flores *et al.*, 2006).

Buscando identificar nuevos fotorreceptores, se ha comenzado a estudiar mas organismos. En otros miembros del género *Trichoderma*, como el ascomiceto *Hypocrea jecorina*, un anamorfo de *Trichoderma reesei*, que se usa en la producción de enzimas celulolíticas y hemicelulolíticas, la regulación de la transcripción de los genes de celulasas, ha sido investigado en detalle para dos genes de celulasa: *cbh1* y *cbh2*. Sin embargo, la vía de señalización en presencia de celulosa o de inductores derivados de celulosa, no ha sido aún dilucidada (Aro *et al.*, 2001; Buchert *et al.*, 1998; Galante *et al.*, 1998; Ilmen *et al.*, 1996; Zeilinger *et al.*, 2001). Uno de los genes que ha sido identificado en *H. jecorina*, codifica para una proteína con alta homología a Vivid, un

gen rápidamente inducido por luz de *N. crassa*, por lo que se presenta la idea de una relación entre la producción de celulasas y la luz en *H. jecorina*. (Betina y Farkas, 1998).

Se ha clonado y caracterizado el gen (*env1*), que se expresa bajo condiciones de inducción de celulasa, en *H. jecorina*; éste gen codifica para una proteína con un pequeño dominio LOV. Por la similitud existente entre Envoy y Vivid, se examinó si el gen *env1* puede tener funciones similares en *H. jecorina*, a las de *vvd* en *N. crassa*. Se encontró que *env1* y *vvd* están involucrados en la regulación de procesos dependientes de luz, pero pueden responder a diferentes estímulos fisiológicos dependiendo de la fisiología y del hábitat de estos dos hongos. Se ha visto que la proteína Envoy quizá pueda estar sujeta a un circuito complejo de autorregulación; y que esta autorregulación dependiente de luz, podría estar relacionada con ortólogos de WC-1, WC-2, BLR-1 y BLR-2. Se asume que Envoy puede unir FMN, y por los residuos en su estructura, hace pensar que ésta proteína puede unir varios ligandos diferentes y responder a la presencia de fuentes de carbono específicas en el medio (Schmoll *et al.*, 2005).

***Escherichia coli* y el fenómeno de Aerotaxis.**

El nivel de energía celular es un determinante crítico para el crecimiento y la supervivencia de la célula. Las bacterias, al igual que otras células, usan un arreglo complejo de estrategias regulatorias para mantener los niveles de energía óptimos, por lo que no es sorprendente descubrir comportamientos bacterianos dirigidos al mantenimiento de la energía (Taylor *et al.*, 1999).

El fenómeno de aerotaxis fue reportado por primera vez por Engelmann (1881-1884), quién demostró que el microaerófilo *Spirillum tenue* era atraído por concentraciones bajas de oxígeno y repelido por concentraciones altas. Beijerinck observó que cada especie motil de bacteria formaba una banda en un gradiente de oxígeno y que la posición de la banda dependía de la especie (1881-1884). Beijerinck fue el primero en sugerir que las bacterias buscan una concentración óptima de oxígeno (Taylor *et al.*, 1999).

La quimiotaxis es la habilidad de células motiles para desplazarse a lo largo de gradientes de químicos. *Escherichia coli* tiene una respuesta quimiotáctica, independiente del metabolismo, a diversos sustratos, como por ejemplo serina, aspartato, maltosa, ribosa y galactosa, y que es detectada por quimiorreceptores transmembranales especializados vía mecanismo receptor-ligando (MCPs). Las señales se presentan directamente de la unión del químico, o de su complejo con una proteína, a un dominio periplásmico de uno de los cuatro quimiorreceptores transmembranales; Tsr (serina), Tar (aspartato y maltosa), Trg (ribosa y galactosa) y Tap (dipéptidos) (Falke y Hazelbauer, 2001).

E. coli también responde quimiotácticamente a parámetros fisico-químicos que afectan el estado redox del sistema de transporte de electrones (ETS) y la fuerza protón-motriz (PMF). Las respuestas a estos estímulos se conocen como **M**ovimiento **D**ependiente de **E**nergía (MDE o energy taxis). En el MDE las células responden, no al químico en si, sino a los cambios en el ETS causados por el químico. Los estímulos para el MDE incluyen aceptores de electrones terminales como oxígeno ó nitrato y sustratos redox activos que interfieran con el transporte de electrones (Alexandre *et al.*, 2000).

En el MDE de *E. coli*, los cambios en el ETS son detectados por los quimiorreceptores Aer y Tsr anclados a membrana. Aunque Aer se encuentra anclado a la membrana, su dominio de detección y su dominio de señalización son citoplasmáticos. Aer tiene un dominio PAS (figura 15) que une FAD como cofactor. FAD es capaz de cambiar su potencial (estado) redox para reflejar el estado en el ETS. Aer es capaz de detectar y señalar cambios en el potencial redox, siendo la oxidación y reducción del FAD lo que produce la señal. Aer también es responsable por la taxis positiva hacia glicerol y succinato. Ambos sustratos son donadores efectivos de equivalentes reducidos para el ETS, y se ha establecido en experimentos directos en *E. coli* que la taxis positiva hacia el glicerol resulta de su oxidación (Zhulin *et al.*, 1997).



Figura 15. Estructura de la proteína Aer. El esquema muestra el arreglo de dominios en la proteína Aer de *E. coli*.

Cuando Aer esta presente como único quimiorreceptor en la célula, puede dirigir la taxis bacteriana en gradientes de ácidos orgánicos oxidables, azúcares y aminoácidos. Las células que expresan a Aer forman un anillo típico de una fuerte respuesta quimiotática en un gradiente espacial de estímulo (sustrato) (tabla 2 y figura 17).

Chemical	Chemotactic response	
	BT3388(pAVR2) (Aer ⁺)*	BT3388(pJL3) (Tsr ⁺)
Succinate	+++	-
Malate	++	-
Glucose	++	++
Galactose	++	++
Fructose	++	++
Ribose	++	++
Proline	++	+
Mannitol	++	-
Mannose	++	++
Sorbitol	++	++
Maltose	++	++
Glycerol	+	++
Alanine	+	+
Arabinose	-	-
Aspartate	-	-
Glutamate	-	-
Glycine	-	-

Tabla 2. Respuesta de Aerotaxis de *E. coli* en diferentes sustratos (Tomada de Greer-Philips *et al.*, 2003)

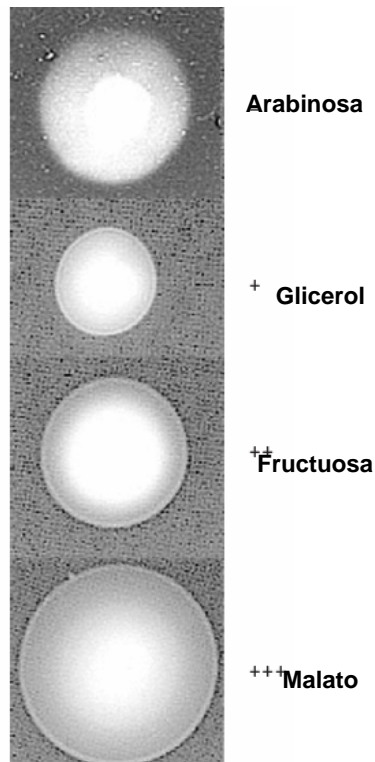


Figura 16. Respuesta de Aerotaxis de *E. coli* en diferentes sustratos (Tomada de Greer-Philips *et al.*, 2003)

El MDE es es una vía eficiente para que las células monitoreen su medio

ambiente, y se ha demostrado que Aer actúa como transductor para el MDE (Repik et al., 2000). Se encontró que el succinato causa la respuesta mas fuerte en las células que expresan a Aer como único quimiorreceptor. La respuesta a este sustrato, y a otros sustratos oxidables, es dependiente de la presencia de FAD como cofactor, lo que es consistente con el mecanismo de detección que se ha propuesto, en donde la succinato deshidrogenasa, que es una flavoproteína que contiene FAD, entra inmediatamente al ETS de *E. coli*. La oxidación del succinato afecta de forma inmediata el estado redox de los componentes del ETS, ya que estos están interactuando con el FAD. Esto puede explicar la fuerte respuesta de Aer unido a FAD en presencia de succinato (Greer-Phillips et al., 2003).

Se ha mostrado que Aer se encuentra anclada a membrana mediante dos segmentos transmembranales (TM1 y TM2) que flanquean un pequeño loop periplásmico. El dominio PAS se encuentra en su extremo N-terminal, y los dominios HAMP y de señalización, en el C-terminal, los cuales son citoplasmáticos. Se propone que la función del loop sea la de mantener a Aer anclado a la membrana, mantener el registro entre el dominio PAS en el extremo N-terminal y los dominios en el extremo C-terminal, o estar involucrado en la detección de señales, en una manera similar a los MCPs (Amin *et al.*, 2006).

Se ha mostrado también, que Aer y Tar pueden responder a luz azul, mientras que Tsr no lo hace. La presencia de los MCPs aumenta la respuesta de Aer. Este efecto de señalización colaborativo es mayor cuando se han formado trímeros de dímeros mezclados, entre Aer y los otros transductores. La contribución de Aer domina la respuesta a estímulos temporales de luz azul, gracias a que tiene la capacidad de revertir el cambio conformacional provocado por el estímulo, de una manera lenta (Wright *et al.*, 2006). Como se puede observar en la figura 17, Aer cuenta con un dominio PAS, familia de dominios a la que pertenecen los dominios.

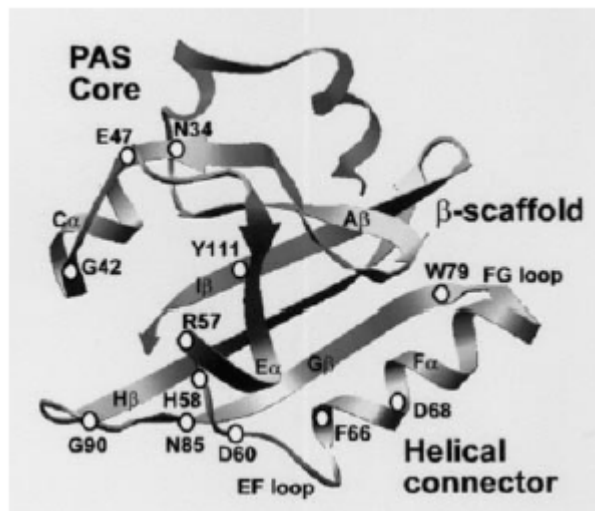


Figura 17. Centro del dominio PAS de la proteína Aer de *E. coli* (Tomado de Repik *et al.*, 2000)

JUSTIFICACIÓN

El ascomiceto *T. atroviride* es un hongo ampliamente utilizado en el control biológico de hongos fitopatógenos (Chet, 1987), y también en la producción de enzimas hidrolíticas, antibióticos (Meyer, 1991) y proteínas heterólogas. Para controlar a los fitopatógenos a nivel campo, suelen usarse esporas como inóculo, sin embargo la producción de conidias a gran escala resulta un problema (Papavizas, 1985). En *T. atroviride*, el crecimiento, el comportamiento micoparasítico y la esporulación parecen estar interconectados.

La limitación de nutrientes y la luz disparan el desarrollo de estructuras asexuales especializadas, las conidias, también conocidas como esporas asexuales. Además, si el hongo recibe un pulso de luz azul, inicia la conidiación y detiene su crecimiento, pero al reiniciar el crecimiento, la conidiación se suspende (Rocha-Ramírez, 2002); por otro lado, estando en limitación de nutrientes, *T. atroviride* forma conidias (Gressel y Rau, 1983) y cuando el hongo se confronta con un huésped, no se observa esporulación, pero al terminar de digerir al huésped se presenta el fenómeno (Rocha-Ramírez, 2002).

A la fecha los esfuerzos por entender el fenómeno de esporulación y la percepción de la luz en *T. atroviride* se han enfocado principalmente en estudios fotobiológicos y bioquímicos. Los estudios genéticos y moleculares han sido escasos y no han llevado a resultados concluyentes; también, hasta donde se sabe, ningún grupo de investigación en hongos ha emprendido la tarea de investigar el papel que juegan los dominios PAS en la percepción de señales internas como el estado redox y en los procesos de esporulación por limitación de nutrientes, se han centrado únicamente en la percepción de la señal luminosa en relación con el ciclo circadiano.

Se han obtenido evidencias de una posible relación entre la esporulación por limitación de nutrientes y la respuesta a la luz azul (Casas-Flores et al., 2006). El trabajo aquí propuesto podría, por lo tanto, aportar nuevos conocimientos sobre un aspecto poco comprendido pero fundamental en el proceso de percepción de señales intra- y extracelulares, y de la esporulación por limitación de nutrientes. Sin duda

alguna, el entendimiento de los mecanismos genéticos y moleculares ayudaría a diseñar mejores estrategias para manipular los diferentes procesos fisiológicos y del desarrollo, y así lograr un aprovechamiento óptimo de *Trichoderma atroviride* en la generación de productos importantes para la industria y la medicina, y también en su uso como agente de control biológico.

HIPÓTESIS

La proteína BLR-1 de *T. atroviride* tiene en su estructura un dominio LOV que se especializa en detectar señales provenientes de estímulos como Luz, Oxígeno y Voltaje; éste dominio pertenece a la familia de dominios PAS encargados de detectar señales intra y extracelulares que son básicas para el correcto desarrollo y supervivencia celular.

Al realizar alineamientos entre el dominio LOV de BLR-1 y dominios LOV de diferentes organismos, entre ellos las fototropinas de plantas, se observa que se conservan todos los residuos necesarios para la unión al cromóforo de tipo flavina que es el encargado de detectar los estímulos y de activar a la proteína para que actúe como factor de transcripción y desencadene las respuestas al estímulo que esta recibiendo. Al haberse mostrado que el complejo BLR-1/BLR-2 en *T. atroviride* es necesario para las respuestas a luz, se propone que el dominio LOV de BLR-1 es donde se lleva a cabo la detección de la señal luminosa mediante la unión del cromóforo de flavina al residuo conservado de cisteína que se encuentra en su estructura, lo que activaría al complejo y permitiría que *T. atroviride* respondiera a la luz azul.

Se realizaron también alineamientos entre el dominio LOV de BLR-1 y dominios PAS de proteínas involucradas en la detección de oxígeno y potencial redox, entre ellas Aer de *E. coli*, que es la encargada de disparar el fenómeno de aerotaxis (desplazamiento dependiente de una concentración óptima de oxígeno) y sabiendo que el dominio LOV detecta cambios en la concentración de oxígeno, se plantea la hipótesis de que el dominio LOV de BLR-1 y el PAS de Aer, son funcionalmente análogos, y por lo tanto, que un intercambio entre ellos reestablecería el fenómeno de aerotaxis en una cepa carente del gen *aer*.

OBJETIVOS

Objetivo General.

Determinar el papel que desempeña el dominio LOV de la proteína BLR-1 de *Trichoderma atroviride*.

Objetivos Específicos.

- Generar una mutante de la proteína BLR-1 mediante la sustitución de la Cisteína conservada por una Alanina en el dominio LOV.
- Sobreproducir y purificar a las proteínas BLR-1 silvestre y mutante en sistemas de expresión heterólogos.
- Determinar los cambios de absorción de las proteínas BLR-1 silvestre y mutante bajo condiciones de luz y oscuridad, por medio de ensayos espectrofotométricos.
- Realizar un intercambio de los dominios PAS de Aer y LOV de BLR-1, para determinar si son funcionalmente análogos.

MATERIALES Y MÉTODOS

□ **Cepas y Condiciones de Cultivo**

Las cepas bacterianas y plásmidos utilizados durante este trabajo se encuentran descritos en la tabla 3.

○ **Hongos**

Se utilizó a la cepa silvestre IMI 206040 del hongo ascomiceto *Trichoderma atroviride*. Las condiciones de crecimiento de esta cepa se realizó a 25°C en medio PDA (Papa Dextrosa Agar, DIFCO™). Para los ensayos de fotoinducción del hongo, un fragmento de periferia de una colonia del hongo, se creció en el centro de una placa con medio PDA (Papa Dextrosa Agar, DIFCO™) y se incubó en oscuridad a 25°C por 48 hrs. Posteriormente, de este cultivo se inocularon fragmentos de la periferia de colonia en cajas que contenían un papel filtro Whatman (no. 50) sobre otro papel filtro Whatman (no. 1) humedecido con tres mililitros de PDYCB (24 g/L de PDB, 2 g/L de extracto de levadura y 1.2 g/L de casaminoácidos, todos de DIFCO™), que a su vez estaban cubiertos por un disco de papel celofán del mismo diámetro que el papel filtro. Las cajas se incuban a 25°C por 36 horas. Subsecuentemente las cajas se exponen a un pulso de luz azul (LEE no. 183; con una intensidad de $3\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}^{-1}$) de cinco minutos de duración, se colecta el micelio y se procede a la extracción del RNA. La colecta del micelio se realiza a los siguientes tiempos: 0 min. (inmediatamente) y 15, 30 y 60 min después de la exposición a luz.

○ **Cepas bacterianas y plásmidos**

- Para la manipulación de plásmidos se utilizó a la cepa TOP10F' (INVITROGEN™) de *Escherichia coli*. Los cultivos de rutina se realizaron en medio LB (1% de triptona, 0.5% de extracto de levadura, de DIFCO™ y 1% de NaCl Research Organics™). Para preparar medio LB sólido se agregó 1.5% de Agar (DIFCO™). Los antibióticos que se usarón son: Carbenicilina (100 mg/mL, Cb 100) a una concentración final de 100 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, Kanamicina (50 mg/mL, Km100) a una concentración final de 50 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, Cloramfenicol (50 mg/mL, Cm 50) a una concentración final de 34 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ y Tetraciclina (12.5 mg/mL, Tet 12.5) a una concentración final de 12.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$.

Para los ensayos de aerotaxis se utilizó la mitad del volumen de los antibióticos. Para la selección mediante colonias blancas y azules, se agregan a la caja 10 μ L de X-Gal (40 mg/mL, BIOLINE™) y 40 μ L de IPTG (32.8 mg/mL, Promega™). Para los ensayos de sobreproducción y purificación de proteínas se utilizó el IPTG, a una concentración de 0.4 mM.

Tabla 3. Cepas, vectores y construcciones usadas para los diferentes ensayos.

Cepa	Genotipo	Fenotipo relevante /descripción	Referencia	Ensayo
RP437	(thr[Am]-1, Leu B6, his-4, met-F[Am]159, eda-50, rpsL1356, thi-1, ara-14, mH-1, xyl-5, ton A31, tsx-78, lac Y1, F ⁻)	Aer ⁺	Donada por el Dr. J. S. Parkinson de la universidad de UTAH	Complementación de Función
UU1117	([aer] Δ 1, thr[Am]-1, Leu B6, his-4, met-F[Am]159, eda-50, rpsL1356, thi-1, ara-14, mH-1, xyl-5, ton A31, tsx-78)	Aer ⁻	Donada por el Dr. J. S. Parkinson de la universidad de UTAH	Complementación de Función
Rosetta Blue Lys S	endA1 hsdR17(r _{K12} ⁻ m _{K12}) supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lacF[proA ⁺ B ⁺ lacI ^q Z Δ M15 ::Tn10(Tc ^R)] (DE3) pLysSARE ⁶ (Cm ^R)	Potencia la expresión de proteínas que contienen codones raramente usados en <i>E. coli</i> (AGG, AGA, AUA, CUA, CCC, GGA), pero que son muy comunes en eucariotes, y tiene una alta astringencia a mutaciones en los genes <i>recA</i> , <i>endA</i> y <i>lacI^q</i> .	Novagen	Sobreproducción de proteínas
TOP10F'	F' ⁺ {lacI ^q , Tn10(Tet ^R)} mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ 80/lacZ Δ M15 Δ lacX74 recA1 araD139 Δ (ara-leu)7697 gaU gaK rpsL (Str ^R) endA1 nupG	Permite el aislamiento de ADN de vectores que tienen un origen de replicación f1. Inuducible por IPTG y selección por colonias blancas/azules	Invitrogen	Manipulación de construcciones
Vector	Genotipo	Descripción	Referencia	Ensayo
pGEM T-Easy		Contiene los promotores de la T7 y de la SP6 RNA polimerasas flanqueando el sitio múltiple de clonación, el que se encuentra dentro la región codificante para el péptido α de la enzima β -galactosidasa por lo que se pueden detectar las clonas mediante colonias blancas/azules. Es un sistema conveniente para la clonación de productos de PCR	Promega	Manipulación de construcciones
pK19		Plásmido sintético formado a partir del vector pBRNeo y el SMC de pUC19. Resistencia a	Pridmore R. D., 1987	Manipulación de construcciones

		Kanamicina		
pTRC99A		<i>trcP</i> vector, <i>lacI^f</i> , SMC de pUC18, entre los sitios Eco RI y Hind III. Resistencia a Kanamicina	Amann <i>et al.</i> , 1998	Complementación de función
pET32a		Promotor T7, inicio de la transcripción de T7, secuencia codificante para tag de Trx, secuencia codificante para tag de histidinas (en N-terminal y C-terminal), secuencia codificante para tag de S, SMC entre Nco I y Xho I, terminador T7, secuencia codificante para <i>lacI</i> , origen de pBR322, secuencia codificante para <i>bla</i> , origen f1. Resistencia a Ampicilina	Novagen	Complementación de función
pET24a		Promotor T7, inicio de la transcripción de T7, secuencia codificante para tag de T7, SMC entre Bam HI y Xho I, terminador T7, secuencia codificante para <i>lacI</i> , origen de pBR322, secuencia codificante para <i>Kan</i> , origen f1. Resistencia a Kanamicina	Novagen	Sobreproducción y purificación de proteínas
Construcc.	Genotipo	Descripción	Referencia	Ensayo
pBS20		Plásmido derivado de pBR322, expresión de <i>aer</i> inducible por IPTG, confiere resistencia a ampicilina. Aer ⁺	Donado por el Dr. J. S. Parkinson de la universidad de UTAH	Complementación de función
pET32a_ <i>aer</i>		Aer ⁺	Este trabajo	Complementación de función
pET32a_ <i>blr-1</i>		BLR-1	Este trabajo	Complementación de función
pET32a_ <i>aer::LOV</i>		AerLOV	Este trabajo	Complementación de función
pET32a_ <i>blr-1::PAS</i>		BLR-1PAS	Este trabajo	Complementación de función
pET32a_ <i>aerΔPAS</i>		AerΔPAS	Este trabajo	Complementación de función
pTRC99A_ <i>aer</i>		Aer ⁺	Este trabajo	Complementación de función
pTRC99A_ <i>blr-1</i>		BLR-1	Este trabajo	Complementación de función
pTRC99A_ <i>aerΔPAS</i>		AerΔPAS	Este trabajo	Complementación de función
pTRC99A_ <i>blr-1ΔLOV</i>		BLR-1ΔLOV	Este trabajo	Complementación de función
pTRC99A_ <i>aer::LOV</i>		AerLOV	Este trabajo	Complementación de función
pTRC99A_ <i>blr-1::PAS</i>		BLR-1PAS	Este trabajo	Complementación de función
pTRC99A_ <i>blr-1CxA</i>		BLR-1 CxA	Este trabajo	Complementación de función
pET24a_ <i>blr-</i>		BLR-1	Este	Sobreproducción y

1			trabajo	purificación de proteínas y ensayos espectrofotométricos
pET24a_blr-1CxA		BLR-1 CxA	Este trabajo	Sobreproducción y purificación de proteínas y ensayos espectrofotométricos

Extracción y manipulación de ácidos nucleicos

Se aisló el RNA total de micelio *T. atroviride* bajo condiciones de oscuridad y luz azul (15 y 30 minutos después del pulso de luz). Se usó el protocolo descrito por Jones *et al.* (1989). La síntesis de la primera cadena de cDNA del gen *blr-1*, se realizó usando el protocolo del kit “Super Script First Strand Síntesis System for RT-PCR” (Invitrogen™). Los plásmidos se purificaron por el método descrito por Birboim y Dolly (1979).

Amplificación de los diferentes fragmentos de los genes que codifican para las proteínas BLR-1 de *T. atroviride* y Aer de *E. coli*.

Mediante PCR se amplificaron diversos fragmentos. En la tabla 4 se describen los oligonucleótidos utilizados y los fragmentos obtenidos.

Tabla 4. Fragmentos necesarios para las construcciones. Las bases de mayor tamaño en la secuencia, son los sitios que reconoce la enzima de restricción.

Oligonucleótidos	Sitios de restricción incluidos o generados	Producto obtenido	Tamaño (pb)
<ul style="list-style-type: none"> ○ Oli Bam HI BLR1: GGATCCATGGAGGGCTT CTACCAGACAAAC ○ Oli Hind III BLR1: AAGCTTGCCATCATTCA TAAGATG 	BamH I y Hind III	cDNA de <i>blr-1</i>	3563
<ul style="list-style-type: none"> ○ Oli Bam HI BLR1: GGATCCATGGAGGGCTT CTACCAGACAAAC ○ Oli_Pst I_Bl1 R: CTGCAGGTGGATTTAG GGCCTTCC 	BamH I y Pst I	N-terminal de BLR-1	1030
<ul style="list-style-type: none"> ○ Oli_Pst I_Bl1 F: CTGCAGATTGATCTTGT 	Pst I y Hind III	C-terminal de BLR-1	1956

GAATGCCC ○ Oli Hind III BLR1: AAGCTTGCCATCATTCA TAAGATG			
○ Oli_BLR1 LOV R_Xba I: TCTAGACACCTGCACAA AAGTGCATTAGC ○ Oli_BLR1 LOV F1_Xba I: TCTAGAAAGGCCCTAAAA TCCACCTGGGC	Xba I	Dominio LOV de BLR-1	480
○ Oli_Aer_LOV R_Hind III: AAGCTTAATGCAGTACC GTCACCGCGTC ○ Oli_Aer_LOV F_Bam HI: GGATCCATGTCTTCTCA TCCGTATGCACC	BamH I y Hind III	Gen aer	1521
○ Oli_Aer_LOV F_Bam HI: GGATCCATGTCTTCTCA TCCGTATGCACC ○ Oli_Aer_LOV R_Xba I: TCTAGAGATGGCGTCAG GGCATTCAAC	BamH I y Xba I	N-terminal de Aer	123
○ Oli_Aer_LOV F_Xba I: TCTAGAGCGACGGATGA AGAGATCGCGGCG ○ Oli_Aer_LOV R_Hind III: AAGCTTAATGCAGTACC GTCACCGCGTC	Xba I y Hind III	C-terminal de Aer	1170
○ Oli_Pst I_AER F_PAS : CTGCAGCAAATACCCC GCTGGCGGAC ○ Oli_Pst I_AER R_PAS : CTGCAGCGGCTCCACC GCCGCGATCTC	Pst I	Dominio PAS de Aer	387
○ Oli Bgl II Mutación1: AGATCTCGCTGTCCACT CGGCCCC ○ Oligo Cisteína BLR1: TACGTATCTGATAATTC CAGAACCTCACTGGATACA GCCGCCATGAAATCATTGG ACAAAACGCGGTTCTTTC AAGCACCCGATGG ○ SR_Xba I_BLR_R: GCTCTAGAGTATCCAGT GAGGTTCTGGAA	Bgl II, SnaB I y Xba I	<i>blr-1</i> mutante (CxA)	3422

Para las reacciones de PCR se usó la enzima de alta fidelidad “Taq Platinum DNA Pol” (Invitrogen™); la mezcla de reacción utilizada fue la siguiente:

<u>Componente</u>	<u>Cantidad</u>
H ₂ O	μL necesarios para un volumen final de 50 μL
Buffer Platinum, 10X	5.0 μL
MgCl ₂ , 10 mM	1.5 μL
dNTPs, 10 mM	1.0 μL
Oligonucleótido 1, 10 μM	1.0 μL
Oligonucleótido 2, 10 μM	1.0 μL
Templado	X μL
<u>Enzima Platinum</u>	<u>0.2 μL</u>
Total	50.0 μL

Tabla 5. Mezcla de reacción general para los PCRs

Desnaturalización Inicial	5 minutos a 94°C	
Desnaturalización	30 segundos a 94°C	
Alineamiento	30 segundos a temperatura variable	30-35 ciclos
Extensión	2-5 minutos a 68-72°C (depende del tamaño del fragmento)	
Extensión Final	7-10 minutos a 72°C	

Tabla 6. Programa general para las reacciones de PCR

Obtención de las diferentes construcciones de BLR-1 y Aer

Los fragmentos obtenidos por PCR se clonaron en el vector pGEM-T Easy (Promega™) de acuerdo al protocolo descrito por el fabricante. Los productos de ligación se transformaron en células de *E. coli* TOP10 F' químicamente competentes. Las transformantes se seleccionaron en placas con medio LB Cb 100, X-Gal e IPTG y posteriormente se les extrajo el plásmido (Birboim y Dolly, 1979) y mediante corte con las enzimas de restricción correspondientes, se comprobaron los insertos.

Las reacciones con enzimas de restricción se llevaron a cabo de acuerdo con el fabricante y mediante técnicas convencionales (Sambrook y Russell, 2001).

Las reacciones de ligación se llevaron a cabo con la enzima T4 ligasa del fago T4 (Invitrogen™). La reacción general de ligación se muestra en la tabla 6.

<u>Componente</u>	<u>Cantidad</u>
H ₂ O	μL necesarios para completar el volumen final de la reacción
Buffer Ligasa 5X (Invitrogen™)	2.0 μL
ATP 10 mM	1.0 μL

Inserto	X.0 μ L
Vector	1:3 (vector:inserto) μ L
<u>T4 Ligasa</u>	<u>1.0 μL</u>
Total	10.0 μ L

Tabla 7. Mezcla de reacción general para las ligaciones entre los diferentes fragmentos

La reacción de ligación se incubaba a 4-25°C, de 1 a 24 horas.

Para obtener las construcciones finales que fueron usadas en el presente trabajo, las quimeras clonadas en el vector pK19 se subclonaron a tres vectores: pET32a (por error), pTRC99A y pET24a, mediante restricción con las enzimas *Hind* III y *Bam*HI. Las construcciones se transformaron en dos cepas diferentes: UU1117 (aer⁻), para los ensayos de complementación de aerotaxis, y Rosetta Blue Lys S.

Ensayos de aerotaxis para *E. coli* en platos semisólidos (Swarm Plates).

Los ensayos de complementación del fenómeno de aerotaxis, se realizaron de acuerdo a Bibikov *et al.*, 1997; se describirá brevemente la metodología:

- Preparar medio mínimo que solo contiene 0.2% (w/v) de Agar + 0.5% (w/v) de NaCl. Esterilizar, enfriar hasta 60°C y agregar:
 - KH₂PO₄ para una concentración final de 10 mM
 - (NH₄)₂SO₄ para una concentración final de 1 mM
 - MgSO₄ para una concentración final de 1 mM
 - Tiamina – HCl para una concentración final de 1 mg/mL
 - Treonina para una concentración final de 0.1 mM
 - Leucina para una concentración final de 0.1 mM
 - Metionina para una concentración final de 0.1 mM
 - Histidina para una concentración final de 0.1 mM
 - Tiamina para una concentración final de 0.1 mM
 - Succinato para una concentración final de 30 mM
 - IPTG para una concentración de 25 μ M a 1 mM.
 - Antibiótico. La mitad del volumen (en vez de 1 μ L por mL, usar 0.5 μ L por mL)
- Vaciar este medio en cajas Petri y dejar reposando las cajas en la campana por cuatro horas antes de inocular.

Para los ensayos de aerotaxis se crecieron preinóculos de las transformantes y para inocular en los platos semisólidos, se introduce un palillo de dientes en el preinóculo de la cepa con la construcción de interés y se pica el medio en el centro de la caja hasta tocar el fondo. Las cajas se incubaron (boca arriba) en un rango de 30 – 35°C por aproximadamente 18 horas, se analizaron y se tomó una fotografía representativa de cada cepa por condición.

Ensayos de sobreproducción de las proteínas BLR-1 y BLR-1 mutante (CxA).

- Preinóculo. En un matraz con 25 mL de LB, 25 μ L de Cb 100, 17 μ L de Cm 50, 25 μ L de Tet 12.5, se inocula una azada de las bacterias con la construcción de interés. El matraz se incuba a 37°C y con agitación a 220 rpm toda la noche.
- Inóculo.
 - En un matraz con un litro de LB, 1 mL de Cb 100, 680 μ L de Cm 50, 1 mL de Tet 12.5 y 20 mL de Glucosa 20%, se agregó todo el preinóculo. Se incubó a 37°C y con agitación a 250 rpm hasta una DO_{600nm} de 0.6. A partir de este momento los experimentos se realizaron en la oscuridad o con luz roja de seguridad.
 - La inducción del cultivo se llevó acabo agregando un mL de IPTG 0.4 mM, y se incubó a una temperatura de 25°C por tres horas. Para realizar la cinética de inducción, se tomaron dos mL de cultivo cada hora a partir de la adición del IPTG.
 - Después de las tres horas de inducción, se colectan las células por centrifugación a 4000 rpm por cinco minutos. La pastilla se lava dos veces con solución de 0.9% de NaCl.
- Extracción de la proteína por sonicación. Se agregaron a la pastilla 25 mL de Buffer A (Tris-HCl 20 mM pH 7.9, NaCl 0.5 mM, 10% de Glicerol, PMSF 1mM) y 200 μ L de una mezcla de inhibidores de proteasas: AEBSF, Bestatina, E-64, EDTA y Pepstatina (SIGMATM). Las muestras se sonicaron (5 pulsos de 10s, con pausas de 10s y colocando en hielo durante las pausas) y se centrifugaron a 20,000 rpm por 20 min. El sobrenadante se dividió en alícuotas de 5 mL.

- Purificación por cromatografía. Un volumen de diez mL del extracto crudo se inyectó a una columna de afinidad cargada con NiSO_4 (para cargarla se le hace pasar, a un flujo de 0.5 mL/min, ocho volúmenes de columna de NiSO_4 5mg/mL; de acuerdo a las especificaciones del manual ProBond™ Resin), previamente equilibrada (dos volúmenes de columna, a un flujo de 1 mL/min) con Buffer A, posteriormente se lava la columna agregando un volumen de columna (aproximadamente 12 mL) de Buffer A para lavar todas aquellas proteínas que no se adhirieron a la columna. Para eluir la proteína de la columna se aplica un gradiente creciente de Buffer B (Buffer A, 0.5 M de imidazol), colectando fracciones de la muestra de interés. Al terminar el gradiente se lavó la columna con Buffer A para eliminar cualquier resto proteico y dejarla nuevamente equilibrada; a continuación se muestra un esquema general del procedimiento.

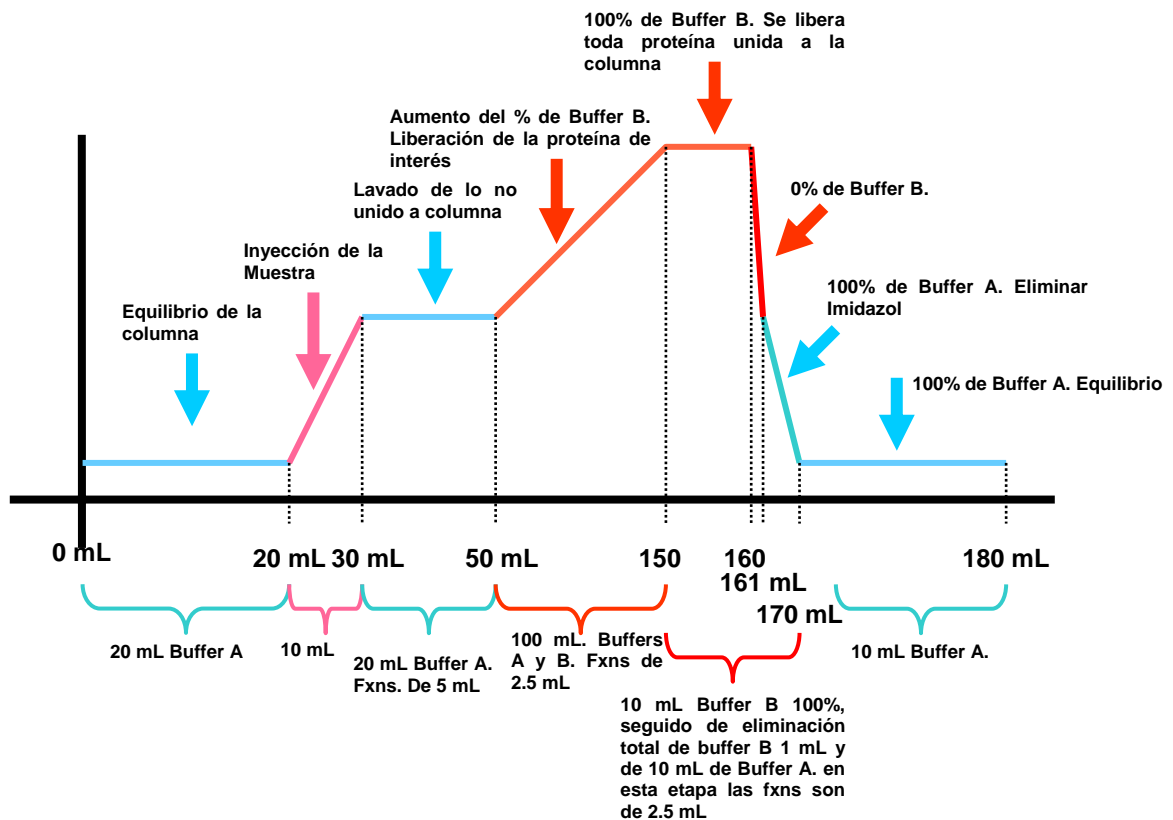


Figura 18. Diagrama general del proceso de purificación de proteínas utilizado durante este trabajo.

Del proceso de purificación se obtiene un cromatograma y en base a este se seleccionan las fracciones con las mayores concentraciones de proteína y se realiza una electroforesis en un gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 12% para visualizar los productos de la purificación.

- Preparación de la muestra para la electroforesis. Se recomienda preparar 100 μL de muestra, por lo que a 80 μL de la fracción(s) se le agregan 20 μL de buffer de carga 5X (60 mM de Tris-HCl pH 6.8, 25% de glicerol, 2% de SDS, 14.4 mM de 2-[β]-mercaptoetanol, 0.1% de azul de bromofenol). La mezcla de muestra y colorante se incuba 10 min. a 100°C y se centrifuga dos minutos a 10000 rpm. La muestra así preparada puede usarse continuamente y se almacena a – 20°C.
- Preparación del Gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). Se preparan por separado las dos fases del gel: la separadora y la concentradora.

- Separadora:

Tabla 8. Mezcla de componentes para la fase separadora para geles de poliacrilamida al 12%

<u>Componente</u>	<u>Cantidad</u>
H ₂ O	4.18 mL
Buffer de Separación (1.5 M de Tris-HCl pH 8.8 + 0.4% de SDS)	3.13 mL
Poliacrilamida (30% w/v acrilamida + 0.8% w/v bis-acrilamida)	5.0 mL
SDS 10%	125 μL
APS 10%	63 μL
TEMED	7 μL
Total	12.504 mL

La mezcla se agrega al dispositivo de la cámara ya montado (aproximadamente cinco mL) y se le agrega alcohol hasta que cubra el espacio entre el gel y el borde de la cámara (aproximadamente dos mL) para evitar que la superficie del gel quede en contacto con el aire, debido a que puede interferir con la polimerización de la acrilamida, y para que la superficie que se forme quede sin ninguna imperfección. Esperar hasta que polimerice, se decanta el alcohol y se le agrega la mezcla de la fase concentradora.

- Fase concentradora.

Tabla 9. Mezcla de componentes para la fase concentradora de geles de poliacrilamida al 12%

<u>Componente</u>	<u>Cantidad</u>
H ₂ O	2.73 mL
Buffer Concentrador (0.5 M de Tris-HCl pH 6.8 + 0.4% de SDS)	1.121 mL
Poliacrilamida	583 μL
SDS 10%	45 μL
APS 10%	22 μL
TEMED	7 μL
Total	4.507 mL

Esta mezcla se agrega sobre la fase separadora ya polimerizada (aprox. dos mL) y se coloca el peine para generar los pozos. Cuando la fase concentradora se polimeriza se retira el peine y se coloca en la cámara de electroforesis.

Se cargaron 30 μL de muestra y 4 μL del marcador de peso molecular de amplio rango (BIORAD™). La electroforesis se realizó con una corriente constante de 15 mA. El gel puede visualizarse usando diferentes colorantes, dos tinciones son las más comunes:

- Tinción del gel con azul de Comassie. El gel se coloca en un recipiente y se le agrega suficiente solución de Comassie (0.1% w/v de azul de comassie R-250, 45% v/v de metanol, 10% v/v de ácido acético glacial) para que el gel se cubra totalmente, y se deja a agitación lenta por espacio de dos horas. Pasado este tiempo, se le retira el colorante y se le agrega solución de desteñido (10% v/v de metanol, 10% v/v de ácido acético glacial) y se deja toda la noche en agitación.
- Tinción del gel de poliacrilamida con Plata.
 - Para un gel de 80 mm de ancho, 100 mm de largo y 1 mm de espesor, se usan 25 mL de las soluciones. El gel se coloca en un recipiente y se le agrega solución de fijación y permanece en agitación por media hora o toda la noche.
 - Se decanta la solución y se le agrega una mezcla de 25 mL de solución sensibilizadora (etanol absoluto 30% v/v, acetato de sodio anhidro 6.8% w/v, tiosulfato de sodio pentahidratado 0.2% w/v) mas 125 μL de glutaraldehído 23% y se deja media hora en agitación lenta.
 - Se decanta la solución sensibilizadora y se le realizan tres lavados de siete minutos cada uno con un volumen suficiente de agua desionizada para que el gel “nade” en el recipiente.
 - Al gel se le agrega una mezcla de 25 mL de solución de plata (nitrato de plata 0.25% w/v) mas 10 μL de formaldehído 37% y se deja en agitación lenta por 25 minutos.
 - Al terminar el tiempo en la solución de plata, se decanta y se realizan dos lavados de un minuto cada uno con agua desionizada.

- Se le agrega al gel una mezcla de 25 mL de solución reveladora (carbonato de sodio 2.5% w/v) mas 5 μ L de formaldehído 37% y se coloca en agitación. El tiempo de esta incubación es variable, cuando la intensidad de las bandas es suficiente para apreciar el resultado, se decanta la solución de revelado y se le agrega al gel 25 mL de solución de Na₂EDTA 1.5% w/v para detener la reacción, y en esta permanece por diez minutos en agitación lenta para que la reacción pare totalmente. Finalmente el gel se coloca en agua y se documenta.

Además en el presente trabajo de tesis se uso una tinción específica para los “tags” de histidinas en las proteínas, en donde un complejo de ácido nitrilotriacético, conjugado a Ni²⁺, fluoresce al ser expuesto a UV permitiendo visualizar aquellas proteínas que vienen de la construcción de interés, el kit es “InVision His-tag In-gel Stain” (Invitrogen™) y el procedimiento se realizó de acuerdo al protocolo del fabricante.

Precipitación con metanol y cloroformo. Después de que las fracciones han sido colectadas, se les realiza una precipitación a fin de concentrar a las proteínas. El protocolo es como sigue:

- Tomar 150 μ L del extracto obtenido de la columna y agregarle 450 μ L de agua desionizada, 600 μ L de metanol y 150 μ L de cloroformo; mezclar por inversión del tubo (unas cuatro veces) y centrifugar dos minutos a 10000 rpm. En caso de que el extracto obtenido de la columna tenga muy poca concentración de proteína, se toman 600 μ L del extracto, y ya no se le adiciona agua sino que directamente se le agreguen los 600 μ L de metanol y los 150 μ L de cloroformo.
- Al terminar la centrifugación se pueden observar tres fases:
 - Superior: mezcla de metanol y cloroformo, se observa ligeramente aceitosa.
 - Intermedia: proteína, es una capa delgada y generalmente blanca u opaca, es la fase mas pequeña de las tres.
 - Inferior: agua o restos acuosos obtenidos junto con la proteína en la columna.

Se debe retirar la fase superior, de preferencia con micropipeta y cuidando de no perforar o arrastrar la fase intermedia de proteína.

- Agregar a las dos fases aun en el tubo 450 μ L de metanol, mezclar por inversión del tubo y centrifugar nuevamente a las condiciones ya mencionadas.
- Al terminar la centrifugación se decanta el líquido, pues ya solo se observa una pastilla de proteína al fondo del tubo; a esta pastilla se le resuspende en Buffer A y se toma una alícuota para prepararla y correrla en gel, o mezclarla directamente con el buffer de corrida.

Ensayos espectrofotométricos a diferentes longitudes de onda.

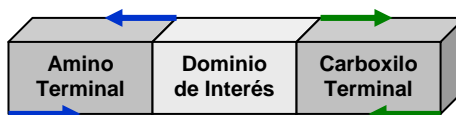
Una vez purificadas las proteínas BLR-1 silvestre y mutante (CXA), se determinaron los cambios de absorción de la proteína, en un espectrofotometro. La lectura se realizó a una absorbancia de 250 nm hasta los 550 nm del espectro. Las proteínas se sometieron al barrido bajo condiciones de luz y oscuridad; es decir, la muestra que ha permanecido en oscuridad, es colocada en el espectofotómetro, y se toma la lectura en el rango ya mencionado, posteriormente ésta muestra se expone a la luz durante cinco minutos, para luego colocarse en el aparato y realizar la lectura.

Para los ensayos espectrofotométricos se utilizó el software Cary 50 (Dell Workstation, Windows 2000), en modalidad de "Simple Reads". Se debe usar como blanco el Buffer A y al colocar una celda de cuarzo con la muestra el equipo proporcionará las lecturas a las diferentes longitudes de onda. Para observar el cambio deben de graficarse los datos obtenidos y la grafica mostrará las diferencias bajo las diferentes condiciones de luz y oscuridad.

RESULTADOS

Construcciones en los diferentes vectores

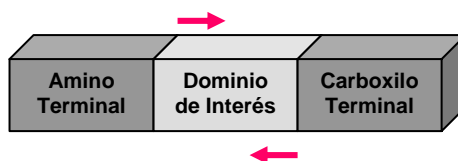
Con la finalidad de determinar la posible función del dominio LOV de la proteína BLR-1, se intercambió el dominio LOV de la proteína BLR-1 por el dominio PAS de la proteína Aer de *E. coli*. Para ello se amplificaron segmentos particulares de estos genes (*blr-1* y *aer*) que codifican para las diferentes proteínas y dominios (ver materiales y métodos), y se clonaron en dos diferentes vectores: pET32a y pTRC99A. De forma general las eliminaciones de dominios se generaron amplificando hacia los extremos terminales de las proteínas, codificadas por la secuencia de ADN, partiendo de los dominios, para posteriormente ligarlos por el sitio único central, generado por los oligonucleótidos usados, el siguiente esquema, en donde los pares de flechas representan un par de iniciadores diferente, muestra de una manera sencilla como se procedió con ambas proteínas:



Para amplificar el extremo amino de Aer se usaron los oligonucleótidos Oli_Aer_LOV F_Bam HI y Oli_Aer_LOV R_Xba I (fragmento de 123 pb), y para el carboxilo se usaron los oligonucleótidos Oli_Aer_LOV F_Xba I y Oli_Aer_LOV R_Hind III (fragmento 1170 pb). En el caso del extremo amino terminal de BLR-1 se usaron los oligonucleótidos Oli Bam HI BLR1 y Oli_Aer_LOV R_Xba I (fragmento de 1030 pb) y para el carboxilo se usaron los oligonucleótidos Oli_Pst I_BlR1 F y Oli Hind III BLR1 (fragmento de 1956 pb) (ver materiales y métodos).

Para generar los intercambios de dominios, se usó la misma estrategia, pero ahora amplificando hacia el dominio, usando el par de oligonucleótidos que generaran el sitio central que contenía la deleción (ver materiales y métodos), es decir, se amplificaba hacia adentro desde los límites de cada dominio. Los oligonucleótidos que se usaron para amplificar el dominio PAS fueron: Oli_Pst I_AER F_PAS y Oli_Pst I_AER R_PAS (fragmento de 387 pb), y para el dominio LOV fueron: Oli_BLR1 LOV R_Xba I y Oli_BLR1 LOV F1_Xba I (fragmento de 480 pb), de la misma manera (ver

materiales y métodos) usando el mismo esquema que en la sección anterior, se mostrará como se hizo:



Cuando se tuvieron los dominios PAS y LOV amplificados, estos se digirieron con la enzima correspondiente y se ligaron en los lugares correspondientes, el LOV en el lugar del PAS y el PAS en el lugar del LOV. Para las construcciones silvestres de Aer y BLR-1 únicamente se realiza un PCR con un par de oligonucleótidos que generarán sitios BamH I y Hind III (ver materiales y métodos), y mediante restricción en estos sitios, y en los mismos sitios en el vector, se generarán las construcciones.

La sustitución de la cisteína por alanina se realizó mediante PCR con un oligonucleótido mutagénico, que además de crear los sitios de restricción deseados, realizaban el cambio en la secuencia que daría como resultado el cambio de aminoácido. Los oligonucleótidos fueron los siguientes: Oli Bgl II Mutación1 y Oligo Cisteína BLR1 (primer PCR, fragmento de aprox. 1600 pb), y SR_Xba I_BLR_1 y SR_Xba I_BLR_R (segundo PCR, fragmento de 3422 pb) (ver materiales y métodos). El producto obtenido mediante el PCR con el oligonucleótido mutagénico se clonó en pGEM T-Easy y se secuenció para comprobar el cambio de cisteína por alanina. En la figura 19 se muestra la secuencia de una de las tres clonas que se enviaron a secuenciar.

GGAAGCAGGATCGAA	CTG	AGAGTTTGTGGACGACGG	nucleótidos	secuencia silvestre
I I G Q N	C	R F F Q A P	aminoácidos	
GGAAGCAGGATCGAA	GCG	AGAGTTTGTGGACGACGG	nucleotides	secuencia mutante
I I G Q N	A	R F F Q A P	aminoácidos	

Figura 19. Muestra la comparación de la secuencia de nucleótidos y aminoácidos para verificar la mutación que genera el cambio de una Cisteína por una Alanina de dominio LOV de la proteína BLR-1

En las figuras 20, 21 y 22 se muestra el análisis por restricción con las enzimas BamH I y Hind III de algunas de las construcciones obtenidas:

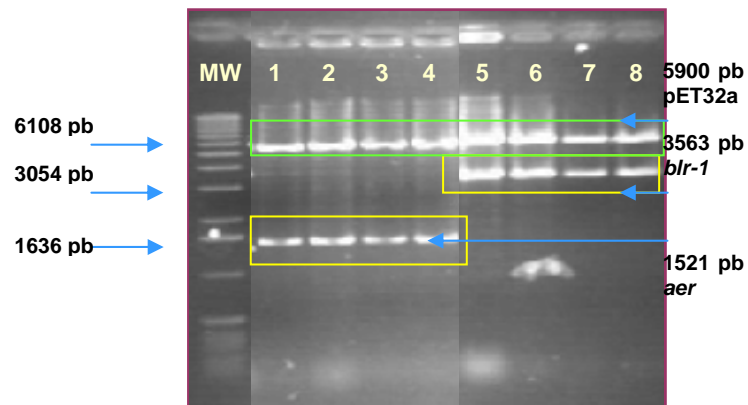


Figura 20. Genes *aer* y *blr-1* (cDNA) en pET32a. La figura muestra la comprobación de que ambos genes ya se encuentran insertos en el vector pET32a. MW = marcador de tamaño molecular; carriles 1 – 4 = clonas de pET32a_Aer; carriles 5 – 8 = clonas de pET32a_BLR-1.

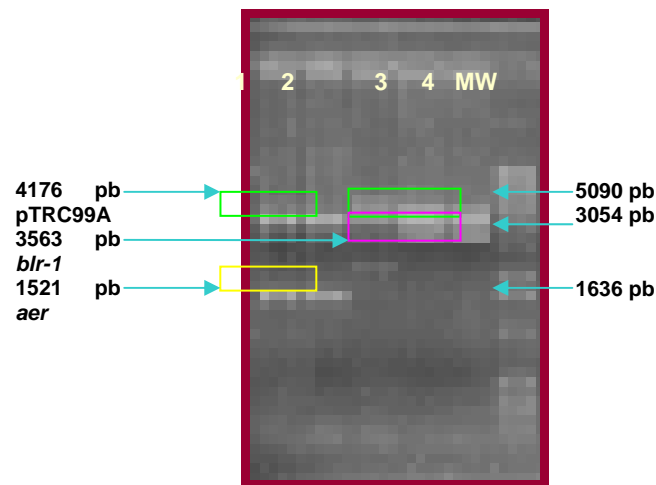


Figura 21. Genes *aer* y *blr-1* (cDNA) en pTRC99A. La comprobación se realizó mediante digestión con Bam HI y Hind III. MW = marcador de tamaño molecular; carriles 1 y 2 = clonas de pTRC99A_Aer; carriles 3 y 4 = clonas de pTRC99A_BLR-1.

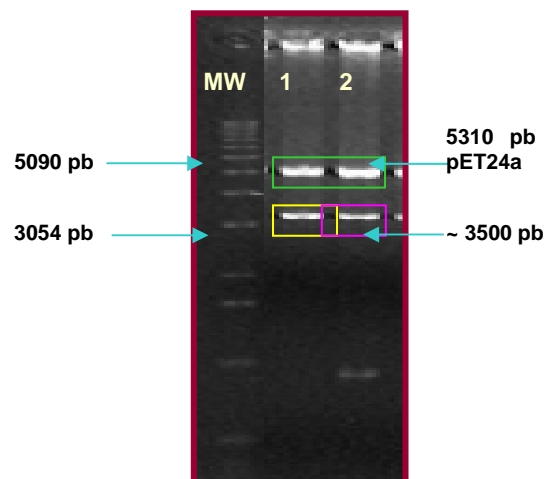


Figura 22. Construcciones de BLR-1 silvestre y mutante, en pET24a. La comprobación se realizó mediante digestión con Bam HI y Hind III. MW = marcador de tamaño molecular; carril 1 = clona de pET24a_BLR-1; carril 2 = clona de pET24a_BLR-1 CxA.

En la siguiente figura se muestra, usando el esquema conocido, las construcciones obtenidas en este trabajo:

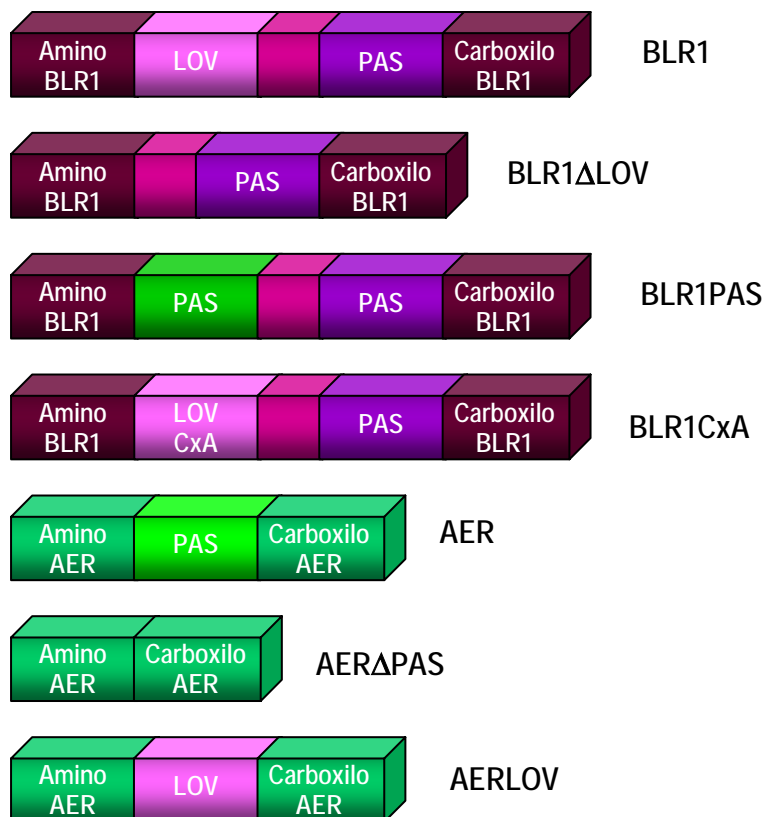


Figura 23. Construcciones obtenidas durante el trabajo de tesis.

Ensayos de Complementación de Función del fenotipo de aerotaxis en *E. coli* con las diferentes construcciones generadas.

Para demostrar una homología funcional entre los dominios LOV de la proteína BLR-1 y el dominio PAS de la proteína Aer de *E. coli*, se llevaron a cabo ensayos de aerotaxis con las diferentes construcciones. En estos ensayos la complementación de la función de los dominios se determinó observando el desplazamiento bacteriano en un medio semisólido con succinato como fuente de carbono (ver Materiales y Métodos). Se debe hacer notar que por error transformamos al vector de expresión pET32a con las diferentes construcciones generadas en la cepa de *E. coli* mutante en el gen Aer, la cual no contiene a la T7 polimerasa del fago T7, y se les realizó en ensayo de aerotaxis. Sorpresivamente, se observó una complementación en todas las construcciones, inclusive para BLR-1 silvestre (figura 24D) y la delección del dominio PAS de Aer (figura 24G). La explicación que podemos dar a este resultado es que

probablemente los genes en nuestras construcciones se están transcribiendo a partir del promotor del gen de la β -lactamasa como una sola unidad transcripcional, permitiendo obtener el producto de las quiméras.

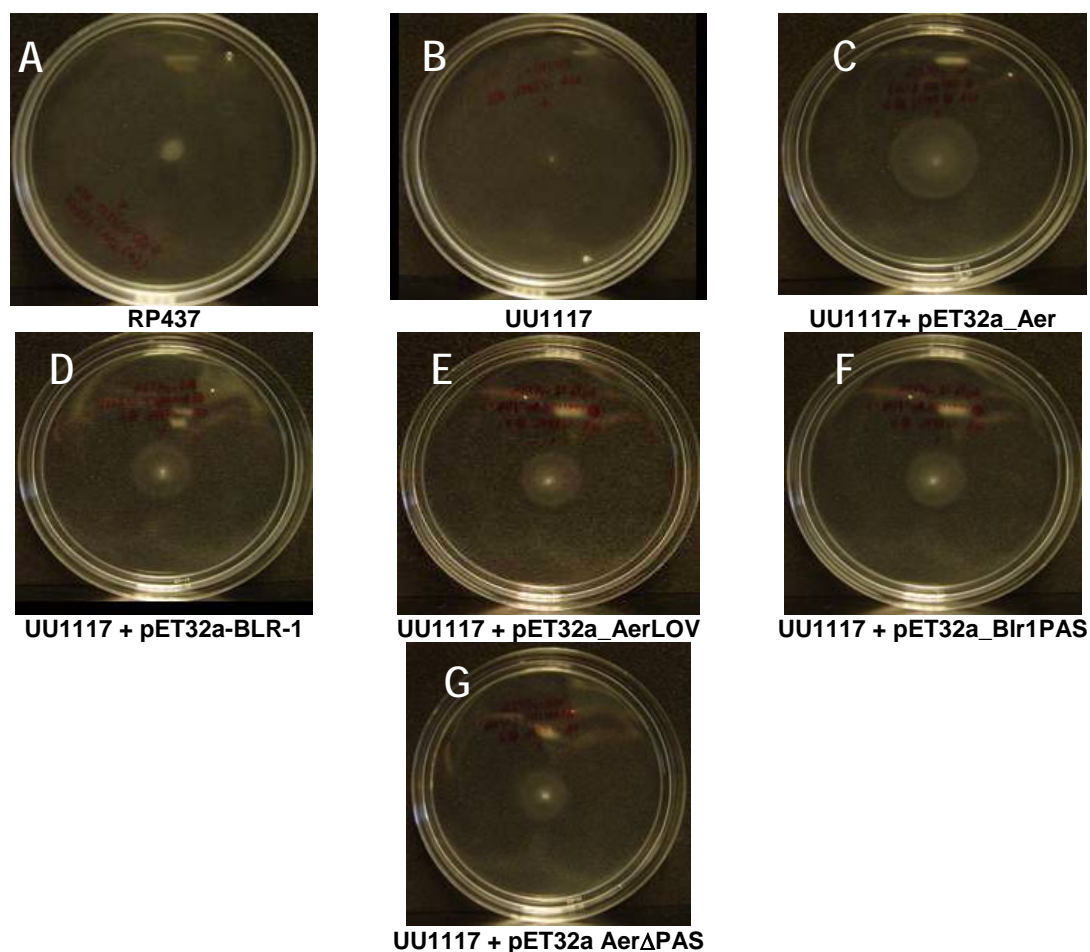


Figura 24. Ensayo de aerotaxis en Swarm Plates, La figura muestra la comparación de desplazamiento (aerotaxis) de las cepas transformadas de *E. coli* con las diferentes construcciones.

Para tener un mayor control de la expresión de los genes híbridos, estos se subclonaron en el vector pTRC99A. Estas nuevas construcciones se analizaron para complementación del fenotipo de aerotaxis. La inducción se llevo a cabo con 25 a 50 μ M de IPTG, ya que se ha reportado que altas concentraciones del inductor inhiben el desplazamiento de la bacteria (Greer-Phillips *et al.*, 2003). Los resultados se muestran en la figura 25.

Como se observa en la figura 25, la cepa RP437 (figura 25A) si presenta desplazamiento, mientras que la UU1117 (figura 25B) no, lo cual concuerda con lo que se esperaba. La cepa mutante transformada con la construcción pBS20 (figura 25C) también presenta desplazamiento ya que sobreexpresa al gen *aer*. En cuanto a las

construcciones, la cepa mutante transformada con la construcción de pTRC99A_ aer (figura 25E), presenta desplazamiento y en mayor medida que la cepa silvestre y el control de pBS20. Con respecto a la construcción del intercambio de dominio aerLOV (figura 25I) no se observó desplazamiento alguno, al igual en el resto de las quimeras y *blr-1* silvestre y mutante (figuras 25F, G, H, J y K), lo cual indica que, que el dominio PAS de Aer y el LOV de BLR-1 podrían no ser funcionalmente análogos (Figura 25).

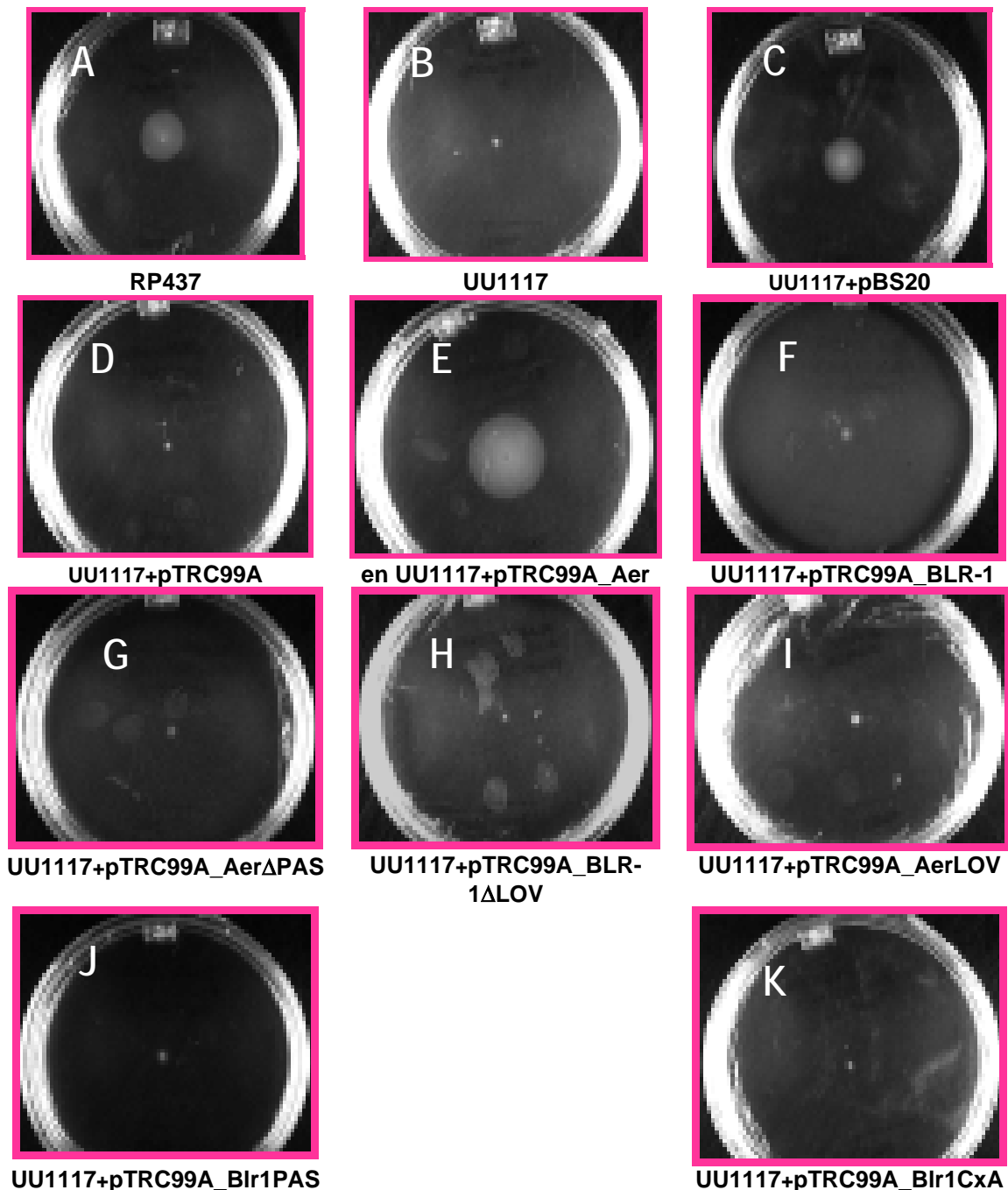


Figura 25. Ensayo de complementación del fenotipo de aerotaxis. La figura muestra un ensayo de platos semisólidos con las diferentes construcciones y sus controles (las primeras cuatro fotos); el ensayo se realizó con 50 μ M de IPTG para todas las transformantes, y antibiótico a la mitad de la concentración que normalmente se usa, para aquellas cepas que fuera necesario el antibiótico.

Ensayos de sobreproducción y purificación de BLR-1 y BLR-1 CxA.

Para la sobreproducción y purificación de las proteínas BLR-1 y BLR-1 CxA se transformaron las construcciones pET24a_*blr-1* y pET24a_*blr-1* CxA a la cepa Rosetta Blue Lys S de *E. coli*. Se realizó una cinética de inducción, a fin de determinar el tiempo óptimo post inducción para la producción de estas proteínas. Se tomó el tiempo de tres horas post inducción para cosecharlas. Es importante mencionar que la producción de las proteínas no fue la esperada.

Las proteínas se purificaron usando el FPLC Äkta. En las figuras 26 y 27 se muestra la absorbancia a 280 nm (eje Y izquierda), de las proteínas presentes en las fracciones colectadas (eje X, el flujo es de 1 mL/min), y la concentración de imidazol a la que fueron desprendidas de la matriz de la columna (eje Y derecha). Se observa un pico (señalado con la flecha) en donde se eluye la mayor concentración de proteína. En la figura 26 la proteína BLR-1 se eluye en la fracción 11, y en la figura 27, la proteína BLR-1 CxA se eluye en las fracciones 18 – 21.

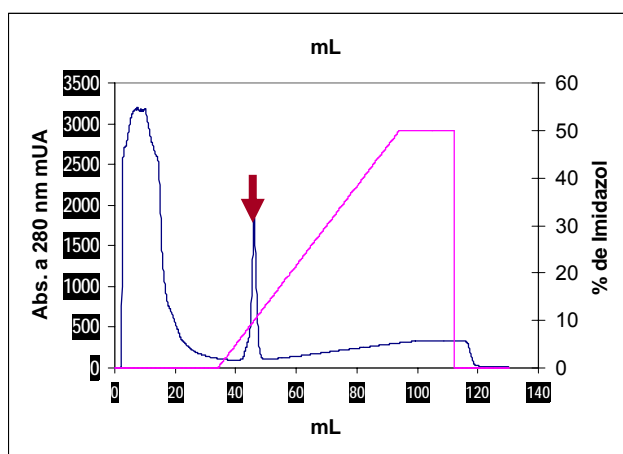


Figura 26. Cromatograma de la purificación de BLR-1. La flecha en rojo muestra la fracción donde se obtuvo la mayor concentración de proteína. La mayor concentración de proteína, corresponde a la fracción 11 y a una concentración del 12.1% de imidazol.

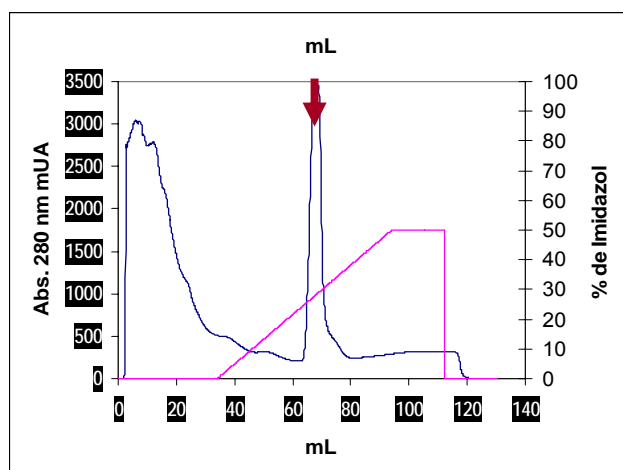


Figura 27. Cromatograma de la purificación de la proteína BLR-1 CxA. La flecha roja indica las fracciones en las cuales se obtuvo la mayor concentración de proteína. La mayor concentración de proteína corresponde a las fracciones 18, 19, 20 y 21, y entre un 25 y 35% de imidazol.

Las fracciones de cada una de las purificaciones (marcadas por los picos), se concentraron mediante precipitación usando el protocolo mencionado en materiales y métodos. Las fracciones se concentraron a un volumen de un mililitro y se cuantificaron espectrofotométricamente (abs_{280} del precipitado – abs_{280} del BufferA). Se obtuvo una concentración de 150 $\mu\text{g/mL}$ y de 9.07 mg/mL para BLR-1 y BLR-1 CxA, respectivamente.

En la figura 28 se muestra un gel de poliacrilamida teñido con un buffer específico para la detección de los “tags” de histidinas presentes en las proteínas BLR-1 y BLR-1 CxA. Esta tinción se realizó con la finalidad de determinar la presencia de las proteínas en las fracciones seleccionadas y concentradas.

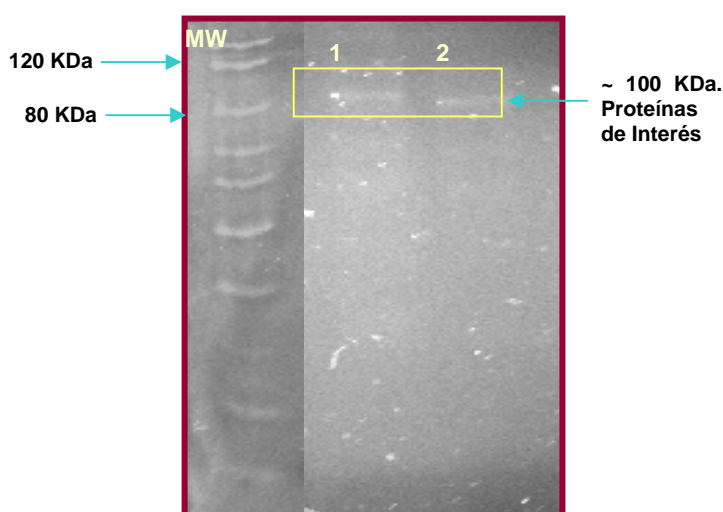


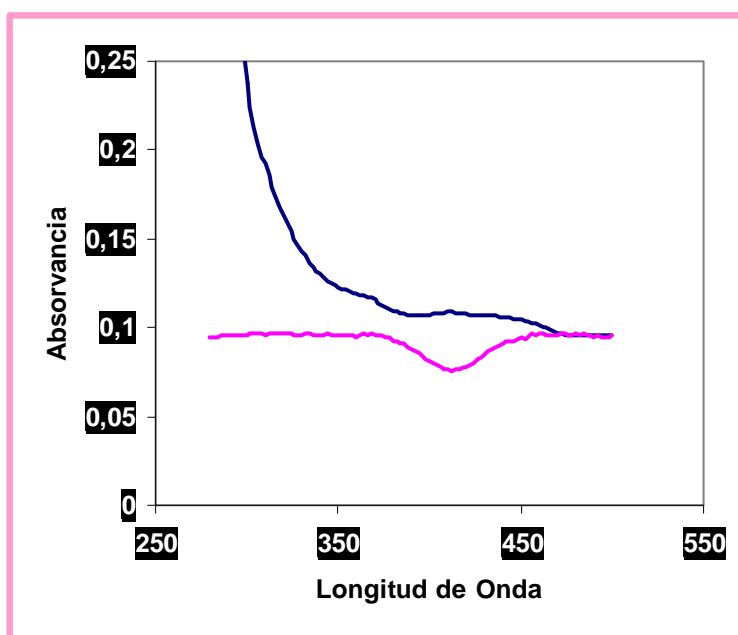
Figura 28. SDS-PAGE. En la figura se muestra un gel de poliacrilamida al 12%, en donde se muestran las fracciones obtenidas para las proteínas BLR-1 silvestre y mutante, con la tinción específica para his-

tag. MW = marcador de peso molecular; caril 1 = BLR-1; carril 2 = BLR-1 CxA. Del marcador de tamaño molecular se cargaron 2 μ L y para ambas proteínas se cargaron 10 μ g de proteína.

Ensayos de Espectrofotetría (Absorbancia) en condiciones de Luz y Oscuridad.

Con la finalidad de determinar la función de la Cisteína (C389) durante la percepción de la señal luminosa, se decidió someter a ambas proteínas a un análisis espectrofotométrico a diferentes longitudes de onda (250 – 550 nm), en condiciones de luz y oscuridad. Estos experimentos se hicieron con las proteínas puras y con extractos crudos. En el primer experimento (figuras 29A y B) no se observó una diferencia significativa en la percepción de la señal luminosa en condiciones de luz y de oscuridad en BLR-1 y BLR-1 CxA, además de que en la gráfica para BLR-1 (figura 29A) ni siquiera es posible observar el pico esperado de la absorción de flavinas en solución.

A



B

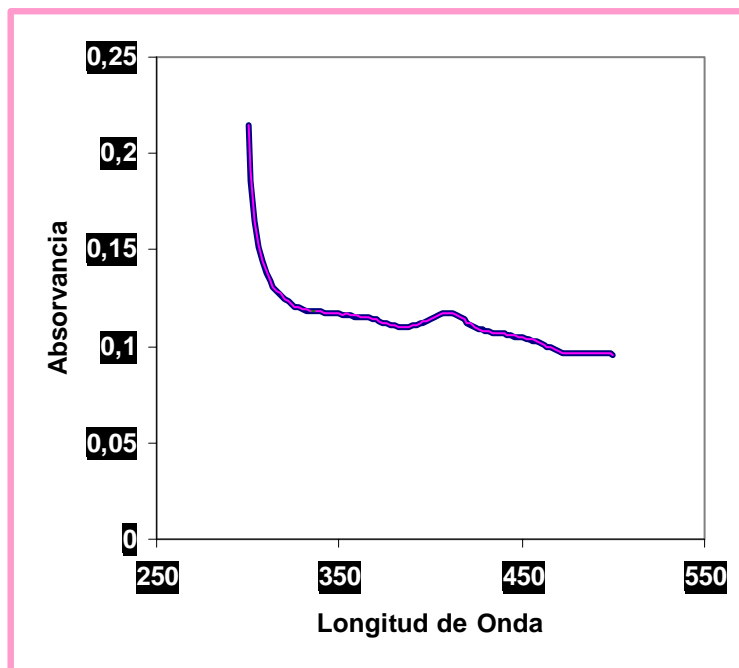
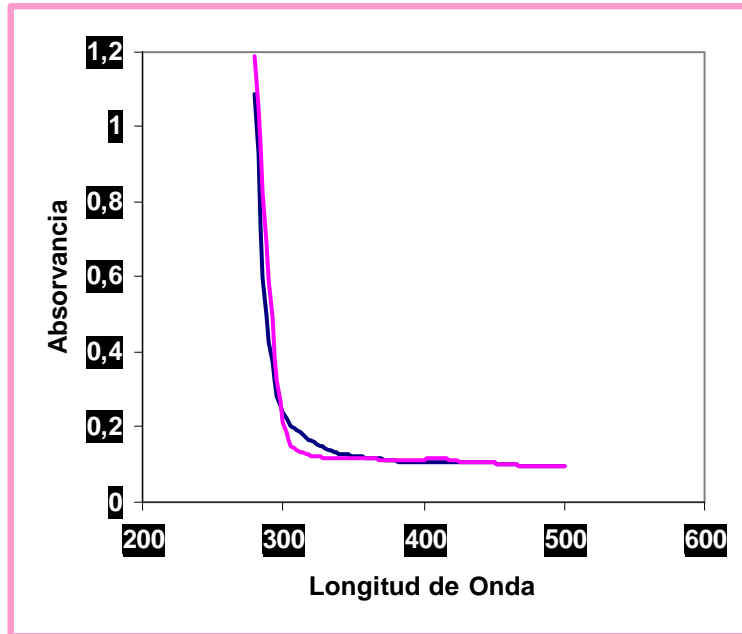


Figura 29. La figura muestra las gráficas de absorvancia obtenidas para BLR-1 (A) y BLR-1 CxA (B). La línea rosa es oscuridad y la azul es luz.

Sin embargo en el segundo experimento (figuras 30A y B), se puede observar que el ensayo con los extractos crudos muestra una diferencia en las lecturas para BLR-1 y BLR-1 CxA en condiciones de luz (figura 30B). esta diferencia corresponda a uno de los picos (el de 400 nm) de la absorción de las flavinas. Lo anterior permite pensar que es posible que el residuo de C389 sea importante durante la percepción de la señal Iminosa, además de que abre la necesidad de identificar el cofactor que une BLR-1 durante esta función.

A



B

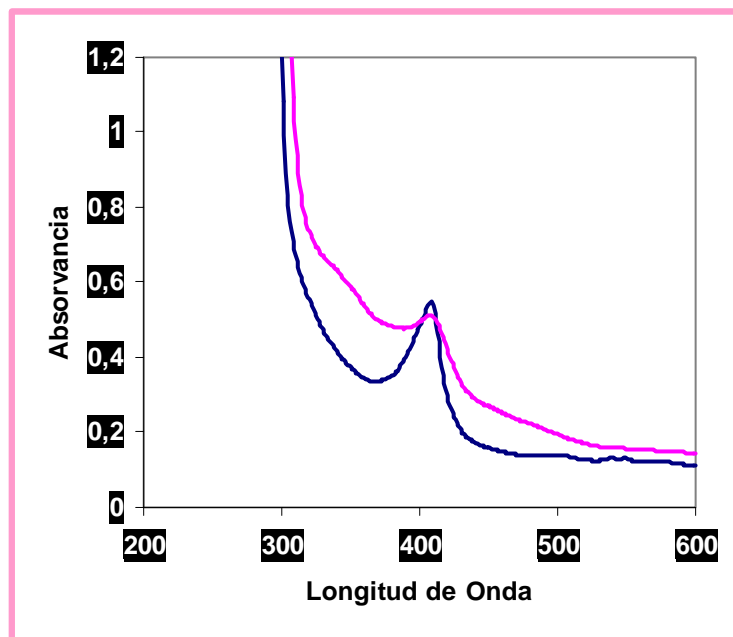


Figura 30. La figura muestra las comparaciones en condiciones de luz de BLR-1 y BLR-1 CxA purificadas (A) y de los extractos crudos correspondientes (B). La línea azul representa a BLR-1 y la rosa a BLR-1 CxA en ambas gráficas

DISCUSIÓN

Ensayos de complementación de la función de aerotaxis en *E. coli*.

Los dominios PAS son módulos de señalización que detectan cambios de luz, potencial redox, oxígeno y de los niveles de energía interna de una célula y han sido identificados de proteínas desde bacterias hasta eucariotes. Estas incluyen cinasas del tipo histidina y serina/treonina, quimiorreceptores y fotoreceptores para la taxis y el tropismo, proteínas del ciclo circadiano, canales iónicos activados por voltaje, fosfodiesterasas de nucleótidos, reguladores de la respuesta a hipoxia y desarrollo embrionario del sistema nervioso central. Aunque la secuencia de aminoácidos de los diferentes dominios PAS muestran una similitud muy baja, sus estructuras tridimensionales parecen estar conservadas. Recientemente se clonaron y caracterizaron los genes *blr-1* y *blr-2* de *T. atroviride*, los ortólogos de *wc-1* y *wc-2* de *N. crassa*. El análisis de la secuencia de aminoácidos reveló que BLR-1 contiene tres dominios PAS y un dominio de dedo de zinc, y carece del dominio de activación que presenta WC-1, mientras que BLR-2, contiene un dominio PAS y un dominio de dedo de zinc. El primer dominio PAS de WC-1 y BLR-1 pertenecen a la subfamilia de dominios LOV, cuyos miembros se ha determinado que unen flavinas de manera no covalente y se especializan en percibir señales de luz azul y ultravioleta. La interrupción de los genes *blr-1* y *blr-2* bloqueó por completo la fotoconidiación y la expresión inducida por luz del gen *phr-1* (Casas-Flores *et al.*, 2004). Adicionalmente, durante la caracterización de las mutantes *blr*, se observó que se elimina la conidiación por limitación de carbono, pero si conidian en limitación de nitrógeno (Casas *et al.*, 2004). El metabolismo de los carbohidratos se ha relacionado con los cambios en la morfogénesis reproductiva. Se sabe también para otros organismos que la limitación de nutrientes conduce a la producción de especies reactivas de oxígeno y que generan un estrés oxidativo, lo cual probablemente lleve al proceso de diferenciación celular. Las proteínas Aer y NifL de *E. coli* y *A. vinelandii* respectivamente, contienen dominios PAS los cuales son capaces de unir FAD como cofactor y detectar cambios en el potencial redox y de las concentraciones de oxígeno. Estas proteínas son consideradas como monitores del estado redox interno de la célula. Las proteínas BLR-1 y BLR-2 de *T. atroviride* contienen dominios PAS y es posible que al igual que de Aer y NifL funcionen

monitoreado el estado redox. Un desbalance del estado redox que al verse descompensado, (como en el caso de limitación de nutrientes) podría ser una señal detectada por los dominios PAS de las proteínas BLR que al sufrir un cambio conformacional para activarse induciría la esporulación. Con los objetivos planteados para este trabajo, se pretendía entender los mecanismos genéticos y moleculares en la percepción de la luz y de la esporulación por limitación de nutrientes en *Trichoderma* y caracterizar la posible relación de los dominios PAS y LOV en estos fenómenos.

De las cinco construcciones realizadas en el vector pET32a: Aer, BLR-1, Aer Δ PAS, AerLOV y BLR-1PAS, se observó desplazamiento y el anillo típico de aerotaxis. Esto sugiere que los dominios PAS de Aer y LOV de BLR-1 son funcionalmente análogos. Interesantemente, al realizar los ensayos de complementación de función con las construcciones en el vector pTrc99A (pTRC99A), no se observó complementación más que en aquellas donde se expresó el gen Aer silvestre.

Una posible explicación para este fenómeno puede ser que el gen clonado bajo el promotor T7, se está cotranscribiendo a partir del gen que codifica para la β -lactamasa que se encuentra río arriba de la construcción de interés. Este fenómeno ha sido documentado ampliamente en los vectores pET (NovagenTM) que son ampicilina (carbenicilina) resistentes.

Además la complementación puede explicarse ya que *E. coli* presenta cuatro proteínas quimiorreceptoras de la familia de receptoras de metilos (MCPs): Tar, Tsr, Tap y Trg, que junto con Aer forman parte de un complejo de señalización para dirigir la quimiotaxis y el MDE (Gosink et al., 2006). Estos MCPs actúan con las proteínas CheA, CheW y CheY para permitir el cambio en la rotación del flagelo e inducir a la bacteria a desplazarse en gradientes de substratos hacia las concentraciones de éstos que les sean propicias para su desarrollo.

De los cuatro MCPs, Tsr es uno de los más abundantes, y se ha reportado que en cepas que no tienen el gen *aer* (o se encuentra defectuoso), pero sí los genes *cheA*, *cheW*, *cheY* y *tsr*, al inducir con IPTG, el fenómeno de aerotaxis se recupera (Greer-Philips et al., 2003); esto sucede también a la inversa, presentes *cheA*, *cheW*, *cheY* y

aer, aún sin ninguno de los cuatro MCPs, el fenómeno de aerotaxis se presenta y la quimiotaxis se lleva a cabo cuando se induce con IPTG.

Lo anterior señala que en ausencia de *Aer*, al sobreexpresar *Tsr* y los demás MCPs, el fenómeno de aerotaxis puede reestablecerse, en una cepa que no tenga los genes *cheA*, *cheW*, *cheY* alterados, que es el caso de la cepa UU1117, por lo que se puede decir que la inducción dependiente del promotor de la β -lactamasa sobreexpresa a *Tsr*, que junto con los demás componentes para quimiotaxis, suple la función del dominio PAS de *Aer* durante el fenómeno de aerotaxis. Es por lo anterior, por lo que se observa el fenómeno de aerotaxis aún en la construcción *Aer* Δ PAS (la cual conserva el dominio *Tsr*), que se esperaba se comportara como la mutante en la que no se observa ni crecimiento bacteriano ni desplazamiento aerotático.

En *N. crassa*, al realizarse intercambios de dominios, se ha sugerido que los dominios LOV pueden adaptarse a las funciones de los dominios PAS, aunque no suplen totalmente la función (Ping *et al.*, 2003). Sin embargo en los resultados obtenidos en el presente trabajo de tesis, no se observa complementación de función entre el dominio PAS de *Aer* y el LOV de BLR-1 (figura 24), pues no se observa el fenómeno de aerotaxis ni en *Aer*LOV, ni en ninguna de las otras construcciones, a excepción de pTRC99A_*Aer*.

Se visualizan diversas propuestas que podrían explicar dichos fenómenos, una de ellas se desprende del hecho de que en *N. crassa* se realizaron intercambios entre dominios LOV de tres diferentes proteínas, WC-1 y VIVID de *N. crassa* y FKF1 de *Arabidopsis thaliana*; además se comparan otras dos proteínas más: ZTL y LKP2, también de *Arabidopsis*, que son muy similares a FKF1 (Ping *et al.*, 2003). En el ensayo se observa que el intercambio de dominios LOV entre WC-1 y VIVID reestablece varias respuestas a luz en *N. crassa*, incluido la inducción por luz del gen *frq* y el encarrilamiento del ritmo circadiano. Cuando se reemplaza el dominio LOV de WC-1 por el de FKF1, sí se observa un reestablecimiento de respuestas, solo que es un reestablecimiento parcial, pues solo se observaron respuestas débiles a luz; estos datos sugieren que, pese a las similitudes entre los dominios LOV de WC-1, VIVID y FKF1, los dominios son en sí diferentes, y tales diferencias pueden reflejar las

distinciones funcionales que cada proteína tiene en su propio sistema (Ping *et al.*, 2003).

Los datos anteriores sugieren que es más fácil el reestablecimiento funcional entre dominios del mismo tipo, es decir, reemplazar dominios LOV por dominios LOV, y muy probablemente con el intercambio de dominios PAS por dominios PAS; el estar intercambiando un dominio LOV por un PAS podría reducir la funcionalidad de la proteína, es quizá por eso que no se observa aerotaxis en AerLOV, pues aunque el dominio LOV pertenece a la familia de los dominios PAS, sus funciones son diferentes, más especializadas, y como se menciona, son de sistemas diferentes, una bacteria y un hongo, por lo que las rutas de señalización tienen diferencias que entorpecen la correcta detección de la concentración óptima de oxígeno, evitando el desplazamiento bacteriano, y por ende, el fenómeno de aerotaxis.

Se ha reportado que la zona de Aer que se encuentra anclada a la membrana en *E. coli* forma dos regiones transmembranales (TM1 y TM2) que flanquean un “loop” periplásmico central; además se ha mostrado que el extremo N-terminal del dominio PAS y el dominio HAMP localizado en el extremo C-terminal de Aer son citoplásmicos. Los residuos que conforman a TM1 y a TM2 no muestran la periodicidad que se esperaría para interacciones cercanas entre hélices vecinas (relacionadas); es decir, que la secuencia de aminoácidos en los segmentos transmembranales de Aer no muestran variación periódica en polaridad, como se esperaría para interacciones TM-TM, lo cual es consistente con el bajo nivel de conservación de secuencia encontrado en la región de anclaje de membrana (Amin *et al.*, 2005).

En base a lo anterior se desprende la siguiente propuesta, en donde se debe tener en cuenta que el dominio LOV de BLR-1 es de mayor tamaño (pb) que el PAS de Aer, y que quizá al insertarse en el sitio del PAS podría estar alterando la estructura de los segmentos transmembranales, lo que ocasionaría que Aer no funcionara correctamente debido a su desestructuración “intramembranal”; además, se menciona que estos segmentos, junto con el PAS, mantienen una polaridad sin cambios, y pudiera ocurrir, que la carga de los residuos del LOV altere también esta distribución, lo que podría interferir con la correcta detección de la señal, pues se debe recordar que la detección en el cambio del potencial redox del ETS se basa en cambio de cargas, lo

que es transmitido a través del FAD que se une al PAS; es posible que el cambio en la distribución de cargas, consecuencia de la diferencia de residuos entre el LOV y el PAS, orille a una interpretación “errónea” del estado redox intracelular, y por lo tanto, de la concentración de oxígeno de la zona de la placa en la que se encuentra.

Siguiendo la misma línea, se está hablando de que los residuos hacia el N-terminal del PAS y el HAMP estabilizan la conformación de todo el dominio PAS, y por ende, de Aer, y la unión de ésta a FAD. Pero si LOV es de mayor tamaño y quizá más hidrofóbico, podría estar desestabilizando a los residuos del HAMP, esto podría dar como resultado una proteína que se detectara como no plegada correctamente y que no uniría FAD establemente, que no sería liberada de la chaperona GroEL, de manera que no existiría proteína que llevara a cabo la función de aerotaxis. Lo anterior se desprende de la idea de que se una primero el FAD a Aer no madura y luego esta entre a la chaperona para ser plegada correctamente y ahora sí poder realizar su función (Herrmann *et al.*, 2004).

La última propuesta se basa precisamente en si el dominio LOV de BLR-1 une naturalmente FAD, o une FMN como las fototropinas de plantas, ya que Aer une FAD, pero puede unir en menor grado y de forma mucho menos estable FMN. La especificidad de la unión depende de los residuos en el centro (core) del PAS; los residuos críticos para la unión del FAD se encuentran entre los residuos 1 y 298, que corresponden a la porción “aerodetectora” de la molécula y aunque existen reportes de que la familia de dominios PAS puede adaptarse a una buena variedad de ligandos, como FAD (NifL y Aer), FMN (NPH1), hemo (FixL), ácido 4-hidroxicinámico (PYP) y dioxina (HERG) (Bibikov *et al.*, 2000), se ha logrado mostrar que dicha variabilidad depende de su estructura primaria, es decir, los aminoácidos que conforman la cadena polipeptídica.

Aún no se reporta que tipo de flavina une el dominio LOV de BLR-1 en *T. atroviride*, y la posibilidad de que quizá podría unir FMN en lugar de FAD, lleva a la posibilidad de que la detección de la señal para aerotaxis en Aer podría estar siendo detectada débilmente, porque aunque Aer sí puede unir FMN, lo hace de una forma menos estable que con FAD; es por eso que es sumamente importante saber que cofactor esta uniendo BLR-1. Como ya se mencionaba al insertar el dominio LOV en el

lugar del PAS podría estarse alterando el correcto plegamiento de Aer, y esto podría también deberse a la diferencia de residuos entre el dominio LOV y el dominio PAS, pues como ya se ha dicho, la conservación de residuos entre los miembros de ésta familia no es mucha, mas bien se conservan a nivel de estructura terciaria, y al existir una diferencia en la cadena polipeptídica por la inserción del dominio LOV, haría que Aer detectara incorrectamente la señal, o que sí logra detectarla, no la transmita de la forma correcta al siguiente actor de la cascada de señalización o activador transcripcional.

Se sabe que Aer es capaz de participar en la formación de trímeros de dímeros, durante la quimiotaxis, y que en dependencia de ésta y el cambio en la rotación del flagelo que es consecuencia de ella, la bacteria puede desplazarse hacia la concentración óptima de oxígeno que le es propicia para su desarrollo y supervivencia; se sabe también que los encargados de la interacción proteína-proteína son los dominios PAS, entonces, se podría pensar que al intercambiar el dominio PAS por el LOV (que no se especializa en interacciones proteína-proteína) la formación de éstos trímeros de dímeros podría estar alterada durante la aerotaxis/quimiotaxis, y por ende, no se transmita correctamente la señal de cambio de rotación hacia los motores flagelares, y por lo tanto, la bacteria no logre desplazarse hacia la concentración óptima de oxígeno que necesita.

Ya se tiene documentado que la oxidación y reducción del FAD genera las señales de encendido y apagado para la aerotaxis, esto mediante la interacción del dominio PAS con un componente del ETS; los cambios en el estado redox del FAD reflejan los cambios en el potencial redox dentro del ETS celular (Taylor *et al.*, 1999). Al realizar el cambio del dominio PAS en Aer por el LOV de BLR-1, y recordando que éste último dominio se encarga de detectar Luz, Oxígeno y Voltaje en una manera directa, es comprensible pensar que existiría una diferencia entre la detección del oxígeno como resultado del pulso luminoso (en formas de ROS), que hacerlo indirectamente como aceptor de electrones en el ETS, lo cual podría provocar un desbalance en la cascada de transducción de señales.

Todas las propuestas anteriores nos hacen notar que, a diferencia de lo que se podría pensar, en un intercambio de dominios pertenecientes a la misma familia, pero

con características y funciones específicas, la estructura primaria sí es importante; y aunque conserven una estructura tridimensional similar, para el correcto funcionamiento del dominio en su sistema, es necesario que la estructura primaria este también conservada.

El papel del dominio LOV y la Cisteína conservada durante la percepción de la luz azul en *T. atroviride*

Al observarse que las respuestas a luz azul son disparadas por el complejo BLR-1/BLR-2, y que estas proteínas son ortólogas a WC-1 y WC-2 se esperaba que, al igual que en *N. crassa* en donde el fotorreceptor es WC-1, en *T. atroviride* fuera BLR-1. Para ello se necesitaba dilucidar el papel del dominio LOV de BLR-1 y el aporte que pudiera tener el residuo de cisteína conservado, cabe mencionar que ambos elementos se encuentran presentes en WC-1 y en la mayoría de los fotorreceptores para luz azul de diversos organismos.

En *N. crassa* se demostró que el complejo WC-1/WC-2 (asociado a FAD), es el responsable de la percepción de la señal luminosa; al mutar sitios putativos de unión a FAD en el dominio LOV de WC-1, se puede ver que esos residuos son importantes para la función en luz de WC-1. La estructura del dominio LOV de WC-1 es similar al de las fototropinas de plantas, y en su estructura se encuentra la cisteína conservada presente en los dominios LOV de las fototropinas (Ping *et al.*, 2003). En BLR-1 esta presente un dominio LOV, y dentro de éste el residuo de cisteína conservado; y como al mutagenizar la cisteína conservada del dominio LOV de WC-1 no se observa respuesta a luz, es fácil pensar que el dominio LOV de BLR-1, y por consiguiente la cisteína conservada, son los responsables de la percepción de la luz azul en *T. atroviride*. Al realizar el cambio de la cisteína por una alanina en el dominio LOV de BLR-1, y comparar datos preliminares de espectrofotometría de las respuestas a la luz azul entre esta mutante y BLR-1 silvestre, se puede observar aunque no de manera contundente que la señal luminosa no es correctamente captada por la mutante (figuras 30 y 31), indicando que dicho residuo es importante en la percepción de la señal luminosa, y por ende, en las respuestas del hongo a ésta.

Como la estructura de ambos sistemas es similar a las regiones donde se encuentran los dominios LOV en las fototropinas de plantas, es permisible compararlos con ellas. Mutaciones en los residuos de cisteína conservados en los dominios LOV de las fototropinas, bloquean el fotociclo y la formación del aducto, inducido por luz, entre el FMN y la cisteína, sin afectar la habilidad de las proteínas para unir flavina; lo que hace pensar que el sistema para la formación del aducto entre el dominio LOV de BLR-1 y la flavina, es similar al de las fototropinas, y que obviamente, al cambiar el residuo, el fotociclo no se lleva a cabo y las respuestas a la luz azul no se disparan. Dentro de esta misma línea, en el dominio LOV2 de fototropina, el mismo cambio de residuo (Swartz *et al.*, 2001) que el que se hizo en este trabajo, permite los pasos iniciales del fotociclo pero no logra formarse el aducto, es decir, se llega a un intermediario que absorbe a 390 nm, pero no se logra pasar a la forma de la proteína activa. Aunque en los resultados se presenta un pico alrededor de los 400 nm en la silvestre que casi no aparece en la mutante, son necesarios mas estudios (quizá de fluorescencia), para demostrar contundentemente que el fotociclo que se lleva a cabo en BLR-1, se realiza de manera parcial como en las fototropinas; además es necesario que se identifique la flavina que BLR-1 esta uniendo.

En *Avena sativa*, la mayor absorción presentada a un pulso de luz azul, en uno de sus dominios LOV, también cae en los 390 nm sugiriendo la formación de un aducto entre el carbono cuatro del FMN y el tiol de la cisteína. El cambio del residuo por una alanina trae como consecuencia que la proteína mutante no sea capaz de detectar la señal luminosa (Salomon *et al.*, 2001), lo cual concuerda con los resultados obtenidos para BLR-1 de *T. atroviride*. Suponiendo que el comportamiento de *N. crassa*, y por ende *T. atroviride*, se comportan mas cercano a las fototropinas de plantas durante la detección de la luz azul, se podría esperar que en el dominio LOV de BLR-1, la formación del aducto se facilita por que el grupo sulfidrilo de la cisteína se encuentra cerca del carbono cuatro del anillo de isaioxacina del cromóforo. Los cambios inducidos por la luz involucran cambios significativos en el ambiente de un gran número de átomos, lo que se explica mejor como cambios conformacionales, que son efectos secundarios causados por cambios estructurales involucrados en la unión covalente cromóforo-proteína; podría decirse pues, que los cambios conformacionales de los dominios LOV inician la formación del complejo BLR-1/BLR-2 y que la formación del

aducto puede actuar como un “switch” optomecánico que dispara la cascada de señalización consecuencia de la luz azul.

Sin embargo, no solo el residuo de cisteína es el responsable de la detección de la señal, sino que son necesarios mas residuos cercanos a éste para estabilizar al cromóforo y la formación del aducto. Al comparar dominios LOV de tres diferentes organismos: *Arabidopsis*, arroz y a *Chlamydomonas reinhardtii* se observó que varios de los aminoácidos conservados juegan un papel importante en la formación del centro de unión del fotorreceptor con el cromóforo, esto mediante la formación de puentes de hidrógeno y fuerzas de van der Waals; éstos aminoácidos se encuentran en la proximidad del anillo de isoaloxacina del cromóforo (Kasahara *et al.*, 2002). Es este un detalle interesante, porque podría explicar el porque se observa un pequeño hombro alrededor de los 400 nm en BLR-1 CxA (figura 31), y aunque es claro que la señal luminosa no esta siendo detectada como con BLR-1, el hombro se encuentra presente; quizá el cromóforo (aún desconocido) sí se encuentra unido a la proteína, estabilizado por los otros residuos conservados, pero sin poder detectar la señal luminosa debido a la ausencia del la cisteína, y obviamente, del aducto. Esto esta en concordancia con lo que anteriormente se mencionara, refiriéndose a que el fotociclo tiene intermediarios antes de llegar a una formación de aducto estable; quizá en BLR-1 se formen uno o varios intermediarios antes de la detección total de la señal, evento que se interpreta como la formación estable del aducto, y podría ser, en el caso de BLR-1 CxA, que este (os) intermediarios estén formados y estabilizados por los residuos conservados aledaños, por eso el hombro, pero no se pueda detectar la señal finalmente a causa de la ausencia de la cisteína conservada. Un dato que merece mención es que los extractos crudos presentaban una coloración amarilla típica de flavinas en solución, que desaparecía en las fracciones colectadas después de la purificación por columna. Esto sugiere que el cofactor podría estar ausente en las proteínas puras, por lo que no se observa la respuesta esperada

En base a la información recopilada, se ha propuesto un modelo del funcionamiento del complejo BLR-1/BLR-2 en condiciones de luz azul (Casas-Flores *et al.*, 2006) (figura 32). El presente trabajo de tesis se ha centrado en la primera parte del modelo que incluye la percepción de la señal luminosa, que activaría al complejo en su papel de regulador transcripcional, disparando así las respuestas a la luz azul. Son

necesarios más estudios, sobretodo enfocados a la identificación del cromóforo que BLR-1 une en su dominio LOV, además de estudios de mutagénesis sobre los residuos conservados aledaños, y el papel que pudieran tener en la estabilidad de la unión cromóforo-BLR-1 para la formación del aducto entre ellos.

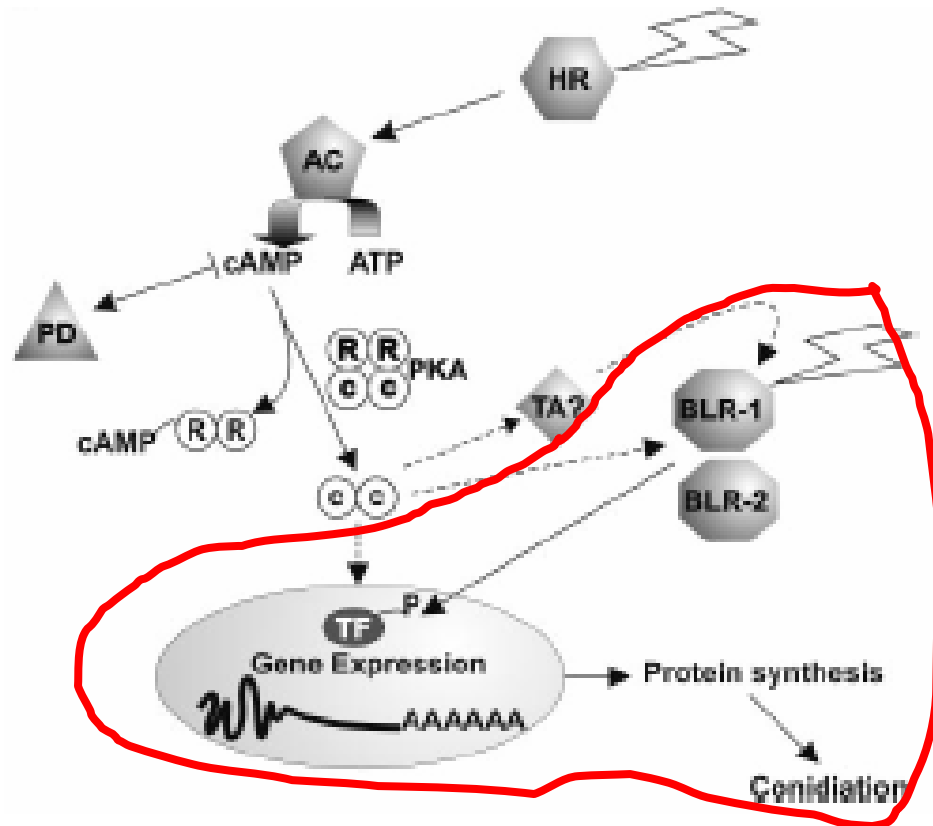


Figura 31. Modelo propuesto para las respuestas a la luz azul en *T. atroviride*. La zona en rojo muestra en que parte del modelo se centro el presente trabajo de tesis.

CONCLUSIONES

1. El dominio LOV de la proteína BLR-1 no es funcionalmente análogo con el dominio Pas de la proteína Aer.
2. Los resultados obtenidos por espectrofotometría realizados con las proteínas BLR-1 silvestre y mutante purificadas no mostraron la respuesta típica de flavinas.
3. Los resultados obtenidos por espectrofotometría realizados con el extracto crudo correspondiente a la proteína BLR-1 silvestre mostraron solamente uno de los picos típicos de flavinas, pero la mutante no muestra ninguno.

BIBLIOGRAFÍA

1. Alexandre G., Greer S. E. y Zhulin I. B. (2000). Energy taxis is the dominant behavior in *Azospirillum brasilense*. *J. Bacteriol.*, 182:6042-6048
2. Amin D. N., Taylor B. L. y Johnson M. S. (2006). Topology and Boundaries of the Aerotaxis Receptor Aer in the Membrana of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 894-901
3. Aro N., Saloheimo A., Ilmen M. y Penttila M. (2001). ACEH, a novel transcriptional activator involved in regulation of cellulase and xylanase genes of *Trichoderma reesei*. *J. Biol. Chem.*, 41:688-697
4. Aronson B., Johnson K., Loros J. J. y Dunlap J. C. (1994). Negative feedback defining a circadian clock: autoregulation in the clock gene *frequency*. *Science* 263:1578-1584
5. Arpaia G., Loros J. J., Dunlap J. C., Morelli G. y Macino G. (1995). Light induction of the clock-controlled gene *ccg-1* is not transduced through the circadian clock in *Neurospora crassa*. *Mol. Gen. Genet.*, 247:157-163
6. Baca M., Borgstahl G. E., Boissinot M., Burke P. M., Williams D. R., Slater K. A. y Getzoff E. D. (1994). Complete chemical structure of photoactive yellow protein: novel thioester-linked 4-hydroxycinnamyl chromophore and photocycle chemistry. *Biochemistry*, 33:14369-14377
7. Berrocal-Tito G., Rosales-Saavedra T., Herrera-Estrella A. y Horwitz B. A. (2000). Characterization of blue-light and development regulation of the photolyase gene *phr-1* in *Trichoderma harzianum*. *Photochem. Photobiol.*, 71:662-668
8. Beshpalov V. A., Zhulin I. B. y Taylor B. L. (1996). Behavioral responses of *Escherichia coli* to changes in redox potential. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 93:10084-10089
9. Betina V. y Farkas V. (1998). Sporulation and light-induced development in *Trichoderma*
10. Bibikov S. I., Biran R., Rudd K. E. y Parkinson J. S. (1997). A signal transducer for aerotaxis in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 179:4075-4079
11. Bibikov S. I., Barnes L. A., Gitin Y. y Parkinson J. S. (2000). Domain organization and flavin adenine dinucleotide-binding determinants in the aerotaxis signal transducer Aer of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 97:5830-5835
12. Briggs W. R. y Huala E. (1999). Blue-light photoreceptors in higher plants. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.*, 15:33-62
13. Buchert J., Oksanen T., Pere J., Siika-Aho A., Suurnäkk A. y Viikari L. (1998). Applications of *Trichoderma reesei* enzymes in the pulp and the paper industry., 343-363
14. Carattoli A., Cogoni C., Morelli G. y Macino G. (1994). Molecular Characterization of upstream regulatory sequences controlling the photoinduced expression of the *albino-3* gene of *Neurospora crassa*. *Mol. Microbiol.*, 13:787-795
15. Casas-Flores S., Ríos-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 *Trichoderma atroviride*. *Microbiology*, 150:3561-3569
16. Casas-Flores S., Ríos-Momberg M., Rosales-Saavedra T., Martínez-Hernández P., Olmedo-Monfil V. y Herrera-Estrella A. (2006). Cross Talk between a Fungal Blue-Light Perception System and the Cyclic AMP Signaling Pathway. *Eukariotic Cell*, 5:499-506
17. Cerdá-Olmedo E. (2001). *Phycomyces* and the biology of light and color. *FEMS Microbiology Reviews*, 25:503-512

18. Cortés C., Gutiérrez A., Olmedo V., Inbar J., Chet I. y Herrera-Estrella A. (1998). The expresión of genes involved in parasitism by *Trichoderma harzianum* is tiggered by a diffusible factor. *Mol. Gen. Genet.*, 260:218-225
19. Corrochano L. M., Lauter F. R., Ebbole D. J. y Yanofsky C. (1995). Light and developmental regulation of the gene *con-10* of *Neurospora crassa*. *Dev. Biol.*, 167:190-200
20. 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
21. Chet I. (1978). *Innovative Approaches to Plant Disease Control*, Ilan Chet (editor). Wiley and Sons, Nueva York, pp 137-160
22. Dunlap J. C. y Loros J. J. (2004). The *Neurospora* Circadian System. *Journal of Biological Rhythms*, 19:414-424
23. Falke J. J. y Hazaelbauer G. L. (2001). Transmembrane signaling in bacterial chemoreceptors. *Trends Biochem. Sci.*, 26:257-265
24. Franklin K. A., Praekelt U., Stoddart W. M., Billingham O. E., Halliday K. J. y Whitelam G. C. (2003). Phytochromes B, D and D Act Redundantly to Control Multiple Physiological Responses in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 131:1340-1346
25. Froehlich A. C., Liu Y., Loros J. J. y Dunlap J. C. (2002). White Collar-1, a Circadian Blue Light Photoreceptor, Binding to *frequency* Promoter. *Science*, 297:815-819
26. 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*. *Eukariotic Cell*, 4:2140-2152
27. Galante Y., De Conti A. y Monteverdi R. (1998). Application of *Trichoderma* enzymes in the food and feed industries, p 311-325
28. Gilles-Gonzalez M. A., Gonzalez G., Perutz M. F., Cogger L., Marden M. C. y Poyart C. (1994). Heme-based sensors, exemplified by the kinase FixL, a a new class of heme protein with distinctive ligand binding and autoxidation. *Biochemistry*, 33:8067-8073
29. Gosink K. K., Burrón-Barral M. C. y Parkinson J. S. (2006). Signaling Interactions between the Aerotaxis Transducer Aer and Heterologous Chemoreceptors in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 188:3487-3493
30. Greer-Philips S. E., Alexandre G., Taylor B. L. y Zhulin I. B. (2003). Aer and Tsr guide *Escherichia coli* in spatial gradients of oxidizable substrates. *Microbiology*, 149:2661-2667
31. Gresik M., Kolarova N. y Farkas V. (1988). Membrane potential, ATP, and cyclic AMP changes induced by light in *Trichoderma viride*. *Exp. Mycol.*, 12:295-301
32. Gressel J. y Rau W. (1983). Photocontrol of Fungal Development. *Encyclopedia of Plant Physiology, New Series*, Mohr H y Shropshire Jr. W. (editors). Springer-Verlag Berlin, Heidelberg Nueva York, Tokio., vol 16B:603-639
33. He Q., Cheng P., Yang Y., Wang L., Gardner K. H. y Liu Y. (2000). White Collar-1, a DNA Binding Transcription Factor and a Light Sensor. *Science*, 297:840-843
34. Herrmann S., Ma Q., Johnson M. S., Repik A. V. y Taylor B. L. (2004). PAS Domain of the Aer Redox Sensor Requires C-Terminal Residues for Native-Fold Formation and Flavin Adenine Dinucleotide Binding. *Journal of Bacteriology*, 186:6782-6791
35. Hill S., Austin S., Eydmann T., Jones T. y Dixon R. (1996). *Azotobacter vinelandii* NifL is a flavoprotein that modulates transcriptional activation of nitrogen-fixation genes via a redox-sensitive switch. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93:2143-2148

36. Horwitz B. A., Malkin S. y Gressel J. (1984). Roseoflavin inhibition of photoconidiation in a *Trichoderma* riboflavin auxotroph: indirect evidence for flavin requirement for photoreactions. *Photochem. Photobiol.*, 40:763-769
37. Horwitz B. A., Perlman A. y Gressel J. (1990). Induction of *Trichoderma* sporulation by nanosecond laser pulses: evidence against cryptochrome cycling. *Photochem. Photobiol.*, 51:99-104
38. Huang D. M., Dempsey K., Tan T. y Liew C. C. (1996). A modular domain of NifU, a nitrogen fixation cluster protein, is highly conserved in evolution. *J. Mol. Evol.*, 43:536-540
39. Ilmen M., Thrane C. y Penttila M. (1996). The glucose repressor gene *cre 1* of *Trichoderma*: isolation and expression of a full-length and a truncated mutant form. *Mol. Gen. Genet.*, 251:451-460
40. Káldi K., Herreros-González B. y Brunner M. (2006). Transcriptional regulation of the *Neurospora* circadian clock gene *wc-1* affects the phase of circadian output. *EMBO reports*, 7:199-204
41. Kolarova N., Haplova J. y Gresik M. (1992). Light-activated adenyl cyclase from *Trichoderma viride*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 72:275-278
42. Kortmme T. y Creighton T. E. (1995). *J. Mol. Biol.*, 253:799-812
43. Kasahara M., Swartz T. E., Olney M. A., Onodera A., Mochizuki N., Fukuzawa H., Asamizu E., Tabata S., Kanegae H., Takano M., Christie J. M., Nagatani A. y Briggs R. W. (2002). Photochemical Properties of the Flavin Mononucleotide-Binding Domains of the Phototropins from *Arabidopsis*, Rice and *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiology*, 129:762-773
44. Kulling C., Mach R. L., Lorito M. y Kubicek C. P. (2000). Enzyme diffusion from *Trichoderma atroviride* (= *T harzianum* P1) to *Rhizoctonia solani* is a prerequisite for triggering of *Trichoderma ech42* gene expression before mycoparasitic contact. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66:2232-2234
45. Lauter F. R. y Russo V. E. A. (1991). Blue light induction of conidiation-specific genes in *Neurospora crassa*. *Nucl. Acid. Res.*, 19:6883-6886
46. Lakin-Thomas P., Coté G. y Brody S. (1990). Circadian rhythms in *Neurospora*: biochemistry and genetics. *Crit. Rev. Micro.*, 17:365-416
47. Lauter F. R. (1996). Molecular genetics on fungal photobiology. *J. Genet.*, 75:375-386
48. Lewis Z. A., Correa A., Schwerdtfeger C., Link K., Xie X. y Gomer R. H. (2002). Overexpression of White Collar-1 (WC-1) activates circadian clock-associated genes, but is not sufficient to induce most light-regulated gene expression in *Neurospora crassa*. *Mol. Microbiol.*, 45:917-931
49. 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
50. Liu Y., He Q. y Cheng P. (2003). Photoreception in *Neurospora*: a tale of two White Collar proteins. *Cell. Mol. Life Sci.*, 60:2131-2138
51. Lledias F. y Hansberg W. (2000). Catalase modification as a marker of singlet oxygen. *Methods Enzymol*, 319:110-119
52. Monson E. K., Ditta G. S. y Helinski D. R. (1995). The oxygen sensor protein, FixL, of *Rhizobium meliloti*. Role of histidine residues in heme binding, phosphorylation, and signal transduction. *J. Biol. Chem.*, 270:5243-5250
53. Nambu J. R., Lewis J. O., Wharton K. A. J. y Crews S. T. (1991). The *Drosophila single-minded* gene encodes a helix-loop-helix protein that acts as a master regulator of CNS midline development. *Cell*, 67:1157-1167

54. Olmedo-Monfil V., Mendoza-Mendoza A., Gómez I., Cortés C. y Herrera-Estrella A. (2002). Multiple environmental signals determine the transcriptional activation of the mycoparasitism related gene *pbr1* in *Trichoderma atroviride*. *Mol. Genet. Genomics*, 267:703-712
55. Ouyang Y., Andersson C. R., Kondo T., Golden S. S. y Johnson C. H. (1998). Resonating circadian clocks enhance fitness in cyanobacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95:8660-8664
56. Papavizas G. C. (1985). *Trichoderma* and *Gliocadium*: biology, ecology, and potencial for biocontrol. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 23:23-54
57. Ponting C. P. y Aravind L. (1997). PAS: a multifunctional domain family comes to light. *Curr. Biol.*, 7:R674-R677
58. Pongratz I., Antonsson C., Whitelaw M. L. y Poellinger L. (1998). Role of the PAS domain in regulation of dimerization and DNA binding specificity of the dioxin receptor. *Mol. Cell Biol.*, 18:4079-4088
59. Qiyang H. y Liu Y. (2005). Molecular mechanism of light responses in *Neurospora*: from light-induced transcription to photoadaptation. *Genes and Development*, 19:2888-2899
60. Rebbapragada A., Johnson M. S., Harding G. P., Zuccarelli A. J., Fletcher H. M., Zhulin I. B. y Taylor B. L. (1997). The Aer protein and the serine chemoreceptor Tsr independently sense intracellular energy levels and transduce oxygen, redox, and energy signals for *Escherichia coli* behavior. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94:10541-10546
61. Repik A., Rebbapragada A., Johnson M. S., Haznedar J. O., Zhulin I. B. y Taylor B. L. (2000). PAS domain residues involved in signal transduction by the Aer redox sensor of *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.*, 36:806-816
62. Ríos-Momberg H. M. (2004). Papel de una proteína homóloga a WC-1 de *Neurospora crassa* en las respuestas a luz de *Trichoderma atroviride*. Tesis de doctorado, especialidad Biotecnología de Plantas. CINVESTAV Irapuato
63. Rocha-Ramírez V., Omero C., Chet I., Horwitz B. A. y Herrera-Estrella A. (2002). *Trichoderma atroviride* G-Protein α -Subunit Gene *tga1* is Involved in Mycoparasitic Coiling and Conidiation. *Eukariotic Cell*, 1:594-603
64. Rosales-Saavedra T., Esquivel-Naranjo E. U., Casas-Flores S., Martínez-Hernández P., Ibarra-Laclette E., Cortes-Penagos E. y Herrera-Estrella A. (2006). Novel light-regulated genes in *Trichoderma atroviride*: a dissection by cDNA microarrays. *Microbiology* 152:3305-3317
65. Sambrook J. y Russell D. W. (2001). *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. Third Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York, 2001
66. Schmidhauser T. J., Lauter F. R., Schumacher M., Zhou W., Russo V. E. y Yanofsky C. (1994). Characterization of *al-2*, the phytoene synthase gene of *Neurospora crassa*. Cloning, sequence analysis, and photoregulation. *J. Biol. Chem.*, 269:12060-12066
67. Schmoll M., Franchi L. y Kubicek C. P. (2005). Envoy, a PAS/LOV Domain Protein of *Hypocrea jecorina* (Anamorph *Trichoderma reesei*), Modulates Cellulase Gene Transcription in Response to Light. *Eukariotic Cell*, 4:1998-2007
68. Spector T. (1978). Refinement of the Coomassie blue method of protein quantitation: a simple and linear spectrophotometric assay for less than or equal to 0.5 to 50 microgram of protein. *Anal. Biochem.*, 86:142-146
69. Salomon M., Eisenreich W., Dür H., Schleicher E., Knieb E., Massey V., Rüdiger W., Müller F., Bacher A. y Richter G. (2001). An optomechanical transducer in the blue light receptor phototropin from *Avena sativa*. *PNAS*, 98:12357-12361

70. Song P. S. (1968). *Photochem. Photobiol.*, 7:311-313
71. Swartz T. E., Corchnoy S. B., Christie J. M., Lewis J. W., Szundi I., Briggs W. R. y Bogomolni R. A. (2001). The Photocycle of a Flavin-binding Domain of the Blue Light Photoreceptor Phototropin. *The Journal of Biological Chemistry*, 276:36493-36500
72. Taylor B. L. y Zhulin I. B. (1999). PAS Domains: Internal Sensors of Oxygen, Redox Potential, and Light. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 63:479-506
73. Taylor B. L., Zhulin I. B. y Johnson M. S. (1999). Aerotaxis and Other Energy-Sensing Behavior in Bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.*, 53:103-128
74. Thannickal V. J. y Fanburg B. L. (2000). Reactive oxygen species in cell signaling. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.*, 279:L1005-L1028
75. Vreede J., van der Horst M. A., Hellingwerf J. K., Crielaard W. y van Aalten D. M. F. (2003). PAS Domains. Common structure and flexibility. *The Journal of Biological Chemistry*, 278:18434-18439
76. Voet G. y Voet J. (1994). *Biochemistry*. Second Edition
77. Wright S., Walia B., Parkinson J. S. y Khan S. (2006). Differential Activation of *Escherichia coli* Chemoreceptors by Blue-Light Stimuli. *Journal of Bacteriology*, 188:3962-3971
78. Zeilinger S., Ebner A., Marosits T., Mach R. y Kubicek C. P. (2001). The *Hypocrea jecorina* HAP 2/3/5 protein complex binds to the inverted CCAAT-box (ATTGG) within the *cbh2* (cellobiohydrolase II-gene) activating element. *Mol. Genet. Genomics*, 266:56-63
79. Zelzer E., Wappner P. y Shilo B. Z. (1997). The PAS domain confers target gene specificity of *Drosophila* bHLH/PAS proteins. *Genes Dev.*, 11:2079-2089
80. Zhulin I. B., Taylor B. L. y Dixon R. (1997). PAS domain S-boxes in Archea, Bacteria and sensors for oxygen and redox. *Trends Biochem. Sci.*, 22:331-333