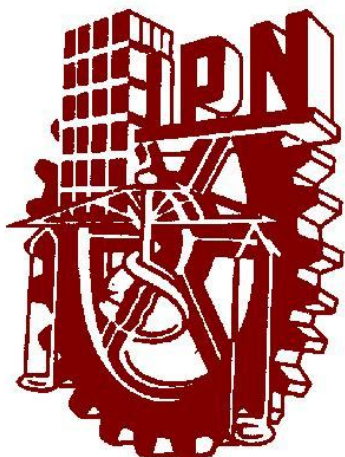


Instituto Politécnico Nacional

Centro de Biotecnología Genómica



“Análisis de un gen que participa en la remodelación de la cromatina y su probable participación en el dimorfismo de *Yarrowia lipolytica*”

Tesis

que para obtener el grado de Maestro en Ciencias en
Biotecnología Genómica

Presenta:

Ulises Mercado Salgado

Director de tesis:

Dr. Juan Manuel González Prieto

Reynosa, Tamaulipas

mayo, 2008.

Dedicatoria.

A mis padres por su amor, su ejemplo y su sabio consejo, que me guían a cada momento de mi vida.

A mis hermanos inigualables, Leopoldo Fabio, René e Israel que son parte de todos mis logros y su hombro un rincón donde desahogar los sinsabores.

A mis amigos: **Saúl** (lo puse con acento y que !!, me estoy yendo por la banquetaaaa), **Humberto** (Shi mi betoh di oro, amos por una lite, nomas una y ya), **Gilberto** (El chapa, pero chapa de oro no cualquiera), **Lupita** (por enseñarme a cocinar sin quemar la carne, su sabio consejo y su apoyo incondicional siempre “no te pongas short para ir a la escuelaaa”), **Krystal** (Ayy indiooo, tú me tienes mala leche), **Maryela** (Descifrando el enigma del chile), **Homar** (Hueriga zapuka mukira, vamos a pescar !!), **El Wilson** (Puro Michoacán).

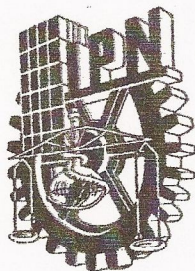
A mis profesores: **Dr. Juan Manuel González** (Por la paciencia casi franciscana con la que me guió siempre, sus conocimientos y determinación para alcanzar los objetivos), **Dr. Nezahualcoyotl Mayek** (Por su valiosa aportación para darle forma a este trabajo, sus historias que nos hicieron reir y el carácter que imprime a todo lo que hace), **M.C. Sanjuana Hernández** (El amor con el que hace las cosas y por ser como una mamá cariñosa y alegre).

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por la beca otorgada que permitió mi manutención y la realización de este trabajo.

Al Programa institucional de Formación de Investigadores, por el apoyo económico que semestre a semestre nos fue entregado.

Al Instituto Politécnico Nacional por la beca institucional que permitió la culminación de la tesis.

Al fondo de becas de movilidad Santander por el apoyo económico en el último semestre.

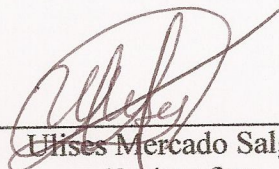


INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESION DE DERECHOS

En la Ciudad de Reynosa, Tam. el día 02 del mes Junio del año 2008, el (la) que suscribe Ulises Mercado Salgado alumno (a) del Programa de Maestría en Ciencias en Biotecnología Genómica del IPN con número de registro B050951, adscrito a Centro de Biotecnología Genómica, manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de Dr. Juan Manuel González Prieto y cede los derechos del trabajo intitulado "Análisis de un gen que participa en la remodelación de la cromatina y su probable participación en el dimorfismo de *Yarrowia lipolytica*", al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección Blvd. del Maestro esq. con Elías Piña S/N Col. Narciso Mendoza, C.P. 88710 Cd. Reynosa, Tamaulipas, México Tels. 01-899 9243627, 9251656. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.



Ulises Mercado Salgado
Nombre y firma



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de Reynosa, Tam. siendo las 12:00 horas del día _____ del mes de _____ del 2008 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CBG para examinar la tesis de titulada:

Análisis de un gen que participa en la remodelación de la cromatina y su probable participación en el dimorfismo de *Yarrowia lipolytica*.

Presentada por el alumno:

Mercado
Apellido paterno

Salgado
Apellido materno

Ulises
Nombre(s)

Con registro:

B	0	5	0	9	5	1
---	---	---	---	---	---	---

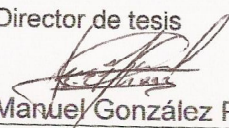
aspirante de:

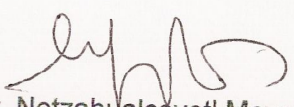
Maestría en Ciencias en Biotecnología Genómica

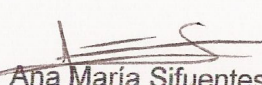
Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **SU APROBACION DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

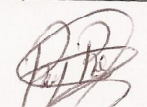
LA COMISIÓN REVISORA


Director de tesis


Dr. Juan Manuel González Prieto


Dr. Netzahualcoyotl Mayek Pérez

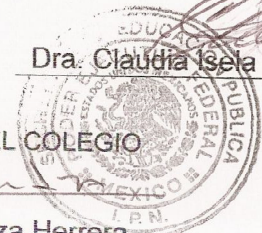

Dra. Ana María Sifuentes Rincón


Dr. Raymundo Rosas Quijano


Dra. Claudia Isela González López

EL PRESIDENTE DEL COLEGIO


Dr. Alberto Mendoza Herrera


INSTITUTO POLITÉCNICO
NACIONAL
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
GENÓMICA

índice

Abreviaturas	vi
Índice de Figuras.....	vii
Índice de cuadros	viii
Página.....	viii
Resumen	ix
Summary	xi
1. Introducción.....	1
2. Antecedentes.....	3
2.1 Generalidades.....	3
2.2 Procesos de diferenciación celular en hongos.....	4
2.3 Mecanismos generales de la regulación de la expresión génica en la diferenciación celular.....	4
2.3.1 El nucleosoma.....	5
2.3.2 La cromatina	5
2.3.3 Inicio de la transcripción y elementos participantes.....	7
2.4 Remodelación de la estructura de la cromatina.....	8
2.4.1 Complejos remodeladores de cromatina	8
2.5 Modificaciones de las Histonas.	9
2.5.1 La desacetilación de las histonas.....	10
2.5.1.1 El gen <i>RPD3</i>	11
2.6 El fenómeno del dimorfismo	12
2.7 El hongo <i>Yarrowia lipolytica</i> como modelo de estudio.....	12
2.8 Dimorfismo en <i>Y. lipolytica</i>	13
3. Justificación.....	15
4. Objetivo General.....	16
5. Objetivos Específicos	16
6. Hipótesis	16
7. Materiales y Métodos.....	17
7.1 Material biológico.....	17
7.2 Plásmidos usados.....	17
7.3 Análisis Bioinformático.....	17
7.6 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	19
7.6.1 Condiciones de amplificación por PCR para el gen <i>YIURA3</i>	20
Cuadro 4. Condiciones de reacción de la amplificación del gen <i>YIURA3</i>	21
7.6.2 Condiciones de amplificación para determinar la mutación del gen <i>RPD3</i>	21
7.7 Purificación de fragmentos de DNA rescatados de geles de agarosa	24
7.8 Clonación de productos de PCR.....	24
7.9 Reacciones de modificación de DNA	24
7.9.1 Digestión enzimática.....	24
7.9.2 Desfosforilación	25
7.9.3 Ligación de fragmentos	25
7.10 Separación de fragmentos de DNA por electroforesis	25
7.11 Transformación genética de <i>E. coli</i>	26
7.12 Extracción de DNA plasmídico de bacterias	26

7.13 Transformación genética de <i>Y. lipolytica</i>	27
7.14 Determinación de la morfología colonial	27
7.15 Determinación de crecimiento celular	28
7.16 Análisis de la mutante por Southern blot	28
7.17 Inducción de la transición dimórfica	29
7.18 Observaciones al microscopio	29
8. Resultados	30
8.1 Análisis bioinformático de la secuencia <i>YIRPD3</i>	30
8.4 Análisis de la mutante $\Delta RPD3$	37
8.4.1 Análisis fenotípico de la mutante	37
8.3.2 Análisis del dimorfismo de la cepa meztli.....	41
9. Discusión.....	47
10. Conclusiones	51
11. Recomendaciones	52
12. Referencias Bibliográficas	53
Apéndice.....	62

Abreviaturas

°C	Grado centígrado.
µg	Microgramo.
µL	Microlitro.
A_{260}	Absorbancia a una longitud de onda de 260 nm.
A_{280}	Absorbancia a una longitud de onda de 280 nm.
A	Adenina
DNA	Ácido desoxirribonucleico.
pb	Pares de bases.
C	Citosina.
Fig.	Figura.
G	Guanina.
kb	Kilobases.
mg	Miligramos.
ml	Mililitros.
mM	Milimolar.
kDa	Kilo daltones
nm	Nanómetros.
PCR	Siglas en inglés de la Reacción en Cadena de la Polimerasa.
pH	Potencial hidrógeno.
rpm	Revoluciones por minuto.
T	Timina.
T _m	Temperatura de fusión.
U	Unidades, utilizado en la concentración de enzimas.
UV	Ultravioleta.
V _t	Volumen total.
Ø	Diámetro.

Índice de Figuras

	Página
Figura 1. Representación esquemática del código de histonas.	10
Figura 2. Esquema de la elaboración del vector de interrupción para el gen <i>YIRPD3</i> .	18
Figura 3. Secuencia de la región promotor del gen <i>YIRPD3</i> , se destacan los motivos de unión a factores transcripcionales identificados, así como la posible caja TATA de inicio de la transcripción.	30
Figura 4. Representación de la secuencia del terminador del gen <i>YIRPD3</i> donde se identificaron de secuencias características de terminación de la transcripción en levaduras.	31
Figura 5. Representación esquemática de la secuencia aminoacídica de <i>YIRPD3</i> comparada con las secuencias de Rpd3p de <i>S. cerevisiae</i> y <i>C. albicans</i>	31
Figura 6. Alineamiento del dominio histona desacetilasa de varios organismos.	33
Figura 7. Dendograma del alineamiento de secuencias de distintos organismos	34
Figura 8. A. Representación esquemática del análisis de restricción de la copia silvestre y mutante y el fragmento usado como sonda en el análisis tipo Southern. B. Análisis de las cepas de <i>Y. lipolytica</i> mediante Southern blot para comprobar la mutación del gen <i>YIRPD3</i> .	35
Figura 9. Análisis teórico y experimental de la mutación.	36
Figura 10. A. Representación esquemática de la región donde se diseñaron los oligos para la prueba de PCR anidado. B. Fotografía de un gel de agarosa al 1% donde se observa la amplificación del tamaño esperado sobre DNAg de la cepa mutante como parte de la comprobación de la mutación del gen <i>YIRPD3</i> .	36
Figura 11. Morfología colonial de cepas de <i>Y. lipolytica</i> en medio completo YPG y diferentes concentraciones celulares.	37
Figura 12. Morfología celular de cepas de <i>Y. lipolytica</i> en medio completo YPG. A. P01a. B. Meztli. Observaciones realizadas a 100X	38
Figura 13. Morfología celular de cepas de <i>Y. lipolytica</i> en medio mínimo YNB. A. P01a. B. Meztli. Observaciones realizadas a 100X	38
Figura 14. Curvas de crecimiento de cepas de <i>Y. lipolytica</i> en medio completo YPG.	39
Figura 15. Curvas de crecimiento de cepas de <i>Y. lipolytica</i> en medio mínimo YNB.	39
Figura 16. Asimilación de diferentes fuentes de carbono de la cepa P01a en medio mínimo YNB.	40
Figura 17. Asimilación de diferentes fuentes de carbono de la cepa Meztli en medio mínimo YNB.	41
Figura 18. Morfología celular de cepas de <i>Y. lipolytica</i> en medio mínimo YNB a pH 7.0 a las 12 horas de incubación con diferentes fuentes de carbono.	42
Figura 19. Morfología celular de cepas de <i>Y. lipolytica</i> en medio mínimo YNB a pH 3.0 a las 12 horas de incubación con diferentes fuentes de carbono.	43
Figura 20. Morfología celular de cepas de <i>Y. lipolytica</i> en medio mínimo YNB a pH 7.0 a las 24 horas de incubación con diferentes fuentes de carbono.	44
Figura 21. Morfología celular de cepas de <i>Y. lipolytica</i> en medio mínimo YNB a pH 3.0 a las 24 horas de incubación con diferentes fuentes de carbono.	45

Índice de cuadros

	Página
Cuadro 1. Características de eucromatina y heterocromatina.	6
Cuadro 2. Oligonucleótidos utilizados en las amplificaciones por PCR.	20
Cuadro 3. Condiciones de reacción de la amplificación del gen <i>YIURA3</i> .	21
Cuadro 4. Condiciones de reacción de la amplificación del gen <i>YIURA3</i> .	21
Cuadro 5. Componentes de la reacción de amplificación por PCR del sitio de la sustitución del gen <i>YIRPD3</i> por la copia no funcional que contiene el gen <i>YIURA3</i> usado como marcador de selección.	22
Cuadro 6. Condiciones de la amplificación del fragmento generado en el sitio de la sustitución.	22
Cuadro 7. Componentes de la reacción amplificación por PCR para la determinación de la correcta sustitución del gen <i>YIRPD3</i> por el marcador de selección <i>YIURA3</i> .	23
Cuadro 8. Condiciones de la PCR para la amplificación del fragmento en la región 3' de la sustitución del marco de lectura de <i>YIRPD3</i> por el marcador <i>YIURA3</i> .	23
Cuadro 9. Porcentaje de identidad de la secuencia <i>YIRPD3</i> con otras enzimas histona desacetilasas.	32

Resumen

La regulación de la transcripción en organismos eucariotes es un sistema complejo de interacciones entre diversos factores protéicos que remodelan la estructura de la cromatina. El equilibrio dinámico que existe entre la activación y el silenciamiento génico se mantiene a través de modificaciones en la estructura de la cromatina a nivel de las histonas del nucleosoma, dentro de las cuales destacan la acetilación y la desacetilación. Las enzimas histona desacetilasas actúan en los residuos de lisina de las colas de las histonas eliminando los grupos acetilo y reprimiendo la expresión génica. En los hongos la desacetilación de histonas participa en procesos de diferenciación celular como la esporulación y la patogénesis. El dimorfismo es un proceso de diferenciación celular que consiste en un cambio morfológico de levadura a micelio como respuesta adaptativa a las condiciones ambientales, este a su vez se asocia con la patogénesis de diversos hongos. El objetivo de este trabajo fue estudiar la posible función de la desacetilación de las histonas en el dimorfismo de *Yarrowia lipolytica*, un hongo ascomiceto dimórfico considerado no patogénico y estudiado ampliamente por su potencial biotecnológico. En este trabajo se caracterizó la secuencia de un gen que codifica para una histona desacetilasa *YIRPD3* que posee un marco de lectura abierto de 1377 bases que codifican para una proteína de 458 aminoácidos. La proteína codificada por este gen mostró una identidad mayor del 80% respecto al gen *Rpd3* en *Saccharomyces cerevisiae*. La secuencia aminoacídica presenta todos los motivos y dominios que caracterizan a esta familia de enzimas. Se construyó un vector con una copia no funcional del gen *YIRPD3* sustituyéndolo por el gen *URA3* de *Y. lipolytica*, mismo que fue usado como marcador de selección. Con este plásmido, mediante retrogenética, se transformó una cepa *ura-* del hongo mediante la técnica de acetato de litio y se recuperaron las transformantes por su capacidad para crecer en medio sintético sin uracilo. El análisis fenotípico de la cepa mutante reveló una morfología colonial lisa, cremosa y de borde circular con respecto a las colonias rugosas e irregulares de la parental; en la mutante la morfología microscópica muestra células con mayor tamaño, de forma anormal y, en algunos casos, células deformes respecto a las células más pequeñas y ligeramente más alargadas que se observan en la cepa parental. En la mutante se observó una reducción importante de aproximadamente siete veces en el crecimiento en medio mínimo con respecto a la cepa parental. La característica principal de la cepa mutante fue la incapacidad para llevar a cabo la transición dimórfica, ya que mostró una morfología levaduriforme en condiciones de inducción, independientemente de la fuente de carbono y pH ensayados. Estos hallazgos constituyen el primer reporte de la participación

de la desacetilación de histonas en el dimorfismo de los hongos como modelo de diferenciación celular en organismos eucariotes.

Summary

The regulation of transcription in eucaryotic organisms is a complex system of interactions among various protein factors that reshape chromatin structure. The dynamic balance between activation and gene silencing is maintained through changes in chromatin structure at level of histones in nucleosome, where acetylation and deacetylation has been the subject of further study. Among them histone deacetylases act on lysine residues in the histone tails, removing acetyl groups and suppressing gene expression. In fungi has been reported deacetylation activity involving in cell differentiation processes such as sporulation and pathogenesis. The dimorphism is a process of cell differentiation characterized by a change in morphology of yeast to mycelium as adaptive response to environmental conditions; this in turn has been associated with the pathogenesis of some fungi. The objective of this work was to study the possible role of the deacetylation of histones in the dimorphism of *Yarrowia lipolytica*, which is an ascomycete dimorphic fungus considered non pathogenic and studied extensively for its biotechnological potential. We characterized the sequence of one gene that encodes for a histone deacetylase and has an open reading frame of 1377 bases that encode for one protein of 458 amino acids. The protein encoded by this gene showed an identity greater than 80% over the *Rpd3* gene of *Saccharomyces cerevisiae*. The aminoacidic sequence presents every motif and domains that characterize this family of enzymes. One vector was built with a non functional copy of the *YIRPD3* gene replaced by the gene *YIURA3* which was used as a selection marker. Through retrogenetics with this plasmid, it was transformed an *ura-* strain of the fungus using the technique of lithium acetate; transformants were recovered because of their ability to grow in synthetic medium without uracile. The phenotypic analysis of the mutant strain colonial morphology revealed a smooth, cream and rounded edge colony, clearly distinct to parental colonies rough and irregular; at microscope morphology of mutant cells showed a larger sample size, abnormal and sometimes deformed cells, which one is clearly different to parental strain where smaller and slightly cells are more elongated. The mutant showed a significant reduction at minimum average growth of around seven times with respect to the parental strain. The main feature of the mutant strain was the inability to carry out the dimorphic transition because it showed yeast morphology under induction condition, regardless the source of carbon and pH tested. These findings constitute the first report of the involvement of histone deacetylation on fungal dimorphism as a model of cell differentiation in eucaryotic organisms.

1. Introducción

Los hongos son organismos eucariotes que se encuentran distribuidos ampliamente en la naturaleza. Establecen diversas relaciones con el ambiente, se les encuentra en forma saprófita, parásita ó simbiótica; siendo estos los que más eficientemente llevan a cabo los procesos de degradación de la materia orgánica ya que poseen la capacidad de colonizar diversos sustratos, además de servir como un atractivo modelo en la industria biotecnológica, agrícola y clínica, entre otras.

La diferenciación celular es el fenómeno por el cual las células se especializan morfológica y/o funcionalmente adaptándose a las condiciones del medio sin alterar sus características genéticas. Se han descrito diferentes procesos de diferenciación celular en hongos, los cuales se asocian con su capacidad de colonización, supervivencia y patogénesis. Las etapas de la diferenciación celular son: recepción del estímulo, decodificación y transducción de la señal, cambio en el programa y cambio morfológico y/o funcional en el organismo (Ruiz-Herrera, 1993).

Un proceso de diferenciación que ha sido sujeto de algunos estudios es el dimorfismo, el cual se define como “la capacidad mostrada por algunos hongos de crecer como levadura o como micelio dependiendo del medio en el que se encuentren o en respuesta a señales ambientales” (Ruiz-Herrera, 1984). Los efectores que generan como respuesta el cambio dimórfico en hongos son el pH, temperatura, fuente de nitrógeno, concentración de gases en la atmósfera O₂/CO₂ y fuente de carbono, principalmente.

Existen diferentes reportes en los que se ha descrito a un gran número de hongos que son patógenos de plantas y animales, lo cual sugiere una fuerte asociación entre el dimorfismo mostrado por ciertos hongos y su patogenicidad. Como parte del estudio de la patogénesis de los hongos se han descrito algunos aspectos moleculares tales como las rutas de señalización involucradas en la transición dimórfica. Las principales rutas de señalización implicadas en el dimorfismo son la ruta de las MAP cinasas y la vía de PKA-AMPC (Durrenberger *et al.*, 1998; Bolker, 2001; Lee, 2003).

Los fenómenos de diferenciación celular en general implican un alto grado de regulación de la expresión génica. El punto de regulación más importante se da en la transcripción a nivel de la estructura de la cromatina, ya que cumple con la función de organizar y empaquetar el DNA a través de las histonas y otras proteínas asociadas. Las histonas forman un octámero en el cual se enrolla el DNA dando lugar a la unidad fundamental de la cromatina llamada nucleosoma (Kornberg, 1974; Kornberg, 1999). Las extensiones amino terminales de las histonas son susceptibles de ser modificadas de diversas formas, principalmente por acetilación y desacetilación, fosforilación, metilación y ubiquitinación (Bird, 1999).

Estas modificaciones ocultan o exponen regiones de las proteínas encargadas de regular la expresión génica.

La desacetilación de las histonas es un proceso de modificación enzimática de la estructura de la cromatina que está asociado con el silenciamiento génico. Las enzimas que llevan a cabo este proceso son las histona desacetilasas. Existen diversos estudios donde se ha observado la participación de este proceso en fenómenos de diferenciación celular tales como la esporulación (Kouzarides, 1999), cambio del tipo de apareamiento (Soll, 1992), patogénesis (Klar, 2001) y germinación de esporas (Christodoulidou, 1996).

El estudio a nivel molecular de los fenómenos de diferenciación celular en hongos, particularmente el dimorfismo, abre la posibilidad de trazar estrategias tales como el diseño de nuevas drogas para el control de las micosis que afectan a los humanos. Al tener un mayor entendimiento de los procesos biológicos que se llevan a cabo en estos organismos y sus genes participantes, es posible extrapolar esos resultados a la búsqueda de respuestas en sistemas eucarióticos más complejos.

Con el fin de observar la probable participación de la desacetilación de las histonas en el dimorfismo de *Y. lipolytica*, en este trabajo se presenta la estrategia de obtención de una cepa del hongo afectada en el gen *RPD3* (Reduced Potassium Dependency Factor) que codifica para una histona desacetilasa y el análisis de la mutante obtenida.

2. Antecedentes

2.1 Generalidades

Los hongos son organismos eucariotes que se han agrupado en el reino mycota o fungi (Whittaker, 1969). Son organismos unicelulares o pluricelulares, heterótrofos, poseen una pared celular formada principalmente de quitina y tienen la característica única del crecimiento apical (Bartnicky-García, 1968; Ruiz-Herrera, 1984). Las relaciones de los hongos con el ambiente son de gran importancia ya que tienen la capacidad de colonizar los más variados sustratos; se encuentran en la naturaleza en forma saprófita, degradando la materia orgánica inerte; además, subsisten formando asociaciones simbióticas con otros organismos y se les puede encontrar también en forma parásita aprovechando los nutrientes de otros organismos, alimentándose de ellos o viviendo en su interior; causando enfermedades en plantas y animales e incluso el hombre. La facilidad de cultivar estos organismos en laboratorio así como el hecho de ser organismos eucariotes, hacen de los hongos un modelo atractivo en la industria biotecnológica, agrícola y médica, entre otras.

La diferenciación celular ha sido definida como la “serie de eventos bioquímicos, que cuidadosamente ordenados en el tiempo y en el espacio dan lugar a la especialización de la célula sin alterar sus características genéticas” (Ruiz-Herrera, 1984). Los procesos de diferenciación celular en los hongos pueden comprenderse en sus diferentes etapas que parten del reconocimiento del estímulo del medio y se recibe en la superficie celular a través de receptores en la membrana. Al respecto solo se conocen unas cuantas proteínas que sirven como receptores en la membrana celular de los hongos. Los estímulos pueden ser de diferente naturaleza: biológica, física y/o química; biológica, en el caso de que el hongo reconozca un hospedero o parte de él; química, si en el medio existen feromonas o pH; física, en el caso de cambios en presión, concentración de gases atmosféricos o de temperatura.

El siguiente paso es la decodificación y transducción de la señal. En esta etapa las proteínas receptoras transmiten la señal mediante cambios químicos y conformacionales, posteriormente la señal viaja a través de diferentes proteínas que participan en diversas vías, las cuales están íntimamente relacionadas con el tipo de receptor que reconoce el estímulo. Algunos ejemplos de estas vías son las rutas PKA “Protein Kinase A”, PKC “Protein Kinase C” y MAPK “Mitogen Activated Protein Kinases”. Cuando la señal llega al núcleo celular se desencadenan cambios en el programa que implican una serie de modificaciones en la expresión génica. Los principales puntos de control de la expresión génica se dan a

nivel transcripcional, traduccional y postraduccional, dichos cambios le permiten al organismo generar variaciones en su morfología y/o función celular que se pueden reflejar en el fenotipo como respuesta a las señales (Ruiz-Herrera, 1993).

2.2 Procesos de diferenciación celular en hongos

Los hongos presentan diversas morfologías y procesos de diferenciación como parte de su ciclo de vida entre los que se encuentra la formación de pseudomicelio, en este proceso se presenta un cambio morfológico en ciertos hongos de un estado levaduriforme a células alargadas, septadas, multinucleadas y la característica que le da el nombre es que en los septos se observa un ligero estrangulamiento de las hifas. Durante la germinación de esporas se observa un cambio en el tipo de crecimiento de isodiamétrico a polarizado, lo que permite a los hongos desarrollarse y colonizar el medio donde se encuentran, esto como respuesta a condiciones físicas y nutricionales favorables. La esporulación permite perpetuar la especie dando lugar al desarrollo de esporas, las cuales constituyen la forma resistente de estos organismos. Una vez que los hongos se establecen y adaptan exitosamente al medio, algunos presentan formación de estructuras reproductivas que se utilizan para la producción de esporas que les permite completar su ciclo de vida, este proceso diferenciativo se utilizó como criterio para clasificar a los hongos en basidiomicetos, ascomicetos, zigomicetos y deuteromicetos (Alexopoulos, 1996). De nuestro particular interés es el dimorfismo que presentan algunos hongos y que se ha definido como la capacidad mostrada para crecer como levadura o como micelio dependiendo del medio donde se encuentren o en respuesta a señales en el ambiente (Ruiz-Herrera, 1985). El cambio dimórfico es reversible y se ha propuesto como un mecanismo de adaptación y colonización al medio ambiente donde se desarrollan. El dimorfismo ha sido asociado con la patogénesis, ya que la mayoría de los hongos dimórficos son patógenos de humanos, animales y plantas (Ruiz-Herrera, 1998).

2.3 Mecanismos generales de la regulación de la expresión génica en la diferenciación celular.

El fenotipo de los organismos está dado por la expresión del genotipo en respuesta al ambiente. La expresión de los genomas está regulada de forma tal que solo se expresa cierto porcentaje del total de genes contenidos en las células (Kornberg 1999). Generalmente, el flujo de la información genética comienza en los genes y finaliza en la formación de proteínas, que dan como resultado el fenotipo en los organismos. En la diferenciación celular como en la mayoría de los procesos celulares el principal punto de regulación de

la expresión de los genes se da a nivel de la transcripción. En este punto la regulación está presente en los diferentes niveles de la organización del DNA, en la cromatina y el nucleosoma.

2.3.1 El nucleosoma

El nucleosoma es la unidad fundamental de la estructura de la cromatina en la cual se organiza y empaqueta el DNA. Consiste de un octámero de histonas (H2A, H2B, H3 y H4) que se da por la formación de un tetrámero entre las histonas H3-H4 y dos heterodímeros, H2A-H2B. En el nucleosoma se enrollan 147pb equivalentes a 1.75 giros (Kornberg, 1974). Existe además la histona H1 que se encuentra en contacto con las regiones de DNA y el octámero mismo, confiriendo estabilidad al complejo. Además, protege de 15 a 20pb de DNA de la digestión enzimática. Otro dato interesante característico de la H1 es su proporción estequiométrica, similar a las cantidades de octámero (Luger, 2001). Existen tres mecanismos principales mediante los cuales los nucleosomas pueden reprimir la transcripción. El primero y más simple es el ocultamiento de regiones de unión de proteínas a DNA interfiriendo con los mecanismos de activación-represión y con la maquinaria transcripcional. El segundo son las interacciones entre los nucleosomas que llegan a reprimir la transcripción en dominios enteros en los cromosomas. El tercer mecanismo es la interacción de nucleosomas con proteínas características de zonas heterocromáticas que reprimen la expresión de forma hereditaria (Kornberg, 1999). Existe evidencia bioquímica y genética que demuestra ampliamente que el nucleosoma es un factor normalmente represivo para la transcripción. (Paranjape y Kamakaka, 1994)

2.3.2 La cromatina

La cromatina es el complejo formado por el DNA, las histonas y otras proteínas no-histonas asociadas con la organización del DNA como la proteína heterocromática HP1 por sus siglas en inglés (heterocromatic protein 1) y el grupo de alta movilidad HMG por sus siglas en inglés (high mobility group). La cromatina constituye el segundo orden en la organización del DNA pues una vez que este se enrolla en los nucleosomas se pliega sobre sí mismo para formar la estructura característica de la cromatina, una fibra de 30 nm conformada por los nucleosomas y la histona H1 (Eissenberg y Elgin, 2000). La principal consecuencia funcional del empaquetamiento de la cromatina es la restricción en el acceso al DNA hacia una gran variedad de proteínas que regulan la actividad génica. La organización estructural de la cromatina en cromosomas eucarióticos es variable en ciertas regiones del cromosoma.

Se han descrito dos tipos de cromatina con base en características bien definidas; eucromatina y heterocromatina. La eucromatina formada por regiones cromosómicas extensas en un estado disperso y relajado, en estas regiones se encuentran la mayoría de los genes que presentan actividad transcripcional. La heterocromatina formada por regiones de DNA que permanecen altamente compactadas y se encuentran constituyendo los telómeros y centrómeros, principalmente. Ciertas regiones de DNA son heterocromáticas para todas las especies en todas las etapas de diferenciación, a estas regiones se les conoce como heterocromatina constitutiva. Otras regiones de DNA se comportan como heterocromáticas en algunas células y eucromáticas en otras debido a la diferenciación que sufren las células de organismos de acuerdo a su nivel de complejidad y se le denomina heterocromatina facultativa (Andrulis *et. al.*, 1998). Existen diferencias notables entre los dos tipos de cromatina que se detallan en el cuadro 1.

Cuadro 1. Principales características de la eucromatina y la heterocromatina.

Característica	Eucromatina	Heterocromatina
Apariencia en interfase	Relajada (tinción baja)	Condensada (tinción alta)
Localización cromosómica	Brazos distales	Pericentromérica y telomérica
Tiempo de replicación	Fuera de la fase S	Fase S tardía
Secuencias que lo componen	DNA único, interrumpido por secuencias medianamente repetitivas	DNA altamente repetitivo (secuencias satélite)
Densidad génica	Alta	Baja
Localización en el núcleo	General	Agrupado a menudo (periferia nuclear, cerca del nucleolo)
Recombinación meiótica	Normal	Ausente
Actividad génica	Alta	Ausente
Silenciamiento de genes	Genes individuales	Grandes Dominios
Metilación del DNA	Islas CpG hipometiladas	Altamente Metiladas
Acetilación de las Histonas	Alta	Baja
Espaciamiento en nucleosomas	Irregular	Regular
Accesibilidad de nucleasas	Variable	Baja

(Modificado de Eissenberg y Elgin, 2000)

2.3.3 Inicio de la transcripción y elementos participantes.

El inicio de la transcripción como mecanismo de regulación de la expresión génica se presenta en dos etapas: 1) el relajamiento de la estructura de la cromatina, seguida de la interacción del complejo RNA polimerasa y 2) los factores generales de la transcripción. Las proteínas reguladoras de la transcripción desencadenan la primera etapa participando junto con complejos remodeladores de la cromatina (Bjorklund y Kim, 1996).

En los primeros estudios sobre la activación de genes fueron identificadas tres RNA polimerasas en eucariotes, designadas numéricamente I, II y III. La RNA polimerasa II es la responsable de la síntesis de mRNA, mientras que las polimerasas I y III sintetizan RNA ribosomal y RNA de transferencia, respectivamente (Roeder y Rutter, 1969). La RNA polimerasa II es un complejo multiprotéico formado por 12 subunidades y que para llevar a cabo su función se vale de las proteínas llamados factores generales de la transcripción o GTF's: TFIIA, -B, -D, -E, -F y -H (Feaver *et. al.*, 1996; Conaway y Conaway, 1997). El inicio de la transcripción de genes codificantes en los eucariotes requiere la formación de un complejo de pre-iniciación (PIC) que consiste de la RNA polimerasa II y los GTF's (Warren, 2002). Un ejemplo de la acción de un cofactor negativo es la represión estérica por medio de la proteína NC2p que, al agregarse en forma de 'pinza' al complejo formado por la proteína de unión a la caja TATA (por sus siglas en inglés TBP), impide la unión de los GTF's (Kamada *et. al.*, 2001).

Los trabajos sobre control en la transcripción en eucariotes se han centrado principalmente en dos clases de elementos regulatorios. Unos son los que actúan en "cis" como los potenciadores, silenciadores y aisladores y los que actúan en "trans", constituido por factores transcripcionales activadores y represores que se unen al DNA, regulando la expresión génica.

Un grupo de elementos "cis" lo conforman los potenciadores que son regiones no traducibles que se encuentran a lo largo de los genomas y son reconocidas por factores proteicos que inducen la expresión de los genes, son específicos y se encuentran desde 100pb hasta varios miles de pares de bases de distancia de los genes sobre los cuales actúan (Maniatis *et. al.*, 1998).

Existen también los silenciadores que son regiones no traducibles que distan desde unos cientos hasta varios miles de pares de bases de los promotores, son secuencias que actúan como sitio de unión de factores represores de la transcripción. Estos factores pueden funcionar dependiendo de la orientación, en cuyo caso actúan en un sentido, o bien existen silenciadores bidireccionales que actúan en ambos sentidos (Brooker, 1999).

Otro ejemplo de elementos “cis” son las secuencias de DNA y proteínas asociadas que pueden cumplir la función de generar sus propias fronteras llamadas ‘Insulator’ o aisladores (West y Gaszner, 2002). Dichas secuencias de DNA protegen a los genes de señales inapropiadas. Los aisladores protegen la expresión génica en su entorno de dos formas: la primera es por un bloqueo de la acción de un potenciador distante el cual solo sucede si el aislador se sitúa entre el potenciador y el promotor y en cualquier otra posición no actúa (Geyer y Corces, 1992; Kellum y Schedl, 1992); la segunda forma en la que un aislador protege el silenciamiento no deseado de un gen es al actuar como una barrera contra regiones condensadas (heterocromáticas) cercanas a genes y que pudieran ejercer un silenciamiento.

Por su parte los elementos que actúan en “trans” son proteínas que pueden reconocer secuencias específicas de DNA, este es un fenómeno que involucra una afinidad estructural y electrostática entre las dos partes. Los tipos de unión que se presentan son enlaces por puente de hidrógeno, enlaces iónicos e interacciones hidrofóbicas, los motivos de unión más representativos que están presentes en los factores transcripcionales son el motivo Hélice-Vuelta-Hélice, las proteínas de unión a DNA por “dedos de zinc”, el motivo hoja- β y el motivo tipo “cierre de leucina”. En general, la función de los factores transcripcionales es modular la expresión génica, activándola o reprimiéndola mediante su unión a las regiones regulatorias de los genes.

2.4 Remodelación de la estructura de la cromatina

Las primeras observaciones hechas en el núcleo celular mostraron heterogeneidad en la organización estructural del DNA, éste hecho cobró importancia una vez que se definieron los dos estadios en los que se encuentra la cromatina en el núcleo: heterocromatina y eucromatina (Heitz, 1928). Las evidencias mostraban que los cambios en la estructura del cromosoma estaban estrechamente vinculados con los niveles de expresión de los genes por lo que el descubrimiento del nucleosoma (Hewish y Burgoyne, 1973; Kornberg y Thomas, 1974) aclaró aún más la participación de la estructura de la cromatina en la regulación de la expresión génica.

2.4.1 Complejos remodeladores de cromatina

Se han propuesto dos grupos de complejos multiproteicos que remodelan la estructura de la cromatina, los dependientes de ATP y los enzimáticos. Estos complejos alteran los contactos entre el DNA y el nucleosoma y modifican la carga de las colas de histonas (Felsenfeld *et al.*, 1996). Los complejos

remodeladores de la cromatina dependientes de ATP representan un importante grupo de factores que participan activamente en la regulación génica. Se han descrito distintos complejos remodeladores de la cromatina tales como SWI/SNF (Switching / Sucrose non fermenting), RSC (remodels the structure of chromatin), NuRF (Nucleosome Remodelling Factor), CHRAC (The chromatin accessibility complex) y ACF (ATP-utilizing chromatin assembly and remodeling factor). De manera general estos complejos actúan sobre los nucleosomas remodelando los contactos entre el DNA y las histonas, propician la movilidad del nucleosoma y permiten la reorganización de arreglos nucleosomales (Kingston, 1999).

El segundo tipo de modificación de la cromatina son las enzimáticas, y estas se llevan a cabo en el extremo amino terminal de las histonas, son modificaciones postraduccionales y reversibles; los efectos sobre la cromatina que provocan las modificaciones enzimáticas de las histonas son la neutralización de las cargas de los residuos aminoacídicos de las histonas, la desestabilización de los contactos entre los nucleosomas y el mayor acceso a proteínas reguladoras de la transcripción.

2.5 Modificaciones de las Histonas.

Las modificaciones de las histonas son cambios que tienen gran implicación en la regulación de la expresión génica. Las modificaciones de las histonas son cambios covalentes, reversibles y postraduccionales, se llevan a cabo en los extremos amino-terminal o “colas de las histonas” y provocan cambios en la carga neta (positiva) de éstas, que normalmente presentan afinidad al DNA (Kuo y Allis, 1998). Entre los hechos más importantes que dieron luz en el conocimiento de los procesos de regulación destacan la identificación de coactivadores asociados con las regiones promotoras con actividad histona acetiltransferasa e histona desacetilasa, éstas activan y reprimen la transcripción, respectivamente (Berger, 2002). Las principales modificaciones enzimáticas son la acetilación y desacetilación, la fosforilación, ADP-ribosilación, metilación y ubiquitinación (Wolffe, 2001). Los diferentes tipos de modificaciones de las histonas se han englobado como el código de histonas (Fig. 1), éste código es una extensión en el potencial de información del código genético y constituye un mecanismo epigenético que regula la mayoría de los procesos que afectan la estructura de la cromatina, impactando de manera esencial en la expresión génica y, por consiguiente en el fenotipo de los organismos. Se ha observado que los aminoácidos que sufren estas modificaciones son arginina y lisina, aunque también se han observado en residuos de serina.

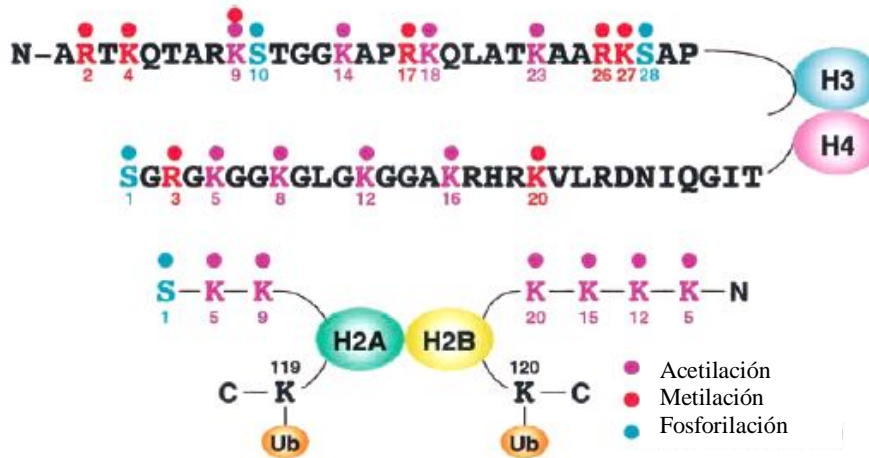


Figura 1. Representación esquemática del código de histonas (Zhang y Reinberg, 2006).

Uno de los principales procesos de modificación enzimática es la acetilación y desacetilación de las histonas. La acetilación de las histonas se lleva a cabo por las proteínas Histona-Acetil-Transferasas (HAT) y consiste en la adición de un grupo acetilo donado por la Acetil-CoA al residuo de lisina, provocando la neutralización de la carga positiva e incrementando la hidrofobicidad del núcleo de histonas, con ello se produce una importante reducción de la afinidad DNA-Histona (Kuo y Allis, 1998). Existen dos formas en las que se puede presentar la acetilación, la primera es como parte de la edición y maduración de las histonas en el citoplasma (cotraduccional), antes de entrar a cumplir su función en el núcleo; la segunda ocurre en los extremos amino terminal cuando forman parte de la cromatina enrollando al DNA.

2.5.1 La desacetilación de las histonas

La desacetilación de las histonas es el proceso contrario a la acetilación, es uno de los mecanismos por los cuales la célula reprime la expresión de genes al compactar la estructura de la cromatina, así se evita la accesibilidad del DNA a los factores y la maquinaria transcripcional. Las enzimas que llevan a cabo la desacetilación son las histona desacetilasas (HDAC) las cuales forman complejos multiprotéicos provocando un efecto contrario al fenómeno de la acetilación, restaurando la carga de los aminoácidos y la compactación de la estructura de la cromatina (Tauton y Hassing, 1996). Las HDAC se han clasificado en tres principales clases: 1, dentro de las cuales se agrupan las clásicas HDAC conteniendo las subclases *RPD3*, *HDA1* y *HOS3*; la clase 2 contiene a las desacetilasas sirtuinas dependientes de la molécula energética nicotin adenin dinucleótido (NAD^+) con las subclases SIR2 y HST1-4; y la clase 3, que agrupa a

las enzimas relacionadas con HD2, específicas de plantas (Trojer *et al.*, 2003). Se ha documentado que la actividad histona desacetilasa a menudo se presenta en grandes complejos. En hongos existen dos grupos definidos, uno es el complejo HDA con un peso de 350 kDa y que posee a la enzima Hda1p como subunidad catalítica. Otro complejo es el HDB que contiene a la enzima Rpd3p con un peso de 600 kDa como subunidad catalítica (Rundlett *et al.*, 1996).

2.5.1.1 El gen *RPD3*

En *S. cerevisiae* el gen *Rpd 3* codifica para una proteína con actividad histona desacetilasa implicada en la regulación transcripcional de ciertos genes; además, se han encontrado proteínas homólogas a esta en otros eucariotes (Suka *et al.*, 1998). La eliminación del gen *Rpd3* incrementa la acetilación de las histonas in vivo (Rundlett *et al.*, 1996). En células diploides de *S. cerevisiae* las mutantes en *Rpd3* presentan defectos en la recombinación mitótica y en la esporulación (Dora *et al.*, 1999). *Rpd3p* es parte de un complejo formado por proteínas como Ume6p, Sin3p y Sap30p, asociadas a su vez con el silenciamiento transcripcional. También, se ha observado que *Rpd3p* reprime la transcripción en loci definidos a través de la interacción con proteínas que se unen al DNA y pueden desacetilar todos los sitios de acetilación de la histona H4 (in vitro) y, junto con Sin3p reprime la transcripción de Ume6p (Vidal y Gaber, 1991). *Rpd3p* y Sin3p forman un complejo capaz de desacetilar las histonas H3 y H4, además de ser un regulador negativo del gen HO (Stillman, 1994). Otro descubrimiento importante fue la participación de las desacetilasas en regiones del genoma con islas de CpG metiladas complementando el silenciamiento que provoca el proceso de metilación con lo que queda manifiesta su actividad represora (Nan *et al.*, 1998). Recientemente, se ha descrito la implicación directa de *Rpd3p* en la regulación de la transcripción de RNA ribosomal. En otros hongos se han caracterizado histona desacetilasas, entre ellas HdaAp homóloga a *Rpd3p* y presente en *Aspergillus nidulans*, y se ha comprobado que mutantes en esta proteína se ven afectadas en el crecimiento y esporulación bajo condiciones de estrés oxidativo (Tribus *et al.*, 2005). Se ha reportado que el gen *Phd1*, que codifica para una histona desacetilasa en *Schizosaccharomyces pombe*, es indispensable en la meiosis y en el mecanismo de resistencia a tricostatina A. Un estudio sobre los genes *HDA1* y *RPD3* de histona desacetilasas encontrados en el patógeno oportunista *C. albicans* mostró que participan en la regulación del cambio fenotípico de alta frecuencia observado en este hongo (Srikantha *et al.*, 2001).

2.6 El fenómeno del dimorfismo

La importancia del dimorfismo se centra en dos aspectos principales, uno es el hecho de que diversos hongos patógenos de plantas y animales presentan una morfología distinta entre su estado saprófito y parásito; el otro aspecto es la posibilidad de estudiar el dimorfismo en los hongos como modelo adecuado y eficiente para la comprensión de los procesos de diferenciación celular en organismos eucariotes.

Existe gran diversidad de condiciones naturales en las que se pueden encontrar los hongos; coexisten dentro de los seres vivos, a los que pueden invadir causando enfermedades. En el caso de los mamíferos, la temperatura corporal y la composición de los tejidos son generalmente condiciones inadecuadas para el crecimiento de la mayoría de los hongos; sin embargo se han observado cepas fúngicas que al ser incapaces de crecer a 37°C no penetran en el hospedero sino que causan lesiones superficiales; mientras que otro grupo de hongos, regularmente dimórficos, son capaces de adaptarse a la temperatura corporal causando infecciones profundas y diseminadas.

2.7 El hongo *Yarrowia lipolytica* como modelo de estudio

Yarrowia lipolytica es un ascomiceto aerobio y dimórfico que se puede encontrar en forma de levadura, pseudomicelio y micelio verdadero, o una mezcla de estos (Barth y Gaillardin, 1996). Este hongo en su forma de levadura se puede aislar fácilmente de productos como queso, yogurt y una gran variedad de productos lácteos. Debido a su incapacidad de crecer en temperaturas superiores a 34°C se le considera no patógeno en humanos. Su tipo de reproducción es sexual, con dos tipos sexuales identificados como A y B; se encuentra de manera estable tanto en estado haploide como diploide y se aparea por conjugación heterotálica. En la etapa de esporulación se producen cuatro ascosporas haploides. La morfología colonial de *Y. lipolytica* es diversa dado que se han observado desde colonias lisas y brillantes hasta opacas y rugosas. Factores como la aireación, fuente de nitrógeno, fuente de carbono y pH, entre otros, son los que determinan el tipo de morfología colonial. *Y. lipolytica* presenta una serie de características que le hacen un interesante objeto de estudio. Por ejemplo su dimorfismo lo convierte en un buen modelo de diferenciación y su capacidad de crecer en substratos inusuales como alcanos o ácidos grasos y la de secretar proteínas y ácidos orgánicos hacen de este organismo un modelo atractivo en la industria de la biotecnología (Beckerich y Gaillardin, 1998); además de ser susceptible de análisis bajo las técnicas más comúnmente utilizadas en genética y biología molecular, se le puede manipular fácilmente en condiciones de

laboratorio, existen métodos eficientes para llevar a cabo su transformación genética, los sistemas de transición levadura-micelio *in vitro* son reproducibles en el laboratorio y su genoma esta actualmente secuenciado (Base de datos www.genolevures.org).

2.8 Dimorfismo en *Y. lipolytica*

Existen estudios donde se han descrito los efectores del dimorfismo de *Y. lipolytica*, entre los cuales están el pH, fuente de carbono, fuente de nitrógeno, citrato y concentración de gases O₂/CO₂ (Domínguez *et al.*, 2000; Ruiz-Herrera y Sentandreu, 2002). Actualmente está bien establecido el método para la inducción de la transición dimórfica en *Y. lipolytica* con base en el uso de medio mínimo con N-Acetil glucosamina (GlcNAc) como fuente de carbono. Se ha visto también que tal inducción es favorecida con un choque térmico a las células previo a la inoculación de éstas al medio inductor (Guevara-Olvera *et al.*, 1993). Durante la transición levadura–micelio las células en estado micelial contienen mayor cantidad de aminoazúcares y muestran una disminución en el contenido de proteínas respecto a la fase levaduriforme (Vega y Domínguez, 1986). Se sabe que las poliaminas son indispensables para el crecimiento y diferenciación en mamíferos y hongos, estas son sintetizadas por una ruta metabólica en donde participa la ornitina descarboxilasa (ODC), que transforma la ornitina en putrescina. Las mutantes en el gen *YIODC* indican un absoluto requerimiento de poliaminas para desarrollar una morfología micelial (Jiménez-Bremont *et al.*, 2001). La actividad de la ODC se incrementa significativamente así como los depósitos de poliaminas en las hifas cultivadas en medio con GlcNAc (Guevara-Olvera *et al.*, 1993). En *Y. lipolytica* el pH ácido induce una morfología levaduriforme, mientras que la morfología micelial se observa a un pH neutro (Ruiz-Herrera, 2002). En un estudio donde se caracterizó y analizó el gen *RIM9* de *Y. lipolytica* de la vía Rim/Pal de respuesta a pH en este hongo, se observó que las mutantes en dicho gen no fue afectada la dependencia del pH en el dimorfismo de *Y. lipolytica* por lo que se cree que puede existir al menos una vía alterna (González-López, 2002). *HOY1* es un factor transcripcional que contiene un homeodominio que se ha identificado en genes responsables del apareamiento en distintos organismos. Las mutantes de este gen son incapaces de formar micelio en condiciones de inducción de la transición dimórfica (Torres-Guzman y Domínguez, 1997). El gen *YWPI* codifica una proteína de pared celular específica de la forma micelial en *Y. lipolytica*, las mutantes en este gen no muestran defectos morfológicos probablemente debido a la existencia de otras proteínas con función homóloga (Ramón *et al.*, 1996). Las mutantes de los genes *CDC25* y *RAS2* son incapaces de realizar la transición levadura-micelio, estos resultados sugieren

que *RAS2* y *CDC25* son componentes de la ruta del AMP cíclico, que es indispensable para la formación de micelio. Las mutantes en ambos genes tienen defectos en la morfogénesis, probablemente debido a perturbaciones en el procesamiento de las proteínas extracelulares (Richard, 2001). El gen *YIBEM1* es necesario para la transición dimórfica. Las mutantes en este gen presentan serios defectos en la morfogénesis y en la regulación del crecimiento polarizado. Dicho gen está íntimamente ligado a la organización del citoesqueleto y a procesos como la formación de septos, a través de posibles interacciones con los filamentos de actina y con el direccionamiento de la quitina, ya que se localiza abundantemente en regiones de biosíntesis de la pared celular y los septos (Hurtado y Rachubisnki, 2002). El gen *TUPI1* de *C. albicans* es un represor de la miceliación; el análisis de cepas mutadas en dicho gen mostraron una morfología micelial constitutiva (Braun y Johnson, 1997). En *Y. lipolytica* se observa el mismo efecto de *TUPI1*, por ello se sugiere como un participante importante en el proceso del dimorfismo (comunicación personal A. Domínguez, 1999). El gen *STE11*, que forma parte de la ruta de las MAP cinasas de *Y. lipolytica* es necesario en el proceso de dimorfismo del hongo, no así en la integridad de la pared celular ni en su tasa de crecimiento. La mutación del gen mostró defectos en el proceso de apareamiento. Por su parte, el AMPc inhibe la formación de micelio bajo condiciones de inducción (Cervantes-Chávez, 2007).

3. Justificación

La importancia de este trabajo radica en dos aspectos fundamentales, la generación de conocimiento para un mejor entendimiento del proceso de dimorfismo y los genes que participan en el mismo, complementando los diversos estudios que se han enfocado principalmente hacia la identificación de genes de señalización (Ruiz-Herrera, 1993) y vías de transducción de señales implicadas en dicho proceso (Cervantes, 2007). La comprensión de los diferentes niveles del proceso del dimorfismo, es la base para poder diseñar estrategias que permitan el control de este fenómeno. El segundo aspecto es el interés antropocéntrico en áreas como la clínica, puesto que se sabe que la mayoría de los hongos dimórficos son patógenos oportunistas y se ha correlacionado la capacidad de llevar a cabo la transición dimórfica con la patogenicidad, ya que las micosis se han convertido en un serio problema para la salud en pacientes inmunocomprometidos (Nemecek *et al.*, 2006).

De esta manera, la comprensión del fenómeno del dimorfismo es parte fundamental de los esfuerzos encaminados hacia el control de enfermedades producidas por hongos en seres humanos, animales y plantas, lo que permitirá el desarrollo de nuevos antifúngicos. El conocimiento de los genes con implicaciones en el dimorfismo, así como el descubrimiento de los mecanismos y su asociación con los procesos biológicos de los hongos para su crecimiento, son estudios estrechamente vinculados cuya repercusión en la industria y en la medicina serán de suma importancia, puesto que dicho conocimiento conlleva al control del crecimiento de los hongos tanto dimórficos como filamentosos o que presenten un cambio de morfología en alguna etapa de su desarrollo. Así mismo, el proceso del dimorfismo es un ejemplo de la diferenciación celular que se presta como un sistema extrapolable a organismos eucariotes superiores en los esfuerzos encaminados a la comprensión de dicho fenómeno en los diferentes niveles de complejidad.

4. Objetivo General

Determinar la posible participación del gen *RPD3* que remodela la estructura de la cromatina en el dimorfismo de *Yarrowia lipolytica*.

5. Objetivos Específicos

Análisis bioinformático del gen *YIRPD3* que codifica para una histona desacetilasa.

Obtener y analizar fenotípicamente una cepa mutante de *Y. lipolytica* afectada en el gen *YIRPD3*.

Analizar la facultad de la cepa mutante $\Delta YIRPD3$ de llevar a cabo la transición dimórfica.

6. Hipótesis

El gen *RPD3* participa en la transición dimórfica de *Y. lipolytica*

7. Materiales y Métodos

7.1 Material biológico

Las cepas utilizadas de *Y. lipolytica* fueron la P01a (MAT A: *ura3-302, leu2-270*) y la cepa meztli (MAT A: *leu2-270, Δrpd3*). Por su parte, las cepas utilizadas en el desarrollo de la estrategia de interrupción del gen fueron: la *E. coli* JM-109 genotipo: $e14^-$ (McrA⁻) *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17* (*rK⁻ mK⁺*) *supE44 relA1. (lac-proAB)* [F' *traD36 proAB lacIqZ.M15*] y la *E. coli* DH5α genotipo: F, $\phi 80dlacZ\Delta M15$, $\Delta(lacZYA-argF)U169$, *deoR, recA1, endA1, hsdR17*(*rk⁻, mk⁺*), *phoA, supE44, λ⁻, thi-1, gyrA96, relA1*

7.2 Plásmidos usados

Los plásmidos que se utilizaron para los ensayos de clonación y transformación fueron: pJMGP1, el cual deriva del plásmido pBluescript, contiene un fragmento *Pst* I de 4kb donde se encuentra el gen *YIRPD3* con su promotor y su terminador; el plásmido pKSURA3 que se derivó del pBluescript-KS® y contiene el gen *URA3* de *Y. lipolytica*, su tamaño total fue 4.67kb, el gen *URA3* fue amplificado por PCR utilizando el oligonucleótido en sentido con un sitio *Nco* I y aprovechando que en el extremo 3' posee otro sitio *Nco* I de manera natural, lo anterior permitió interrumpir el marco de lectura del gen *YIRPD3* que posee sitios *Nco* I flanqueando la mayor parte de dicho marco. Por último se utilizó el plásmido pJMGP1A7 que se derivó del pJMGP1. Con esa construcción se obtuvo el vector de interrupción del gen de interés en este estudio, el plásmido pJMGP1A7 contiene el gen *YIURA3* sustituyendo el marco de lectura de *YIRPD3*, y se utilizó para la transformación genética de *Y. lipolytica*.

7.3 Análisis Bioinformático

Para el análisis de las secuencias nucleotídicas y de aminoácidos se utilizó el programa computacional DNASTAR (Lasergene®, USA). En internet se utilizaron las herramientas de la base de datos del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) como el BLASTn y BLASTp, el sitio Genolevures (<http://cbi.labri.fr/Genolevures/>), la base de datos *Saccharomyces* Genome Database (SGD) (<http://www.yeastgenome.org/>) y la herramienta Matinspector de la base de datos TRANSFAC (<http://genomatix.gsf.de/matinspector>).

7.4 Estrategia de interrupción del gen *YIRPD3*

A partir del vector pJMGPI, que contiene el gen *YIRPD3* con su promotor y terminador, se diseñó una estrategia para interrumpir el marco de lectura del gen. El marco de lectura abierto del gen se eliminó y se sustituyó por el gen *YIURA3* usado como marcador de selección. El análisis de restricción del gen *YIRPD3* mostró que posee sitios *NcoI* flanqueando la totalidad de la secuencia traducible. A partir del plásmido pKSURA3 se diseñaron oligonucleótidos con la secuencia de restricción para *NcoI* en la región del promotor y terminador del gen *URA3* (*YIURA S* y *YIURA R*), de manera que los sitios *NcoI* permitieran la sustitución del marcador de selección por el gen en estudio (Fig. 7). Mediante retrogenética se transformó la cepa P01a de *Y. lipolytica* que tiene auxotrofia para uracilo y leucina.

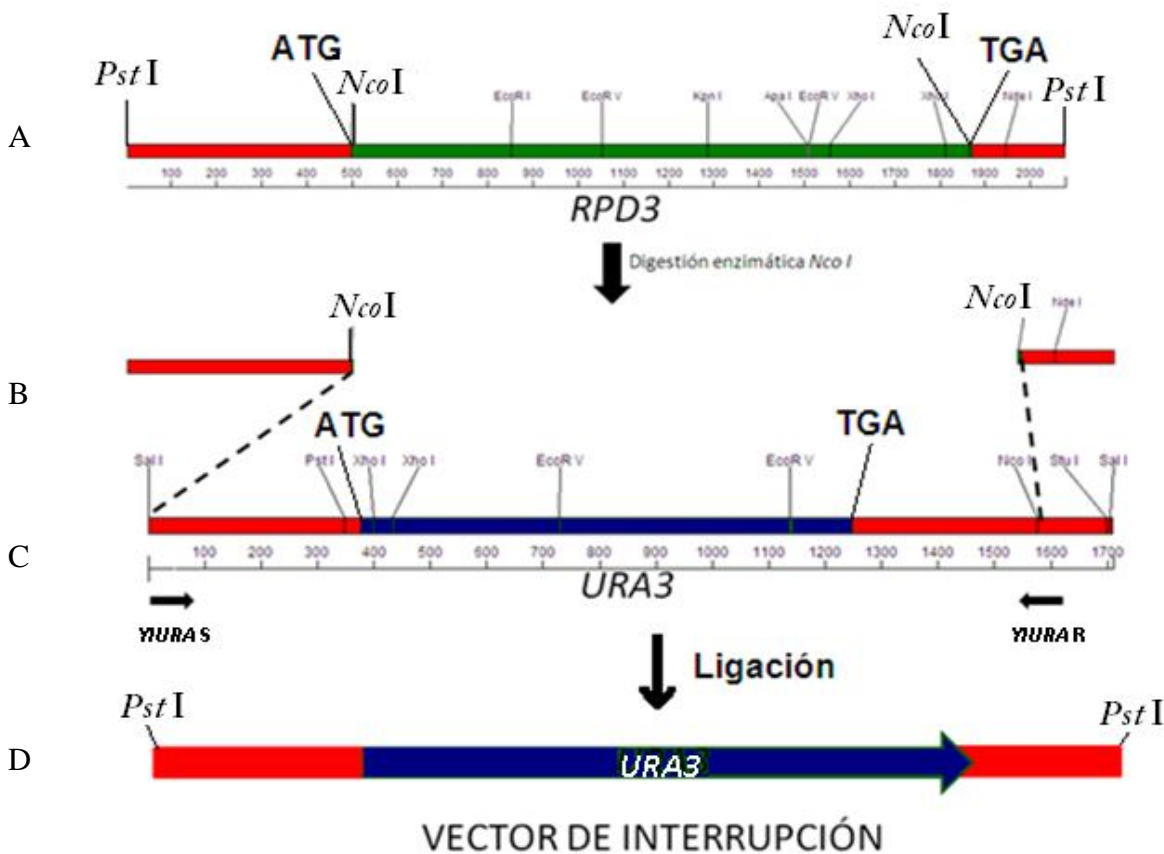


Figura 2. Esquema de la elaboración del vector de interrupción para el gen *YIRPD3*. **A.** Análisis de restricción del gen *YIRPD3*. **B.** Digestión con *Nco I*. **C.** Obtención del marcador *YIURA3* con sitios *Nco I* flanqueantes. **D.** ligación del marcador de selección en el plásmido con zonas flanqueantes de *YIRPD3*

7.5 Extracción de DNA genómico de *Y. lipolytica*

La extracción del DNA de *Y. lipolytica* se realizó mediante el método de Hoffman y Wriston (1987). La cepa P01a se cultivó en 20 mL de medio rico (YPG) por 18 h a 30 °C con agitación a 200 rpm. Pasado el tiempo de incubación se centrifugó el cultivo en tubos eppendorf descartando el sobrenadante. El sedimento celular obtenido (pastilla) se lavó con agua destilada y se centrifugó nuevamente. Sin el sobrenadante la pastilla lavada se resuspendió en 200 μ L de solución de lisis (Tritón X-100 2%; SDS 1%; NaCl 0.1M; Tris-HCl pH 8 10 mM y EDTA 1 mM). Posteriormente se añadieron aproximadamente 300 mg de perlas de vidrio (ballotini) de 0.45mm de diámetro y 200 μ L de fenol:cloroformo (1:1). Los tubos se agitaron en un agitador tipo vortex durante ciclos simultáneos de 1min al vortex más 1min en hielo, con tres repeticiones. Concluida la agitación se agregaron 200 μ L de TE 10:1 (Tris 10mM y EDTA 1mM) y se centrifugó por 10 min a 12,000 rpm. El sobrenadante se rescató en tubos nuevos y se agregó 30 μ g de RNasa A. posteriormente se incubaron durante 5 min a 37°C y se añadieron 10 μ L de acetato de amonio 4M y 1ml de Etanol al 100%, los tubos se mezclaron por inversión y se dejaron reposar durante 20min a -20°C. El contenido de los tubos se centrifugó durante 5min a 12,000 rpm descartando el sobrenadante; luego se lavó el precipitado con 100 μ L de etanol 70%, el sobrenadante se eliminó a través de una centrifugación, posteriormente se secó el sedimento de DNA durante 1-2 min a 55°C. Finalmente el DNA genómico se resuspendió en 30 μ L de TE 10:1 y se almacenó a -20°C.

7.6 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Las amplificaciones por PCR se realizaron en un termociclador BIORAD® modelo *i-cycler* y se usaron aproximadamente 100 ng de DNA genómico (DNAg) y 10 ng de DNA plasmídico (DNAp) como templado, oligonucleótidos a una concentración de 500 ng μ L⁻¹. Los deoxinucleótidos (dNTP's) se usaron a concentración de 10 mM, 1.5 μ L Cloruro de Magnesio a 50 mM, 5 μ L de buffer 10X y 2.5 U de enzima *Taq* DNA polimerasa (Invitrogen®) en un volumen final de 50 μ L. Las condiciones en que se llevaron a cabo las amplificaciones variaron de acuerdo con el tamaño del fragmento y la temperatura de alineamiento de los oligonucleótidos, la temperatura de desnaturalización del DNA fue 94 °C al igual que la temperatura de extensión de la *Taq* polimerasa (72 °C). El cuadro 2 indica la secuencia de los oligonucleótidos utilizados y su respectiva temperatura de fusión, (Tm). Alternativamente, se utilizó el estuche PCR SuperMix (Invitrogen®) con el que se realizaron ensayos de PCR para obtener productos de alta fidelidad; ello con el fin de asegurar que la amplificación de la copia no funcional del gen de interés

que contiene una copia del gen *YIURA3* sea susceptible de ser expresada y así utilizarse como marcador de selección en ensayos de transformación genética.

Cuadro 2. Oligonucleótidos utilizados en los ensayos de amplificación por PCR.

Nombre	Secuencia	Tm (°C)
JMGP1 (Sentido <i>URA3 NsiI</i>)	GTCGATGCATATCTGTCTGACTCGT	63
JMGP2 (Reverso <i>URA3 NsiI</i>)	ACAAATGCATGTTTCTCGGTGTACA	59.7
JMGP3 (Oligo Interno Sent)	CTGGACTACCACTACACC	56
JMGP4 (Oligo interno Rev)	TCCAACGAAGAATGTATC	49.1
JMGP5 (Sentido RPD3)	GCACCACACACCGCCATC	60.5
JMGP6 (Reverso RPD3)	CGTTTGATAGCTAGTCAC	51.4
YIURAS (Sentido <i>URA3 NcoI</i>)	GTCGCCATGGATCTGTCTGACTCGTC	74.6
YIURAR (Reverso <i>URA3</i>)	TCCATAACAAGTTCTTCTGCCTCC	66.2

7.6.1 Condiciones de amplificación por PCR para el gen *YIURA3*

Mediante un ensayo de PCR se obtuvo el gen *YIURA3* que se usó como marcador de selección de las cepas mutantes en *YIRPD3*. Las condiciones de amplificación se establecieron tomando en cuenta la longitud del fragmento y la temperatura de fusión de los oligonucleótidos, la reacción se realizó utilizando 100ng de DNA plasmídico y oligonucleótidos a una concentración de 0.5 $\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$, el resto de los componentes de la reacción forman parte del buffer del PCR supermix (Invitrogen®); las condiciones se muestran en el cuadro 3 y 4.

Cuadro 3. Componentes de la reacción en la amplificación del gen *YIURA3*

Componente	Cantidad
DNA _(pKSURA3)	1 µL
Oligo JMGP1	1 µL
Oligo JMGP2	1 µL
PCR supermix	
HIFI (Contiene dNTP's, Mg++, Buffer y Enzima)	47 µL

Cuadro 4. Condiciones de reacción de la amplificación del gen *YIURA3*.

Condiciones	Tiempo	T (°C)	Ciclos
T°C desnaturalización	5 min	94	1
T°C desnaturalización	45 s	94	
T°C alineamiento	45 s	55	30
T°C extensión	2 min	72	
T°C adición de poly A	5 min	72	1
T°C mantenimiento (tiempo indefinido)	-	4	-

7.6.2 Condiciones de amplificación para determinar la mutación del gen *RPD3*

Una prueba de PCR sobre la región *RPD3* permitió determinar si la cepa mutante integró de manera exitosa la copia mutada con la que se transformó genéticamente. La prueba se realizó a partir de DNA genómico de la cepa mutante y la cepa parental utilizando oligonucleótidos diseñados en las zonas adyacentes al sitio de sustitución (Cuadro 5 y 6).

Cuadro 5. Componentes de la reacción de amplificación por PCR del sitio de la sustitución del gen *YIRPD3* por la copia no funcional que contiene el gen *YIURA3* usado como marcador de selección.

Componente	Cantidad
DNAg	1 μ L
Oligo JMGP5	1 μ L
Oligo JMGP6	1 μ L
Mg ⁺⁺	1.5 μ L
Buffer	5 μ L
Nucleótidos	1 μ L
Agua	39 μ L
Enzima <i>Taq</i>	0.5 μ L

Cuadro 6. Condiciones de la amplificación del fragmento generado en el sitio de la sustitución.

Condiciones	Tiempo	T (°C)	Ciclos
T° C desnaturalización	5 min	94	1
T° C desnaturalización	45 s	94	
T° C alineamiento	45 s	48	30
T° C extensión	1 min 45 s	72	
T° C adición de poly A	5 min	72	1
T° C mantenimiento (tiempo indefinido)	-	4	-

Con una prueba de PCR sobre la región *YIRPD3* fue posible la determinación de la recombinación de la copia mutada del gen, de manera que permitió conocer si ésta se integró específicamente en el sitio del gen de interés, para ello se utilizó un oligonucleótido interno sentido diseñado sobre el marcador de

selección *YIURA3* y un oligonucleótido reverso diseñado sobre la región genómica adyacente al marco de lectura (ORF) sustituido del gen *YIRPD3* (Cuadro 7 y 8)

Cuadro 7. Componentes de la reacción amplificación por PCR para la determinación de la correcta sustitución del gen *YIRPD3* por el marcador de selección *YIURA3*.

Componente	Cantidad
DNAg	1 μ L
Oligo JMGP3	1 μ L
Oligo JMGP6	1 μ L
Mg ⁺⁺	1.5 μ L
Buffer	5 μ L
dNTP's	1 μ L
Agua	39.5 μ L
Enzima <i>Taq</i>	0.5 μ L

Cuadro 8. Condiciones de la PCR para la amplificación del fragmento en la región 3' de la sustitución del marco de lectura de *YIRPD3* por el marcador *YIURA3*.

Condiciones	Tiempo	T (°C)	Ciclos
T°C desnaturalización	5 min	94	1
T°C desnaturalización	45 s	94	
T°C alineamiento	45 s	48	30
T°C extensión	30 s	72	
T°C adición de poly A	5 min	72	1
T°C mantenimiento (tiempo indefinido)	-	4	-

7.7 Purificación de fragmentos de DNA rescatados de geles de agarosa

En los ensayos de electroforesis realizados se rescataron fragmentos de DNA producto de reacciones de digestión enzimática o PCR, con la finalidad de obtener fragmentos puros, se utilizó agarosa ultra pura de la compañía Promega® para la preparación de geles 1%, una vez corrida la electroforesis, se llevó el gel al transiluminador de luz UV para visualizar la banda de interés, procurando una exposición mínima a la luz UV, se cuantificó la banda a través del cálculo respecto a la concentración del marcador de peso molecular, se cortó la banda de interés con una navaja de bisturí, los fragmentos cortados del gel con el DNA se sometieron al protocolo indicado en el estuche comercial de Promega® *Wizard SV PCR and agarose gel clean-up system* No. Cat. A9280. Una vez purificado el fragmento se sometió a una electroforesis para su cuantificación, encontrándose que el producto recuperado representó normalmente el 80-90% de la cantidad inicial.

7.8 Clonación de productos de PCR

La clonación de productos de PCR se llevó a cabo para la conservación de fragmentos de interés o construcciones que permitieron la mutación del gen *YIRPD3*, se utilizó el estuche comercial de Promega® pGEM T-easy vector system de acuerdo a las especificaciones del fabricante. La primera etapa de la clonación consistió en la ligación del fragmento de interés en el vector pGEM T – Easy vector que contiene el estuche y que está linearizado para aceptar el inserto. La preparación de la mezcla de ligación consistió en colocar 5 µL de buffer 2X de la enzima, 1 µL de vector pGEM T – Easy (50 ng), producto de PCR (siguiendo la relación inserto : vector - 3:1) y por último 1 µL de enzima T4 DNA ligasa en un tubo eppendorf de 1.5 µL, la reacción se incubó 1 h a temperatura ambiente, o bien, si el máximo número de transformantes es requerido se puede dejar toda una noche ligando a 4 °C.

7.9 Reacciones de modificación de DNA

7.9.1 Digestión enzimática

Los distintos ensayos de digestión enzimática se llevaron a cabo para la obtención del marcador de selección *YIURA3* con los extremos *Nco* I compatibles con el vector pJMGP1 que contenía la copia del gen de interés *YIRPD3* y que fue digerido con la misma enzima de restricción. Los ensayos se realizaron de

acuerdo al protocolo descrito por Invitrogen® en un volumen final de 20 µL, añadiendo de 100 hasta 500 ng de DNAP o productos de PCR, o bien de 0.2 a 0.5 µg de DNAG, de 1 a 5 U de enzima de restricción y 2 µL del buffer (10X) correspondiente para cada enzima. Posteriormente, se incubaron durante 1 ó 2 h a la temperatura que la casa comercial específica para cada enzima de restricción utilizada.

7.9.2 Desfosforilación

Se llevaron a cabo ensayos de desfosforilación de los extremos cohesivos de un vector digerido de acuerdo con las especificaciones de la fosfatasa alcalina (CIAP) de Invitrogen®. El método simplificado de desfosforilación consiste en añadir 1 U de enzima directamente en el tubo donde se llevó a cabo la digestión, utilizando así el propio buffer de la enzima de restricción sin necesidad de purificar el fragmento. La mezcla se incubó durante 30 min a 37 °C y se eliminó la enzima con una columna del estuche comercial de Promega® Wizard No. Cat. A9280. El método alternativo para llevar a cabo la desfosforilación consistió en purificar el DNAP previamente digerido para eliminar la enzima y, posteriormente, se desfosforiló usando el buffer específico de la fosfatasa, la concentración utilizada de DNAP fue de 200 a 500 ng, se añadieron 4 µL de buffer 10X, agua destilada hasta 39 µL y 0.01 U de la enzima fosfatasa, se incubó la reacción a 37 °C durante 30 min.

7.9.3 Ligación de fragmentos

Las ligaciones se llevaron a cabo siguiendo la técnica descrita por Invitrogen® para la T₄ DNA ligasa. Para la estimación del DNA a ligar se utilizó una proporción inserto – vector de 3:1 en la ligación, 4 µL del buffer 5X, 1 U de enzima T₄DNA ligasa y agua destilada estéril hasta un volumen total de 20 µL, posteriormente se incubó durante 4 h a temperatura ambiente o bien toda la noche a 4 °C.

7.10 Separación de fragmentos de DNA por electroforesis

La resolución de fragmentos de DNA resultado de los distintos ensayos se realizó a través de electroforesis utilizando una cámara de electroforesis horizontal BioRad® en la cual se colocó un gel de agarosa 1% y se cubrió con solución TAE 1X (40mM Tris-Acetato y 1mM EDTA pH 8.0), las muestras de DNA y el marcador λ/HindIII (50 ng µL⁻¹) se cargaron en el gel, para lo cual se utilizó Orange 6X y SYBR gold® en el buffer de carga. Por último, se aplicó un voltaje de 80v durante 1 h para la visualización correcta de cada fragmento.

7.11 Transformación genética de *E. coli*

Los ensayos de transformación de *E. coli* se realizaron siguiendo el protocolo descrito por el estuche comercial de Promega® pGEM T – easy vector. Una vez que se obtuvo la ligación, se colocaron 2 μL de dicha reacción en un nuevo tubo eppendorf y posteriormente se añadieron las células calcio - competentes JM-109 mantenidas en hielo todo el tiempo, por cada ensayo de clonación se usaron 50 μL de células competentes. Una vez mezcladas las células con la reacción de ligación, se mantuvieron en hielo por 20 min. Posteriormente se les aplicó un choque térmico a 42 °C por 50 seg. Inmediatamente después se volvió a transferir el tubo con la mezcla a hielo durante 2 min para posteriormente añadir 950 μL de medio de cultivo LB sin antibiótico y se colocó en un equipo Thermomixer® a 37 °C durante 1.5 h. Posteriormente se prepararon placas con medio LB + ampicilina, a las que se añadió el componente X-Gal (20 μL a una concentración de 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$) y el componente IPTG inductor de la alfa-complementación (100 μL a 100 mM), por último, una vez transcurrida la incubación, las células se sembraron en las placas y se incubaron a 37 °C durante toda una noche.

7.12 Extracción de DNA plasmídico de bacterias

La obtención de DNAp se llevó a cabo con el protocolo de Bimboim y Doly (1979). Las colonias se sembraron en 3 mL de medio LB líquido con ampicilina a 37 °C y agitación durante toda una noche, posteriormente se transfirió el cultivo a tubos eppendorf de 2ml y se centrifugó a 12000 rpm durante 30 s. El sobrenadante se descartó y el sedimento celular se resuspendió en 300 μL de la solución P1 (Tris-HCl pH8 50mM; EDTA 10mM; RNAsa A 0.1 mg mL^{-1}). Posteriormente, se añadieron 350 μL de la solución P2 (NaOH 200 mM; SDS 1%), se mezcló por inversión y se añadieron 350 μL de la solución P3 (acetato de potasio 3M, pH5.5), el tubo se invirtió varias veces y se centrifugó a 12000 rpm durante 5min. El sobrenadante se rescató y se añadió 1 vol de cloroformo-isoamílico (24:1), el tubo se agitó vigorosamente y se centrifugó durante 5 min a 12000 rpm. Posteriormente, se rescató la fase acuosa y se colocó en un tubo nuevo al cual se añadió 0.6 vol de isopropanol, el tubo se invirtió 3 veces y se guardó a -20 °C durante 15 min. Posteriormente los tubos se centrifugaron a 12000 rpm durante 5 min. El sobrenadante se desechó y la pastilla de DNA se lavó con etanol 70%. Finalmente el contenido se centrifugó durante 5min y el sobrenadante se desechó. El DNA se secó a 55 °C durante 1 a 2 min. Una vez libres de restos de etanol, los DNA's se resuspendieron en 50 μL de TE 10:1 y se almacenaron a -20°C hasta su uso posterior.

7.13 Transformación genética de *Y. lipolytica*

El ensayo de transformación genética de *Y. lipolytica* se realizó con células intactas tratadas con acetato de litio (Xuan *et al.*, 1988). La cepa P01a se inoculó en 5ml de medio completo YPG, pH 4.0 a 28 °C, en agitación durante 18h. Posteriormente se tomó el volumen necesario del preinóculo para obtener 12.5 mL del medio completo YPG pH 4.0 con una concentración de $1 \times 10^5 \text{ cel mL}^{-1}$, se incubó en un matraz de 250 mL a una temperatura de 28 °C con agitación hasta alcanzar una concentración de $1 \times 10^8 \text{ cel mL}^{-1}$. El cultivo se utilizó para obtener células competentes del hongo. El cultivo se centrifugó a 5000 rpm durante 5 min y se sometió a dos lavados con TE (Tris-HCl 10mM, EDTA 1mM, pH 8.0). El siguiente paso fue la resuspensión de las células en regulador de citrato con acetato de litio 0.1M, pH 6.0 hasta obtener una concentración de $5 \times 10^7 \text{ cel mL}^{-1}$ y se incubaron durante 1 h a 28 °C con agitación suave de 70 a 100 rpm. Posteriormente las células se centrifugaron y se resuspendieron en regulador de citrato con acetato de litio 0.1M, pH 6.0 hasta obtener una concentración de $5 \times 10^8 \text{ cel mL}^{-1}$.

Las células competentes (100 μL) se colocaron en un tubo falcon de 15 mL, posteriormente se añadieron 5 μL de DNA sonificado de esperma de salmón (5 mg mL^{-1}) y 500 ng de DNA del vector de interrupción linearizado; se mezcló suavemente y se incubó por 15 min a 28 °C sin agitación. Una vez transcurrido el tiempo se agregaron 700 μL de una solución de polietilenglicol PEG 4000 al 40 % en regulador de citrato con acetato de litio 0.1M, la mezcla se incubó por 1 h a 28 °C con agitación suave (75 rpm). Por último, las células se sometieron a un choque térmico a 39 °C durante 10 min para después añadir 1 mL de TE pH 8.0 y sembrar 200 ó 400 μL de la suspensión en placas con medio selectivo sin uracilo, mismas que se incubaron a 28°C hasta la aparición de colonias.

7.14 Determinación de la morfología colonial

Para la observación de la morfología colonial se sembró por goteo sobre la placa, colocando 5 μL de una suspensión celular de 1×10^7 , 1×10^6 , 1×10^5 y $1 \times 10^4 \text{ cel mL}^{-1}$ respectivamente en la misma placa con medio completo YPG o medio mínimo YNB, las placas se incubaron a 28 °C en oscuridad durante 36 h o hasta la visualización de la morfología colonial, el experimento se realizó con dos repeticiones.

7.15 Determinación de crecimiento celular

El análisis del crecimiento se realizó midiendo la absorbancia a 600 nm de los cultivos a diferentes tiempos, para ello se utilizó el espectrofotómetro Beckman Coulter® DU – 650 y se llevó a cabo paralelamente un conteo celular con la cámara Neubauer® bajo microscopía de campo claro con un objetivo 40X, el diseño del experimento consistió en hacer tres repeticiones de cada muestra.

7.16 Análisis de la mutante por Southern blot

La hibridación DNA-DNA se realizó siguiendo el protocolo de Southern (1975). En dicho ensayo se utilizaron 2 µg de DNAg previamente digerido con *Pst* I. Los fragmentos se separaron por electroforesis en gel de agarosa 1% y se tiñeron con bromuro de etidio. Posteriormente, se colocó el sistema de transferencia del DNA a una membrana de nylon, usando una solución de transferencia (NaOH 0.4M) durante toda una noche. Posteriormente la posición del gel se marcó en la membrana y el DNA transferido se fijó en un equipo “Stratalinker” que emite radiación UV que permite la fijación del DNA en la membrana, se aplicaron dos ciclos predeterminados por el aparato. La membrana se pre-hibridó con una solución SSC 4X que contiene SDS al 1%, reactivo de Denhardt 1X (polivinilpirrolidona, 0.02 %; Ficoll, 0.02 %; Seroalbúmina bovina, 0.02 %) y DNA de esperma de salmón (100 µg mL⁻¹) como agente bloqueador. La membrana se incubó con la solución a 65 °C durante 4 h. Posteriormente se hibridó la membrana a 65 °C durante toda una noche utilizando la solución SSC 4X con dextran sulfato de sodio 10% y DNA de esperma de salmón (100µg mL⁻¹), utilizando como sonda el fragmento *Sal* I de 0.6 kb del promotor del gen en estudio marcado por radioactividad, el marcaje de la sonda se realizó por el método de iniciador al azar (random priming) de acuerdo con las especificaciones del estuche comercial Rediprime de la compañía Amersham®, el nucleótido marcado fue la citosina con fosforo radioactivo P₃₂, el nucleótido se denominó gamma-dCTP. La membrana se lavó utilizando la solución ‘a’ (2XSSC y SDS 0.1%) a temperatura ambiente para remover el excedente de la solución de hibridación. Los siguientes lavados se realizaron con la solución ‘b’ (1XSSC y SDS 0.1%) y ‘c’ (0.1XSSC y SDS 0.1%) en intervalos de 10 a 15 min cada uno hasta que la membrana alcanzó un valor de 400 a 600 cpm. La exposición de las membranas se hizo en “cassettes” con película fotográfica X-OMAT (Kodak), incubándola a -70 °C durante 24 h.

7.17 Inducción de la transición dimórfica

Los ensayos de inducción del dimorfismo se realizaron de acuerdo con Guevara-Olvera (1993) y Ruiz-Herrera (2002). Las cepas se cultivaron en medio completo YPG en 10 mL a 200 rpm para obtener así el preinóculo. Posteriormente, se inocularon 3×10^6 células mL^{-1} en un volumen total de 2 mL de medio mínimo YNB (leucina 150 mM y uracilo 100 mM) dependiendo de los requerimientos de cada cepa; se utilizó buffer de citratos 100 mM; se utilizaron tres diferentes fuentes de carbono tales como glucosa, N-acetil glucosamina, 1.0% y suero, 2 %. Como única fuente de nitrógeno se utilizó sulfato de amonio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.5%. La preparación de las células previo a la inoculación en el medio consistió en un lavado de las células con agua destilada, posteriormente se resuspendieron en un volumen de agua destilada hasta cinco veces menor que el original y se mantuvieron en agitación suave (75 rpm) durante 4 h o hasta observar todas las células con morfología levaduriforme. Una vez sincronizados los cultivos se aplicó un choque térmico de 37 °C por 15 min. Posteriormente los cultivos se incubaron a 28 °C con agitación a 250 rpm, el experimento se realizó por triplicado, por último se registró la morfología al microscopio cada 12 h para lo cual se fotografiaron distintos campos microscópicos de alícuotas de cada muestra.

7.18 Observaciones al microscopio

El análisis de la morfología celular de las cepas de *Y. lipolytica* mutante y parental se realizó mediante microscopía de campo claro. Las observaciones se realizaron a diferentes tiempos y se hicieron diluciones cuando fue necesario, colocando 10 μL del cultivo en un portaobjetos. El análisis morfológico se realizó a 100 aumentos en el microscopio Olympus® BX51. Se capturaron imágenes de las observaciones utilizando una cámara Hitachi® KP-D50 color digital, integrada al microscopio.

8. Resultados

8.1 Análisis bioinformático de la secuencia *YIRPD3*

La secuencia del gen *YIRPD3* posee un marco de lectura abierto de 1377 pb. Con el programa computacional TRANSFAC se realizó el análisis de la región promotora, que mostró sitios de reconocimiento de factores transcripcionales que pueden sugerir los diferentes tipos de regulación de dicho gen (Fig. 2). Dentro de dicho análisis se identificaron motivos de unión al factor transcripcional MluI que se ha descrito como un regulador dependiente del ciclo celular en organismos eucariotes. Además esta presente el sitio MSN2/MSN4 al cual se une reguladores de respuesta a estrés; el motivo Gal4 es un sitio de activación de la transcripción bajo inducción por galactosa que es característico de levaduras. El sitio HMG box es reconocido por proteínas de activación transcripcional del tipo denominado “grupo de alta movilidad” y es un sitio de interacción para la proteína Ste11p. También se encuentra el sitio de unión GCN4 que es un factor de activación transcripcional característico de levaduras. Adicionalmente, se identificó la posible caja TATA de inicio de la transcripción de este gen.



Figura 3. Secuencia de la región promotor del gen *YIRPD3*, se destacan los motivos de unión a factores transcripcionales identificados, así como la posible caja TATA de inicio de la transcripción.

El análisis de la región del terminador del gen *YIRPD3* mostró las secuencias conservadas que sirven de señal para el término de la transcripción en levaduras, los motivos observados son TTT, TAG, TAGT, y regiones ricas en Timina (Russo, 1993) (Fig. 4).

```

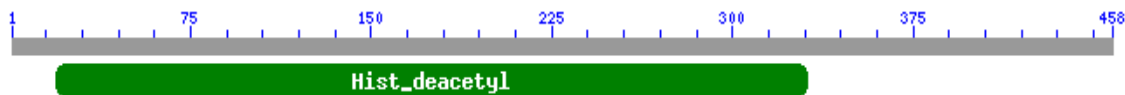
ATGCCAAGGACATCAACAACCTCTAGGACAAGGATGTCGCCATGGAGGACTAATTTTATTATATGTAGAAGAATAAATT      80
TATGTTGACTAGCTATCAAACGTTGGACGGGCACATATCATATGATAAATTGTATAGAAAATAACACACAGGAGTATGGAGA      160
CATAGTCAAGACTTGTGGATGATGCGATAACATGTTTGTGTAGAAGATAAATTCAAACTAATACAGTATGGAGAATGC      240
AATGGTTGACTATCAAAGTCGACTCTGTTTTCTTTTCAAATGCCAATCAAACCTGTACCCACCTTGTCTGTAGTCCTC      320
ATACTCCTGGCCAAAGAAGGAGACGAGAAACTGCTCTTCAAAGTCGATTGTTCCCGGAAAAGGCCAGAGAACTACAA      400
AGAAGGCCGCAAAGCCACAGAGTTGAACAGCAGCATCTGAGTGCCCAAGGCCAGTAGAAGAAGCCAAAGTAGGACGGG      480
TGACGCAGCAGAGAGTAGAT                                          500

```

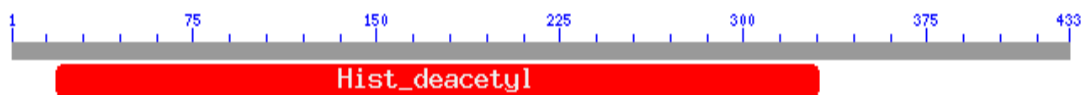
Figura 4. Representación de la secuencia del terminador del gen *YIRPD3* donde se identificaron de secuencias características de terminación de la transcripción en levaduras.

El marco de lectura de *YIRPD3* codifica para una proteína de 458 a.a. que muestra una identidad mayor al 80% con respecto a su homóloga en *S. cerevisiae* (Cuadro 9). YIRpd3p presenta el dominio característico de esta familia de enzimas (Fig 5).

Y. lipolytica



S. cerevisiae



C. albicans

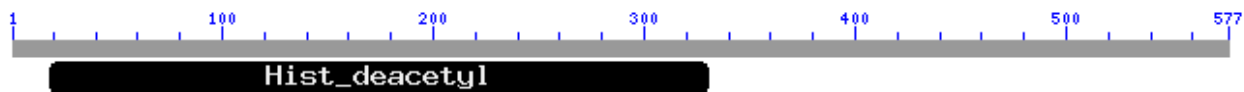


Figura 5A. Comparación de secuencias de Rpd3p en levaduras, se muestra una representación esquemática de la secuencia aminoacídica de YIRpd3p comparada con las secuencias de Rpd3p de *S. cerevisiae* y *C. albicans* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

Cuadro 9. Identidad de YIRpd3p con otras enzimas histona desacetilasas.

Secuencias <i>RPD3</i> en otros organismos	Identidad (%)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	82
<i>Xenopus laevis</i>	58
<i>Mus musculus</i>	65
<i>Drosophila melanogaster</i>	60
<i>Homo sapiens</i>	65

Con la herramienta bioinformática Megalign de Lasergene® se alinearon distintas histona desacetilasas y se observó el grado de conservación que existe entre secuencias. Las regiones destacadas muestran los aminoácidos conservados en estas enzimas (Fig 5B.)

Posteriormente, se construyó un dendrograma con base en las secuencias de proteínas histona desacetilasas obtenidas de distintos organismos (Fig. 6).

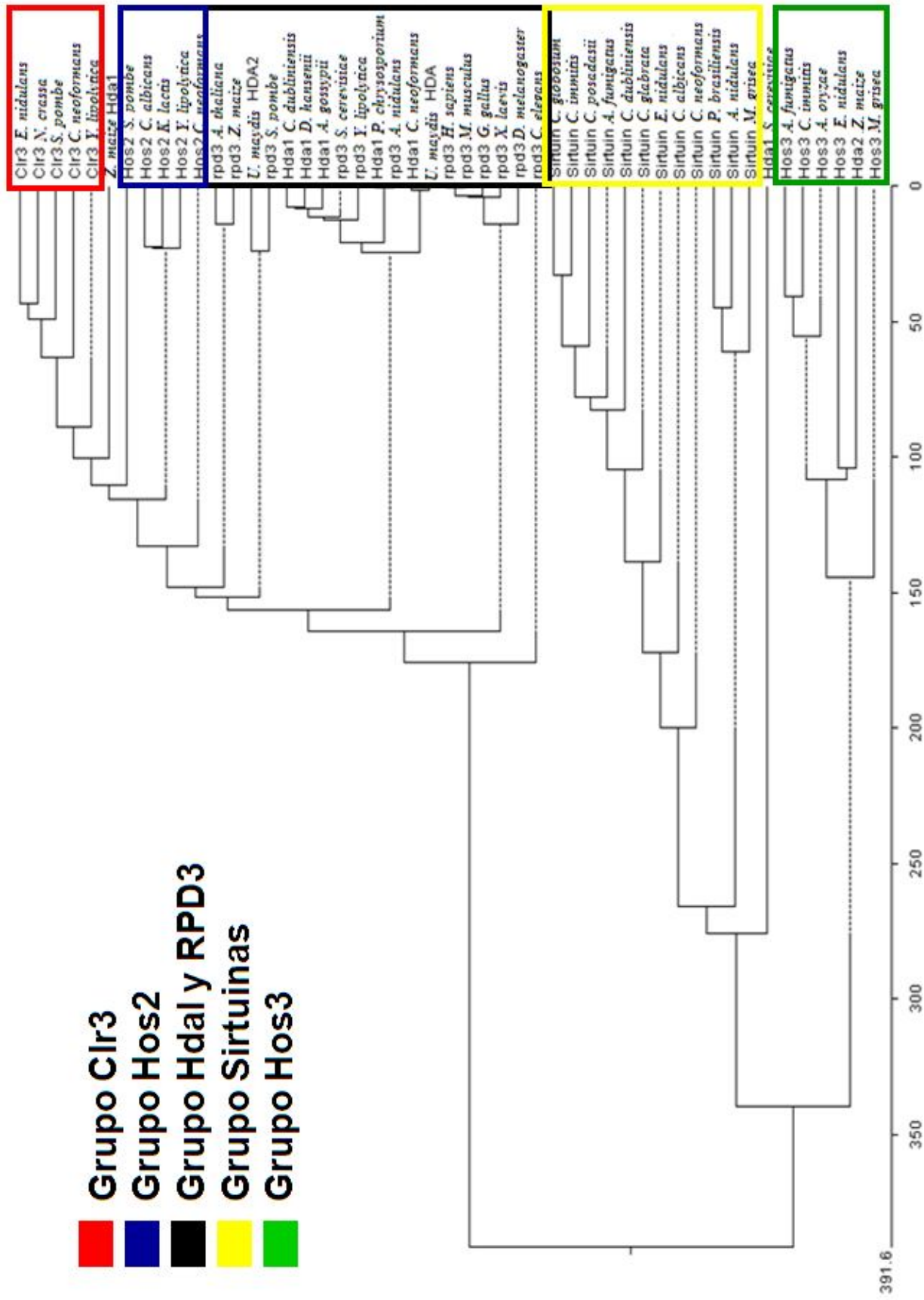


Figura 6. Dendrograma del alineamiento de secuencias de histona desacetilasas de distintos organismos.

8.2 Transformación genética de *Y. lipolytica* y obtención de la mutante $\Delta RPD3$

El ensayo de transformación genética de *Y. lipolytica* dio como resultado cincuenta transformantes que se recuperaron y analizaron por su capacidad para crecer en un medio selectivo. Las colonias transformantes se aislaron y resembraron en medio sólido y líquido de YNB con leucina. Se recuperaron cincuenta colonias para su análisis posterior.

8.3 Comprobación de la mutación

Las cincuenta colonias que se recuperaron fueron analizadas por Southern blot para observar el número de copias y el tipo de integración del vector de interrupción en el genoma del hongo, para ello se utilizó como sonda el fragmento *SalI* del promotor del gen (Fig. 8.A), utilizando DNAg digerido con *PstI*. El tamaño de la señal observada que corresponde a la copia silvestre del gen es de 3.97 kb, mientras que en las transformantes es de 2.74 kb debido al sitio interno *PstI* presente en el marcador de selección (Figs. 8 A y B). El análisis mostró que 49 de las 50 colonias analizadas integraron de manera homóloga y con copia única el vector de interrupción en la región del gen *YIRPD3*. Adicionalmente se llevaron a cabo pruebas de PCR para corroborar la integración de la copia no funcional del gen *YIRPD3* (Figs. 9 y 10).

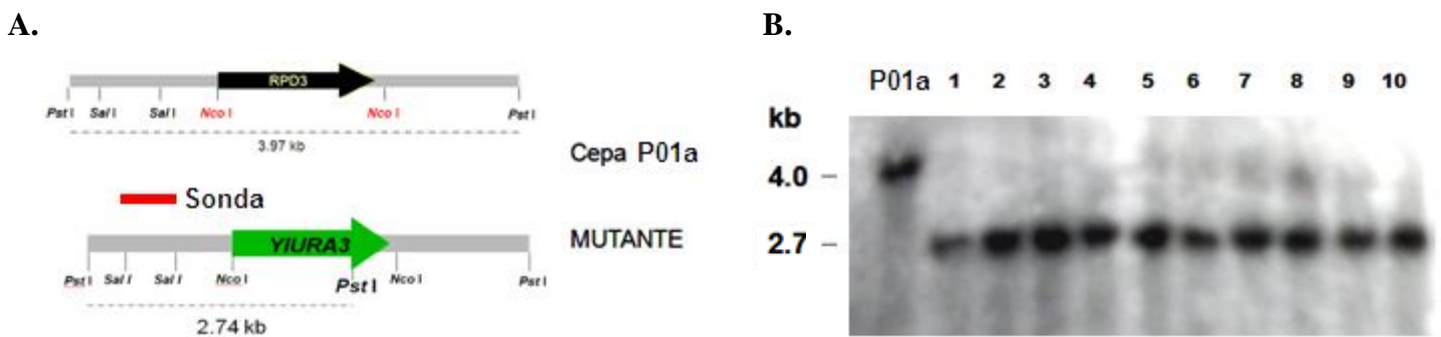


Figura 8. Comprobación de la mutación del gen *YIRPD3* A. Representación esquemática del análisis de restricción de la copia silvestre y mutante y el fragmento utilizado como sonda en el análisis tipo Southern. B. Análisis de las cepas de *Y. lipolytica* mediante Southern blot para comprobar la mutación del gen *YIRPD3*.

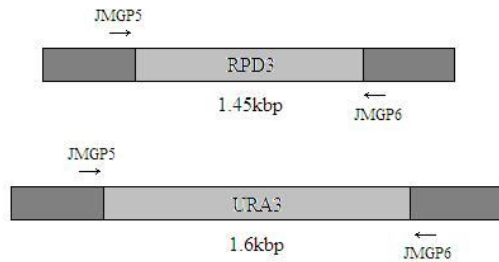
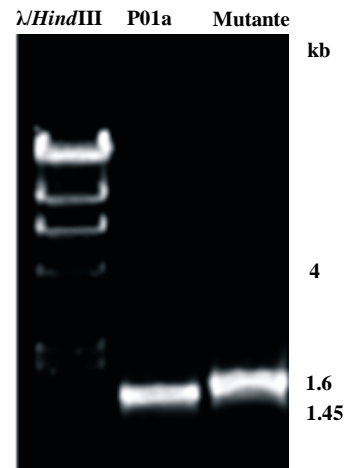
A.**B.**

Figura 9. **A.** Representación esquemática del sitio donde se diseñaron los oligonucleótidos para el ensayo de PCR para la comprobación de la mutación, el tamaño esperado para el fragmento obtenido con DNAg de la cepa parental es de 1.45kbp, mientras que el tamaño esperado para el fragmento de DNAg de la mutante es mayor con un tamaño de 1.6kbp. **B.** Resultados de la amplificación por PCR utilizando los oligonucleótidos JMGP5 y JMGP6 en cepas de *Y. lipolytica*.

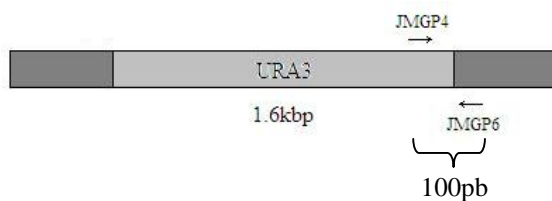
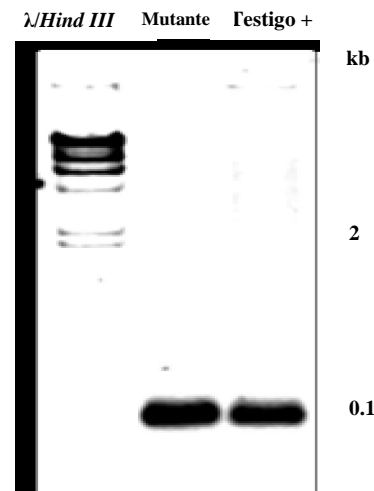
A.**B.**

Figura 10. **A.** Representación esquemática del diseño de oligonucleótidos para la comprobación de la mutación, el oligo sentido se ubicó en la región 3' del marcador de selección, mientras que el oligo reverso se diseñó en la región terminador del gen *YIRPD3*, el tamaño esperado es de 100pb. **B.** Resultados de la amplificación por PCR utilizando los oligonucleótidos JMGP4 y JMGP6 en cepas de *Y. lipolytica*.

8.4 Análisis de la mutante *ARPD3*

El análisis de la cepa mutante consistió en la observación y comparación de su morfología colonial y celular respecto de la cepa parental cultivada y documentada bajo las mismas condiciones, lo que permitió la caracterización fenotípica de la cepa obtenida en este estudio.

8.4.1 Análisis fenotípico de la mutante

El análisis de la morfología colonial se realizó cultivando la cepa P01a y una de las cepas mutantes en placas con medio completo durante 36 h y se realizó un registro fotográfico. Las diferencias en el borde de colonia fueron notables, las cepas parentales P01a presentaron crecimiento de borde irregular y apariencia rugosa mientras que las cepas mutantes mostraron bordes circulares y apariencia cremosa y lisa. Debido al fenotipo colonial, la cepa mutante se denominó ‘meztli’ (que significa ‘luna llena’ en lengua náhuatl) (Fig. 11).

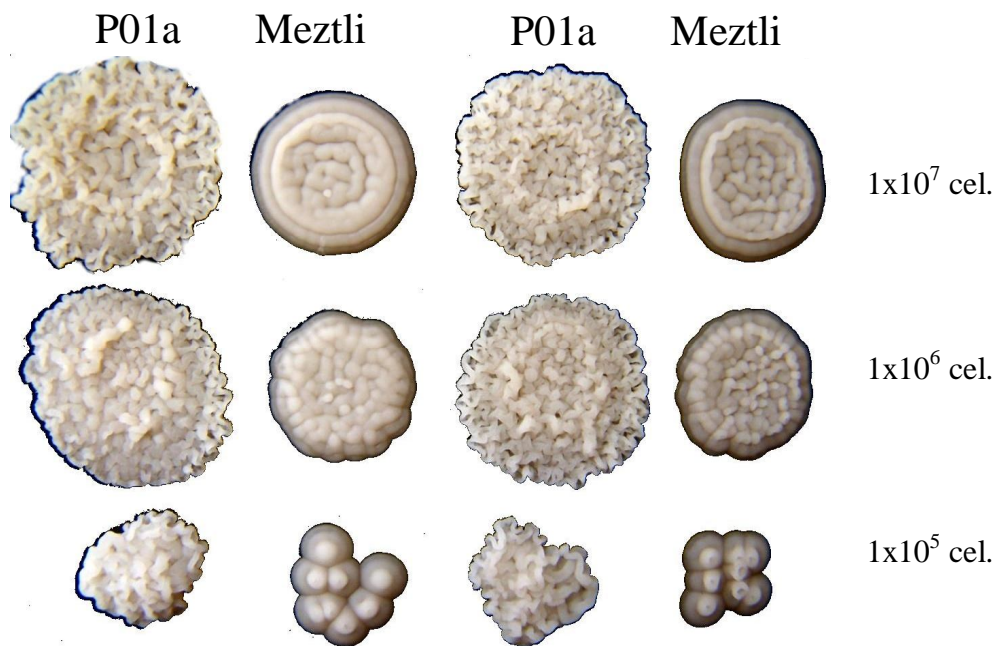


Figura 11. Morfología colonial de cepas de *Y. lipolytica* en medio completo YPG a diferentes concentraciones celulares.

El análisis de la morfología celular se determinó cultivando la cepa meztli y la parental P01a en medio completo YPG y medio mínimo YNB con microscopía de campo claro. Las células de la cepa mutante se caracterizan por una morfología ovalada (Fig. 12) y mayor tamaño que la parental en medio mínimo (Fig. 13).

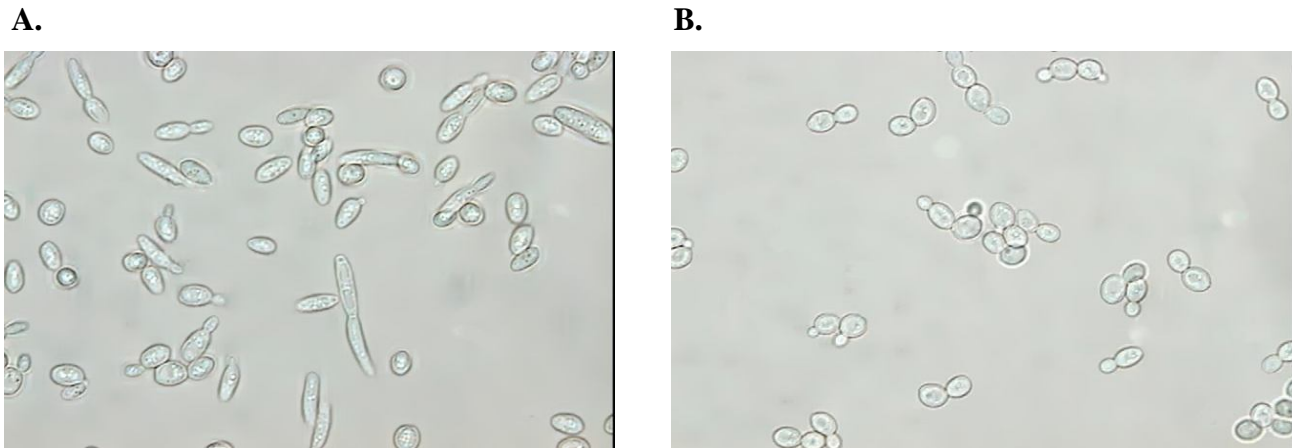


Figura 12. Morfología celular de cepas de *Y. lipolytica* en medio completo YPG. **A.** P01a. **B.** Meztli. Observaciones realizadas a 100X.

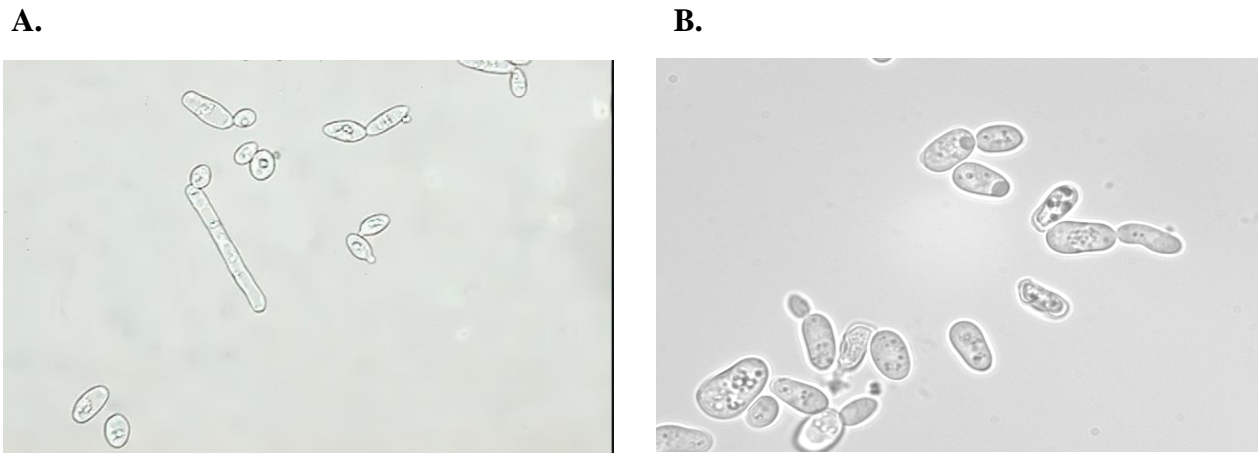


Figura 13. Morfología celular de cepas de *Y. lipolytica* en medio mínimo YNB. **A.** P01a. **B.** Meztli. Observaciones realizadas a 100X

La tasa de crecimiento en medio completo (Fig. 14) no mostró diferencias entre la cepa meztli y parental. En medio mínimo se observó una drástica reducción en la tasa de crecimiento de la cepa mutante respecto a la cepa parental de aproximadamente siete veces (Fig. 15).

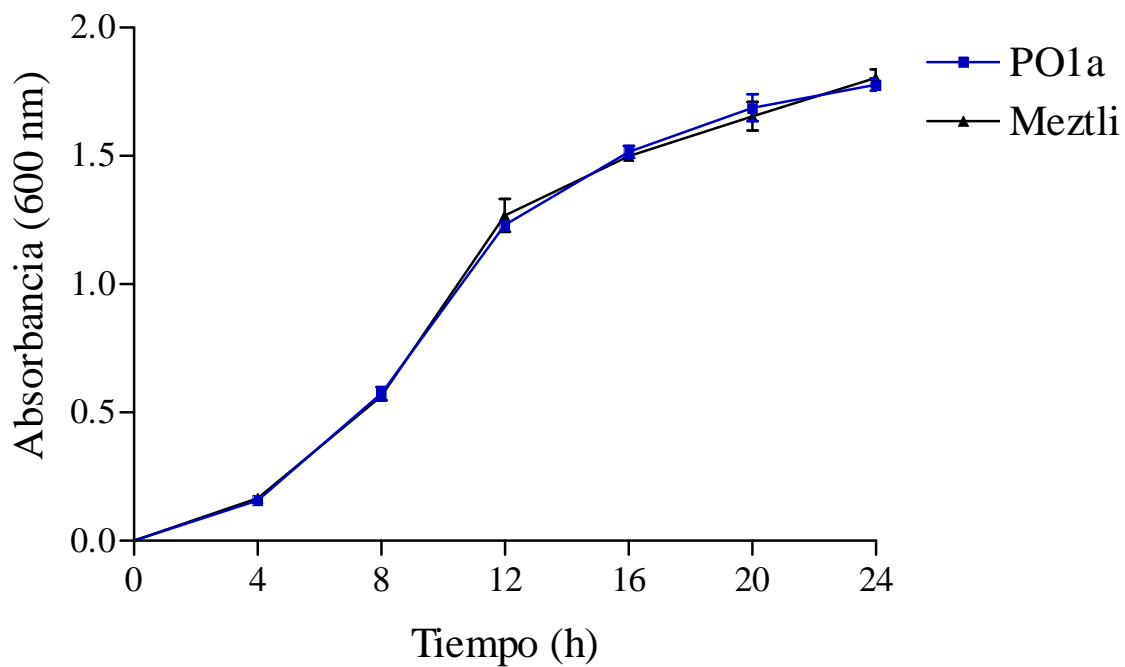


Figura 14. Crecimiento de cepas de *Y. lipolytica* en medio completo YPG. Los valores son el promedio de tres repeticiones y se calculó el error estándar a través del programa Prisma® para obtener las barras de error.

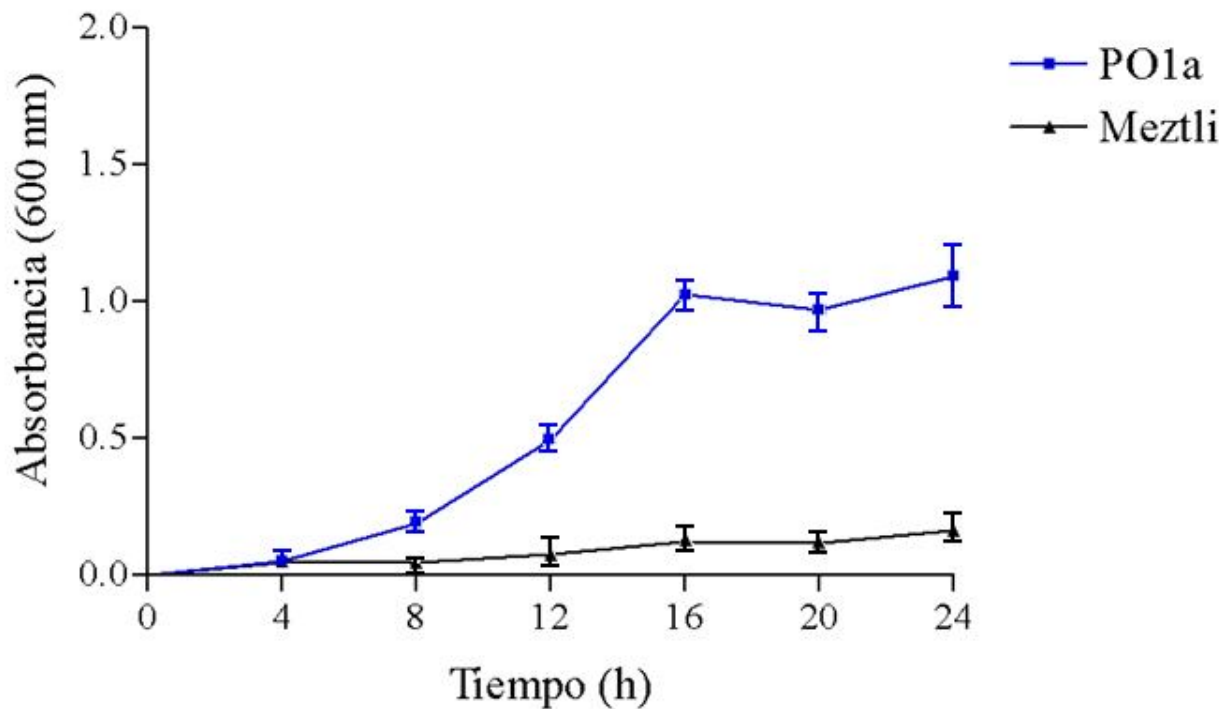


Figura 15. Crecimiento de cepas de *Y. lipolytica* en medio mínimo YNB. Los valores son el promedio de tres repeticiones las barras mostraron el error estándar a través del programa Prisma®.

La capacidad de asimilación de las cepas de *Y. lipolytica* en medio mínimo YNB se evaluó en diferentes fuentes de carbono (Fig. 16 y 17). La glucosa y sacarosa son las fuentes de carbono más eficientemente asimiladas por P01a, el resto de las fuentes de carbono fueron pobremente asimiladas (Fig. 16). Meztli mostró una diferencia clara respecto a la parental en la asimilación de las fuentes de carbono ensayadas (Fig. 17).

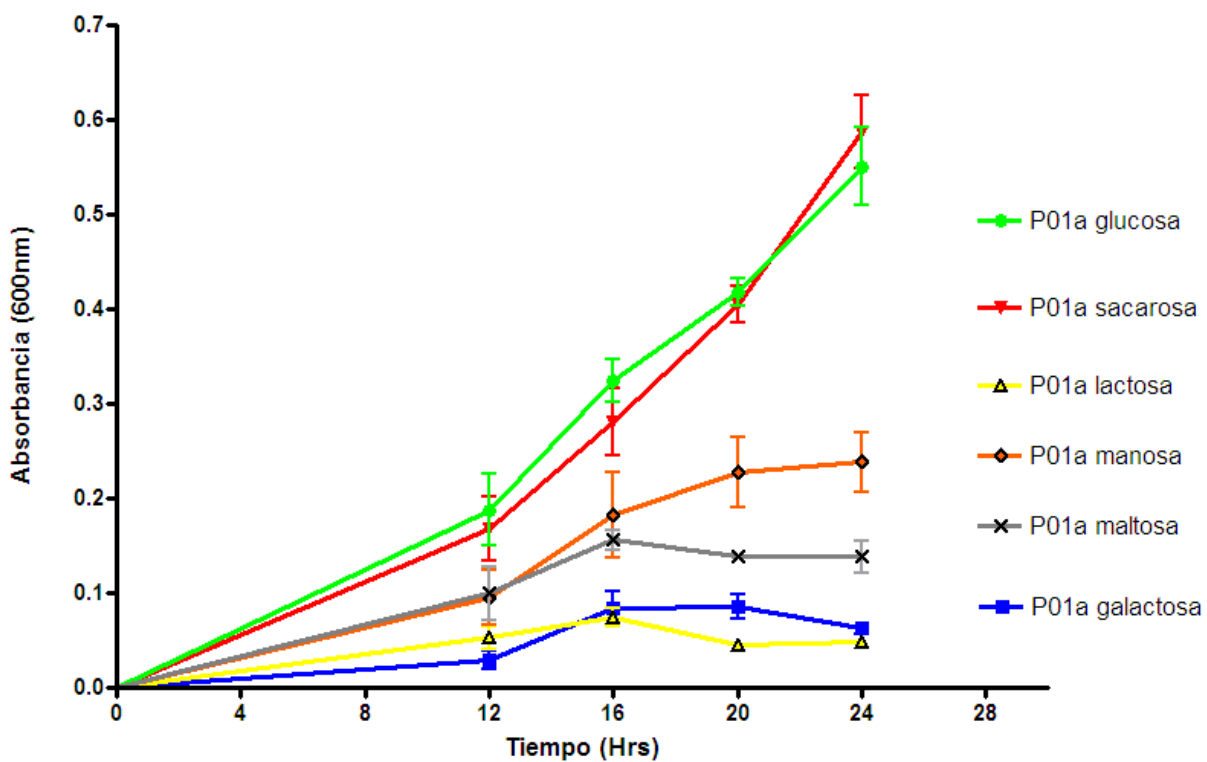


Figura 16. Asimilación de diferentes fuentes de carbono de la cepa P01a en medio mínimo YNB, los valores son el promedio de tres repeticiones y se calculó el error estándar con el programa Prisma®.

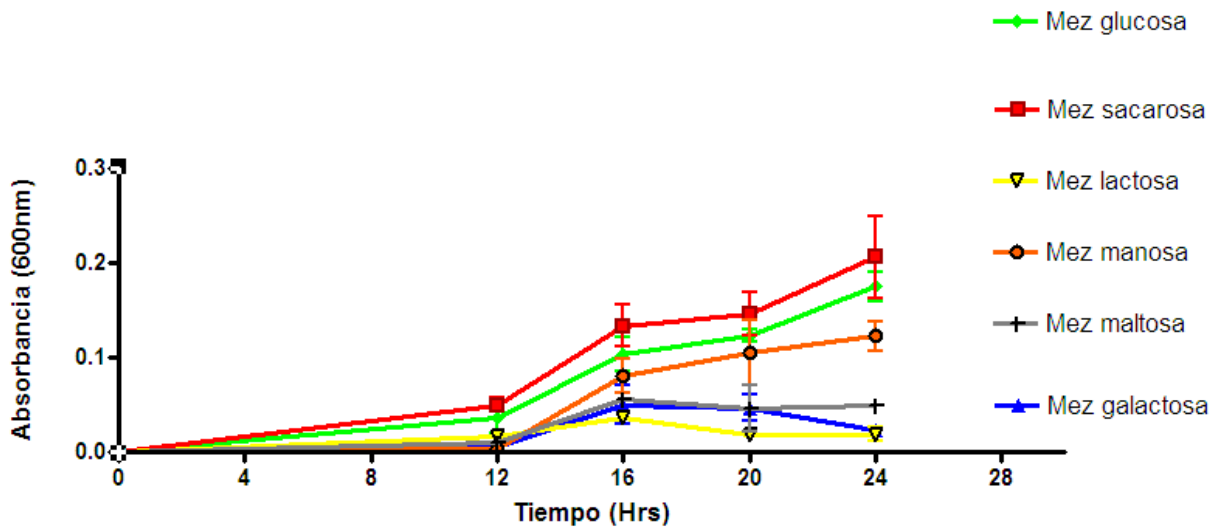


Figura 17. Asimilación de diferentes fuentes de carbono de la cepa meztli en medio mínimo YNB. Los valores mostrados son el promedio de tres repeticiones, las barras de error se calcularon por medio del error estándar con el programa Prisma®.

8.3.2 Análisis del dimorfismo de la cepa meztli

La morfología celular en el tiempo cero es levaduriforme para ambas cepas, debido a la sincronización a la que se sometió previo a la inoculación en el medio inductor (resultados no mostrados). A las 12 horas de incubación a pH7 con glucosa se observan células de la cepa parental respondiendo al estímulo presentando la formación de micelio; la cepa meztli presentó una tasa de crecimiento menor respecto a la parental y su morfología celular fue levaduriforme. Con N-acetil glucosamina en P01a se observaron células alargadas; mientras que en meztli se detectaron células levaduriformes ligeramente alargadas. En suero, P01a mostró mayor respuesta a la transición dimórfica con un mayor número de células con morfología micelial; mientras que meztli con suero, exhibió tasa de crecimiento menor y morfología levaduriforme con células ligeramente alargadas por la gemación en los polos, similares a las observadas en los cultivos con N-acetil glucosamina (Fig. 18).

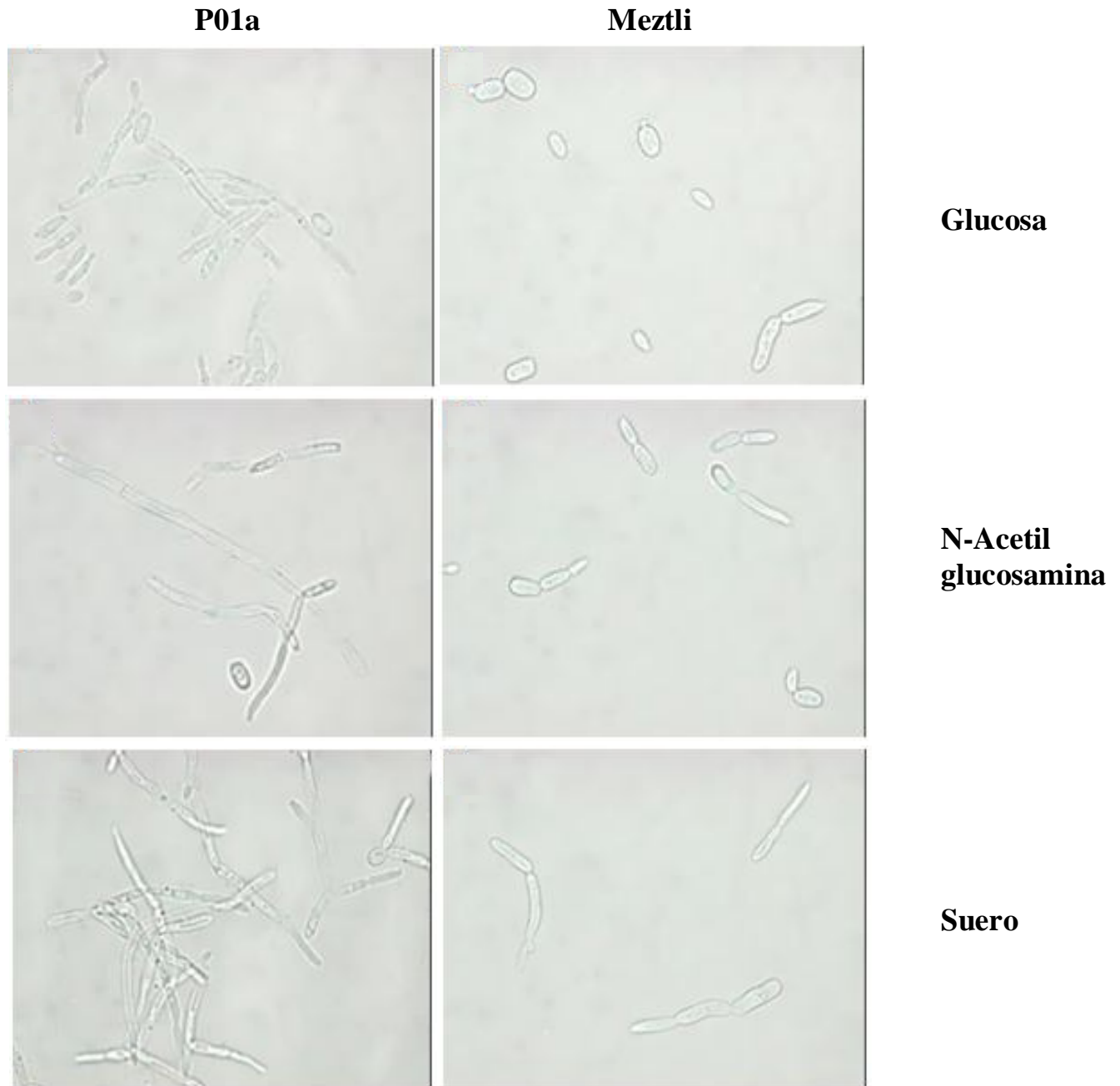


Figura 18. Morfología celular de cepas de *Y. lipolytica* en medio mínimo YNB a pH 7.0 a las 12 horas de incubación con diferentes fuentes de carbono.

A las 24 horas de incubación se registró nuevamente la morfología celular de los cultivos de P01a y meztli. A pH 7.0 con glucosa se observó que P01a presentó una morfología micelial con hifas muy largas en tanto que meztli mantuvo morfología celular totalmente levaduriforme. Los cultivos con N-acetil

glucosamina muestran que la cepa parental desarrolló casi por completo un crecimiento micelial; mientras que meztli presentó morfología levaduriforme. Las observaciones de los cultivos con suero mostraron a la cepa P01a con morfología 100% micelial; mientras que los cultivos de meztli exhibieron una morfología levaduriforme con células ligeramente alargadas (Fig. 19).

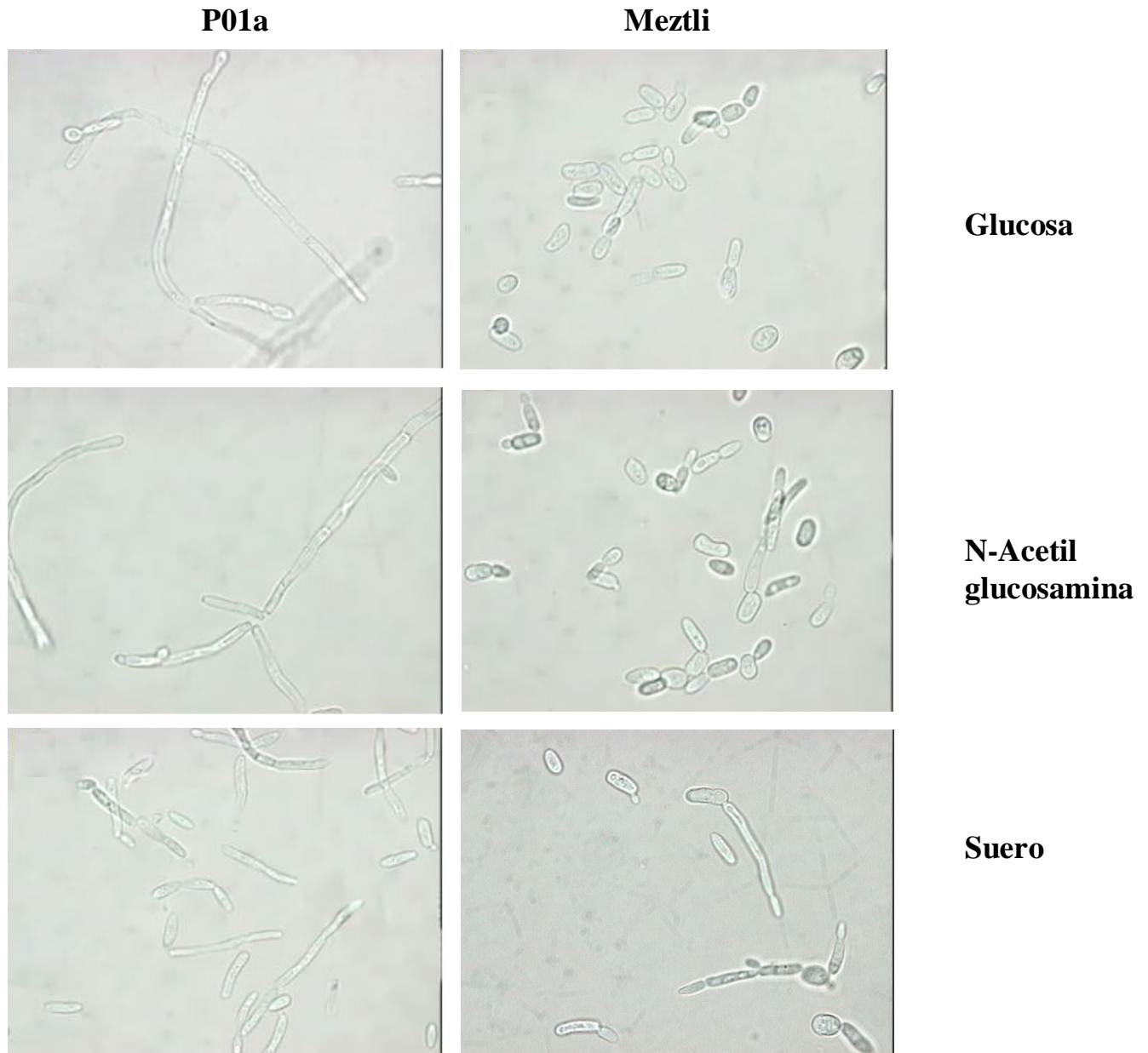


Figura 19. Morfología celular de cepas de *Y. lipolytica* en medio mínimo YNB a pH 7.0 a las 24 horas de incubación con diferentes fuentes de carbono.

A las 12 horas de incubación se realizaron observaciones microscópicas de los cultivos a pH 3.0. Los cultivos de P01a en glucosa mostraron morfología micelial y en los cultivos de la cepa meztli se encontraron solo levaduras. Los cultivos con N-acetil glucosamina de P01a mostraron una tasa de crecimiento menor que la observada a pH 7.0 y morfología micelial; la cepa meztli en cambio mostró morfología celular levaduriforme. P01a en suero exhibió morfología celular micelial y bajo número de células observadas por campo óptico; por su parte los cultivos de meztli mostraron levaduras ligeramente alargadas (Fig. 20).

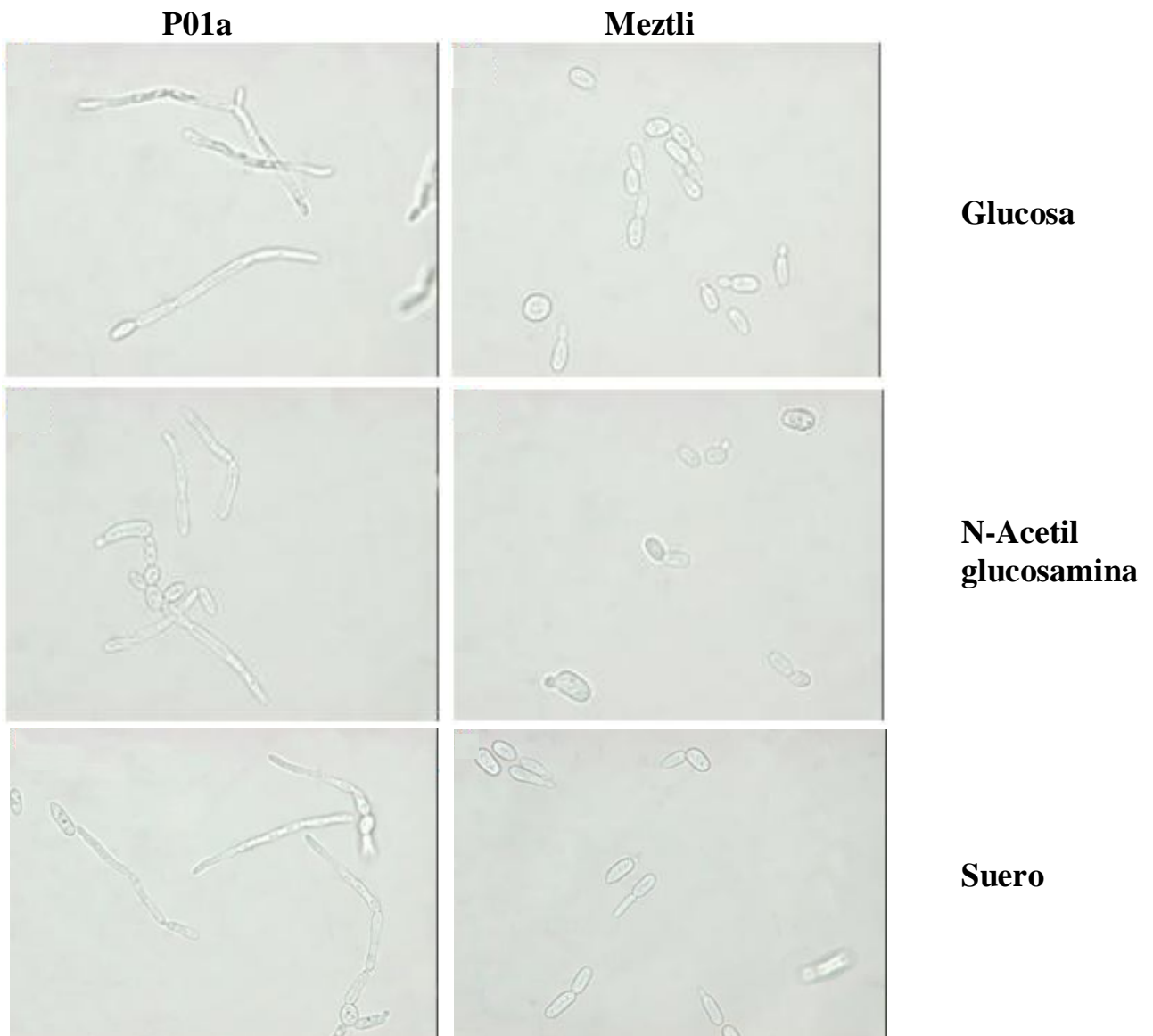


Figura 20. Morfología celular de cepas de *Y. lipolytica* en medio mínimo YNB a pH 3.0 a las 12 horas de incubación con diferentes fuentes de carbono.

A las 24 horas de incubación a pH 3.0, la cepa parental en medio con glucosa, N-Acetil glucosamina y suero mostró una morfología celular micelial; en tanto que meztli mostró solamente células levaduriformes (Fig. 21).

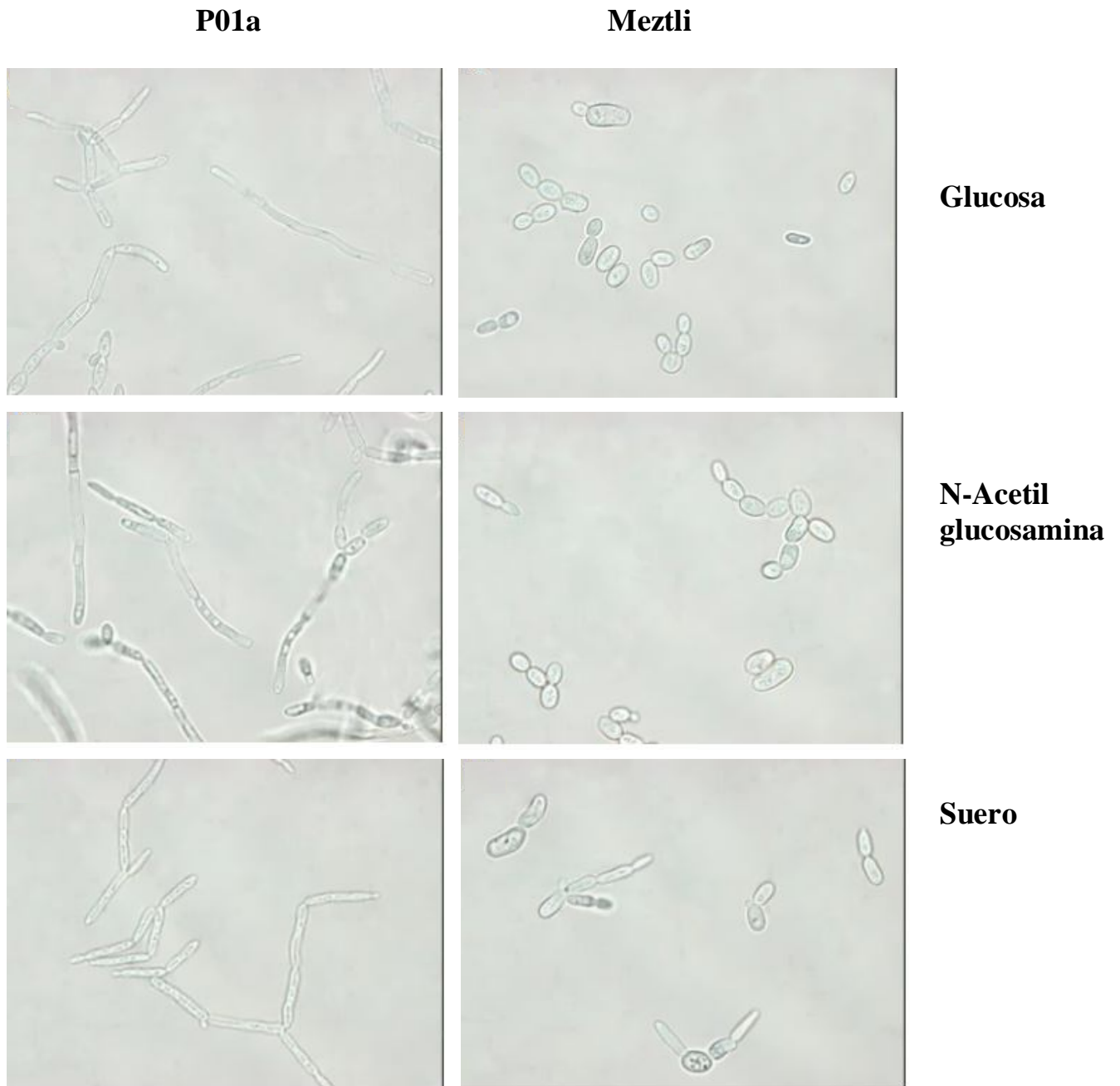


Figura 21. Morfología celular de cepas de *Y. lipolytica* en medio mínimo YNB a pH 3.0 a las 24 horas de incubación con diferentes fuentes de carbono.

Finalmente, se registró la morfología de los cultivos a las 48 h con el fin de observar posibles cambios en la morfología registrada durante las primeras 24 h en ambas cepas. La morfología celular de la cepa meztli se mantuvo levaduriforme en todas las condiciones ensayadas; en tanto que P01a exhibió morfología micelial a las 48 h. Cabe mencionar que el suero como inductor de la miceliación, tuvo un efecto ligero en meztli cuando se cultivó a pH 7, ya que se observaron células levaduriformes en gemación más alargadas de lo normal (datos no mostrados).

9. Discusión.

El análisis de la secuencia obtenida de la base de datos www.genolevures.org del gen *YIRPD3* mostró un tamaño de 1377 pb que corresponde al promedio observado en la secuencia homóloga reportada del gen *Rpd3* de *S. cerevisiae* (Vidal *et al.*, 1990). La secuencia carece de intrones al igual que las ya reportadas (Srikantha *et. al.*, 2001). Un análisis de la región del promotor del gen *YIRPD3* reveló la presencia de sitios de reconocimiento de proteínas y factores reguladores transcripcionales similares a los reportados para *Rpd3* en *S. cerevisiae*. La presencia del sitio de unión a MluI sugiere que *YIRPD3* puede estar regulado en alguna etapa del ciclo celular, probablemente al final de la fase M del ciclo puesto que se observan células de la cepa mutante que no alcanzan a separarse una vez que han gemado. Una región MSN2/MSN4 se identificó, esta podría participar en respuesta a situaciones de estrés en el organismo (Schmitt y McEntee, 1996), en este caso, el estrés nutricional que sufre el hongo en condiciones de medio mínimo. La secuencia de unión al factor transcripcional Gal4 (Melcher y Johnston, 1995) presente en el promotor indica que probablemente la galactosa pudiera influenciar la actividad de *YIRPD3*, sin embargo la galactosa fue una de las fuentes de carbono utilizadas en el análisis fenotípico de la mutante y fue pobremente asimilada no solo por la cepa mutante sino también por la parental. La secuencia HMG box sirve como sitio de interacción a la proteína Ste11p perteneciente a la vía de señalización de las MAP cinasas en hongos, tal es el caso de *S. cerevisiae* y *S. pombe* (Kjærulff *et al.*, 1997) por lo que es posible que dicha ruta cuya activación se da en respuesta a nutrientes afecte la expresión del gen en estudio. Además se observó la secuencia que reconoce el factor GCN4 cuya implicación en los procesos de biosíntesis de aminoácidos en respuesta a carencia de los mismos es conocida (Hope y Struhl, 1986), esto indica la posibilidad de que *YIRPD3* participe en la regulación de genes responsables de la respuesta a condiciones de limitación o ausencia de aminoácidos, situación que se presenta en condiciones de medio mínimo y cuya repercusión en la cepa mutante se traduce en una disminución en su tasa de crecimiento.

El análisis de la región terminador mostró los motivos característicos en levaduras que sirven de señal para la terminación de la transcripción. La identidad entre la secuencia del gen *Rpd3* de *S. cerevisiae* y *RPD3* de *Y. lipolytica* es mayor a 80%, lo cual sugiere que son genes homólogos, este hecho se ve reforzado en la comparación de dominios cuyo resultado mostró que el mismo dominio histona desacetilasa con 312 a.a. de extensión esta presente en los genes correspondientes de *S. cerevisiae* y *C. albicans*; incluso en *S. cerevisiae* el dominio inicia en la misma posición de la secuencia aminoacídica (19 al 331). La longitud promedio del dominio histona desacetilasa fue 312 aminoácidos y se observaron

variaciones mínimas. Tales evidencias indican que el gen en estudio corresponde al homólogo de *RPD3* en *S. cerevisiae*.

Actualmente la clasificación de las enzimas histona desacetilasas esta basada en comparaciones entre secuencias dentro de la cual se proponen tres principales clases de histona desacetilasas: la clase I donde se agrupan las desacetilasas clásicas conteniendo las subclases RPD3, HDA1 y HOS3; la clase II contiene a las histona desacetilasas Sirtuinas dependientes de NAD⁺ con las subclases SIR2 y HST1-4. Finalmente la clase III agrupa a las enzimas HD2 específicas de plantas (Trojer *et al.*, 2003). Con diferentes secuencias proteicas de histona desacetilasas se realizó un dendrograma que mostró las relaciones entre las especies analizadas y donde se situó a la secuencia YIRpd3p en el grupo de las histona-desacetilasas clase I, en tanto que las demás incluidas se agruparon de manera congruente a la clasificación descrita anteriormente, por lo que las relaciones filogenéticas a partir de distintas secuencias de desacetilasas apoyan la clasificación propuesta por Trojer.

La técnica de doble recombinación homóloga fue seleccionada para la interrupción de *YIRPD3*. A través de esta técnica se eliminó la mayor parte del marco de lectura incluyendo el dominio funcional histona desacetilasa. El resultado obtenido en este trabajo mostró una integración sitio-específica de copia única del gen mutado en 49 de las 50 colonias analizadas.

El análisis de la morfología colonial mostró a la cepa mutante meztli (*ΔRPD3*) con apariencia cremosa, de borde definido y circular, mientras que la cepa parental P01a exhibió colonias rugosas de borde irregular. El fenotipo de la cepa meztli (*ΔRPD3*) presentó similitud a nivel de morfología colonial y celular con cepas afectadas en el gen *YIBEM1* (Cleofe y Rachubinsky, 2002) así como en mutantes en *HOY1* (Torres-Guzmán y Domínguez, 1997) y *ODC* (Jiménez-Bremont *et al.*, 2001)

En medio completo el crecimiento entre P01a y meztli no mostró diferencias significativas, sin embargo en medio mínimo se observó una drástica reducción del crecimiento de la cepa mutante respecto de la parental de siete veces aproximadamente; la morfología celular mostró diferencias claras entre P01a y meztli, las células de P01a son ligeramente alargadas y se observa una mezcla de células levaduriformes y algunas hifas cortas. En la cepa meztli se observan células más redondeadas, de mayor tamaño y en muchos casos una morfología deformada, logrando gemar pero con defectos en la separación de las células, sugiriendo que la mutación puede impactar en el desarrollo normal del ciclo celular en el hongo.

Las fuentes de carbono mejor asimiladas por la levadura fueron glucosa y sacarosa; la maltosa, manosa, galactosa y lactosa son pobremente asimiladas de acuerdo a lo observado en las curvas de crecimiento, comparativamente existe un estudio hecho para la determinación de los patrones de

asimilación de fuentes de carbono de diferentes levaduras donde observaron que en *S. cerevisiae* al igual que en *Histoplasma capsulata*, *Pichia pastori* entre otros, asimilan de manera eficiente la glucosa, seguida por la sacarosa y galactosa, mientras que la lactosa, maltosa y manosa son generalmente poco asimilables como única fuente de carbono en levaduras (Shifrine, 1954). En los ensayos se observó que meztli crece en una proporción mucho menor respecto a P01a; sin embargo mantiene el perfil de asimilación de fuentes de carbono tal como la cepa parental y por tanto, la eliminación del gen *YIRPD3* probablemente no tiene influencia en la asimilación de las fuentes de carbono analizadas.

El diseño experimental para observar la respuesta de meztli a la inducción del dimorfismo se realizó como describen Ruiz-Herrera y Santandreu (2002) cultivando simultáneamente la cepa meztli y la P01a bajo las mismas condiciones y registrando cada 12 horas la morfología celular. A las 12 horas se observó que P01a mostró células alargadas mientras que meztli exhibió una morfología completamente levaduriforme independientemente de la fuente de carbono y pH ensayados, este fenotipo resulta similar al reportado por Cleofe y Rachubinsky (2002), en cuyo estudio se obtuvieron mutantes afectadas en el gen *YIBEM1* el cual es homólogo al gen *Scd2* de *S. cerevisiae* cuya participación en el crecimiento polarizado de ese hongo es bien conocida, las observaciones al microscopio de dicha mutante indicaron la presencia de células esféricas, de mayor tamaño y en muchos casos deformes respecto a la parental de referencia y de igual forma que lo observado en meztli resultaron incapaces de llevar a cabo la transición dimórfica, Aunado a lo anterior se ha observado que mutantes del gen *YIRAC1* que codifica para una molécula de señalización indispensable para la formación de micelio, presentan un fenotipo similar al observado en las mutantes afectadas en *RPD3* con morfología celular de forma redondeada e incapacidad para llevar a cabo la transición dimórfica (Hurtado *et al.*, 2000), estas evidencias sugieren que el fenotipo similar de dichas mutantes implica una posible interacción entre la señalización que lleva a cabo *YIRAC1* y la actividad como factor transcripcional de *YIRPD3* y el complejo del que forma parte.

A las 24 horas P01a mostró una morfología micelial en las condiciones ensayadas; sin embargo en pH 3 mostró una mezcla de levaduras y micelio, contrastando con lo observado por Ruiz-Herrera y Santandreu (2002), quienes reportaron una morfología levaduriforme en pH 3, probablemente la respuesta de la cepa P01a a la miceliación a pH3 se deba a que algunas células no se sincronizaron al inicio del experimento. Por su parte la morfología observada en la cepa meztli es levaduriforme independientemente de las fuentes de carbono y pH probados, El suero provocó una morfología levaduriforme aunque con células más alargadas que las observadas en glucosa y N-Acetil glucosamina como fuente de carbono. A las 48 horas se registró también la morfología de los cultivos de meztli y P01a, observando solamente

células levaduriformes en los cultivos de meztli y micelio en los cultivos de P01a. Estas observaciones indican que independientemente del tiempo de cultivo ensayado para la inducción de la transición dimórfica, la morfología celular muestra el mismo patrón. La razón de monitorear la morfología después de las 48 h se debe a que algunas cepas de este hongo pueden miceliar cuando se cultivan por períodos mayores a 36 h (Barth y Gaillardin, 1996).

Un estudio de cepas de *Y. lipolytica* defectivas en el gen *HOY1* cuyo producto se ha identificado en el núcleo, contiene un homeodominio que le permite interacción con DNA y es característico de distintos factores transcripcionales. Dichas mutantes son incapaces de formar micelio y presentan una morfología deforme y alterada respecto a la parental (Torres-Guzman y Domínguez, 1997).

Por las evidencias anteriores dada la similitud de fenotipos observada con otros genes estudiados previamente, queda clara la participación del gen *YLRPD3* en el dimorfismo de *Y. lipolytica*, aunque por la naturaleza de la proteína que codifica, se sabe que actúa como regulador de la expresión de ciertos genes (Rundlett *et al.*, 1996), lo que sugiere que puede actuar al final de una de las vías de transducción de señales del hongo debido a que se asocia con otras proteínas formando complejos que actúan a nivel de la cromatina. Las observaciones realizadas sobre la cepa meztli de *Y. lipolytica* incapaz de realizar el cambio dimórfico son consistentes con la teoría de que al ser *RPD3* un cofactor que interviene en la represión o silenciamiento génico está íntimamente ligado a procesos diferenciativos que se caracterizan por un alto grado de regulación de la expresión génica (Vidal y Gaber, 1991). En *S. cerevisiae* se ha descrito a *TUP1* como factor represor de la transcripción. En *C. albicans* la mutación del gen *TUP1* provoca un crecimiento micelial constitutivo (Braun *et al.*, 1997). Adicionalmente se ha descrito la interacción entre *TUP1* y complejos de histona desacetilasas (Davie, 2003), en *S. cerevisiae* se ha descrito la participación de *TUP1* en la formación de heterocromatina a través del reclutamiento de la histona desacetilasa *HDA1* (Fagerstrom 2005), sin embargo la prueba de la interacción de *TUP1* y *RPD3* en *S. cerevisiae*, la dio a conocer Watson *et al.*, (2000) al observar que la eliminación de *RPD3* provoca un cambio significativo en la actividad represora de *TUP1*. Por la evidencia anterior, es probable que en *Y. lipolytica* el gen *RPD3* actúe junto con *TUP1*, lo que explicaría que la cepa meztli crezca constitutivamente como levadura, y por tanto, *RPD3* esté actuando como un regulador positivo de la miceliación.

10. Conclusiones

Se identificó la secuencia del gen *RPD3* de *Y. lipolytica*, así como el dominio histona desacetilasa, a su vez se analizó la región del promotor encontrando los posibles mecanismos de regulación del gen. La identidad entre *YIRPD3* y otras histona desacetilasas fue significativa, lo que permitió predecir que el gen *YIRPD3* es homólogo a *RPD3* de *S. cerevisiae*.

La caracterización fenotípica de la mutante de *Y. lipolytica* afectada en el gen de la histona desacetilasa *RPD3* demostró una reducción significativa del crecimiento comparada con la cepa parental cuando se cultivaron en medio mínimo con diferentes fuentes de carbono. La glucosa y la sacarosa se asimilaron mejor en ambas cepas que el resto de las fuentes de carbono probadas. La mutante presentó células de mayor tamaño y de aspecto redondo comparadas con las de la cepa parental que principalmente exhibió células pequeñas y ligeramente alargadas. Las colonias que formó la mutante fueron de aspecto liso, cremoso y de borde circular mientras que la cepa de referencia mostró colonias de aspecto rugoso y borde irregular.

Las observaciones realizadas sobre la respuesta dimórfica de una cepa de *Y. lipolytica* afectada en la histona desacetilasa *RPD3* indicaron que la proteína participa en este proceso diferenciativo, ya que la cepa mutante en el gen en estudio mostró una clara incapacidad para llevar a cabo la transición dimórfica. Estas observaciones son el primer reporte que se ha realizado sobre la implicación de la desacetilación de las histonas en el dimorfismo de *Y. lipolytica*.

11. Recomendaciones

Las observaciones realizadas muestran claramente el efecto de la mutación en la capacidad de realizar el cambio dimórfico de *Y. lipolytica*. Es importante realizar estudios que proporcionen el mayor entendimiento sobre las posibles interacciones de *RPD3* con otros genes implicados en el dimorfismo de este hongo. Actualmente se cuenta con técnicas avanzadas para la interrupción de genes que podrían permitir el análisis de otros genes que participen en la remodelación enzimática de la cromatina para poder ofrecer una visión más clara de la implicación de dicho proceso en el fenómeno de dimorfismo analizado en este estudio. Existe además la opción de utilizar inhibidores de las histona desacetilasas en posteriores estudios que permitan ampliar el conocimiento y valorar la importancia que estas desempeñan en los procesos de diferenciación celular; particularmente en el dimorfismo cuya mejor comprensión permitirá el diseño de mejores estrategias de control de las micosis que las que actualmente se utilizan.

12. Referencias Bibliográficas

Alani, E., Cao, L. and Kleckner N. (1987) A method for gene disruption that allows for repeated use of *URA3* selection in the construction of multiple disrupted yeast strains. *Genetics* 116:541–545.

Alexopoulos, C.J., Mims, C.W. and Blackwell. M. (1996). *Introductory Mycology*. 4 ed. John Wiley & Sons, Inc. New York.

Andrulis, E.D. and Neiman, A.M. (1998) Perinuclear localization of chromatin facilitates transcriptional silencing. *Nature*. 394: 592-595.

Armstrong, J.A. and Emerson, B.M. (1998) Regulation of enhancer by topological de-repression supercoiled DNA *in vitro*. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 94: 7257-7262.

Ballestar, E. and Wolffe A.P., (2001) Metil-Cpg binding proteins: represor-specific narrow. *Eur. J. Biochem.*; 268: 168-176.

Barth, G. and Gaillardin, C. (1996). The dimorphic fungus *Yarrowia lipolytica*. In: *Genetics, Biochemistry, and Molecular Biology of Non Conventional Yeasts*. K. Wolf (Ed.) Springer Verlag, Heidelberg, p.p. 313-388.

Bartnicki-García, S., Nelson, N. and Cota-Robles, E. (1968) A Novel Apical Corpuscle in Hyphae of *Mucor rouxii*. *Bacteriol.* 1968; 95(6): 2399-2402

Beckerich, J.M., Boisrame-Baudevin, A. and Gaillardin, C. (1998). *Yarrowia lipolytica*: a model organism for protein secretion studies. *Int. J. of Microbiol.* 1:123 – 130.

Berger, S.L. (2002) Histone modifications in transcriptional regulation. *Curr. Opin. Gen. Dev.* 12: 142-148.

- Bird, A.P. and Wolffe, A.P. (1999). Methylation-induced repression-belts, braces, and chromatin. *Cell* 99: 451–454.
- Bjorklund, S. and Kim, Y-J (1996) Mediator of transcriptional regulation. *Trends Biochem. Sci.* 21: 759-767.
- Boeke, J.D., Trueheart, J., Nastoulis, G. and Fink, G.R. (1987). 5-fluoroorotic acid as a selective agent in yeast molecular genetics. *Met. and Enzimol.* 154: 164-175.
- Bolker, M. (2001) *Ustilago maydis* a valuable model system for the study of fungal dimorphism and virulence. *Microbiology* 147, 1395–1401
- Braun, B.R. and Johnson, A.D. (1997) Control of Filament Formation in *Candida albicans* by the Transcriptional Repressor *TUPI*. *Science* 277: 105 – 109.
- Brooker, R.J. (1999) *Genetics: Analysis and Principles*, Addison-Wesley Longman, Inc.
- Christodoulidou, A., Bouriotis, V. and Thireos G. (1996) Two Sporulation-specific Chitin Deacetylase-encoding Genes Are Required for the Ascospore Wall Rigidity of *Saccharomyces cerevisiae*. *The American Society for Biochemistry and Molecular Biology.* 271: 49 pp. 31420-31425.
- Domínguez, A., Ferminan, E. and Gaillardin, C. (2000) *Yarrowia lipolytica*: an organism amenable to genetic manipulation as a model for analyzing dimorphism in fungi. *Contrib. Microbiol.* 5:151-172.
- Cervantes-Chávez, J.A. (2007) Análisis de genes participantes en la ruta de las MAP cinasas y su probable participación en el dimorfismo de *Yarrowia lipolytica*. Tesis doctoral
- Cleofe A. R. and Rachubinsky A.R. (2002). Isolation and Characterization of *YIBEM1*, a Gene Required for Cell Polarization and Differentiation in the Dimorphic Yeast *Yarrowia lipolytica*. *Eukaryotic Cell* p. 526–537
- Conaway, R. and Conaway, J. (1997) General transcription factors of *RNA pol II*. *Mol. Biol.* 56: 327-346

Cosma, M.P., Tanaka, T. and Nasmyth, K. (1999) ordered recruitment of chromatin remodeling and transcriptional factors to a cell cycle and developmentally regulated promoter. *Cell* 97: 299-311.

Davie, J. K., Edmondson, D.G., Coco, C.B. and Dent, S.Y. (2003) Tup1-Ssn6 interacts with multiple class I histone deacetylases in vivo. *Journal of Biology and Chemistry*; 278(50):50158-62

Dora, E.G., Rudin, N., Martell, J.R., Esposito, M.S. and Ramírez, R.M. (1999) *RPD3* (REC3) mutations affect mitotic recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet* 35(2):68-76.

Durrenberger, F., Wong, K. and Kronstad, J.W. (1998) Identification of a cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit required for virulence and morphogenesis in *Ustilago maydis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 5684-5689.

Eissenberg, J.C. and Elgin, S.C.R. (2000) Heterochromatin and Euchromatin St. Louis university school. St. Louis, Missouri, USA. *Curr. Opin. Genet. Dev.*10:204

Esposito, M.S. and Brown, J.T. (1990) Conditional hyporecombination mutants of three *Rec* genes of *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet* 17(1):7-12.

Fagerstrom-Billai, F. and Wright, A.P. (2005) Functional comparison of the Tup11 and Tup12 transcriptional corepressors in fission yeast. *Mol Cell Biol* 25(2):716-27

Feaver, W.J., Henry, N.L., Wang, Z., Wu, X., Svejstrup, J.Q., Bushnell, D.A., Friedberg, E.C. and Kornberg, R.D. (1996) Genes for *Tfb2*, *Tfb3* and *Tfb4* subunits of yeast transcription/repair factor *IIIH*. *J. Biol. Chem.* 272: 19319-19327

Felsenfeld, G., Boyes, J. and Chung, J. (1996) Chromatin structure and gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 9384-9388.

Geyer, P.K. and Corces, V.G. (1992). DNA position-specific repression of transcription by a *Drosophila melanogaster* zinc finger protein. *Genes Dev.* 6: 1865–1873.

González-López, C.I., Ortíz-Castellanos, L. y Ruiz-Herrera, J. (2006) The Ambient pH Response Rim Pathway in *Yarrowia lipolytica*: Identification of *YRIM9* and Characterization of Its Role in Dimorphism. *Curr. Microbiol.* 53: 8-12.

Guevara-Olvera L, Calvo-Mendez C. and Ruiz-Herrera J. (1993) The role of polyamine metabolism in dimorphism of *Yarrowia lipolytica*. *J Gen Microbiol*; 139:485-93.

Haynes, S.R., Dollard, C., Winston, F., Beck, S., Trowsdale, J. and Dawid, I.B. (1992) The bromodomain: a conserved sequence found in human, *Drosophila* and yeast proteins. *Nucleic Acids Res.* 20:2603.

Hoffman, C.S. and Wriston, F. (1987) A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*. *Gene.* 57, 267-272.

Hope, I.A. and Struhl, K. (1986) Functional dissection of a eukaryotic transcriptional activator GCN4 of yeast. *Cell* 46:885-894

Hurtado, C.A., Beckerich, J.M., Gaillardin, C. and Rachubinski, R.A. (2000) A Rac Homolog Is Required for Induction of Hyphal Growth in the Dimorphic Yeast *Yarrowia lipolytica*. *J Bacteriol.* 182: 2376–2386.

Jimenez-Bremont, J.F., Ruiz-Herrera, J. and Dominguez. A. (2001) Disruption of gene *YIODC* reveals absolute requirement of polyamines for mycelial development in *Yarrowia lipolytica*. *FEMS Yeast res.* 3:195-204.

Kamada, K., Shu, F. and Roeder R.G. (2001) Crystallographic structure of NC2 recognition negative cofactor 2 over *TBP-DNA* transcriptional complex. *Cell* 106: 71-81

Kingston, R.E. and Narlikar, G.J. (1999) ATP-dependent remodeling and acetylation as regulators of chromatin fluidity. *Genes Develop.* 13: 2339-2352.

Kjærulff, S., Dooijes, D., Clevers, H. and Nielsen, O. 1997. Cell differentiation by interaction of two HMG-box proteins: Mat1-Mc activates M cell-specific genes in *S. pombe* by recruiting the ubiquitous transcription factor Ste11 to weak binding sites. *EMBO J.* 16:4021-4033.

Klar, A. Srikantha, J. T. and Soll D. R. (2001) A Histone Deacetylation Inhibitor and Mutant Promote Colony-Type Switching of the Human Pathogen *Candida albicans* *Genetics* 158: 919-924

Kornberg, R.D. and Lorch, Y. (1999) Twenty-Five years of the nucleosome, fundamental particle of the eukariote chromosome. *Cell* 98: 3. 285-294

Kornberg, R.D. (1974) Chromatin structure: a repeating unit of histones and DNA. *Science* 184: 868-871

Kouzarides, T. (1999) Histone acetylases and deacetylases in cell proliferation. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 9: 40-48.

Kuo, M.H. and Allis, C.D. (1998) Histone acetyl transferases and Deacetylases in gene regulation. *Bioessays* 20: 615-626.

Lee N. D'Souza, C.A. W. and Kronstad, J. (2003) Of smuts, blasts, mildews and blights: cAMP Signaling in Phytopathogenic Fungi. *Ann. Rev. of Phytopathol.* 41: 399-427

Luger, K. (2003). Structure and dynamic behavior of nucleosomes. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 13: 127-35.

Maniatis, T., Falvo, J.V., Kim, T.H., Kim, T.K., Lin, C.H., Parekh, B.S. and Wathelet, M.G. (1998) Structure and function of the interferon-beta enhancesome. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **63**: 609-620.

Melcher, K. and Johnston, S. A., 1995. GAL4 interacts with TATA-binding protein and coactivators. *Mol. Cell. Biol.* **15**:2839-2848

Nan, X., Ng, H.H., Johnson, C.A., Laherty, C.D., Turner, B.M., Eisenman, R.N. and Bird, A. 1998 Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex. *Nature* 393: 386–389.

Nemecek, J.C., Wuthrich, M., Klein, B.S. (2006) Global Control of Dimorphism and Virulence in Fungi *Science* 312, 583

Paranjape, S.M. and Kamakaka, R.T. (1994) Structural function of chromatin in transcriptional regulation by *RNA pol II*. *Annu. Rev. Biochem.* 63: 265-297.

Pile, L.A., Schlag, E.M. and Wassarman, D.A. (2002). The SIN3/RPD3 Deacetylase Complex Is Essential for G₂ Phase Cell Cycle Progression and Regulation of SMRTER Corepressor Levels. *Mol. And cell Biol.* 50: 4965-4976.

Richard, M., Rosas-Quijano, R., Bezzate, S., Bordon-Pallier, F. and Gaillardin C. (2001) Tagging Morphogenetic Genes by Insertional Mutagenesis in the Yeast *Yarrowia lipolytica*. *Journal of Bacteriology.* 183 p. 3098-3107.

Riego L., Avendano, A., Deluna A., Rodriguez, E. Gonzalez, A. (2002) *Gdh1* expression is regulated by *Gln3*, *Gcn4*, and *Hap4* under respiratory growth. *Biochem Biophys Res Commun* 293:79-85

Roeder, R.G. and Rutter, W.J. (1969) Multiple forms of DNA-dependent *RNA polymerase* in eukariotic organisms. *Nature* 224: 234-237.

Ruiz-Herrera, J. (1984). El dimorfismo en hongos como modelo de diferenciación bioquímica. Caminos en la biología fundamental. Ed. G. Soberón Acevedo., J. Martuschelli y R. palacios de la Lama. Universidad Nacional Autónoma de México. México. 285-303.

Ruiz-Herrera, J. (1993). The role of polyamines in fungal cell differentiation. *Arch. Med. Res.* 24: 263-265.

Ruiz-Herrera, J. (2001). El asombroso reino de los hongos. *Avances y Perspectiva.* 20: 275-281.

Ruiz-Herrera, J. y Sentandreu, R. (2002) Different effectors of dimorphism in *Yarrowia lipolytica*. Arch. Microbiol. 178: 477-483.

Rundlett, S.E., Carmen, A.A., Kobayashi, R., Bavykin, S., Turner, B.M. and Grunstein, M. (1996) *HDA1* and *RPD3* are members of distinct yeast histone deacetylase complexes that regulate silencing and transcription. Proc Natl Acad Sci U S A 93:14503-8.

Russo, P., Li, W. Z., Guo, Z., and Sherman, F. (1993) Signals that produce 3' termini in *CYC1* mRNA of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Mol Cell Biol.; 13: 7836-7849

Sambrook, J. and Russell, DW. (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Lab. Press, Third Edition: 1-3.

Schmitt, A. P., and K. McEntee (1996). Msn2p, a zinc finger DNA-binding protein, is the transcriptional activator of the multistress response in *Saccharomyces cerevisiae*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **93**:5777-5782

Shifrine, M., Phaff, H.J. and Demain, A.L. (1954) Determination of carbon assimilation patterns of yeast by replica plating. J. Bacteriol.; 68: 28 - 35.

Soll, D.R. (1992) High-frequency switching in *Candida albicans*. Clin. Microbiol. Rev. 5: 183-203

Srikantha, T., Tsai, L., Daniels, K., Klar, A.J.S. and Soll, D. R. (2001) The histone deacetylase genes *Hda1* and *Rpd3* Play Distinct Roles in Regulation of High-Frequency Phenotypic Switching in *C. albicans*. J. Bacteriol. 183: 4616-4625.

Stillman, D.J., Dorland, S. and Yun, Y. (1994) Epistasis Analysis of suppressor Mutations That Allow *HO* Expression in the Absence of the Yeast *SWI5* Transcriptional Activator. Genetics 136: 781-788

Suka, N., Carmen, A.A., Rundlett, S.E. and Grunstein, M. (1998) The regulation of gene activity by histones and the histone deacetylase *RPD3*. Cold Spring Harb Symp Quant Biol 63:391-9

Sun, F.L. and Elgin, S.C. (1999). Putting boundaries on silence. Cell 99: 459–462.

Tauton, J. and Hassing, C.A. (1996) Histone deacetylase in mammalian and its relation with *Rpd3* yeast regulator complex. Science 272: 408-411.

Torres-Guzman, J.C. and Domínguez, A. (1997) *HOY1* a homeo gene required for hyphal formation in *Yarrowia lipolytica*. Mol. Cel. Biol. 17:6283-6293.

Tribus, M., Galehr, M.J., Trojer, P., Brosch, G., Loidl, P., Marx, F., Haas, H. and Graessle, S. (2005). *HdaA*, a major class 2 histone deacetylases of *Aspergillus nidulans*, affects growth under conditions of oxidative stress. Eukaryotic Cell. 4: 1736-1745.

Trojer, P., Brandtner, E.M., Brosch, G., Loidl, P., Galehr, J., Linzmaier, R., Haas, H., Mair, K., Tribus, M. and Graessle, S. (2003). Histone deacetylases in fungi: Novel members, new facts. Nucl. Acids. Res. 14: 3971-3981

Vidal, M. and Gaber, R.F. (1991). *RPD3* encodes a second factor required to achieve maximum positive and negative transcriptional states in *Saccharomyces cerevisiae*. Mol. Cel. Biol. 11: 6317-6327

Vidal, M., Buckley, A.M., Hilger, F. and Gaber, R.F. (1990) Direct selection for mutants with increased K⁺ transport in *Saccharomyces cerevisiae*. Genetics 125:313-20

Warren, A.J. (2002) Transcriptional factors in eukariotes. Curr. Op. Struct. Biol. 12: 107-114

Watson, A.D., Edmondson, D.G., J.R., Bone, J.R., Mukai, Y., Yu, Y., Du, W., Stillman, D.J. and Roth, S.Y. (2000) *Ssn6-Tup1* interacts with class I histone deacetylases required for repression. Gen. and Dev. Vol. 14, pp. 2737-2744.

West, G.A. Gaszner, M. and Felsenfeld, G. (2002) Insulators: many functions, many mechanisms. *Genes Dev.* 16: 271-288

Whittaker, R. H. (1969) New concepts of kingdoms of organisms. *Science* 163: 150–160.

Zhang, Y and Huck-Hui, N. (1999) Complexity and a connection with DNA methylation analysis of the NuRD subunits reveals a histone deacetylase core. *Genes Dev.* 13: 1924-1935

Apéndice

Medios de cultivo

Medio completo (YPG): Extracto de levadura, 1%; D- Glucosa, 1%; Bacto peptona Difco, 2 % (Sambrock y Rusell, 2001).

Medio mínimo (YNB): Base nitrogenada de levadura sin aminoácidos (YNB w/o aa), 1.7g/l; Sulfato de amonio como fuente de nitrógeno, 0.5%; fuentes de carbono, 1% cuando fue necesario glucosa, maltosa, manosa, lactosa, galactosa, sacarosa. Cuando fue necesario uracilo 250mM y leucina 200mM.

Medio de inducción: base nitrogenada de levadura sin aminoácidos (YNB w/o aa), 0.67%, sulfato de amonio, 0.5%, buffer de citratos, 0.1M, fuente de carbono, 1% cuando fue necesario glucosa o N-Acetil glucosamina, suero, 2%, uracilo 250mM y leucina 200mM cuando fue necesario.

Medio LB: Extracto de levadura 0.5%, Bacto triptona 1% y NaCl 1%,