



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

Unidad de Genómica Avanzada

**La regeneración de hifas de un hongo filamentoso
depende de RNAs pequeños y de la activación del
sistema inmune innato**

Tesis que presenta

M. en C. José Manuel Villalobos Escobedo

Para obtener el grado de

DOCTOR EN CIENCIAS

En la especialidad de

BIOTECNOLOGÍA DE PLANTAS

Codirector: Dr. Alfredo Herrera Estrella

Codirector: Dr. Cei Abreu Goodger

Irapuato, Guanajuato

Marzo del 2019

EL PRESENTE TRABAJO FUE REALIZADO EN LOS **LABORATORIOS DE EXPRESIÓN GÉNICA Y DESARROLLO DE HONGOS** y **GENÓMICA COMPUTACIONAL DEL RNA** DE LA UNIDAD DE GENÓMICA AVANZADA DEL CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL, BAJO LA DIRECCIÓN DE LOS DRES. ALFREDO HERRERA ESTRELLA Y CEI ABREU-GOODGER.

Dedicada a mi abuelito Erasmo y a mi tía *Mey*
Gracias por ser mis ejemplos de trabajo y lucha.

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada con número de registro 262371, durante la realización de los estudios para obtener el grado de Maestro en Ciencias en el CINVESTAV, Unidad Irapuato.

Al Dr. Alfredo Herrera Estrella por el gran apoyo brindado al desarrollo de este trabajo en su laboratorio. Sobre todo, por darme la libertad de siempre seguir mis propias ideas.

Al Dr. Cei Abreu-Goodger por apoyar al desarrollo de esta investigación con sus consejos y enseñanzas.

A los miembros de mi comité tutorial por sus consejos y guía durante la planeación y desarrollo de este proyecto, los doctores José Ruiz Herrera, Stewart Gillmor, Stefan de Folter, Jesús Aguirre.

Al Dr. Eugenio Mancera Ramos por aceptar ser parte de mi comité tutorial en la recta final de este trabajo doctoral.

A mis compañeros de laboratorio actuales, Peter, Ma. Daniela, Inna, Orlando, Emmy, José, Memo, Ared y a mis excompañeros, Nohemí, Miguel, Alex Sanchez y Elizabeth, gracias por todas las discusiones científicas y enseñanzas.

Agradezco a mis amigos Sergio Alan, Rosy, Abraham, Nelly, Miguel, Noé, Sergio Campos y su esposa Liz, Luis Pablo, Irepan, César Aza, Pablito González, quienes siempre estuvieron conmigo a lo largo de esta importante etapa.

A mis amigos de la carrera, Ricardo, Kike, Balam, Coco, Monse, Tania, por estar en todas las aventuras.

A la protectora de todos mis sueños, mi madre, sin ella jamás hubiera podido alcanzar esta o ninguna otra meta.

A mi hermana Aglaé y Christian, por estar cerca y vivir parte de esta importante etapa.

A Tania Janeth, por ser mi compañera, por aguantar mis berrinches y apoyar mis locuras, eres mi soporte junto a nuestra Michellita.

A toda mi familia por darme su cariño y apoyo. En especial a mi tía América (tía Mey), gracias por todo.

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
1. INTRODUCCIÓN	3
2. El mecanismo de respuesta a heridas y la regulación de la expresión génica por RNAs pequeños en hongos	5
2.1. Respuesta a daño mecánico en plantas, animales y hongos.....	5
2.2. Regulación génica postranscripcional por RNA pequeños.....	20
4. Objetivos	28
4.1. Objetivo general.....	28
4.2. Objetivos específicos.....	28
5. El sistema inmune innato parece participar en la regeneración de Trichoderma atroviride	29
5.1. Introducción.....	29
5.2. Materiales y Métodos.....	30
5.3. Resultados y Discusión.....	33
5.4. Conclusión.....	51
6. Los ex-siRNA regulan genes metabólicos relacionados con el estado redox celular, que pueden ser necesarios para la respuesta a daño	52
6.1. Introducción.....	52
6.2. Materiales y Métodos.....	53
6.3. Resultados y Discusión.....	57
6.4. Conclusión.....	73
7. Los microRNA regulan la regeneración y la conidiación en respuesta a daño mecánico en T. atroviride	74
7.1. Introducción.....	74
7.2. Materiales y Métodos.....	75
7.3. Resultados y Discusión.....	76
7.4. Conclusión.....	93
8. Discusión general	94
8.1. El sistema inmune innato de los hongos y la regeneración.....	94
8.2. El papel de los RNAs pequeños durante la regeneración.....	99
9. CONCLUSIONES GENERALES	104
10. PERSPECTIVAS	106
REFERENCIAS	108
MATERIAL SUPLEMENTARIO	115

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1.- Respuesta fenotípica de los hongos filamentosos a daño mecánico.	7
Figura 2.- El proceso de regeneración de extremidades en anfibios.	10
Figura 3.- Microscopia del proceso de regeneración después del daño mecánico en <i>Trichoderma atroviride</i> .	11
Figura 4.- Esquema de las dos principales vías de síntesis de sRNAs citoplasmáticos en eucariontes.	21
Figura 5.- Mecanismos de biogénesis por la RNAi de miRNAs y ex-siRNAs en los hongos filamentosos.	26
Figura 6.- Gráfica del análisis <i>Multidimensional scaling (MDS)</i> de las librerías transcriptómicas.	34
Figura 7.- Gráfica del número de genes diferenciales en cada contraste realizado.	36
Figura 8.- Análisis transcriptómico del efecto del compuesto BAPTA en la cepa silvestre de <i>T. atroviride</i> .	38
Figura 9.- Enriquecimiento de términos GO de procesos biológicos en el tratamiento con BAPTA.	40
Figura 10.- Perfil de expresión de genes diferenciales en respuesta a daño con y adición de BAPTA.	42
Figura 11.- Análisis transcriptómico de la respuesta a daño en la cepa silvestre y las mutantes $\Delta tmk1$ y $\Delta tmk3$.	43
Figura 12.- Enriquecimiento de términos GO de procesos biológicos en respuesta a daño de la cepa silvestre y las $\Delta tmk1$ y $\Delta tmk3$ de <i>T. atroviride</i> .	45
Figura 13.- Búsqueda de los genes involucrados en la regeneración.	48
Figura 14.- Análisis de expresión de los genes por qPCR durante el proceso de regeneración.	50
Figura 15. La respuesta a daño mecánico está afectada en las mutantes de la RNAi.	58
Figura 16.- Análisis transcriptómico de la respuesta a daño de las cepas WT, $\Delta dcr2$ y $\Delta rdr3$.	59
Figura 17.- Genes que participan en procesos metabólicos son regulados por la RNAi.	61
Figura 18. <i>dcr2</i> tiene un papel independiente de <i>rdr3</i> .	63
Figura 19.- Existe una clara disminución en la población de sRNAs en la mutante $\Delta dcr2$.	65
Figura 20.- Anotación genómica y análisis de expresión diferencial de los sRNAs predichos por <i>ShortStack</i> .	67
Figura 21. Los ex-siRNAs diferenciales entre la cepa WT y la mutante $\Delta dcr2$, provienen preferentemente de genes metabólicos.	70
Figura 22.- Análisis de expresión de los genes por qPCR durante la conidiación de <i>T. atroviride</i> .	72
Figura 23.- Existen tres miRNA altamente expresados en <i>T. atroviride</i> .	78

Figura 24.- Los miRNAs aumentan su expresión durante la proliferación y diferenciación celular desencadenadas por el daño mecánico.	80
Figura 25.- Expresión diferencial de los genes blanco para el miRNA1 y el miRNA2.	82
Figura 26.- Mutación específica del miRNA2 causa un defecto en el crecimiento.	85
Figura 27.- Fenotipo de conidiación de las cepas mutantes del miRNA2 en respuesta a luz constante y daño mecánico.	87
Figura 28.- Expresión diferencial de los genes en el fondo mutante del miRNA2.	89
Figura 29.- Procesos Biológicos involucrados en señalización y ciclo celular son regulados por el miRNA2.	92
Figura 30.- Modelo de la respuesta molecular al daño.	98
Figura 31.- Modelo del mecanismo de señalización regulada por miRNAs.	101
Tabla 1.- Matriz de contrastes usados para hacer la expresión diferencial.	32
Tabla 2.- Valor del <i>fold-change</i> en \log_2 de los genes blanco para el miRNA2 inducidos en la comparación mutante $\Delta dcr2$ y cepa silvestre.	83
Tabla 3.- Valor del <i>fold-change</i> en \log_2 de los genes blanco para el miRNA2 inducidos en la comparación mutante $\Delta dcr2$ y cepa silvestre.	90

RESUMEN

La capacidad para responder al daño mecánico involucra una serie de procesos biológicos que están conservados en los diferentes reinos eucarióticos. El hongo filamentoso *Trichoderma atroviride* ha sido usado en nuestro laboratorio como modelo para entender los mecanismos de respuesta al daño y se ha concluido que existe un nivel alto de similitud entre los mecanismos que este hongo usa para responder al estímulo y el observado en las plantas y los animales.

Posterior al daño mecánico, las células rotas liberan una serie de moléculas que funcionan como señales de alerta de daño, conocidas como Patrones Moleculares Asociados a Daño (DAMPs, por sus siglas en inglés). El ATP extracelular y el DNA son parte de estas moléculas señal, las cuales se perciben a través de receptores. Posteriormente la señal es transducida por vías de señalización que conducen a la activación de genes. El incremento intracelular de calcio es esencial para responder apropiadamente a estas señales. Por otro lado, en las plantas y los animales la regulación de la expresión génica vía RNAs pequeños (sRNAs) también es importante para responder al daño.

En trabajos previos se ha demostrado que la respuesta al daño de *T. atroviride* requiere de los DAMPs y del incremento en el calcio intracelular. Sin embargo, hasta ahora no se ha estudiado el papel de los sRNAs en dicha respuesta.

Aquí se describen a profundidad los procesos transcripcionales y la regulación por sRNAs que se producen bajo las señales de alarma y vías de percepción del daño. Los resultados presentados en esta tesis permiten proponer que el daño activa un sistema inmune innato y que dicha activación es esencial para la regeneración de las hifas. Además, los RNAs pequeños pueden participar en un cambio metabólico necesario para la conidiación, y se presenta fuerte evidencia de que al menos tres microRNAs están involucrados en el desarrollo asexual disparado por el daño mecánico y la regeneración.

ABSTRACT

The ability to respond to injury involves several biological processes that are conserved in the different eukaryotic kingdoms. The filamentous fungus *Trichoderma atroviride* has been used in our laboratory as a model to understand the mechanisms of response to injury and it has been concluded that there is a high level of conservation in the response processes in this fungus and other eukaryotic organisms.

After mechanical damage, the broken cells release a series of molecules that act as warning signals of damage, known as Damage-Associated Molecular Pattern (DAMPs). Extracellular ATP and DNA are part of these signal molecules, which are perceived through receptors. Subsequently the signal is transduced by signaling pathways that lead to gene activation. The intracellular calcium increase is essential to respond appropriately to these signals. On the other hand, in plants and animals the regulation of gene expression via small RNAs (sRNAs) is also important to respond to injury. Previous studies in *T. atroviride* have shown that the response to injury requires the DAMPs and the intracellular calcium increase. However, to date, the sRNAs role in response to injury has not been investigated.

Here I describe in depth the transcriptional processes and the regulation by sRNAs that occur under the alarm signals and damage perception pathways. The presented results in this thesis allow to propose that the injury activates an innate immune system that is essential for hyphae regeneration. In addition, I conclude that small RNAs can participate in a metabolic change necessary for conidiation, and I present strong evidence that at least three microRNAs are involved in the asexual development and regeneration.

1. INTRODUCCIÓN

Los procesos de respuesta a daño y regeneración han sido ampliamente estudiados en modelos de animales y plantas. Sin embargo, poco se sabe sobre esta respuesta en hongos filamentosos, los cuales representan un modelo microbiano muy interesante para su estudio. Esto debido a que tienen un ciclo vida corto y su manejo experimental e informático es de poca complejidad.

Desde la descripción del mecanismo de la respuesta a heridas en *Trichoderma atroviride* en 2012, se infirió que un análisis transcriptómico podría producir un incremento de calcio intracelular después del daño mecánico en las hifas. Recientemente nosotros demostramos que dicho incremento sucede en los primeros 2 seg después de la herida y que a los 10 seg disminuye (Medina-Castellanos *et al.*, 2018). Este mismo fenómeno se ha observado tanto en las plantas como en los animales, donde se ha determinado el papel del calcio como una molécula señal esencial para poder responder al daño mecánico. Además, en estos organismos se ha descrito que una vez que las células son dañadas, se liberan al espacio extracelular moléculas que son percibidas por receptores membranales de células no dañadas, llevando a una respuesta concertada al daño mecánico, disparando el proceso de sanación y en algunos casos la regeneración del área dañada. A estas moléculas liberadas se les conoce como Patrones Moleculares Asociados a Daño (DAMPs, por sus siglas en inglés). El ATP extracelular (eATP) es una de estas moléculas, la cual es percibida por las células como una señal de alarma que inicia el proceso de inflamación en los animales o la respuesta sistémica a daño en las plantas. En nuestro modelo, se ha descrito que la aplicación de eATP activa vías de señalización y promueve el incremento de calcio intracelular, lo que al final conduce a la formación de las estructuras de reproducción asexual (conidios), emulando los efectos del daño mecánico en hifas de *T. atroviride* (Medina-Castellanos *et al.*, 2014; Medina-Castellanos *et al.*, 2018). El eATP y el incremento del calcio intracelular activan las vías de señalización de las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPKs). La señalización por MAPKs promueve la transcripción de genes esenciales en la respuesta al daño. La eliminación de los genes principales de dos de estas vías, Tmk1 y Tmk3, mostró

que ambas proteínas están directamente relacionadas con la formación de conidios, mientras que la vía de Tmk1 participa específicamente en el proceso de regeneración. Esto llevó a la conclusión de que son estos los procesos más importantes para la señalización y respuesta al daño. Sin embargo, poco se sabe de los cambios transcripcionales promovidos por las MAPKs, que a su vez son activados por los DAMPs. Por esta razón, en esta tesis se realizó un análisis transcriptómico de la respuesta a daño mecánico en el micelio de *T. atroviride*, evaluando el efecto de la adición de eATP, la remoción de calcio extracelular y evaluando la respuesta transcripcional a daño mecánico en los fondos mutantes $\Delta tmk1$ y $\Delta tmk3$.

En nuestro laboratorio recientemente se describió que la maquinaria de RNAi participa en el crecimiento y formación de conidios en *Trichoderma atroviride* (Carreras-Villaseñor *et al.*, 2013). En la presente tesis determiné que la regulación por RNAs pequeños dependientes de la maquinaria de RNAi, es necesaria para el proceso de conidiación y la regeneración en respuesta al daño. Los datos generados en este trabajo sugieren que un cambio metabólico que permite un incremento en el poder reductor de las células es regulado por ex-siRNAs (RNAs pequeños generados de regiones codificantes), mientras que la búsqueda de blancos para microRNAs predichos, indicó que éstos pueden jugar un papel importante en el control de la proliferación celular.

Dado que el presente trabajo fue desarrollado en tres etapas, donde cada cuestión planteada nos llevó a proponer una estrategia de investigación, en los apartados 5, 6 y 7 se presentan a profundidad estos trabajos. En el apartado 5, presento el trabajo que me llevó a concluir que el sistema inmune innato de *T. atroviride* es esencial para poder llevar a cabo la regeneración, esta es una colaboración con Medina castellanos y publicamos juntos en coautoría un artículo sobre este tema en el 2018. El apartado 6 trata sobre la participación de la maquinaria de RNA interferente en la respuesta a daño y el cambio metabólico necesario para llevar a cabo la respuesta correcta a este estímulo, que es regulado por ex-siRNAs. El apartado 7 trata específicamente de la función de los microRNAs en la respuesta al daño de *T. atroviride*. Finalmente, en el octavo apartado expongo una discusión global de estos

tres proyectos, mostrando un panorama general de la investigación con un enfoque masivo sobre la respuesta al daño mecánico usando a *T. atroviride* y propongo a este hongo como un modelo microbiano para el estudio de la regeneración.

2. El mecanismo de respuesta a heridas y la regulación de la expresión génica por RNAs pequeños en hongos

2.1. Respuesta a daño mecánico en plantas, animales y hongos

La respuesta al daño engloba una serie de mecanismos concertados que culminan en la protección y en algunos casos la regeneración del área perdida. Este mecanismo está altamente conservado en animales y plantas (Heil *et al.*, 2012) y ha sido ampliamente estudiado en estos organismos, donde se ha determinado que especies reactivas de oxígeno, señalización por calcio y metabolismo de lípidos son esenciales (Hernández-Oñate & Herrera-Estrella, 2015). El daño rompe las células que constituyen los tejidos y el material citoplásmico se escapa. Esto puede conducir a la deshidratación celular e infecciones, que concluirá con la muerte del organismo, si no se detiene la pérdida del material y se inicia un proceso de desinfección. Por esta razón tanto animales como plantas han desarrollado un mecanismo fino y rápido para prevenir los efectos causados por el daño. En los animales como *Ambystoma mexicanum* e hydra, se ha descrito profundamente el proceso de regeneración, por lo que profundizaré en los procesos fisiológicos que se llevan a cabo en los animales, en este capítulo. Mientras que en las plantas la percepción de moléculas de alarma involucradas en la respuesta a daño por herbivoría ha sido extensivamente estudiada, describiré a detalles este proceso. Con estos antecedentes establecidos tanto en los animales como en las plantas, durante este capítulo pretendo mostrar las evidentes similitudes con el mecanismo de respuesta al daño de los hongos filamentosos.

Los hongos son también capaces de responder al daño mecánico. En la **Figura 1**, se observa que el hongo *Sclerotium rolfsii*, cuando es dañado induce la formación de esclerocios. Mientras que *Aspergillus flavus*, *T. atroviride*, *T. harzianum*, *T. hamatum* y *T. virens* disparan la producción de conidios (Hernández-Oñate &

Herrera-Estrella, 2015). En *Aspergillus ssp* y *Neurospora crassa* se ha demostrado que después de que una hifa es dañada, se inicia la formación de cuerpos *Woronin* proteicos, formados por la acumulación de la proteína Hex, que sellan el septo adyacente a esta hifa para prevenir la pérdida de material citoplásmico, evitando así la muerte de las células no dañadas (Jedd, 2011).

En nuestro laboratorio hemos estudiado a profundidad el mecanismo de respuesta de *T. atroviride* al daño mecánico. Usando un enfoque bioquímico, genético y genómico, propusimos que los procesos esenciales para responder son similares a los usados por otros eucariotes (Hernández-Oñate *et al.*, 2012). Así en este capítulo discutiremos todos los procesos necesarios para responder al daño mecánico en general y particularmente los descubrimientos que se han hecho en *T. atroviride* y en otros hongos filamentosos.

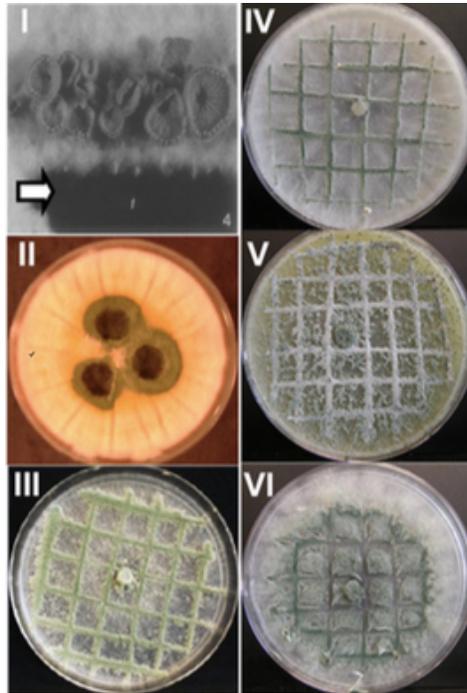


Figura 1.- Respuesta fenotípica de los hongos filamentosos a daño mecánico. Formación de cuerpos fructíferos en *S. commune* (I), conidiación en *A. flavus* (II), *T. atroviride* (III), *T. harzianum* (IV), *T. hamatum* (V) y *T. virens* (VI). (Tomada de Hernández-Oñate y Herrera-Estrella, 2015).

2.1.1. Saneamiento y regeneración

En las plantas, la primera estrategia en respuesta al daño es la formación de un perímetro alrededor de la lesión, donde se produce una lignificación de la pared celular y la deposición de compuestos fenólicos. Estos tejidos así protegidos son impermeables por lo que evitan la pérdida de agua, la penetración de la mayoría de los patógenos y además son fuentes menos valiosas de alimentos para los herbívoros (Heil *et al.*, 2012). El incremento de ROS puede funcionar como una barrera antiséptica, pero como veremos más adelante son también moléculas señal. En la papa, por ejemplo, en la zona del daño se acumula suberina, la cual contiene dominios fenólicos y alifáticos, y es responsable de la resistencia a la infección por *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* y *Fusarium sambucinum* (Lulai & Corsini 1998).

Los procesos de reparación y saneamiento del daño en animales, aunque similares a las plantas, incluyen mecanismos propios como el reclutamiento de neutrófilos y la activación de factores de crecimiento como TGF- α , KGF, HGF, citocininas, interleucinas, y otros más. Además, se produce la activación de la cascada de coagulación. Posteriormente se comienza a formar la matriz extracelular, incentivada por los factores de crecimiento y la integrina, el citoesqueleto se reorganiza para facilitar el movimiento para cerrar la lesión y restablecer la función del tejido (Gailit & Clark, 1994; Crosby & Waters, 2010).

Algunos animales, al perder una extremidad o una parte estructural, pueden volver a formarla; a este proceso se le conoce como regeneración. Entre los organismos más estudiados por su capacidad regenerativa están los anfibios y reptiles, donde se han determinado algunos de los factores importantes para llevar a cabo este proceso (Chang *et al.*, 2009). El proceso regenerativo de extremidades y dígitos en animales se compone de tres fases distintas: en la primera fase se produce el saneamiento de la herida y la formación de la capa apical ectodérmica, posteriormente se da la formación del blastema y en la última etapa se produce el rebrote de la extremidad y diferenciación digital, donde se genera el hueso nuevo y el tejido circundante (**Fig. 2**; Taghiyar *et al.*, 2018). El saneamiento de la lesión es un paso necesario en la regeneración epimórfica, éste consta de cuatro etapas que

inician con la coagulación de la sangre, después se produce el proceso inflamatorio, la remodelación del área dañada y finalmente, la formación de epidermis en la herida (Yokoyama, 2008; Fernando *et al.*, 2011; Simkin *et al.*, 2013). La formación del blastema es el evento más importante en la regeneración de extremidades, éste ocurre simultáneamente con el saneamiento de la herida, durante la regeneración apomórfica (Tanaka & Reddien, 2011). Después se inicia la formación de una población de células madre mesenquimales que interactúan entre sí durante la fase de desarrollo de la regeneración. Estas células madre mesenquimales son principalmente pluripotentes y es aquí donde la activación de varios genes conducirá al final a la formación de la estructura regenerada (Taghiyar *et al.*, 2018). Durante la regeneración tisular, el sistema inmune innato juega un papel esencial para el saneamiento del área dañada, independientemente de qué agente causó el daño, siendo una respuesta inespecífica (Chang *et al.*, 2015). Uno de los procesos esenciales conducidos por este sistema es el reconocimiento de material propio del organismo de aquel que proviene de organismos extraños. La importancia de la activación del sistema inmune en la regeneración se ha observado en organismos como hidras y peces cebras (Wenger *et al.*, 2014; Lai *et al.*, 2017). Recientemente, un estudio comparó a nivel transcriptómico la regeneración del tejido cardíaco entre el pez cebra y medaka, quienes están muy cercanos filogenéticamente, sin embargo, el pez cebra es capaz de regenerar tejido cardíaco, mientras que medaka no puede hacerlo. Interesantemente, a nivel transcripcional la principal diferencia es la activación del sistema inmune en el pez cebra, el cual permanece sin cambio en medaka (Lai *et al.*, 2017).

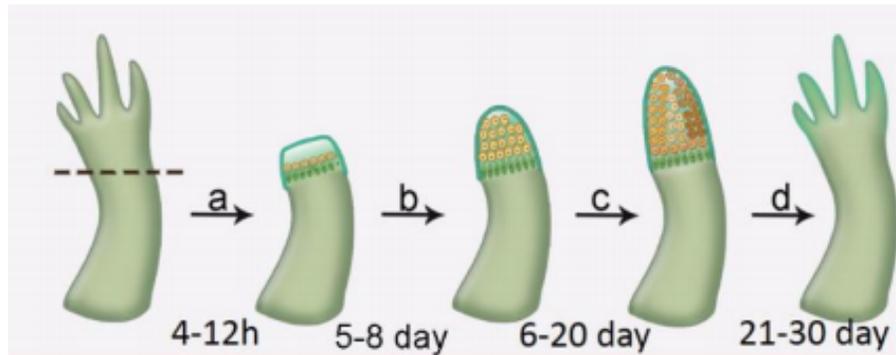


Figura 2.- El proceso de regeneración de las extremidades en anfibios. A) El epitelio se forma entre las 4 y 12 h después de la amputación. B) El epitelio de la herida se espesa para formar el un capuchón epitelial apical entre los 5 y 8 días; fibras de colágeno son removidas y ocurre la formación de células mesenquimales indiferenciadas. C) El blastema continúa creciendo. D) Comienza la re-diferenciación y modelado, hasta obtener una extremidad regenerada completa (Tomada de Taghiyar *et al.*, 2018).

Los hongos filamentosos también responden de manera similar a los animales que regeneran. Las nuevas hifas que emergen después del daño provienen de la célula adyacente a la dañada como fue observado en *T. atroviride* (**Fig. 3**). Dichas hifas son evidentes a una h después del daño. Posteriormente éstas se alargan para dar lugar a la formación de conidióforos a las 24 h y entre las 36 y 48 h, se producen los conidios maduros (Hernández-Oñate *et al.*, 2012).

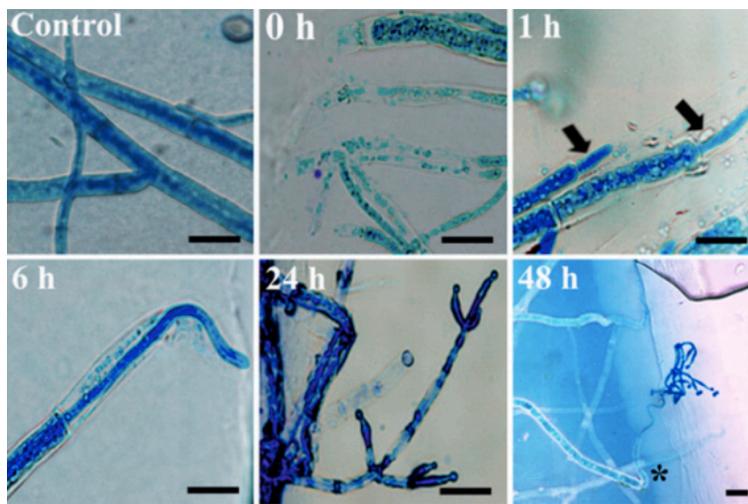


Figura 3.- Microscopía del proceso de regeneración después del daño mecánico en *Trichoderma atroviride*. Al tiempo cero se observan las hifas dañadas, entre 1 y 6 h se ven claramente las nuevas hifas y a partir de las 24 h se observa la formación de los conidióforos y los conidios. Barra de escala: 20 μ m (Tomada de Hernández-Oñate *et al.*, 2012).

2.1.2. PAMPs y DAMPs

En los animales existen mecanismos para detectar la infección por patógenos a través del reconocimiento de moléculas específicas, llamadas *patrones moleculares asociados a patógenos* (PAMPs). Los PAMPs se unen a receptores llamados PRR, los cuales disparan la respuesta del sistema inmune para combatir al patógeno (Vénéreau et al., 2015). Además, las células animales son capaces de contender contra el daño al tejido, activando el sistema inmune en respuesta a moléculas intracelulares relacionados con el daño. Estas moléculas son conocidas como *patrones moleculares asociados a daño* (DAMPs). Estas moléculas normalmente tienen un papel fisiológico dentro de la célula, pero adquieren una función adicional cuando salen al ambiente extracelular debido a la lisis causada por el daño. Es en estas condiciones cuando actúan como una señal de alerta, estimulando la respuesta inflamatoria y finalmente los procesos regenerativos (Vénéreau et al., 2015).

Las plantas al no contar con movilidad para escapar de agentes que les causan daño como son los insectos herbívoros, han desarrollado un sofisticado mecanismo de defensa (Savatin et al., 2014). Este mecanismo puede ser activado por patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs), que son señales provenientes de células extrañas a la planta, las cuales alertan al sistema inmune de la presencia de patógenos. También se activa por la presencia de DAMPs, que alertan al sistema inmune innato para iniciar la muerte celular programada en respuesta al daño cuando una planta está bajo ataque (Tang et al., 2012).

En las plantas se producen dos tipos de respuesta, una inmediata que es justo en el área dañada, conocida como respuesta local, mientras que el tejido no dañado también se activan ciertos procesos. Esto último es conocido como respuesta sistémica, que es una señal que recorre toda la planta para comunicar la condición crítica (Farmer & Ryan, 1992). Para llevar a cabo la respuesta sistémica, genes que codifican enzimas involucradas en la biosíntesis de ácido jasmónico (JA) y etileno (ET), son rápidamente activados (Reymond et al., 2000; Stenzel et al., 2003). Los incrementos de ácido jasmónico y calcio intracelular, son las señales secundarias que conducen a la respuesta sistémica.

Señales similares se producen en los animales, tanto en respuesta a patógenos como al daño, las cuales disparan la activación del sistema inmune innato en presencia de organismos extraños, o al proceso de inflamación donde moléculas como la adenosina trifosfato (ATP), el ácido úrico, DNA o RNA e interleucina 1 α , entre otros, son percibidos como DAMPs (Heil, 2012).

En los hongos también se ha sugerido la existencia de este tipo de moléculas señal. En este sentido, un extracto de micelio de *S. commune*, al entrar en contacto con micelio no dañado induce la formación de cuerpos fructíferos (CITAS). Pruebas con RNasas y DNasas, llevaron a una reducida actividad de este extracto y la fracción más activa tiene su máxima absorción de luz a los 263 nm. Por ello se sugirió que se trataba de nucleótidos que podrían funcionar como moléculas señal (Leonard & Dick, 1968; Rusmin & Leonard, 1978). Sin embargo, después de estos trabajos, poco se había profundizado en la identificación de estas moléculas.

2.1.3. El ATP como señal de alarma

El ATP aplicado sobre hojas de plantas de frijol (*Phaseolus lunatus*), además de sacarosa o extracto de hojas, origina un incremento significativo en los niveles de ácido jasmónico (JA) (CITAS). Particularmente, al usar extracto de hoja y sacarosa, se observa un incremento en la concentración de JA, mayor al que se produce con el ATP extracelular puro (eATP). Estas respuestas también ocurren en *Arabidopsis thaliana* y tomate. Estos resultados sugieren que las plantas tienen un mecanismo de reconocimiento de material intracelular que inicia la respuesta inmune al daño (Heil, 2012; Heil, 2009). Así también, en los animales el ATP liberado de células rotas funciona como una importante señal de alarma. En los seres humanos, la percepción de eATP por receptores purinérgicos, inicia la movilización de calcio en el tejido epitelial. En el pez cebra se describió que el receptor del eATP es el P2Y, un receptor purinérgico acoplado a proteínas G (Junger, 2011; Eltzschig *et al.*, 2012). Estos receptores son divididos en dos clases basadas en su respuesta a adenosina (receptor del tipo P1), o a ATP/ADP (receptor del tipo P2). Así, en los animales, una vez que los receptores perciben la presencia de eATP, la reacción es amplificada por hemicanales de pannexina y connexina que bombean ATP de

células no dañadas hacia el espacio extracelular. Después de esta amplificación de la señal, se genera una reacción inmune estéril, el ATP es convertido a adenosina en una reacción donde las proteínas CD39 y CD73 participan, lo que conduce al proceso de inflamación en los tejidos donde estos genes son expresados (Corps *et al.*, 2015).

Recientemente, en *T. atroviride* se demostró que, al agregar ATP disuelto en agua al micelio, se dispara la conidiación sin necesidad de causar daño. Sin embargo, otros nucleótidos no son incapaces de provocar esta respuesta, a excepción del CTP, que también induce significativamente la conidiación, aunque sin llegar al nivel que provoca el ATP (Medina-Castellanos *et al.*, 2014). Basándose en estos resultados, se sugiere que la molécula usada para percibir el daño mecánico en este hongo es el eATP. Si este proceso es general para todos los *phyla* del Reino Fungi, permanece por ser demostrado.

2.1.4. Especies reactivas de oxígeno (ROS) en respuesta a daño

Tanto en las plantas como en los animales estudiados, después del daño se produce una acumulación inmediata de especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés). Dentro de las ROS de mayor importancia biológica se encuentran el anión superóxido (O_2^-), el peróxido de hidrogeno (H_2O_2), el oxígeno singulete (1O_2) y el radical hidroxilo (OH^-) (Aguirre *et al.*, 2005). Estas moléculas, al acumularse en la célula por acción de la respiración mitocondrial, oxidan componentes celulares como proteínas, lípidos y el material genético. Por mucho tiempo la acumulación de ROS en la célula se clasificó como un estrés que lleva a un decremento de la homeostasis celular. Sin embargo, hoy se sabe que las ROS funcionan también como una señal que activa los procesos de proliferación celular, transducción de señales, diferenciación y la respuesta al daño (Hernández-Oñate & Herrera-Estrella, 2015). La producción de las ROS en respuesta al daño es debida a la actividad de las NADPH oxidasas (Nox), un complejo enzimático que cataliza la reacción de oxidación del NADPH a $NADP^+$ utilizando para ello oxígeno molecular y produciendo radical superóxido. Así por ejemplo, durante el ataque por herbívoros en plantas como soya y frijol, se produce inmediatamente un incremento de los

niveles de ROS (Bi & Felton, 1995; Maffei *et al.*, 2006). Experimentos farmacológicos y genéticos, han demostrado que las Nox participan en la generación de ROS en respuesta a daño tanto en *Arabidopsis* como tomate (Orozco-Cardenas & Ryan, 1999; Orozco-Cárdenas *et al.*, 2001; Sagi *et al.*, 2004). En animales se han descrito cinco genes *NOX*, los cuales participan durante el proceso inflamatorio incrementando la concentración de ROS en las células (Brandes *et al.*, 2014).

En los hongos como *Aspergillus nidulans* y *N. crassa*, se ha descrito que las ROS formadas por las proteínas Nox, participan en diversos procesos fisiológicos (Aguirre & Lambeth, 2010). En *T. atroviride* se demostró que después del daño mecánico se produce inmediatamente un incremento de las ROS en el área dañada. Cuando este incremento se inhibió con antioxidantes, el hongo fue incapaz de formar conidios en respuesta a este estímulo, sugiriendo que la acumulación de ROS en los primeros segundos después del daño es necesaria para disparar la reproducción asexual. La mutación de los genes *nox1* y *noxR*, mostró que estos participan en la formación de estas ROS y dichas mutantes son incapaces de conidiar en respuesta al daño (Hernández-Oñate *et al.*, 2012). Finalmente se ha concluido que en hongos filamentosos las ROS también funcionan como moléculas señal necesarias para iniciar la respuesta temprana al daño.

2.1.5. El calcio como segundo mensajero

Junto con el incremento de ROS, un pulso de calcio se produce inmediatamente después del daño en las plantas y los animales (Pittas *et al.*, 2018; Mousavi *et al.*, 2013). Estos cambios en la concentración de Ca^{2+} se producen al parecer en las plantas por cambios en el potencial de membrana (Mousavi *et al.*, 2013). Tanto en plantas como en animales se activan los canales de calcio al percibir daño mecánico, resultando en el incremento en la concentración de dicho catión, tanto en la zona dañada como en células cercanas no lastimadas (Arimura & Maffei, 2010). Este incremento en la concentración de calcio es percibido por proteínas como calmodulinas, proteínas cinasas dependientes de calcio y proteínas con el dominio mano EF de unión a Ca^{2+} , que posteriormente inducen cambios transcripcionales.

Además, en plantas, la existencia de dominios EF en todas proteínas NADPH oxidasas (RBOH) sugiere que el incremento en la concentración de calcio modula la actividad de estas proteínas para producir las ROS (Keller *et al.*, 1998).

En los animales, el cambio de potencial eléctrico que provoca el daño es percibido por el sistema nervioso central a través del aminoácido glutamato que actúa como un neurotransmisor. Esto activa los canales de glutamato. Interesantemente, cuando las plantas están bajo ataque de herbívoros, se produce una señalización similar. Inmediatamente después del daño, en las hojas de *Arabidopsis*, el nivel de calcio intracelular se incrementa y propaga por toda la planta. Esto se observó usando el sensor de calcio GCaMP3, basado en una proteína fluorescente y una calmodulina (Toyota *et al.*, 2018). Interesantemente, se demostró que el glutamato activa la respuesta sistémica, al igual que lo hace el daño físico, ya que, al agregarse a las hojas, se produce el mismo efecto en la concentración de calcio en la planta. La mutación de los canales-receptores de glutamato inhibe esta respuesta. Esta elevación de los niveles del calcio citosólico conduce a la activación de los genes de la vía de ácido jasmónico (Toyota *et al.*, 2018). Así el incremento de calcio intracelular después del daño es un proceso necesario tanto como en las plantas como en los animales.

En los hongos filamentosos también se ha identificado al calcio como un segundo mensajero durante el crecimiento, desarrollo y otros procesos biológicos (Yu *et al.*, 2012). En *Aspergillus awamori* se demostró que la perturbación mecánica, el estrés hipo-osmótico y el tratamiento con calcio externo, inducen un incremento en la concentración de calcio intracelular (Nelson *et al.*, 2004). En *T. atroviride* usando un enfoque transcriptómico se determinó que, en respuesta al daño, los genes de bombas de calcio se inducen (Hernández-Oñate *et al.*, 2012). Experimentos con quelantes de calcio demostraron que al aplicarse al micelio de *T. atroviride*, se inhibe por completo la capacidad de conidiar en respuesta al daño (Medina-Castellanos *et al.*, 2014). De mayor interés fue determinar que al cultivar a *T. atroviride* en presencia de 10 mM de BAPTA, (ácido aminopolicarboxílico, quelante específico de calcio), este hongo es incapaz de regenerar al aplicarse un daño mecánico. Esto sugiere que para la formación de nuevas hifas en respuesta al daño también es

necesario el incremento en la concentración de calcio. Para observar este cambio a nivel celular, se transformó a *T. atroviride* con el sensor de Ca^{2+} , GCaMP6::GFP (Fig. 1: Medina-Castellanos *et al.*, 2018), similar al usado en el estudio de Toyota y colaboradores. Usando esta técnica fue posible observar que tal y como se observa en *Arabidopsis*, existe un incremento de calcio a los 2 seg después del daño y que a los 10 seg esta concentración baja. Sin embargo, en presencia de BAPTA, no se produce este incremento. Interesantemente, se produce una disminución significativa de la regeneración al tratar al micelio con BAPTA (Medina-Castellanos *et al.*, 2018). En la presente tesis, uno de los objetivos principales fue determinar qué genes se ven afectados por este pulso de calcio.

2.1.6. Señalización por MAPKs

Las vías de señalización por MAPKs están bien conservadas y regulan varios procesos celulares en los organismos eucariontes. En plantas estas rutas han sido descritas como de respuesta a diferentes tipos de estrés, en especial durante el ataque de patógenos y daño. Usando un enfoque de silenciamiento génico inducido por virus (VIGS, por sus siglas en inglés), se descubrió que las proteínas cinasas inducidas por ácido salicílico o inducidas por herida (SIPK o WIPK, por sus siglas en inglés) juegan un papel central en la respuesta a la herbivoría en *Nicotiana attenuata* (Wu *et al.*, 2007). Río abajo, vías de respuesta a daño como la del ácido jasmónico, etileno y genes de defensa, dependen de la activación por MAPKs en plantas. En animales se ha demostrado que la mayoría de los blancos finales de las MAPKs son factores de transcripción, cuya estabilidad, localización o actividad cambian al ser fosforilados. En las plantas, se ha demostrado que estas vías también funcionan en respuesta a daño, como en el caso de la MPK6 en *Arabidopsis*, la cual fosforila directamente dos sintetasas de ácido carboxílico ACS2 y ACD6, estabilizándolas, lo que provoca un incremento en la síntesis de etileno para contender mejor con los patógenos (Liu & Zhang, 2004).

En animales, la participación de las MAPKs en respuesta a daño fue demostrada, usando un modelo *in vitro*, donde la MAPK p38 α regula la respuesta al daño cerebral

traumático (Kim & McGinnis, 2010). También la fosforilación del factor de transcripción *Grainy Head* por la proteína ERK es esencial para la regeneración de tejidos y saneamiento en *Drosophila melanogaster* (Rämet *et al.*, 2002). De manera similar, se ha demostrado en células de mamífero que la activación de ERK acelera la reparación de células tubulares renales epiteliales, mientras que inhibe la progresión de fibrosis isquémica después del daño (Jang *et al.*, 2013).

En las levaduras como *Saccharomyces cerevisiae* se ha establecido que las vías de señalización por MAPK participan en la respuesta a estrés oxidativo, a estrés osmótico, en la proliferación y en la diferenciación celular (Jendretzki *et al.*, 2011). En *Trichoderma* se han identificado tres vías de MAPKs, la de Tmk1, involucrada en el micoparasitismo y crecimiento, la de Tmk2 que está relacionada con la integridad de la pared celular y la de Tmk3 que es homóloga de Hog1 de *S. cerevisiae* y que controla la respuesta a estrés osmótico (Mendoza-Mendoza *et al.*, 2003; Delgado-Jarana *et al.*, 2006; Reithner *et al.*, 2007; Zeilinger & Omann, 2007). Con respecto a la participación de las MAPKs en la respuesta al daño, las mutantes *tmk1* y *tmk3*, son incapaces de conidiar en respuesta al daño (Medina-Castellanos *et al.*, 2014), mientras que la mutante de *tmk2*, presenta un fenotipo pleiotrópico y no ha sido considerada para estos estudios. Además, se observó que la proteína Tmk1 es fosforilada un min después del daño y se mantiene así durante 30 min, mientras que Tmk3 se fosforila en el primer min, pero inmediatamente decrece esta señal, lo que lleva a suponer que Tmk1 funciona por más tiempo, mientras que la participación de Tmk3 parece ser transitoria. Interesantemente, ambas vías son activadas por la aplicación de eATP. Sin embargo, la activación de Tmk1 no depende de la actividad de las Nox, pero si la activación de Tmk3. Por otro lado, en *T. atrovoride* la activación de ambas vías parece ser independiente del incremento de calcio (Medina-Castellanos *et al.*, 2014). Recientemente se demostró que la mutante $\Delta tmk1$ está fuertemente afectada en la capacidad para regenerar en respuesta a daño (Medina-Castellanos *et al.*, 2018). Estos resultados llevan a pensar que la vía de Tmk1 está directamente involucrada en la activación de los genes necesarios para la regeneración, proceso que depende de la señalización por ATP, pero no del incremento de ROS. Este proceso en general parece estar

afectado en la activación final de genes dependientes de calcio, pero no a nivel de fosforilación de la cascada de señalización (Medina-Castellanos *et al.*, 2018; Medina-Castellanos *et al.*, 2014). Esto sugiere que el calcio tiene un papel río abajo del proceso de activación de la vía de Tmk1 en *T. atroviride*.

2.1.7. Señalización por oxilipinas

Se conoce como oxilipinas a un grupo de compuestos biológicamente activos con una amplia diversidad estructural, las cuales son generadas por la acción coordinada de lipasas, lipoxigenasas y un grupo de citocromos P450 especializados en el metabolismo de ácidos grasos hidroperoxi (Howe & Schillmiller, 2002). Estos compuestos son producidos inmediatamente después del incremento de ROS y Ca^{2+} en respuesta al daño en las plantas. El ácido jasmónico es la oxilipina más importante y abundante en las plantas, mientras que en los animales son los eicosanoides, los cuales incluyen a las prostaglandinas y leucotrienos. Tanto en plantas como animales, las oxilipinas son moduladores de la respuesta a daño (Farmer *et al.*, 2003; Noverr *et al.*, 2003).

En *Arabidopsis* se han identificado las enzimas de biosíntesis de oxilipinas que incluyen a la fosfolipasa D, fosfolipasa A, lipoxigenasa, aleno óxido sintasa, y aleno óxido ciclasa, entre otras (Gfeller *et al.*, 2010). Los jasmonatos son sintetizados a partir del ácido α -linoleico y son considerados reguladores centrales de la respuesta al daño mecánico y herbivoría en las plantas (Arimura *et al.*, 2011; Gfeller *et al.*, 2010). Así, la regulación de la acumulación de ácido jasmónico es particularmente importante para responder de manera sistémica y rápidamente durante un ataque por herbívoros en las plantas. En *Arabidopsis*, tomate y tabaco se ha observado que las vías de MAPKs regulan la acumulación de oxilipinas (Kim *et al.*, 2003). En los animales el daño lleva a la activación de la fosfolipasa A2, que es esencial para la biosíntesis de prostaglandinas y leucotrienos, los cuales están involucrados en el proceso de inflamación y reparación de tejido dañado (Crosby & Waters, 2010). Las prostaglandinas más abundantes en mamíferos son aquellas derivadas del ácido araquidónico, producidas por lipoxigenasas (Noverr *et al.*, 2003). La síntesis de estos lípidos oxidados está íntimamente ligada al incremento de ROS, además de

que la activación de los genes necesarios depende del flujo de calcio y la fosforilación de las enzimas de la vía de síntesis por MAPKs.

Un análisis transcriptómico en *T. atroviride* mostró que genes como la fosfolipasa A2, lipoxigenasa y citocromo P450 se inducen en respuesta a daño, por lo que es posible que la síntesis de oxilipinas, como en las plantas y los animales, sea necesaria para activar la respuesta inmune de este hongo (Hernández-Oñate *et al.*, 2012).

2.2. Regulación génica postranscripcional por RNA pequeños

El mecanismo de silenciamiento por RNA interferente o RNAi, está altamente conservado a nivel evolutivo en los eucariontes. Este mecanismo produce RNAs pequeños de entre 20 y 32 nucleótidos, que inducen la inactivación y degradación de RNAs mensajeros específicos. Los RNAs pequeños regulan la expresión de genes permitiendo cambios rápidos o modulados, para poder llevar a cabo procesos como el desarrollo embrionario y la respuesta a estímulos como las infecciones virales, carencia de nutrientes y presión osmótica, entre otros (Kruszka *et al.*, 2012, Biggar & Storey, 2015).

Existen dos clases principales de RNAs pequeños (sRNAs) citoplasmáticos, los siRNAs y los microRNAs (miRNAs). La principal diferencia entre estas clases de sRNAs son las proteínas requeridas para su biogénesis y las regiones de donde provienen. Durante la biogénesis de los siRNAs, las RNA polimerasas dependientes de RNA (RdRP) producen y amplifican dobles cadenas de RNA (dsRNA) a partir de RNAs de cadena sencilla, usando RNAs pequeños complementarios a esta cadena como cebadores. Posteriormente estas dobles cadenas son cortadas por la acción de las proteínas Dicer, que generan los RNAs cortos que posteriormente se unen a proteínas Argonautas, para volver a ser unidas a sus blancos y continuar así el silenciamiento de transcritos (**Fig. 4**; Axtell *et al.*, 2011). Mientras que los miRNAs no dependen de la función de las RdRPs, ya que son procesados por Dicer o enzimas análogas, a partir de estructuras naturales de doble cadena (tallo-asa) y son cargados también en las Argonautas para llevar a cabo el silenciamiento de sus genes blancos (Fig. 4; Axtell *et al.*, 2011; Ha & Kim, 2014).

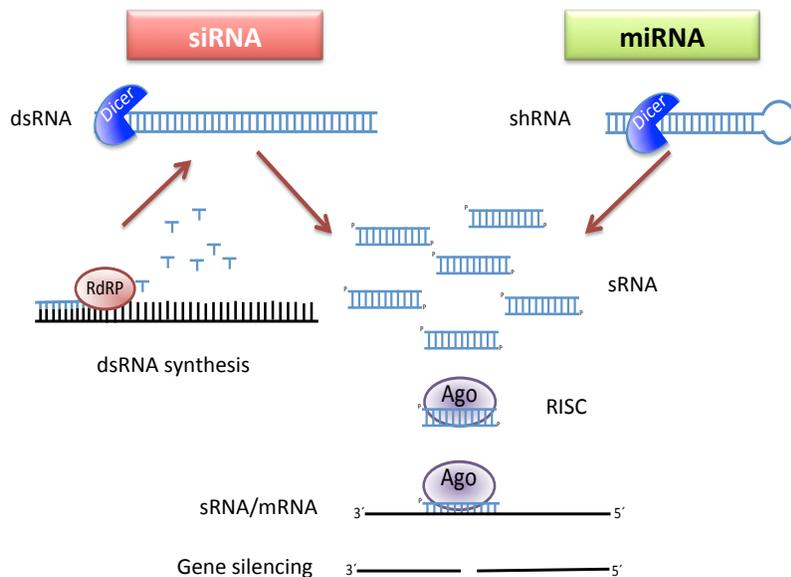


Figura 4.- Esquema de las dos principales vías de síntesis de sRNAs citoplasmáticos en eucariontes. RdRP= RNA polimerasa dependiente de RNA, dsRNA: doble cadena de RNA, shRNA: estructura tallo-asa de RNA, Ago: Argonauta, sRNA: RNA pequeño, RISC: complejo de silenciamiento inducido por RNA.

Los siRNAs pueden provenir de dsRNAs exógenos, como el material genético viral o endógenos, como aquellos de retrotransposones o transcritos que son procesados por las RdRP. Algunas de estas regiones pueden ser codificantes y es así como la expresión de estos genes es controlada. Normalmente los siRNAs están involucrados en la protección del genoma de infecciones virales, de actividad de elementos transponibles o estabilizando la heterocromatina (Ameres & Zamore, 2013; Blair & Olson 2015).

Los miRNAs son RNAs pequeños de cadena sencilla de aproximadamente 21 nucleótidos participan en el proceso de silenciamiento de genes, necesario para el desarrollo y la respuesta a estrés, tanto en las plantas como en los animales (Kruszka *et al.*, 2012; Ameres & Zamore, 2013; Biggar & Storey, 2015). Los miRNA están codificados en el genoma y se transcriben como moléculas largas llamadas RNAs primarios (pri-RNAs), que posteriormente son procesados por proteínas Dicer en el caso de las plantas o Drosha en el caso de los animales para dar lugar a moléculas más pequeñas llamadas precursores (pre-miRNAs), que son finalmente madurados por la proteína Dicer, formando microRNAs maduros. Los pri-miRNA se pliegan en una estructura tallo-asa la cual sirve como sustrato para las Dicer. Para llevar a cabo el control del silenciamiento postranscripcional, tanto en las plantas como en los animales los miRNAs se unen a proteínas Argonautas. Sin embargo, el mecanismo de reconocimiento de los genes blanco difiere entre estos dos reinos (Villalobos-Escobedo *et al.*, 2016).

En las plantas los miRNAs son totalmente complementarios al transcrito blanco de cadena sencilla y normalmente se unen a la región codificante de un transcrito. En los animales los miRNAs son parcialmente complementarios a su blanco, usando una región “semilla” de 6 a 8 nucleótidos de su extremo 5’ para aparearse generalmente a la región 3’UTR de su blanco. Una diferencia interesante es que en los animales el nivel de silenciamiento no es tan drástico como en las plantas, en las cuales los transcritos son abatidos por un mecanismo de degradación llevado a cabo por Argonautas, las cuales tienen actividad de endonucleasa. En los animales la actividad es más modulada, ya que se produce una desestabilización del transcrito blanco llevando a una degradación menos drástica a la que se lleva en las plantas (Carthew & Sontheimer, 2009; Axtell *et al.*, 2011; Ha & Kim, 2014; Eichhorn *et al.*, 2014).

A pesar de la importancia de la RNAi y de los RNAs pequeños en la función de las células de las plantas y los animales, hasta hace muy poco se han comenzado a describir procesos fisiológicos y de respuesta a estrés en los hongos filamentosos donde participa la RNAi. Sin embargo, aún desconocemos mucho sobre este mecanismo de silenciamiento génico en estos modelos.

2.2.1. La función de los siRNAs exónicos en los hongos

En el hongo filamentoso *Mucor circinelloides* se han descrito con mayor detalle la función de los sRNAs que provienen de regiones exónicas, los cuales son conocidos como *exonic-siRNAs* (ex-siRNAs). Existen cuatro clases principales de ex-siRNAs, la primera clase dependen de la función de la RdRP-2, para generar la doble cadena de RNA, que posteriormente es procesada por Dcl-2 (*dicer-like 2*). La clase II depende de Dcl-2 y RdRP-1. Tanto la clase I y II depende de la actividad de Ago-1 para su biogénesis y estabilidad. En la biogénesis de la clase III de ex-siRNAs, participan todas las anteriores proteínas y además participa la Dcl-1. La cuarta clase es dependiente de la R3B2, una RNasa III distinta a las dicer, dando lugar a los llamados *dicer-independent sRNAs* (**Fig. 5A**).

El estudio de estas moléculas comenzó al descubrir que la depleción de los genes *DICER* reduce el crecimiento de las hifas de *M. circinelloides*. Se demostró que el gen *dcl-2* participa en el silenciamiento de genes, produciendo ex-siRNAs, y la mutación de este gen reduce la capacidad de conidiación, pero hasta la fecha no se ha demostrado que sean los ex-siRNAs la causa del fenotipo de la reducción del crecimiento en la mutantes de los genes *dicer* en *M. circinelloides* (Nicolás *et al.*, 2007; 2010; de Haro *et al.*, 2009).

Interesantemente, también en *M. circinelloides* se encontró que el desarrollo de la resistencia al antifúngico FK506 (*tacrolimus*), depende de la RNAi. El *tacrolimus* forma un complejo con la Peptidilprolil isomerasa (FKBP12). Este complejo inhibe a la proteína Calcineurina fosfatasa, lo que provoca el bloqueo de la formación de hifas, forzando a *M. circinelloides* a crecer como una levadura. Sin embargo, las mutantes del gen *FKBA*, que codifica a la proteína FKBP12, pueden crecer normalmente en presencia del FK506. Cuando *M. circinelloides* crece en presencia de este antibiótico, algunas cepas silvestres son capaces de silenciar la expresión de este gen mediante RNAi, generando ex-siRNAs provenientes del *fkba*, lo que se comprobó usando sRNA-seq. Dicho proceso de silenciamiento depende de los genes *DCL2*, *AGO1* Y *RDRP-2*. Estos resultados muestran que la maquinaria de

RNAi confiere a este hongo la capacidad de adaptarse rápidamente a un cambio de condición ambiental (Calo *et al.*, 2014).

En *T. atroviride* se determinó que la maquinaria de RNAi está constituida por dos proteínas Dicer, 3 RdRPs y 3 Argonautas. En nuestro laboratorio se demostró que las mutantes de los genes *DCR2* y *RDR3*, están afectadas en el crecimiento y la capacidad de conidiar. Sin embargo, no se observó un fenotipo claro en las mutantes argonauta⁻. Un análisis transcriptómico reveló que el metabolismo está afectado en la mutante $\Delta dcr2$ durante la conidiación, lo que también sucede en las mutantes involucradas en la biogénesis de RNAs pequeños en el hongo *M. circinelloides*. Esto sugiere que se trata una estrategia de regulación metabólica extendida a otros hongos. Además, en *T. atroviride* se observó que genes que participan en la conidiación, están desregulados en la mutante $\Delta dcr2$ y es esta mutación la causante del fenotipo más drástico observado en este hongo. Los sRNAs afectados por dicha mutación están relacionados con ex-siRNAs, lo que se encontró por un análisis de secuenciación de RNAs pequeños (Carreras-Villaseñor *et al.*, 2013). Sin embargo, en el trabajo de Carreras-Villaseñor, no se investigó el papel de la maquinaria de RNAi en la respuesta temprana a un estímulo como el daño mecánico y no se ha explorado el papel de la Rdr3 en estos procesos. Por ello en los apartados 6 y 7 profundizo en un análisis genómico de estas mutantes en respuesta a daño.

2.2.2. Los microRNAs en hongos filamentosos

Aunque la función de los microRNAs ha sido bastante explorada en las plantas y los animales, poco sabemos de este mecanismo de regulación en los hongos filamentosos. Este tipo de sRNAs fue por primera vez descubierto en *N. crassa* y se determinó que son capaces de generar represión de la expresión de genes a nivel tanto de transcrito como de proteína (Lee *et al.*, 2010). Sin embargo, por un lado, las estructuras de pre-miRNAs que dan lugar a los miRNAs maduros y las enzimas que participan en la biogénesis en los hongos filamentosos no son canónicas, por lo que fueron nombrados RNAs similares a microRNAs o *microRNA-like RNAs* (miRNAs). Se han determinado tres principales vías de biogénesis de estos

milRNAs, la primera depende de la proteína Dicer, de una Argonauta llamada QDE-2 y de una RNasa tipo III llamada MRPL3. La segunda vía no depende de QDE-2, mientras que la última únicamente depende de esta proteína y en ella no participa la Dicer (**Fig. 5B**).

A la fecha, ni en *N. crassa*, ni en ningún otro hongo se ha demostrado que el silenciamiento de genes por estos milRNAs, lleve a un defecto fenotípico evidente. Por ello existe una duda razonable de la importancia de este mecanismo de silenciamiento en los hongos.

Recientemente se han realizado una gran cantidad de experimentos de secuenciación de RNAs pequeños en distintos hongos, como *Sclerotinia sclerotiorum*, *Mycosphaerella graminicola*, *Fusarium oxysporum*, *Aspergillus flavus*, *Penicillium chrysogenum*, *Antrodia cinnamomea* y *Trichoderma reesei*, entre otros, donde se determinó la existencia de milRNAs. Estos han sido relacionados a procesos muy particulares en cada organismo, pero no se ha observado conservación a nivel de secuencia, o defectos importantes a nivel fenotípico asociados a la ausencia o sobreexpresión de los milRNAs propuestos (Villalobos-Escobedo *et al.*, 2016).

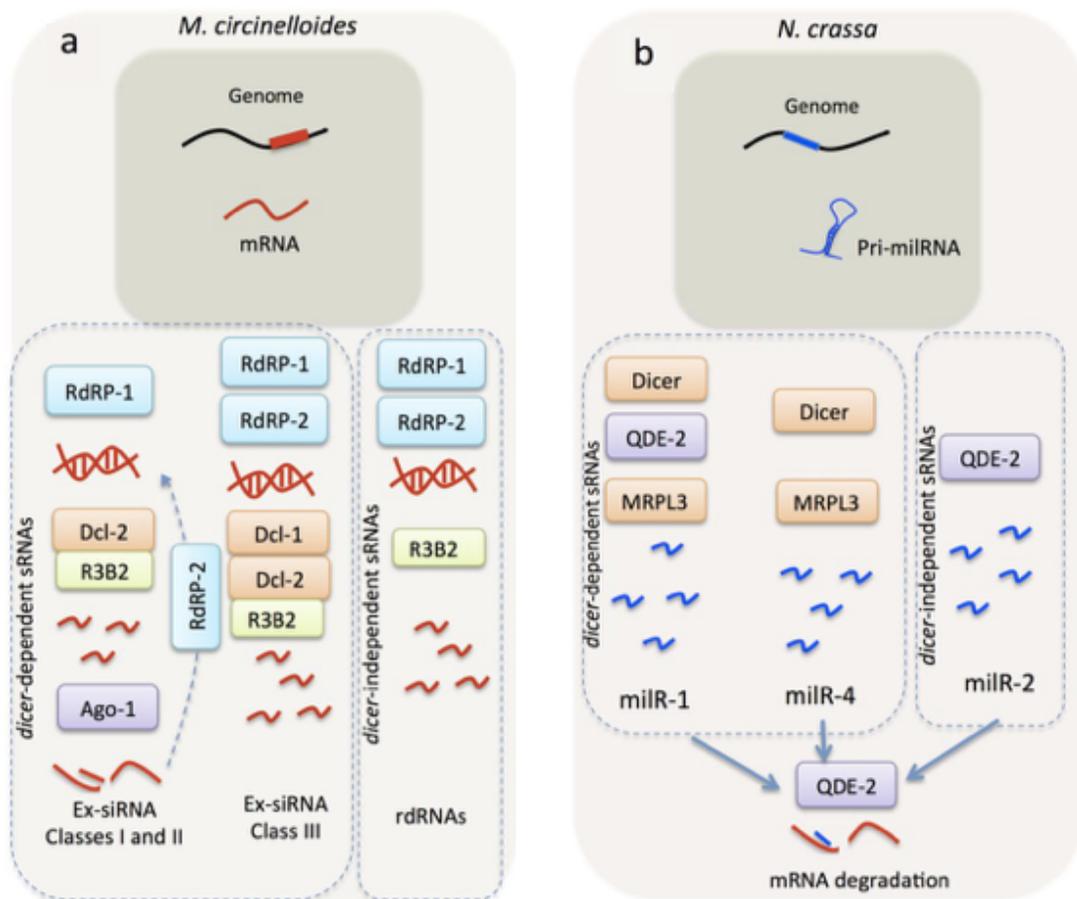


Figura 5.- Mecanismos de biogénesis por la RNAi de miRNAs y ex-siRNAs en los hongos filamentosos. A) Mecanismos de biogénesis y silenciamiento de los ex-siRNAs en *Mucor circinelloides*. B) Mecanismos de biogénesis y silenciamiento de los miRNAs en *Neurospora crassa*. (Modificada de Villalobos-Escobedo *et al.*, 2016).

2.2.3. Participación de los RNAs pequeños en la respuesta a daño mecánico

En animales se ha demostrado la participación de microRNAs durante el proceso de inflamación, proliferación celular y regeneración. Por ejemplo, durante el daño a células endoteliales de las arterias, se dispara una respuesta de saneamiento y regeneración. En este proceso, varios miRNAs como miR-92 y miR-712, los cuales modulan la proliferación celular y el proceso de inflamación, se inducen durante el disturbio del flujo sanguíneo. Además, en los macrófagos, miR-342-5p induce la expresión de miR-155 durante la progresión de la aterosclerosis y esto promueve la inducción de los genes relacionado con la inflamación haciendo blanco sobre el gen *Bcl6* (Natarelli & Schober, 2015).

Las salamandras son uno de los modelos biológicos donde más se ha estudiado el proceso de regeneración. En ellas se demostró la inducción de MiR-196 después de cortar la cola y éste miRNA ha sido implicado en la regulación del gen *Hoxb8*. MiR-196 también se induce a las 24 h después de la amputación y luego se mantiene así durante los posteriores 14 días. Al inhibir la expresión de este miRNA, se observan defectos severos en el desarrollo de la nueva cola (Sehm *et al.*, 2009). Estas evidencias muestran claramente que la regulación por sRNAs del proceso de respuesta al daño y la regeneración en animales, es necesaria. Así, en el apartado 5 de esta tesis, nosotros ponemos a prueba la hipótesis de que existen RNAs pequeños involucrados en la respuesta al daño y determinamos los defectos causados por mutaciones en componentes de la maquinaria de RNAi en la respuesta a este estímulo en *T. atroviride*. Mientras que en el capítulo 6 presentamos un trabajo exhaustivo para determinar el papel de los miRNAs de *T. atroviride* durante la proliferación celular.

3. Hipótesis

En el hongo filamentoso *Trichoderma atroviride* durante la regeneración de las hifas y la conidiación en respuesta a herida, los mecanismos de percepción, señalización y de regulación, reportados como esenciales en otros modelos eucarióticos, también juegan un papel relevante.

4. Objetivos

4.1. Objetivo general

Determinar los mecanismos genéticos que participan en el inicio de la regeneración y la conidiación en respuesta al daño mecánico en *Trichoderma atroviride* que son regulados por los patrones moleculares asociados a daño (DAMPs) y RNAs pequeños.

4.2. Objetivos específicos

Encontrar los cambios transcripcionales activados por DAMPs en respuesta al daño mecánico que conducen a la regeneración y la conidiación en *T. atroviride*.

Determinar los genes asociados con la respuesta al daño mecánico afectados en mutantes defectuosas en la maquinaria de RNAi.

Determinar la población y función de los RNAs pequeños regulados en respuesta a daño mecánico.

5. El sistema inmune innato parece participar en la regeneración de *Trichoderma atroviride*

5.1. Introducción

La interacción de los organismos eucariontes superiores con su medio ambiente, supone una exposición constante a distintos tipos de estrés ambientales, bióticos y abióticos. Uno de los más comunes es el daño mecánico, que puede ser producto de las interacciones presa-predador. En respuesta a este estímulo los organismos han desarrollado un mecanismo que les permite sobrevivir. En primer lugar, los organismos perciben los Patrones Moleculares Asociados a Daño (DAMPs, por sus siglas en inglés), que pueden ser ADN, ATP, Ca^{2+} y otras moléculas liberadas de células rotas (Vénéreau *et al.*, 2015). Posteriormente se produce una activación de la transcripción de genes vía las MAP cinasas, que al final conducen a la sanación o incluso regeneración del área dañada (Heil & Land, 2014). Se sabe además que el incremento de calcio y ROS en las células cercanas al área de la lesión son importantes para conducir esta respuesta. Por otro lado, en animales se ha determinado que genes del sistema inmune innato, permiten a las células determinar la presencia de organismos extraños en un sistema de reconocimiento “self/non-self” y así decidir si entrar a un proceso de sanación y regeneración o iniciar la muerte celular programada (Heil & Land, 2014).

En *T. atroviride* se ha podido determinar que el eATP funciona como una señal de daño que dispara la conidiación (Medina-Castellanos *et al.*, 2014). Además, se ha determinado que un incremento inmediato en la concentración intracelular de calcio y la activación de la vía de *tmk1* son necesarios para llevar a cabo la regeneración. Mientras que el incremento de ROS y la activación de la vía de *tmk3*, son esenciales para que se produzca la conidiación en respuesta a daño (Medina-Castellanos *et al.*, 2018; Hernández-Oñate *et al.*, 2012).

En este trabajo nos enfocamos en determinar los cambios transcripcionales que llevan a la regeneración y conidiación, activados por el eATP, el Ca^{2+} y las vías de señalización *Tmk1* y *Tmk3*. Este trabajo es parte de artículo donde soy co-primer autor junto con Medina-Castellanos, publicada en el 2018. Aquí presento toda la

estrategia transcriptómica y cómo se identificaron los procesos biológicos esenciales para regenerar las hifas dañadas y las señales que dan inicio a estos procesos en *T. atroviride*.

5.2. Materiales y Métodos

5.2.1. Cepas y tratamientos

El micelio de las cepas $\Delta tmk1$, $\Delta tmk3$ y WT se colectó 30 min después del daño y se congeló inmediatamente en nitrógeno líquido. Para el experimento que permitió determinar los genes afectados por el incremento de calcio intracelular, se trató a la cepa silvestre (WT) con BAPTA (un quelante específico de calcio), a una concentración 10 mM. Para determinar aquellos genes afectados por el ATP extracelular, la cepa WT fue tratada con un pulso de este compuesto a una concentración 100 μ M durante 15 min. En todos los casos, se incluyeron un control sin tratamiento químico y un control sin daño. Para realizar la secuenciación se hicieron tres réplicas biológicas por cepa y/o tratamiento. El RNA total se extrajo usando el kit comercial TRIzol de Invitrogen.

5.2.2. Preparación de bibliotecas y secuenciación del RNA

Las bibliotecas para RNA-seq se prepararon usando el protocolo de TruSeq RNA Library Prep kit v2 de Illumina. Cada biblioteca se secuenció usando un equipo NextSeq500 High Output en formato de corrida 1x75. Se obtuvieron 18 bibliotecas con un promedio de 25 millones de lecturas por biblioteca con alta calidad (Tabla Suplementaria 1). Los datos de RNA-seq fueron depositados en la base de datos GEO (*Gene Expression Omnibus*) de NCBI y son accesibles a través del número de acceso GSE115811. El vínculo es: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE115811>.

5.2.3. Análisis de expresión diferencial

Las lecturas finales de 75 nt fueron pseudo-alineadas a los transcritos de *T. atroviride* de la versión 2 del genoma (<https://genome.jgi.doe.gov/Triat2/Triat2.info.html>), usando el programa de cuantificación de transcritos *kallisto* (Bray *et al.*, 2016).

Para el análisis de expresión diferencial, solo se consideraron genes que tenían asociados más de tres cuentas por millón en al menos diez de las 18 bibliotecas. Todos los análisis se llevaron a cabo utilizando el paquete edgeR (Robinson *et al.*, 2010). Para determinar la expresión diferencial entre las comparaciones, utilizamos la prueba de razón de verosimilitud. La matriz de contrastes se muestra en la Tabla 1. Se calculó la tasa de falsos descubrimientos (FDR) y se consideraron diferencialmente expresados aquellos genes con un FDR < 0.05 y un valor absoluto de log₂Fold-change ≥ 1. Diagramas de Venn y *heatmaps* se construyeron para comparar los universos de genes expresados diferencialmente entre las comparaciones utilizando el paquete gplots en R. Para identificar el conjunto de genes relacionados con la regeneración, un análisis de la expresión diferencial altamente restrictiva se realizó con un valor de FDR < 0.01, pero sin limitar con respecto al log₂Fold-change. Nosotros pensamos que podíamos encontrar los genes con mayor posibilidad de estar involucrados en la regeneración, comparando las bibliotecas de expresión de condiciones que conducen a la regeneración (WT injury, $\Delta tmk3$ injury), contra las condiciones en que no son capaces de regenerar ($\Delta tmk1$ injury, BAPTA injury), esto basado en los datos fenotípicos obtenidos en el trabajo de Medina-Castellanos y colaboradores (2018).

Tabla 1.- Matriz de contrastes usados para hacer la expresión diferencial.

<i>Efecto del daño en los fondos mutantes</i>
WT daño vs. WT Control
tmk1 daño vs. tmk1 Control
tmk3 daño vs tmk3 Control

<i>Efecto de BAPTA y ATP</i>
WT Injury BAPTA vs WT Injury
WT Injury BAPTA vs WT Control
WT ATP vs WT Control

5.2.4. Análisis de enriquecimiento de categorías funcionales

Los análisis de enriquecimiento para las ontologías de genes (GO-terms) de componentes celulares y procesos biológicos se realizaron usando la función *camera*, incluido en el paquete *limma* (Wu & Smyth, 2012). Los términos GO con $FDR \leq 0.05$ se consideraron significativamente enriquecidos en cada comparación. Presentamos estos datos en un mapa de calor agrupado usando un modelo de correlación de Pearson, en estas gráficas se destacan las categorías enriquecidas con asteriscos, donde ** representa $FDR < 0.01$ (altamente significativos) y * $FDR < 0.05$ (significativos). Los valores graficados son el porcentaje de genes que pertenecen a cada categoría que se consideran diferencial. Los términos GO primero se filtraron por redundancia, y también se eliminaron aquellos que contenían más de 1000 o menos de 4 genes.

5.2.5. Análisis de expresión de algunos genes por RT-qPCR

Cuatro genes identificados como involucrados en la regeneración, encontrados con la estrategia explicada anteriormente, fueron evaluados para conocer su perfil de expresión en una cinética extendida durante la regeneración. El micelio de la cepa silvestre de *T. atroviride* fue colectado a los 15, 30, 60, 120 y 300 min después del

daño mecánico, que es la ventana de tiempo donde se producen las nuevas hifas y se produce el alargamiento de éstas. El micelio fue congelado en nitrógeno líquido y posteriormente se realizó la molienda y extracción del RNA usando el kit comercial TRIzol de Invitrogen. Los oligonucleótidos usados para el RT-qPCR se diseñaron para producir amplicones de alrededor 150 pb (Tabla S2). El cDNA se sintetizó a partir del RNA extraído del micelio que sufrió daño y el control sin daño, usando la enzima transcriptasa reversa *RT II SuperScript* de Invitrogen. Se hicieron cuatro repeticiones biológicas y tres técnicas. La mezcla de reacción para las PCRs cuantitativas fue la siguiente: 10 µl de SYBR (*Applied Biosystems*), 3 µl de cDNA (3 ng/µl) y 1 µl de cada uno de los oligonucleótidos (10 µM). El programa de PCR fue el siguiente: un ciclo a 95 °C durante 5 min, 40 ciclos a 95 °C cada uno durante 30 seg, a 65 °C durante 30 seg, 72 °C durante 40 seg. Se realizó una curva de calibración y se calculó la expresión relativa con respecto al gen control DNA pol famB. Se realizaron pruebas de ANOVA y Tukey para determinar la significancia estadística de los cambios en la expresión génica.

5.3. Resultados y Discusión

Usando los métodos antes mencionados, determiné los procesos regulados por calcio y por el ATP extracelular y encontré los genes que son activados por las vías de Tmk1 y Tmk3 en respuesta al daño. Además, usando los datos transcriptómicos obtenidos en las distintas condiciones, encontré los genes con mayor posibilidad de estar involucrados en la regeneración.

5.3.1. Relación entre muestras y expresión diferencial

Para conocer la variación entre las replicas biológicas de nuestros experimentos de RNA-seq, se realizó un análisis de dispersión usando un *multidimensional scaling plot* (MDS), que se aprecia en la **Figura 6**. Esto se hizo posterior a la cuantificación de las bibliotecas, donde se obtuvieron los porcentajes de pseudo-alineamiento mostrados en la Tabla suplementaria 1.

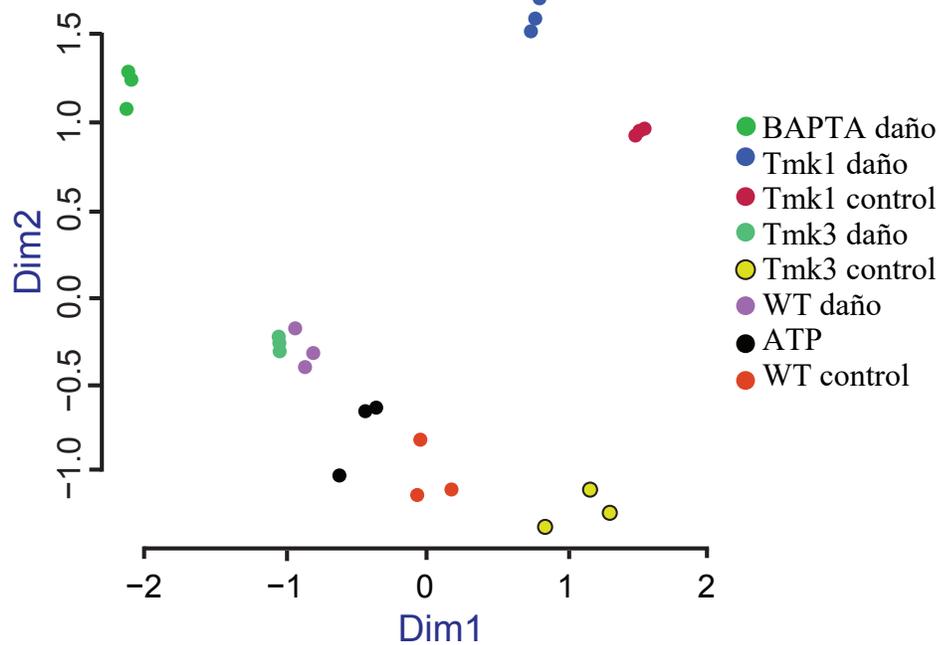


Figura 6.- Gráfica del análisis *Multidimensional scaling (MDS)* de las librerías transcriptómicas. En el MDS podemos observar representadas por puntos cada una de las librerías secuenciadas y “mapeadas” del genoma de *T. atroviride*, Los distintos colores representan los tratamientos. Para este análisis se usaron los 500 genes con más variación de los más de 8000 genes que tuvieron lecturas asociadas.

En el MDS (**Fig. 6**), se observó una notable consistencia entre las tres replicas biológicas por cada tratamiento. Interesantemente, podemos ver que el tratamiento con BAPTA y las librerías pertenecientes a la mutante del gen *tmk1* con daño y en la condición control, están notablemente alejadas de las otras condiciones evaluadas en la segunda dimensión, lo que sugiere que son los tratamientos con los mayores cambios transcripcionales comparados con los otros tratamientos. Por otro lado, la primera dimensión nos permite ver claros grupos entre las replicas de los distintos tratamiento y cepas evaluadas, donde los tratamientos control de las cepas WT y $\Delta tmk3$ están cercanas entre ellas, mientras que las librerías de estas mismas cepas en respuestas al daño, se agrupan entre ellas y se alejan del resto de las librerías, e intermedio a estos tratamiento se encuentran las librerías del tratamiento con ATP, lo que sugiere una respuesta transcripcional similar a que tienen daño, por lo que es importante hacer el análisis de expresión diferencial entre este tratamiento el control. Interesantemente, la agrupación de las librerías parece reflejar las diferencias fenotípicas en las cepas, donde tanto la mutante del gen *tmk1*, como aquellas cepas tratadas con BAPTA, están fuertemente afectadas en la conidiación y la regeneración en respuesta al daño, como se mencionó en los antecedentes.

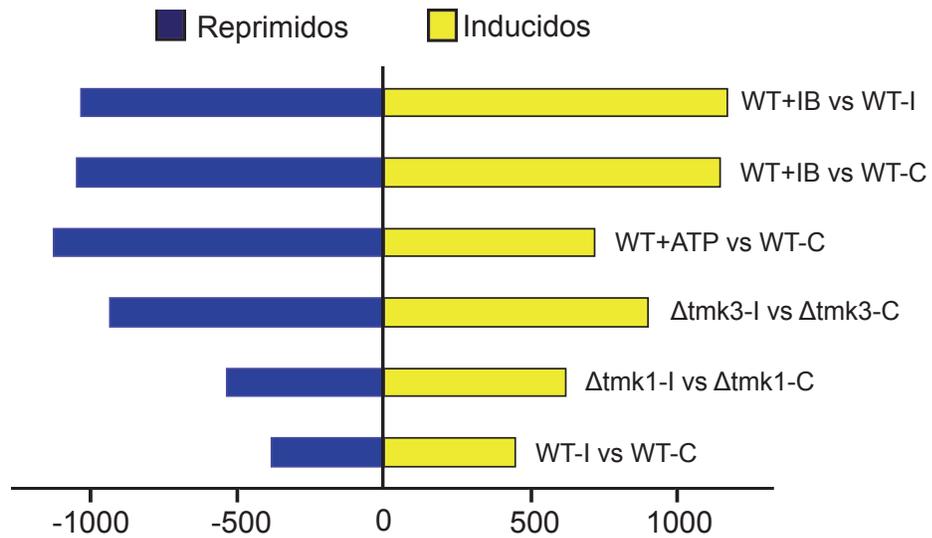


Figura 7.- Número de genes diferenciales en cada contraste realizado. En barras amarillas se muestran los genes inducidos y en barras azules los reprimidos. I= daño, C= Control sin daño, IB= daño y tratamiento con BAPTA.

En análisis de expresión diferencial (**Fig. 7**), se encontraron 442 genes inducidos en respuesta a herida en el fondo silvestre de *T. atroviride*, mientras que 383 genes se encontraron reprimidos. Como se puede observar en la gráfica anterior, es en este contraste donde existen menos genes diferenciales, mientras que en el contraste $\Delta tmk1-I$ vs $\Delta tmk1-C$, 612 genes se inducen y 533 se reprimen y en el contraste $\Delta tmk3-I$ vs $\Delta tmk3-C$, 893 genes se inducen y 928 se reprimen. Sin embargo, en las dos comparaciones donde se uso el compuesto BAPTA, se observaron valores mucho mayores a la silvestre tanto reprimidos como sobreexpresados (WT+IB vs WT-C = 1141 inducidos y 1042 reprimidos; WT+IB vs WT-I = 1165 inducidos y 1028 reprimidos), lo que indica que la ausencia de calcio extracelular durante la respuesta a daño provoca una clara desregulación génica. Esto es interesante ya que no solo se trata de un cambio bioquímico, sino de un control de la expresión de la oleada transcripcional necesaria para llevar acabo las modificaciones morfológicas que permitirán la adaptación al estímulo.

5.3.2. Procesos celulares regulados por el calcio en respuesta al daño

Para determinar los procesos afectados al inhibir el incremento en la concentración, se hizo una comparación de la cepa silvestre con daño en presencia o no del quelante BAPTA. Como se puede apreciar en la **Figura 8A**, 241 y 180 genes se inducen y reprimen respectivamente, exclusivos a la cepa sin tratamiento. Estos genes pueden estar directamente involucrados en la regeneración de las nuevas hifas dado el fenotipo observado al adicionar BAPTA. Para determinar los procesos afectados a nivel de localización subcelular, se realizó el análisis de enriquecimiento, presentando los resultados en la figura 7B. Estos resultados sugieren que componentes relacionados con el núcleo deben activarse transcripcionalmente para poder responder al estímulo, mientras que aquellos relacionados con vacuolas y vesículas en general están reprimidos durante dicha respuesta. Es evidente que al tratar las cepas con BAPTA todo el perfil transcripcional se ve afectado, interesantemente existe un enriquecimiento en componentes celulares como microcuerpos y vesículas, lo que incluso demuestra

un comportamiento contrario a lo que sucede en presencia del pulso de calcio, como se observa en la **Figura 8B**. Esto indica que el calcio participa en dar prioridad al tipo de estructuras celulares que se van a sintetizar durante la regeneración, siendo los cromosomas y ribosomas los componentes más importantes durante este proceso, ya que se produce replicación del material genético y producción de proteínas nuevas.

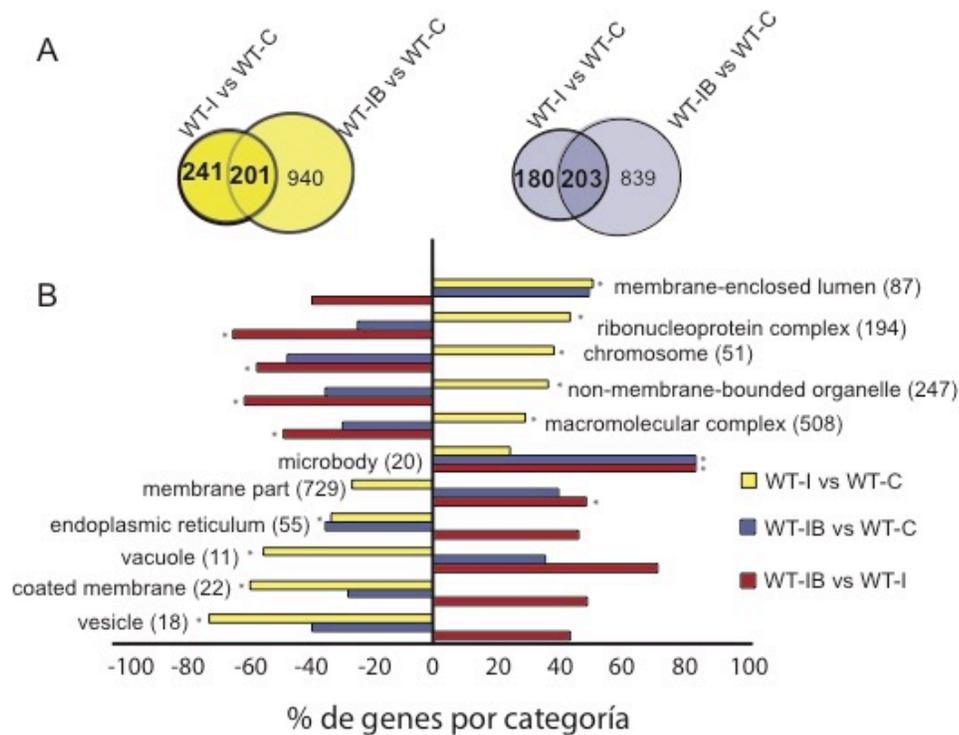


Figura 8.- Análisis transcriptómico del efecto del compuesto BAPTA en la cepa silvestre de *T. atroviride*. A) En los Diagramas Venn se muestra el número de genes inducidos en amarillo y reprimidos en azul, esto en las comparaciones de la cepa silvestre en respuesta a daño en ausencia y presencia del compuesto quelante. B) Enriquecimiento de términos GO de CC, los asteriscos muestran la significancia en la prueba. Los números entre paréntesis son la cantidad de genes contenidos en cada termino GO, y los datos están expresados en porcentaje de genes diferenciales contenidos en cada categoría. Las barras amarillas representan aquellos componentes celulares favorecidos a los 30 min después de daño en la cepa silvestre. (Tomada de Medina-Castellanos *et al.*, 2018).

El análisis de enriquecimiento de las categorías pertenecientes a Procesos Biológicos (BP) presentado en la **Figura 9**, muestra que, en ausencia de calcio intracelular, la respuesta a daño afecta los procesos de metilación, la replicación del DNA y la transcripción que evidentemente tienen un papel esencial durante la proliferación celular, ya que estos se enriquecen en el control sin BAPTA (WT-I vs WT-C) pero se pierden al adicionar BAPTA, lo que sugiere que la replicación celular y la regulación transcripcional depende del incremento del calcio intracelular una vez que se percibe el daño mecánico. Además, la represión de procesos metabólicos de carbohidratos y de especies reactivas de oxígeno no parecen llevarse a cabo correctamente cuando las células son tratadas con BAPTA. Esto sugiere que en ausencia de Ca^{2+} , hay un decremento de la capacidad de síntesis de nuevo material genético y en la redirección energética para poder responder al estímulo. Interesantemente, se sabe que un incremento de ROS es necesario para poder formar conidios en respuesta a daño, y para esto es necesaria una represión de genes como catalasas (Hernández-Oñate *et al.*, 2012). Como podemos observar en el *heatmap*, la categoría donde están contenidos dichos genes no se enriquece, lo que lleva a pensar que este defecto es causa de la pérdida de conidiación en respuesta a daño cuando el Ca^{2+} es eliminado del medio (Medina-Castellanos *et al.*, 2014).

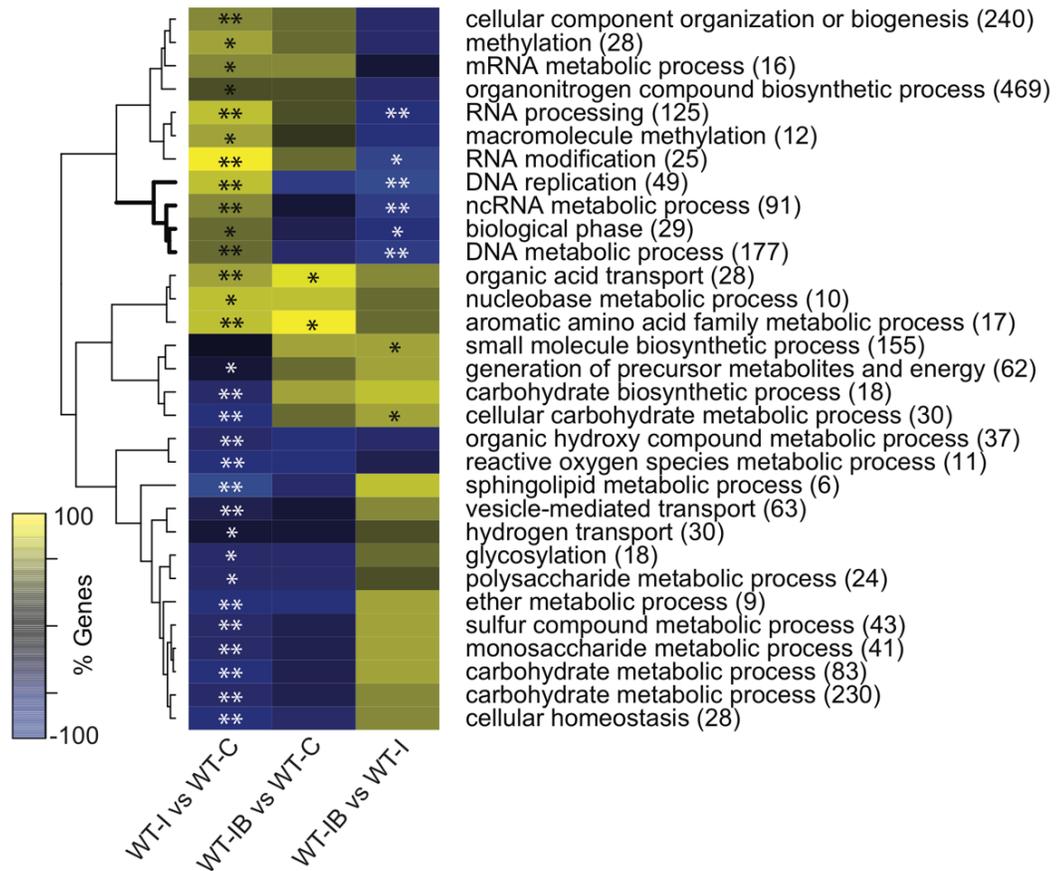


Figura 9.- Enriquecimiento de términos GO de procesos biológicos en el tratamiento con BAPTA. Entre paréntesis se muestra el número de genes totales por categoría presentada. La escala de color indica el porcentaje de genes desregulados del total en cada GO y los asteriscos destacan la significancia del enriquecimiento. (Tomada de Medina-Castellanos *et al.*, 2018).

En las plantas se ha observado un incremento de la concentración de Ca^{2+} citosólico durante la herbivoría y esto provoca el incremento del ácido jasmónico que participa en la respuesta sistémica (Zebelo & Maffei, 2015; Mousavi *et al.*, 2013). Por otro lado, en animales se ha reportado que luego del daño mecánico se presenta un incremento en la concentración de calcio citosólico (Jaffe, 2010) y se activa la fosfolipasa A2, la cual participa en la síntesis de prostaglandinas y leucotrienos, que son importantes en los procesos de inflamación y reparación del tejido dañado (Martin & Leibovich, 2005). Esto indica que los procesos de señalización y defensa contra el daño dependen del incremento en la concentración de Ca^{2+} lo cual se cumple a varios niveles evolutivos.

Un análisis de algunos genes particulares (**Fig. 10**) me permitió observar que genes esenciales para la señalización como *gpcr-protein* y *g-protein* están reprimidos en presencia de BAPTA, en comparación a lo que sucede en la cepa silvestre sin tratamiento. Además, genes involucrados en la formación del conidióforo, la esporulación y la pigmentación de los conidios en la que participa el gen *alb1* descrito en *Aspergillus fumigatus* (Tsai *et al.*, 1998). Además, el gen *cbf5* que es importante durante el ciclo celular también se ve afectado (Jiang *et al.*, 1993). Como se había visto a nivel de categorías funcionales, genes relacionados con procesos de oxido-reducción, especialmente aquellos involucrados en la reducción de ROS como la catalasa peroxisomal, son reprimidos en respuesta al daño. Interesantemente, en las cepas tratadas con BAPTA, los genes relacionados con oxido-reducción incrementan su expresión.

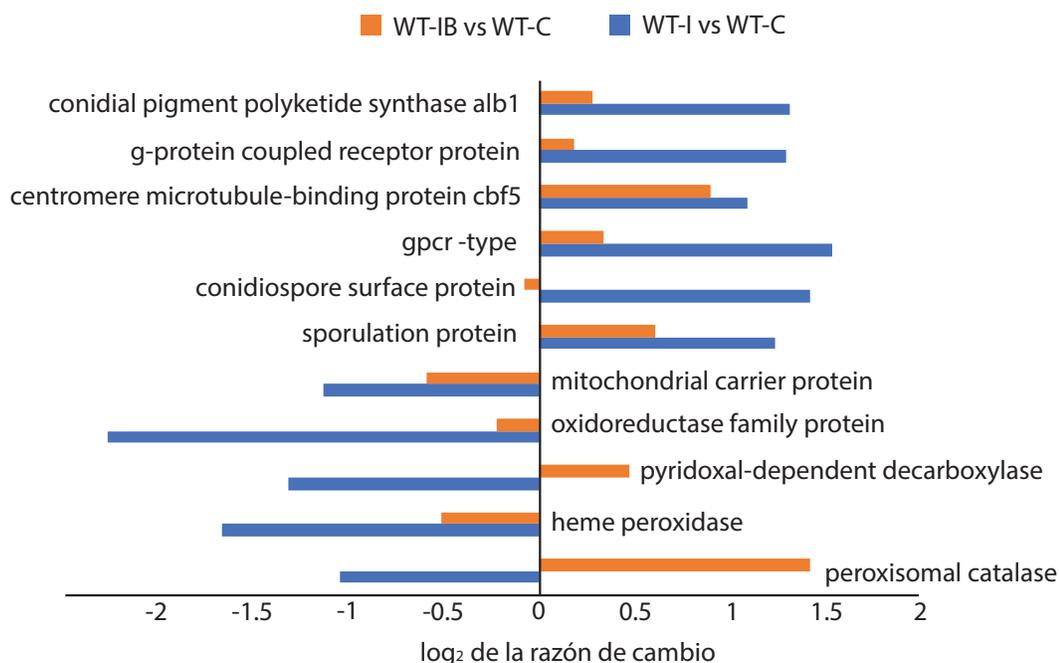


Figura 10.- Perfil de expresión de genes diferenciales en respuesta a daño con y adición de BAPTA. Los valores son la razón de cambio o *Fold-change* de los genes en las comparaciones realizadas. IB= daño con BAPTA, I= daño, C=Control.

5.3.3. RNA-seq de la respuesta a daño de las mutantes de las MAPKs

Como se mencionó antes, las mutantes $\Delta tmk1$ y $\Delta tmk3$ están afectadas en la conidiación en respuesta al daño y la mutante $\Delta tmk1$ es incapaz de regenerar como lo hacen la cepa silvestre y la mutante $\Delta tmk3$. Por esta razón realicé un análisis transcriptómico sobre dichas mutantes en respuesta al daño.

Para identificar aquellos genes directamente involucrados en la regeneración bajo la vía de Tmk1 y aquellos necesarios para la conidiación, razoné que luego de realizar los contrastes mencionados en la Tabla 1, los genes diferenciales que estuvieran compartidos entre la respuesta al daño de las cepas WT y $\Delta tmk3$, pero excluidos de la respuesta al daño de la $\Delta tmk1$, serían aquellos que probablemente participasen durante la regeneración. Así también, aquellos genes que únicamente se inducen o reprimen en la cepa WT, tienen mayor posibilidad de estar

involucrados en la conidiación. Se abordaron estas hipótesis usando diagramas de Venn que se muestran en la **Figura 11A-B**, donde podemos observar que 94 genes están inducidos y 127 reprimidos en la comparación $(WT \cap \Delta tmk3) - \Delta tmk1$, tratándose entonces de los que más probablemente estarían involucrados en la regeneración, mientras que 162 genes inducidos y 182 reprimidos exclusivamente en la cepa silvestre (**Fig. 11A-B**) serían los más probablemente involucrados en la conidiación.

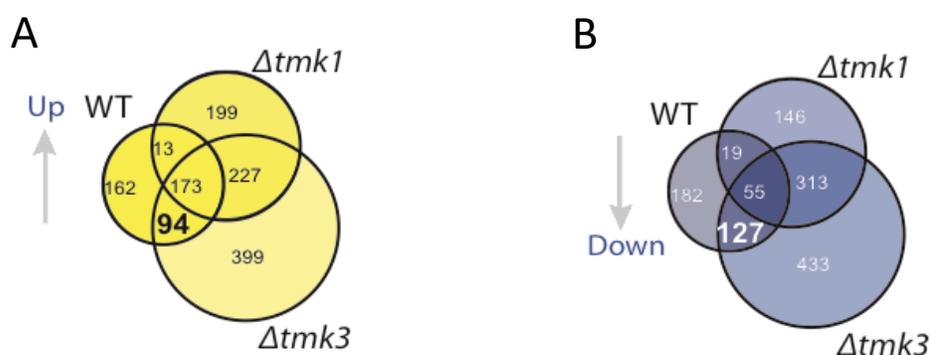


Figura 11.- Análisis transcriptómico de la respuesta a daño en la cepa silvestre y las mutantes $\Delta tmk1$ y $\Delta tmk3$. Diagrama de Venn de los genes inducidos (A) y reprimidos (B) en respuesta al daño en todas las cepas. (Tomada de Medina-Castellanos *et al.*, 2018).

El análisis de las categorías funcionales de los procesos biológicos que aparecen la **Figura 12**, muestra que en la mutante $\Delta tmk1$ no tiene lugar un enriquecimiento significativo la categoría de replicación de DNA. Este proceso claramente está involucrado en la proliferación celular, pudiendo ser ésta la causa del defecto observado en la regeneración y no un defecto a nivel de genes estructurales como aquellos involucrados en la formación de pared celular. Además, la categoría de proceso de aminocidos aromáticos también se incrementa en respuesta a herida en la cepa silvestre y se ve afectada en las mutantes de las *TMKs*, por lo que al parecer estas mutaciones afectan procesos metabólicos necesarios para responder

al estímulo. Por otro lado, se puede observar que los procesos metabólicos se reprimen en la cepa silvestre al responder al daño, pero en la mutación de *tmk1* estos no parecen tener una represión significativa, a diferencia de lo que sucede con el metabolismo de monosacáridos, el cual no sufre una represión significativa en las tres cepas. Además, genes que codifican proteínas asociadas a actina y proteólisis, están reprimidos significativamente en la cepa $\Delta tmk1$, lo que puede también ser un defecto importante respecto a la WT, al momento de producir las nuevas hifas, ya que durante el proceso de crecimiento polar existe producción de citoesqueleto y degradación de proteínas durante los cambios de fases de la mitosis (Sharp *et al.*, 2000).

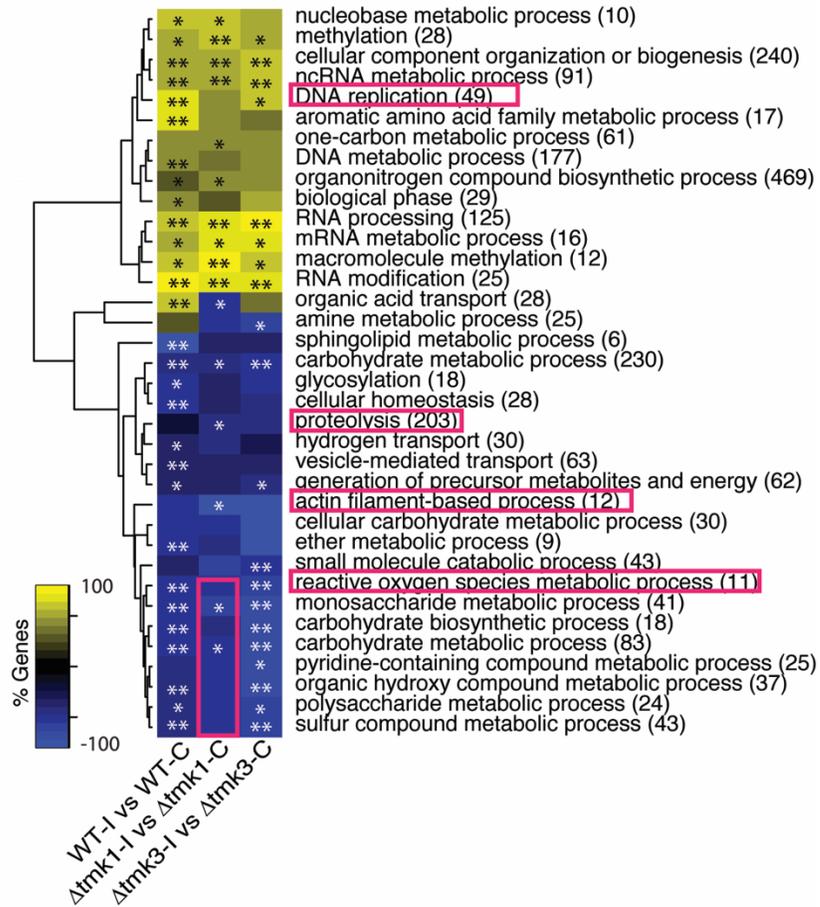


Figura 12.- Enriquecimiento de términos GO de procesos biológicos en respuesta al daño de la cepa silvestre y las mutantes $\Delta tmk1$ y $\Delta tmk3$. Entre paréntesis se muestra el número de genes totales por categoría presentada. La escala de color indica el porcentaje de genes contenidos en cada GO y los asteriscos destacan la significancia del enriquecimiento. Algunas de las categorías afectadas en la mutante $\Delta tmk1$ se destacan en recuadros rojos. (Tomada de Medina-Castellanos *et al.*, 2018).

5.3.4. RNA-seq de la respuesta a ATP extracelular

Al analizar el experimento de las cepas inducidas con ATP extracelular, se encontró que los mismos procesos de replicación del DNA y en general activación del ciclo celular, se incentivan en presencia de este compuesto, como lo hacían en la respuesta al daño en la cepa silvestre (**Fig. S1**), por lo que podemos concluir que efectivamente el eATP funciona como la molécula señal que activa estos procesos necesarios para entrar a la proliferación celular. Sin embargo, de manera inesperada determinamos que, a los 30 min de realizado este experimento, los procesos de metilación y metabolismo del RNA en general, se reprimen en presencia del eATP, lo que no sucede en la respuesta normal al daño. Como mencionamos en los antecedentes, la activación por eATP de un pulso en el aumento en la concentración de calcio, presenta un retraso para alcanzar el pico máximo, por lo que es posible que existan diferencias a nivel transcripcional entre las causadas por la liberación del ATP de células las rotas y el agregar esta molécula de manera ectópica. En el tratamiento ectópico, las cepas son expuestas al eATP durante 15 min, por lo que incluso el exceso de esta molécula puede ser causa de las diferencias transcripcionales. Por otro lado, es posible también que para la correcta activación de la respuesta sea necesaria la presencia de otras moléculas asociadas al daño (DAMPs) además del eATP. Para poder tener un experimento concluyente en un futuro, será necesario determinar cuál es la concentración normal de ATP liberado durante el daño y plantear un experimento mucho más fino al observar los cambios de las hifas en una cinética después del tratamiento, para poder tener un resultado mucho más confiable.

5.3.5. Identificación de los genes relacionados con la regeneración

Para identificar aquellos genes que tengan una mayor probabilidad de participar en el proceso de regeneración, se realizó un análisis de expresión diferencial, donde se compararon aquellas condiciones que al recibir el daño mecánico conducen a la regeneración y aquellas donde este proceso se ve afectado (WT-I+ $\Delta tmk1$ -I vs WT-IB+ $\Delta tmk3$ -I). Este universo fue definido usando como filtro el valor de FDR < 0.05 pero sin tomar en cuenta el valor de la relación del cambio (*Fold-change*), para así identificar todos los genes que podrían ser importantes en el proceso de regeneración. Para hacer un poco más estricta dicha prueba, este universo se comparó con el resultado del contraste de la cepa silvestre con daño y sin daño (FDR < 0.05 & log₂FC = 1). Esta estrategia me permitió a determinar que 520 genes inducidos y 466 reprimidos, tienen una alta posibilidad de participar en la regeneración.

Usando el universo de genes posiblemente involucrados en la regeneración, se determinó que los genes inducidos están enriquecidos en los procesos metabólicos de DNA y RNA, respuesta a diferentes tipos de estrés celular, ciclo celular y biogénesis de ribosomas, entre otros términos GO (**Fig. 13**). Sin embargo, no se encontró enriquecimiento de genes reprimidos. Una inspección manual de la anotación de los genes clasificados como involucrado en la regeneración, nos permitió obtener una clasificación bastante clara de 7 grupos de genes (ver material suplementario de Medina-Castellanos *et al.*, 2018, *Dataset S9*). Seis de estos grupos están relacionados con procesos claramente esenciales para la regeneración: proliferación celular (35 genes), replicación del DNA (43 genes), señalización (10 genes), respuesta a estrés y reparación del DNA (25 genes), regulación de la transcripción (69 genes) y traducción (36 genes). De mayor interés fue determinar que el séptimo grupo está compuesto por 22 genes relacionados con muerte celular, ya que estos genes en su mayoría contienen dominios HET y NATCH, los cuales en *N. crassa* están involucrados en los procesos de muerte celular programada durante la formación de heterocariontes incompatibles (Glass *et al.*, 2006). Sin embargo, recientemente se ha visto que, en los hongos filamentosos, las proteínas que contienen a estos dominios, además de estar

involucrados en el proceso de muerte celular, durante el apareamiento entre especies diferentes, constituyen el sistema inmune innato, para reconocer material genético extraño y proteger la integridad genómica (Zhao *et al.*, 2015; Glass & Dementhon, 2006). Así, una conclusión por demás importante de este trabajo fue que la activación del sistema inmune innato es posiblemente esencial para poder iniciar el proceso de proliferación celular. Estos resultados me permiten sugerir que la activación de sistema inmune innato es necesario para iniciar la regeneración en respuesta a daño. Estas ideas se discuten a mayor profundidad en el apartado de discusión general de esta tesis.

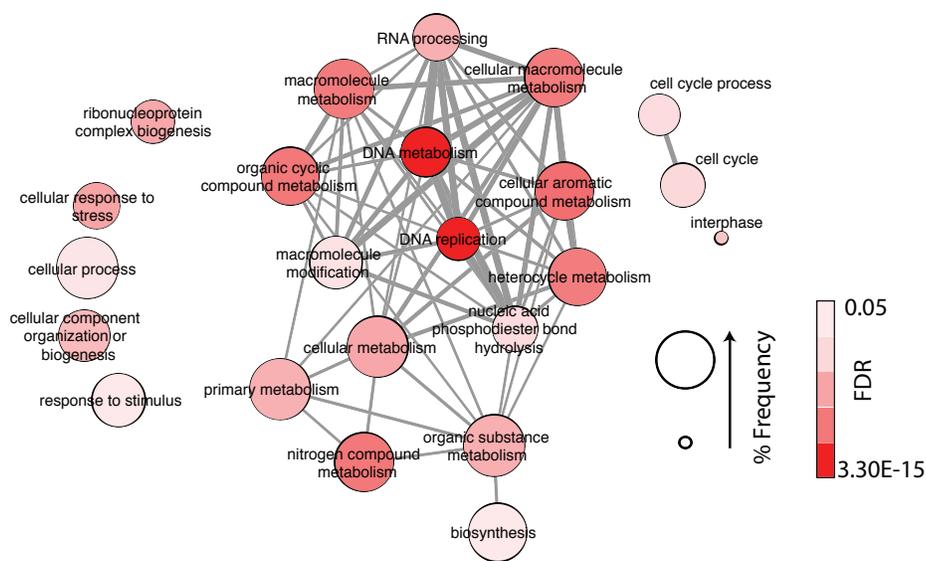


Figura 13.- Búsqueda de los genes involucrados en la regeneración. Red de categorías funcionales enriquecidas durante la regeneración. (Tomada de Medina-Castellanos *et al.*, 2018).

5.3.6. Expresión temporal de los genes involucrados en la regeneración

Se tomaron cuatro genes de los predichos como importantes durante el proceso de regeneración, 2 de ellos contenidos en el grupo clasificado como respuesta inmune innata que contienen los dominios HET (Id: 294334) y NACHT (Id: 88516). Además, se eligió al gen que codifica la proteína calmodulina (*cmk1*), que está clasificada como de señalización y que al ocurrir un incremento en la concentración de calcio se activa para iniciar la transcripción de genes “rio abajo”. Por último, se tomó al gen *rad5*, esencial para llevar a cabo la reparación de daño al DNA y para mantener la progresión del ciclo celular, por lo que tiene una doble clasificación como de proliferación celular y reparación del DNA.

Como se puede apreciar en la **Figura 14A**, se produce un fuerte incremento en el nivel de expresión de los cuatro genes a los 15 min del daño y es justamente en este momento cuando las hifas nuevas comienzan a ser visibles (**Fig. 14B**). A pesar de que la expresión claramente decrece a los 30 min, cuando las hifas comienzan el proceso de alargamiento, aún a este tiempo el cambio es significativo para tres de estos genes, respecto al control sin daño, lo cual es consistente con nuestros resultados de RNA-seq. Después de este tiempo, la expresión de estos 4 genes comienza a decrecer y a las 5 h, después del daño, cuando casi todas las hifas han regenerado, su expresión vuelve al estado basal, mostrando que estos genes no son necesarios para procesos posteriores a la regeneración como la extensión de las hifas. Esta observación sugiere que los productos de estos genes son altamente específicos para la respuesta temprana al daño en este hongo.

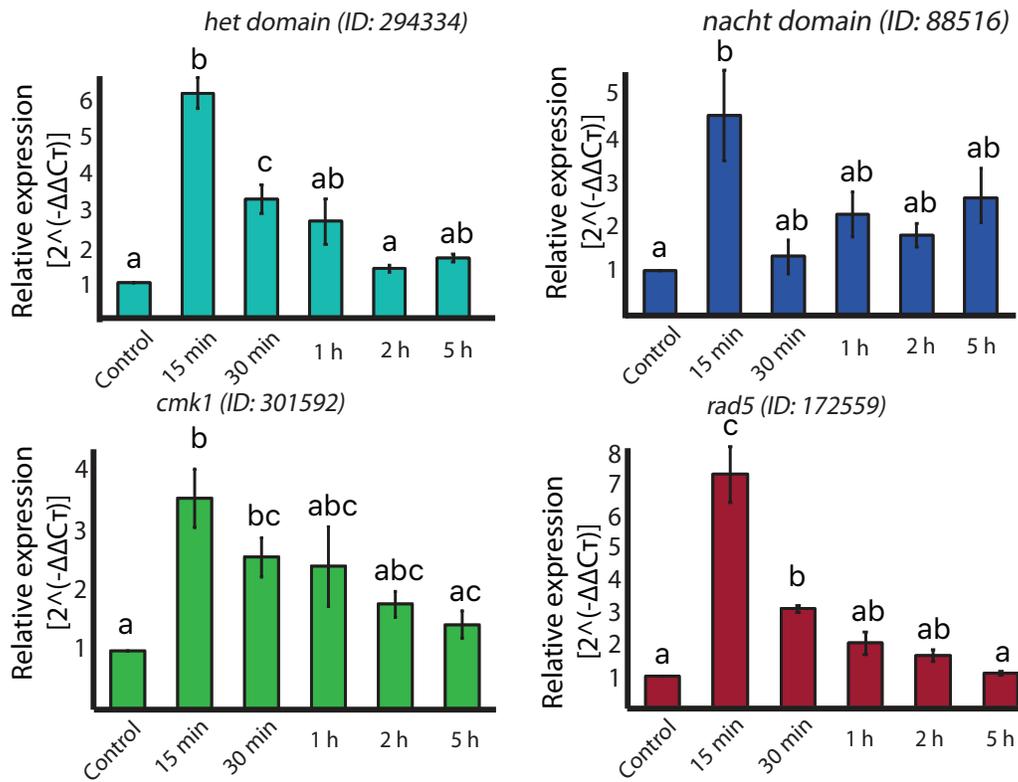


Figura 14.- Análisis de expresión de los genes por qPCR durante el proceso de regeneración. qPCR de la expresión de cuatro genes relacionados con la regeneración. Las letras destacan los tiempos donde existe expresión diferencial entre los tiempos evaluados. Una prueba de ANOVA, seguida de una prueba de Tukey fueron realizadas para determinar las diferencias significativas ($P < 0.05$). Un gen que codifica la DNA polimerasa *famB* fue usado como control interno del qPCR. (Modificada de Medina-Castellanos *et al.*, 2018).

5.4. Conclusión

Con toda la evidencia aportada en este trabajo usando un enfoque transcriptómico, se pudo concluir que el calcio y la vía de la Tmk1 actúan sobre un grupo de genes directamente involucrados en la regeneración en los primeros minutos después del daño. Interesantemente, el sistema inmune innato parece ser esencial para la regeneración. Este sistema está constituido por proteínas con dominios HET y NACHT, que hasta ahora han sido involucrados en el reconocimiento de material genético extraño durante la formación de heterocationtes. Sin embargo, en este trabajo observamos que este sistema es activado inmediatamente después del daño.

Más investigación es necesaria para determinar por completo cuál es el papel del sistema inmune innato en la regeneración de *T. atroviride* y propongo como una estrategia interesante hacer experimentos con DNA y RNA exógenos y otros compuestos que imiten la presencia de organismos extraños, para observar si existen defecto en la regeneración.

Por otro lado, es de gran relevancia observar si genes involucrados en muerte celular también se activan en otros modelos de regeneración como Axolote, hydra y nematodos, por lo que propongo una búsqueda dirigida a este tipo de genes en dichos modelos y así poder encontrar indicios de la distribución de este fenómeno en otros organismos.

6. Los ex-siRNA regulan genes metabólicos relacionados con el estado redox celular, que pueden ser necesarios para la respuesta a daño.

6.1. Introducción

La regulación postranscripcional de la expresión génica por RNAs pequeños es un mecanismo de los organismos eucariontes, que permite producir cambios drásticos en el paisaje transcripcional en respuesta a estímulos ambientales o cambios finos en la expresión de algunos genes importantes durante procesos de desarrollo. En el laboratorio de regulación genética y desarrollo de hongos se determinó mediante el uso de mutantes de la maquinaria de biogénesis de RNAs pequeños, que éstos tienen un papel importante en la formación de conidios y crecimiento de *T. atroviride*. Esto me llevó a plantearme si la maquinaria y los RNAs pequeños podrían tener algún papel durante la respuesta a daño mecánico, y de ser así qué tipo de sRNAs están involucrados en la respuesta a este estímulo y cuáles procesos son regulados por este mecanismo.

Para tratar de responder estas preguntas en este trabajo usé a las mutantes de la RNAi de *T. atroviride* generadas en el trabajo de Carreras-Villaseñor y colaboradores en el 2013. Estas mutantes fueron dañadas con un bisturí y posteriormente se realizaron análisis de conidiación y regeneración. Para determinar el estado del paisaje transcripcional, se realizaron experimentos de secuenciación de RNAs mensajes y RNAs pequeños, a un tiempo temprano (30 minutos después del daño) tiempo al cual en el trabajo con DAMPs, demostré que los genes involucrados en la regeneración y la conidiación se activan. Así en este capítulo describiré a detalle los hallazgos en este compendio de datos obtenidos de experimentos masivos. Los resultados obtenidos sugieren que los procesos metabólicos esenciales para la conidiación en respuesta a daño son regulados por sRNAs en *T. atroviride*.

6.2. Materiales y Métodos

6.2.1. Cepas y condiciones de cultivo

T. atroviride-IMI206040 se usó como cepa silvestre (WT). Todas las mutantes de la RNAi utilizados para esta investigación se han descrito anteriormente por Carreras-Villaseñor *et al.*, 2013. Todas las cepas se propagaron en agar dextrosa de papa (PDA) de Difco a 28°C, en condiciones de oscuridad. El daño mecánico fue hecho en un cuarto de luz roja.

6.2.2. Inducción de daño y cuantificación de conidios

A las 36 horas de crecimiento en PDA en la oscuridad total, se dañó el micelio usando un bisturí o un molde para galletas bajo una luz de seguridad roja (Hernández-Oñate *et al.*, 2012). Para observar y realizar la cuantificación de la conidiación, la cepa silvestre y las mutantes de la RNAi, se incubaron durante 36 horas después del daño. La cuantificación de los conidios se realizó en una cámara de Neubauer, usando un microscopio de luz blanca.

6.2.3. Ensayo de regeneración

Las cepas WT, $\Delta dcr2$, $\Delta rdr3$ y $dcr2C$ se cultivaron en PDB a la mitad con agar al 1.5% en portaobjetos de vidrio (Corning®), y se incubaron durante 24 h a 28°C. Después del tiempo de incubación, el micelio se cortó con un bisturí, se incubó durante 3 adicionales y las hifas se tiñeron con azul de lactofenol durante 10 min, se observaron en un microscopio Leica CTR6000-B (40X) y se fotografiaron. Para determinar el porcentaje de regeneración, se examinaron 150 hifas rotas por colonia y de ellas se contó cuántos formaron una nueva hifa, se realizaron tres réplicas biológicas por experimento y se realizó una prueba de ANOVA de una vía y la prueba de Tukey, para evaluar la significancia de las diferencias entre las cepas.

6.2.4. RNA-seq y análisis de la expresión diferencial

El micelio de las cepas analizadas en los experimentos transcriptómicos se colectó y congeló inmediatamente después de crecer durante 36 h en la oscuridad para la condición de control o 30 min después del daño mecánico. El RNA total se extrajo utilizando el protocolo TRIzol (Invitrogen). Las bibliotecas para RNA-seq se prepararon usando el protocolo *TruSeq RNA Sample Preparation Kit v2 (Illumina)*. Las bibliotecas del experimento $\Delta dcr2$ y su control WT se secuenciaron utilizando la tecnología HiSeq 2500 High Output en el formato 1x100. Los experimentos de $\Delta rdr3$ y $\Delta miRNA2$ (junto con el control WT para cada experimento) se secuenciaron usando el secuenciador NextSeq 500 High Output en el formato 1x75. Las lecturas obtenidas se pseudo-alinearon a los transcritos anotados (FrozenGeneCatalog_20100319) en el genoma de *T. atroviride* V2 usando el programa *kallisto* para cuantificar su abundancia (Bray et al., 2016). Los datos de RNA-seq fueron depositados en la base de datos de NCBI, GEO (*Gene Expression Omnibus*), y son accesibles a través del número de acceso GSE123330, el vínculo es: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE123330>.

Para el análisis de expresión diferencial solo se consideraron aquellos genes que tenían al menos tres lecturas por millón en al menos diez bibliotecas. Para normalizar las librerías usamos el método de TMM. Todos los análisis se llevaron a cabo utilizando el paquete *edgeR* (Robinson et al., 2010). Para determinar la expresión diferencial entre las comparaciones se utilizó el modelo lineal generalizado (GLM). Una dispersión común entre las replicas de 0.0194 fue calculada, además una dispersión *tagwise* fue también calculada. La tasa de falsos descubrimientos (FDR) se calculó y solo los genes con un FDR < 0.05 se consideraron expresados diferencialmente.

6.2.5. Análisis de enriquecimiento de categorías funcionales

Se realizó una anotación de todos los genes de *T. atroviride* como se explicó en el capítulo anterior. Para el análisis de enriquecimiento, los términos GO con menos de 4 genes o con más de 1000 no fueron considerados. Estos filtros se realizaron

con un script de R (www.r-project.org) desarrollado en nuestro grupo. Los análisis de enriquecimiento para componentes celulares (CC) y procesos biológicos (BP) se realizaron utilizando el paquete GOseq (Young et al, 2010). Los términos GO con $FDR \leq 0.05$ se consideraron significativamente enriquecidos en cada comparación. Presentamos estos datos en un mapa de calor agrupado que destaca las categorías enriquecidas con asteriscos, donde $FDR < 0.01$ se representa con ** y $FDR < 0.05$ con *.

6.2.6. Small RNA-seq y anotación genómica

La secuenciación de RNAs pequeños de las cepas WT y $\Delta dcr2$ se realizó en un MiSeq System de *Illumina*. Las bibliotecas se prepararon utilizando el protocolo *TruSeq Small RNA Library Preparation Kit* de la misma compañía y se realizaron tres réplicas biológicas. Con la ayuda de *Minion* y *Reaper*, que son parte de la herramienta *Kraken* (Davis et al., 2013), se realizó la detección y eliminación del adaptador del resultado de sRNA-seq. Usando la herramienta *ShortStack* (Johnson et al., 2016), se detectaron 11718 clusters que producen RNAs pequeños probablemente por una proteína Dicer (*Dicer-call clusters*). Para este proceso se utilizaron todos los archivos BAM obtenidos a partir del “mapeo” del genoma de *T. atroviride* v2. El “mapeo” se realizó con el programa *Bowtie1* (Langmead et al., 2009).

Para la anotación genómica de estos sRNAs, usamos el catálogo de genes del archivo GFF (20100319) y el FASTA del ensamblado de la versión 2 del sitio web del JGI que contiene los 29 contigs del genoma de *T. atroviride* (<https://genome.jgi.doe.gov/portal/Triat2/Triat2.download.ftp.html>). Se realizó una predicción de regiones UTR considerando 500 pb “río arriba” y “río abajo” de los genes. Además, Rfam 11.0 (Burge et al., 2013) se utilizó para anotar las familias de RNA no codificante en el genoma de *T. atroviride*.

6.2.7. Análisis de expresión diferencial de ex-siRNAs

Realizamos una cuantificación de lecturas asociadas a los “clusters” que están en regiones codificantes, utilizando *featureCounts* (Liao *et al.*, 2014). Solo las regiones con al menos 10 cuentas por millón se consideraron en este análisis. El análisis de expresión diferencial se realizó con el paquete *edgeR* (Robinson *et al.*, 2010). Para normalizar las librerías usamos el método de TMM. Para estimar la dispersión común se usó el método de *Cox-Reid profile-adjusted likelihood (CR)*, estimado una dispersión de 0.297 y se utilizó la prueba de razón de verosimilitud. Un FDR < 0.01 se consideró diferencial. Para visualizar la acumulación de lecturas en regiones genómicas, se utilizó el programa *IGV* (Robinson *et al.*, 2017).

6.2.8. “Stem-loop” RT-PCR y qPCR

Para validar la expresión de ex-siRNAs y miRNAs en las cepas mutantes y silvestre de *T. atroviride*, utilizamos la técnica de “stem-loop” RT-PCR. Los oligonucleótidos para RT-PCR se diseñaron para producir amplicones de 72 pb según Varkonyi-Gasic *et al.*, 2007 (las secuencias de estos oligonucleótidos se presentan en la **Tabla Suplementaria 4**). El cDNA se sintetizó siguiendo las recomendaciones del fabricante del kit de síntesis de cDNA de *RevertAid First Strand (Thermo Scientific)*. La reacción de RT se realizó en las siguientes condiciones: 30 min a 16 °C, luego 60 ciclos (30 seg a 30 °C, 30 seg a 42 °C, 1 segundo a 50 °C) y finalmente 5 min a 85 °C. La PCR se llevó a cabo según el kit *GoTaq® Green Master Mix* para los RT semi-cuantitativos y para los qPCR se siguió el protocolo *SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems)*. Para tener un control interno, identificamos un tRNA constitutivo codificado en la región contig_21:1,402,684-1,402,704 del genoma (**Tabla suplementaria 4**).

6.3. Resultados y Discusión

6.3.1. La maquinaria de RNAi participa en la respuesta al daño

Para determinar si la maquinaria de RNAs pequeños participaba en la respuesta a herida, evalué el fenotipo de las mutantes nulas de todos los genes que codifican para la maquinaria de RNAi (*dicer*, *rdrps* y *argonautas*) así como de la doble mutante de *dicer* ($\Delta dcr1\Delta dcr2$) en respuesta a daño. Así puede observar una disminución drástica en la capacidad de conidiar en respuesta al daño en los mutantes $\Delta dcr2$, $\Delta dcr1\Delta dcr2$ y $\Delta rdr3$ (**Fig. 15A**), similar a lo que ya se había observado en respuesta a luz en el trabajo de Carreras-Villaseñor et al., 2013, con una reducción del 99%, 99.5% y 98% en comparación con la cepa WT, respectivamente (**Fig. 15B**). Esto indica que los genes *dcr2* y *rdr3* juegan un papel importante en la conidiación inducida por el daño mecánico. Consistentemente, la capacidad de formar conidios de la mutante $\Delta dcr2$ se restauró completamente cuando se volvió a transformar con el gen *dcr2* (*dcr2C*, Fig. 14B). Para determinar si había un defecto temprano en las mutantes $\Delta dcr2$ y $\Delta rdr3$ que pudiera explicar su capacidad fuertemente reducida para producir conidios, evalué la capacidad para regenerar las hifas después del daño de estas mutantes. El análisis microscópico de la respuesta al daño mostró que existe una disminución en la capacidad de regeneración de la mutante $\Delta dcr2$, con respecto a la cepa WT y a la $\Delta rdr3$ (**Fig. 15C**). Esto se corroboró al realizar una cuantificación de las hifas regeneradas en estas cepas, lo que mostro una diferencia significativa en la capacidad regenerativa de la mutante $\Delta dcr2$: solo el 37% de las hifas dañadas regeneraron, en comparación con el 54% observado para la cepa silvestre (**Fig. 15D**). Aunque parecía haber un defecto en la capacidad regenerativa de la cepa $\Delta rdr3$, éste no fue significativo ($p > 0.05$), lo que claramente muestra que no existe una correlación entre la capacidad de regenerar y conidiar, por lo que es posible que se estén afectando dos procesos diferentes. Curiosamente, la mutante $\Delta dcr2$ también se ve significativamente afectada en el crecimiento vegetativo (Carreras-Villaseñor et al., 2013). Estas observaciones sugieren que Dcr2 podría

participar en el crecimiento y la regeneración produciendo sRNAs que regulan estos procesos.

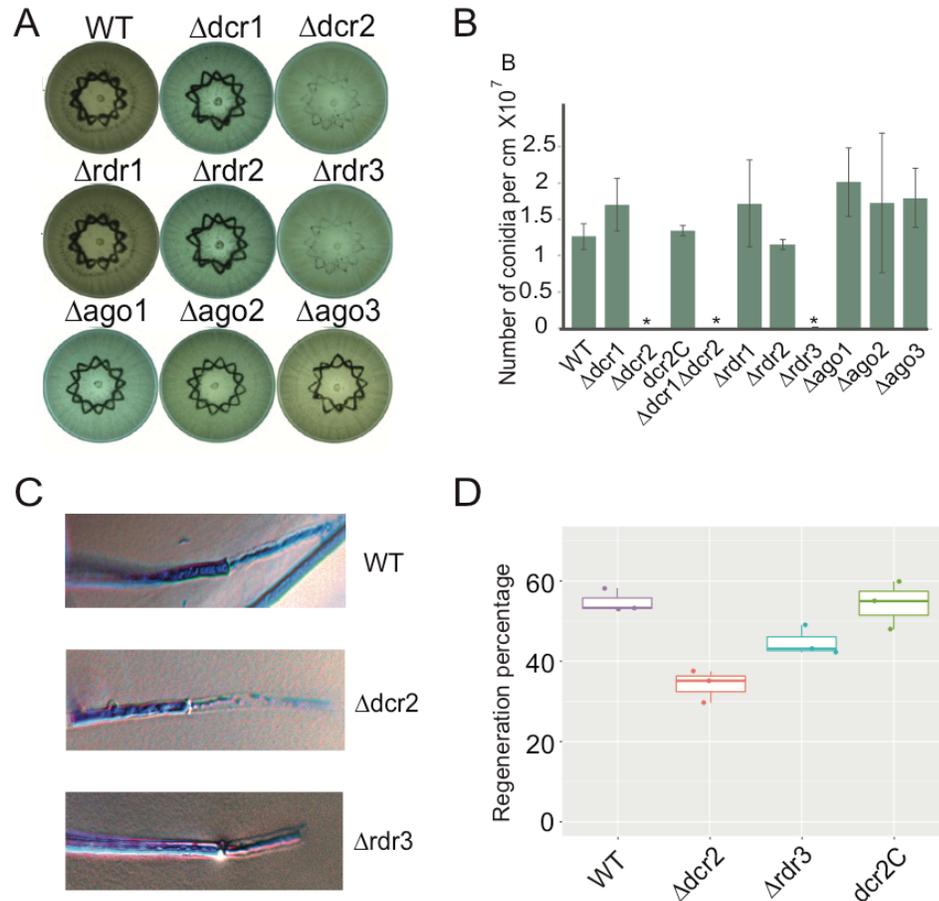


Figura 15. La respuesta a daño mecánico está afectada en las mutantes de la RNAi. A) fenotipo de conidiación en respuesta a daño en la cepa WT y las mutantes de la RNAi, en medio PDA a las 72 h de crecimiento. B) Cuantificación de conidios formadas en respuesta a la herida en las cepas evaluadas. C) Fotografía de la regeneración de las hifas en la cepa silvestre y las mutantes $\Delta dcr2$ y $\Delta rdr3$, después de 3 h de ser dañadas. D) Cuantificación de la regeneración en las cepas mutantes y silvestre. Una prueba de ANOVA, seguida de una prueba de Tukey fueron realizadas para determinar las diferencias significativas ($P < 0.05$). (Modificada de Villalobos-Escobedo *et al.*, 2019).

6.3.2. Resultados de RNA-seq sugieren que el estado redox celular es regulado por la RNAi

Como vimos en el capítulo anterior, los mayores y más importantes cambios transcripcionales se producen a tiempos tempranos, alrededor de los 15 y 30 min. Por esta razón, realicé experimentos transcriptómicos de la respuesta al daño de las cepas WT, $\Delta dcr2$ y $\Delta rdr3$ a la media hora de que recibieran daño sobre el micelio, el número de lecturas y porcentajes de “mapeos” se muestran en la **Tabla Suplementaria 2**. Como se puede apreciar en la **Figura 16A**, Identificamos 1346, 1384 y 884 genes expresados diferencialmente (comparación en cada cepa con daño contra el crecimiento vegetativo), respectivamente. La **Figura 16B** muestra que se indujeron 125 genes y 129 fueron reprimidos en respuesta al daño únicamente en la cepa WT y no en las mutantes. Estos genes únicos para la cepa silvestre pueden incluir aquellos que están involucrados en la conidiación, por lo que el análisis de estos genes nos puede ayudar a saber qué procesos son regulados por la RNAi.

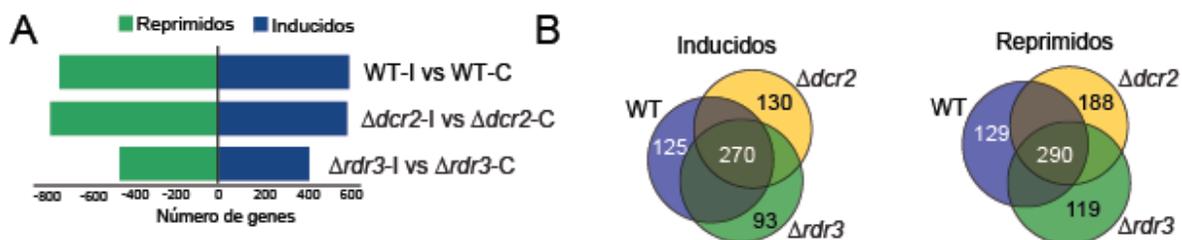


Figura 16.- Análisis transcriptómico de la respuesta al daño de las cepas WT, $\Delta dcr2$ y $\Delta rdr3$. A) Número de genes diferenciales en las comparaciones entre las condiciones con daño y sin daño, en las cepas WT, $\Delta dcr2$ y $\Delta rdr3$ (FDR <0.05, *Fold-change* > 1). B) Diagramas de Venn de genes inducidos y reprimidos en los contrastes realizados. (Tomada de Villalobos-Escobedo *et al.*, 2019).

Como se puede observar en el *heatmap* de la **Figura 17A**, los genes afectados por ambas mutaciones están involucrados en los procesos de respuesta inmune, respuesta a calcio, el crecimiento, la regulación de la transcripción/traducción y la remodelación de la cromatina. Estos genes no se inducen al nivel que lo hacen en la cepa silvestre. Interesantemente, los genes reprimidos están relacionados con el metabolismo del carbono y el nitrógeno, y en muchos casos se relacionan íntimamente con el estado redox celular. En este grupo de genes encontramos al gen COP9, el cual es un regulador negativo de la biosíntesis de oxilipinas (Tsitsigiannis and Keller, 2007), además de una catalasa y genes que codifican citocromos P450. Ya hemos descrito que estos genes se reprimen en respuesta al daño para conducir a la conidiación (Hernandez-Oñate *et al.*, 2012), y ahora observamos que en ausencia de una RNAi funcional, este perfil es afectado. Estas observaciones sugieren que la regulación por RNAs pequeños puede tener un papel importante en los cambios del estado redox celular necesarios para responder a estímulos ambientales, además de afectar el metabolismo de especies reactivas de oxígeno y la señalización vía lípidos oxidados, lo que en consecuencia impide la activación de procesos necesarios para la formación de conidios como proceso de sobrevivencia en respuesta al daño. Esto se discute a profundidad en el apartado 8.

Para determinar si estos procesos se enriquecen a nivel global, se llevó a cabo un análisis de enriquecimiento de categorías funcionales. Se hicieron contrastes donde se compararon la expresión génica de la cepa WT con respecto al que tienen las mutantes tanto en la condición control, como en respuesta a daño (WT vs ($\Delta dcr2 + \Delta rdr3$)/2). Como se observa en la **Figura 17B**, existe un enriquecimiento en procesos metabólicos reprimidos en la cepa silvestre en respuesta a daño, sobre todo aquellos relacionados con las vías de aminoácidos.

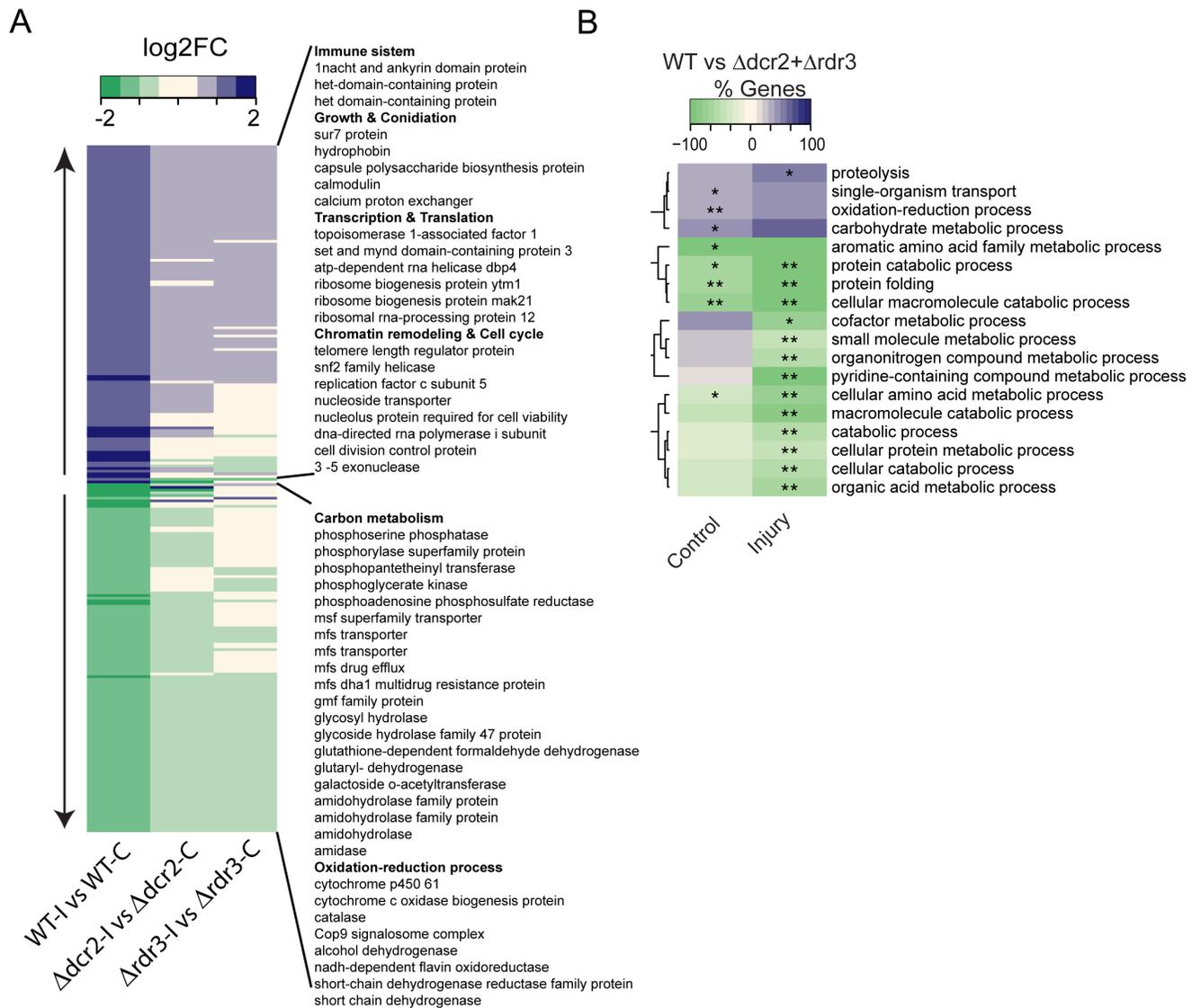


Figura 17.- Genes que participan en procesos metabólicos son regulados por la RNAi. A) Comparación del perfil de expresión de los genes diferenciales únicos para la WT en las cepas mutantes de la RNAi. B) Análisis de enriquecimiento de categorías funcionales de BP en la comparación WT vs $(\Delta dcr2 + \Delta rd3)/2$ (FDR < 0.01 **; FDR < 0.05 *). (Tomada de Villalobos-Escobedo *et al.*, 2019).

Debido a que observé que la regeneración está afectada en la mutante $\Delta dcr2$, pero no en la $\Delta rdr3$, realicé un análisis de enriquecimiento en una comparación pareada del perfil transcriptómico de estas mutantes y la cepa silvestre, tanto en la condición control, como en respuesta a daño. Así determiné que los procesos biosintéticos de aminoácidos y de compuestos organo-nitrógenados en general, se indujeron preferentemente en ambas mutantes, pero no en la cepa WT (**Fig. 18**). Este efecto aumenta claramente en respuesta a daño, por lo que concluimos que para llevar a cabo el proceso de conidiación es necesario reprimir estos procesos metabólicos a través de la maquinaria RNAi.

Por otro lado, está claro que la mutante $\Delta dcr2$ tiene un defecto en el metabolismo del fósforo y los lípidos, incluso sin daño, que afecta la comunicación celular y la capacidad del hongo para responder a los estímulos (**Fig. 18**). Este defecto es más evidente en respuesta al daño mecánico. Por lo tanto, parece que Dcr2 juega un papel importante en la regulación del metabolismo de fósforo y lípidos que no depende de Rdr3. Este defecto transcripcional puede ser la causa del defecto en la regeneración e incluso el de crecimiento.

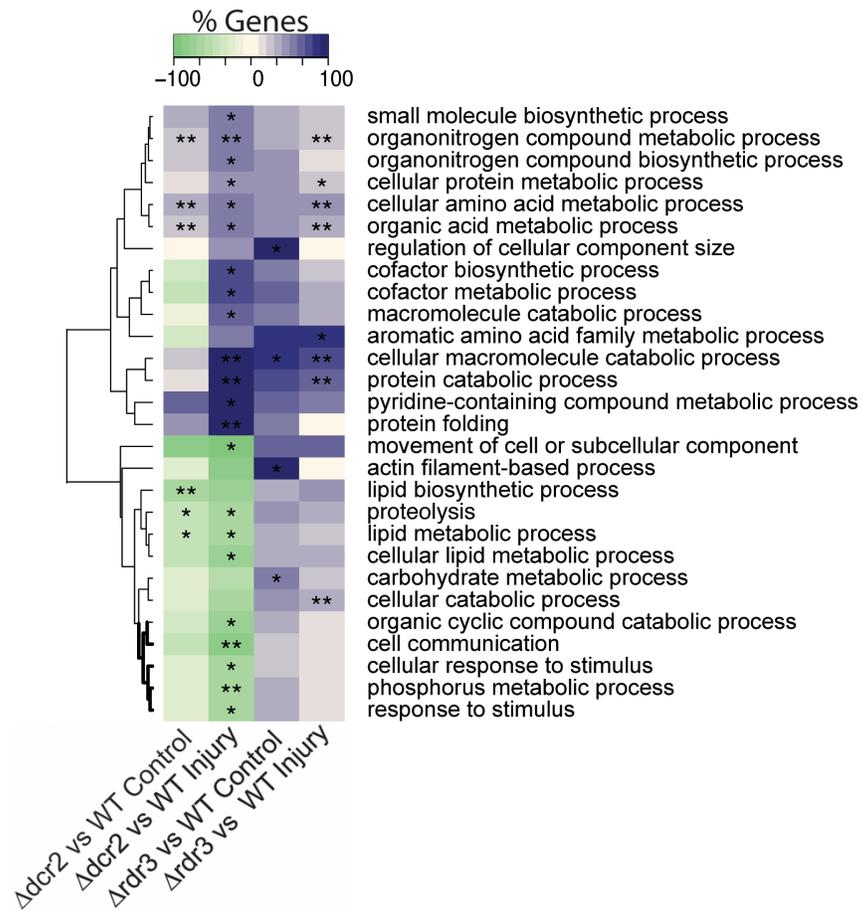


Figura 18. *dcr2* tiene un papel independiente de *rdr3*. Heatmap agrupado del análisis de enriquecimiento de BP en la comparación pareada de las mutantes respecto a la cepa silvestre en respuesta a daño y en la condición control (FDR <0.01 **; FDR <0.05 *). (Tomada de Villalobos-Escobedo *et al.*, 2019).

6.3.3. Los ex-siRNAs y los microRNAs dependen de Dcr2

Para identificar los RNAs pequeños que podrían estar regulando la expresión génica durante el crecimiento vegetativo y en respuesta a daño en *T. atroviride*, se llevó a cabo un experimento de small RNA-seq en las cepas WT y $\Delta dcr2$ (resumen de datos se muestra en la **Tabla Suplementaria 3**). La **Figura 19A** muestra la distribución de tamaños de las lecturas de los RNAs pequeños secuenciados. Es evidente que hay un pico de 21 a 22 nucleótidos en la cepa WT donde se observa la concentración máxima de lecturas, tanto en la condición control, como en respuesta al daño. Para determinar las proporciones de las clases de sRNAs producidas por las cepas WT y $\Delta dcr2$, se llevó a cabo una anotación completa del genoma (**Fig. 19B**). Este análisis demostró claramente que los microRNA son la clase de sRNA producidos principalmente por Dcr2, que son principalmente de 21 a 22 nt de longitud. Esto se ha observado ya en otros hongos filamentosos como *Fusarium graminearum*, *F. oxysporum*, *Metarhizium robertsii* y otros más (Villalobos-Escobedo *et al.*, 2016). Sin embargo, a la fecha no se ha demostrado con certeza cuál es la función de este tipo de sRNAs en estos organismos, por lo que es interesante encontrar esta población fuertemente afectada en una mutante de *dicer* que presenta un fenotipo claro en respuesta a daño. El estudio de los probables microRNAs en *T. atroviride* se profundizará en el apartado 7.

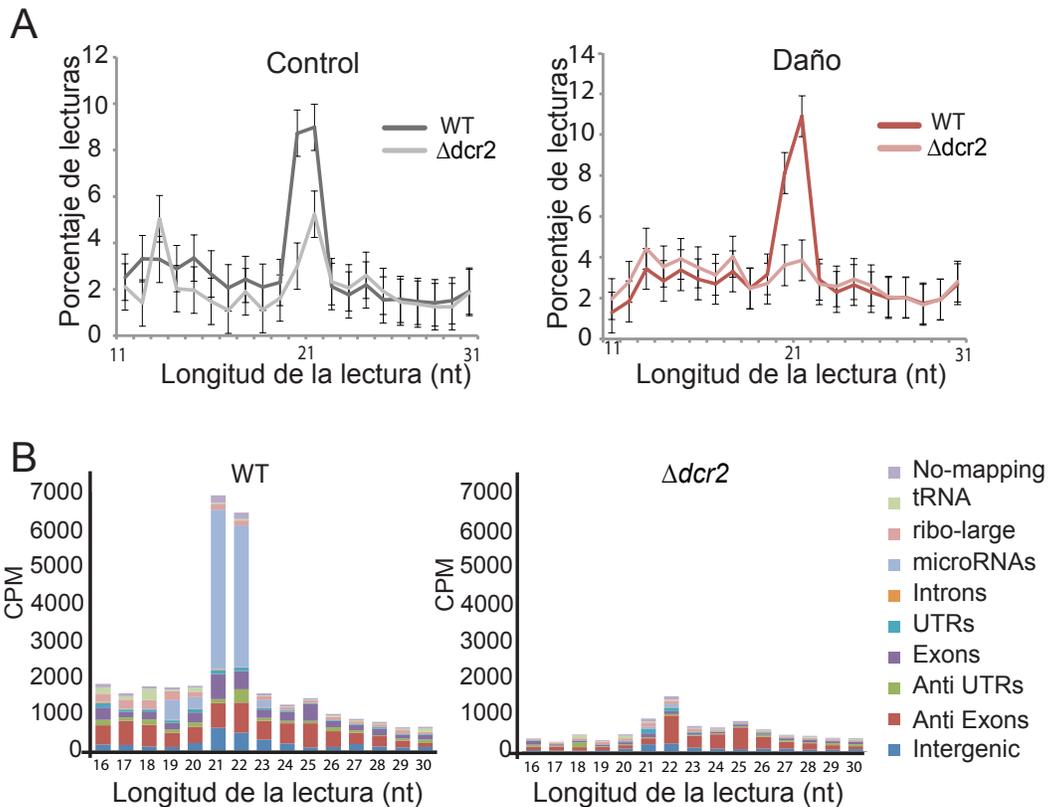


Figura 19.- Existe una clara disminución en la población de sRNAs en la mutante $\Delta dcr2$. A) Gráfica de la distribución en porcentaje de las lecturas totales de RNAs pequeños entre 11 y 31 nucleótidos de longitud, en respuesta a daño y en la condición control. B) Anotación genómica de las regiones que generan sRNAs y las lecturas asociadas en cuentas por millón. La gráfica muestra el promedio de las tres replicas biológicas. (Modificada de Villalobos-Escobedo *et al.*, 2019).

La anotación de las regiones genómicas que generan los sRNAs en *T. atroviride* me permitió obtener diez grandes grupos funcionales en los que todos los “clusters” predichos por el programa *ShortStack* se agruparon (**Fig. 20**). Identificamos 11877 regiones productoras de RNAs pequeños, de estos 791 fueron candidatos a ser generados por Dicer (cluster *DicerCall*). Teniendo en cuenta solo las regiones *DicerCall* (resaltadas en el gráfico con puntos azules), realicé un análisis de expresión diferencial global de los sRNAs entre $\Delta dcr2$ y la WT (FDR < 0.05). Este análisis mostró que los sRNAs que provienen de regiones codificantes en sentido y antisentido dependen principalmente de *dcr2* (**Fig. 20**). Además, usando el programa *miRDeep2*, se pronosticaron 118 miRNAs, sin embargo, solo se confirmaron 20 regiones como clúster *DicerCall* por *ShortStack*, los cuales también parecen depender de Dcr2, ya que, en la comparación, la mayoría de estas regiones se reprimen por la mutación del gen correspondiente. Interesantemente, la mutación *dcr2* parece incrementar la existencia de fragmentos de RNAs que provienen de ribosomas y tRNAs, que no son predichos como clústeres *DicerCall*, lo que hace pensar que se trata de degradación, esto puede implicar que en ausencia de *dcr2*, existe una degradación de estas regiones y es posible que esta proteína participe en la estabilidad del complejo de traducción, esto es algo interesante que podría ser abordado en una futura investigación (**Fig. 20**).

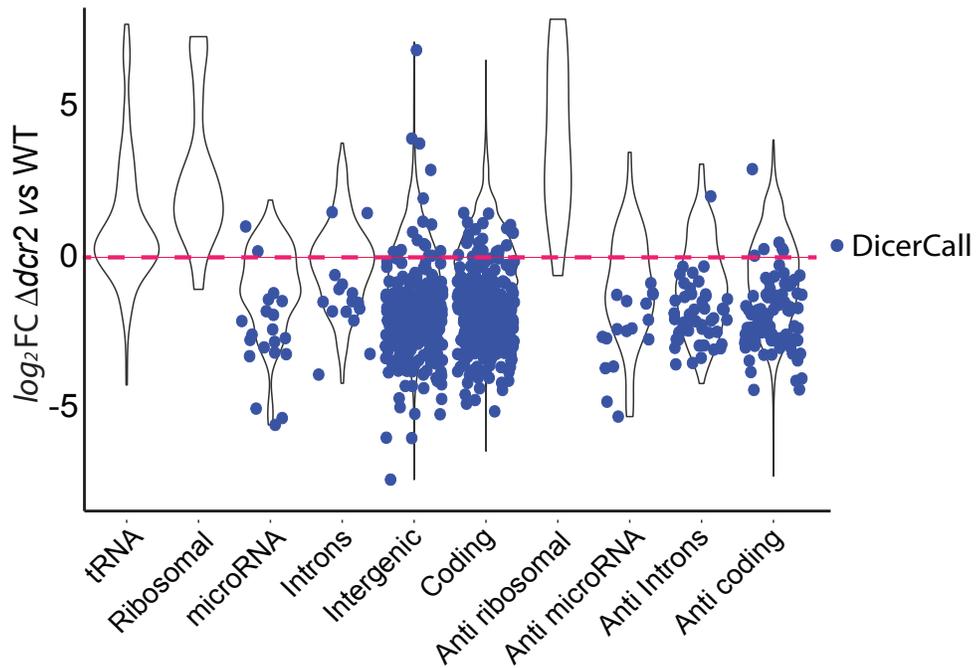


Figura 20.- Anotación genómica y análisis de expresión diferencial de los sRNAs predichos por *ShortStack*. Para este análisis se compararon las cuentas obtenidas para los sRNAs en la cepa WT, contra los obtenidos en la mutante $\Delta dcr2$ (FDR <0.05). Los puntos azules representan las regiones productoras de sRNAs con mayor posibilidad de ser procesados por Dicer. (Modificada de Villalobos-Escobedo *et al.*, 2019).

6.3.4. Los ex-siRNAs provienen de genes involucrado en el metabolismo de aminoácidos y el estado redox celular

Todos los sRNAs “mapeados” en sentido, antisentido o en ambos sentidos a regiones codificantes (ex-siRNAs) fueron considerados para un análisis de expresión diferencial. Para esto solo se usaron aquellos exones (regiones codificantes donde se concatenaron varias regiones productoras de sRNAs) con más de 5 cuentas por millón, así se obtuvieron 1255 regiones a comparar. En la **Figura 21A**, se muestra un *heatmap* donde se presentan aquellos ex-siRNAs que tuvieron un cambio significativo en la comparación WT vs $\Delta dcr2$, tanto en respuesta al daño, como en la condición control. El análisis de este resultado sugiere que los ex-siRNAs que dejan de producirse en la mutante del gen *Dcr2*, provienen de genes importante en el metabolismo de aminoácidos, así como en el control del estado redox intracelular. Genes que codifican para una NADH deshidrogenasa, una epimerasa dependiente de NAD y una kinurenina 3-monooxigenasa producen ex-siRNAs de una manera dependiente de *Dcr2*. Además, genes importantes en la síntesis de polisacáridos como una polisacárido-sintetasa *Cps1p* y la UDP-glucosa 6-deshidrogenasa, también generan este tipo de sRNAs. Esta observación correlaciona a nivel global en los transcriptomas de las mutante $\Delta dcr2$ y $\Delta rdr3$ (categorías enriquecidas), lo que sugiere que posiblemente existe regulación directa por ex-siRNAs de procesos metabólicos, incluso durante el crecimiento vegetativo. Hasta este momento lo que puedo sugerir, es que el control vía siRNAs es necesario para regular procesos metabólicos que usen NADH o NADPH, para llevar a cabo procesos anabólicos. Interesantemente, en el análisis transcriptómico de las mutantes de la RNAi, observé que el gen *Nmral1* (HSCARG) se induce en ambas mutantes, esta proteína actúa como un sensor del estado redox celular y a bajos niveles de NADPH, se une a la proteína Argininasuccinato sintasa (AS), que participa en la síntesis de óxido nítrico. Esto lleva a la inhibición de la síntesis del óxido nítrico y los genes involucrados con muerte celular programada no se activan en cultivos de células de humanos (Zhao *et al.*, 2008). Como discutí en el apartado anterior, la activación de estos genes, previamente involucrados en la muerte celular programada, se produce en respuesta al daño. Así también en el análisis

transcriptómico de las mutantes de la RNAi aparecieron afectados los genes que codifican una proteína con dominio HET y otra con el dominio NACHT, lo que correlaciona con nuestra hipótesis. Sin embargo, no todo el grupo de genes necesarios para la regeneración están alterados en estas mutantes, por lo que esto solo explica parcialmente el defecto observado en las mutantes. Aun así, estos datos sugieren fuertemente que los cambios metabólicos controlados por los ex-siRNAs, permiten la correcta activación de genes íntimamente ligados a la respuesta a daño mecánico.

En la **Figura 21B** se ilustra cómo los transcritos de estos genes metabólicos se encuentran bajo una regulación negativa que se pierde tanto en las mutantes $\Delta dcr2$ como $\Delta rdr3$. Además, se observa la acumulación de ex-siRNAs en estas regiones en la cepa silvestre, lo que no sucede en la mutante del gen *Dcr2*. Para verificar que tanto *dcr2* como *rdr3* están implicados en la biogénesis de los ex-siRNAs, se realizó un *stem-loop* RT-PCR del ex-siRNA más abundante identificado, derivado del transcrito 297535 (**Fig. 21C**). Como se esperaba, este ex-siRNA está presente tanto en el WT como en el fondo de $\Delta ago1$ y desaparece por completo en las mutantes $\Delta dcr2$ y $\Delta rdr3$.

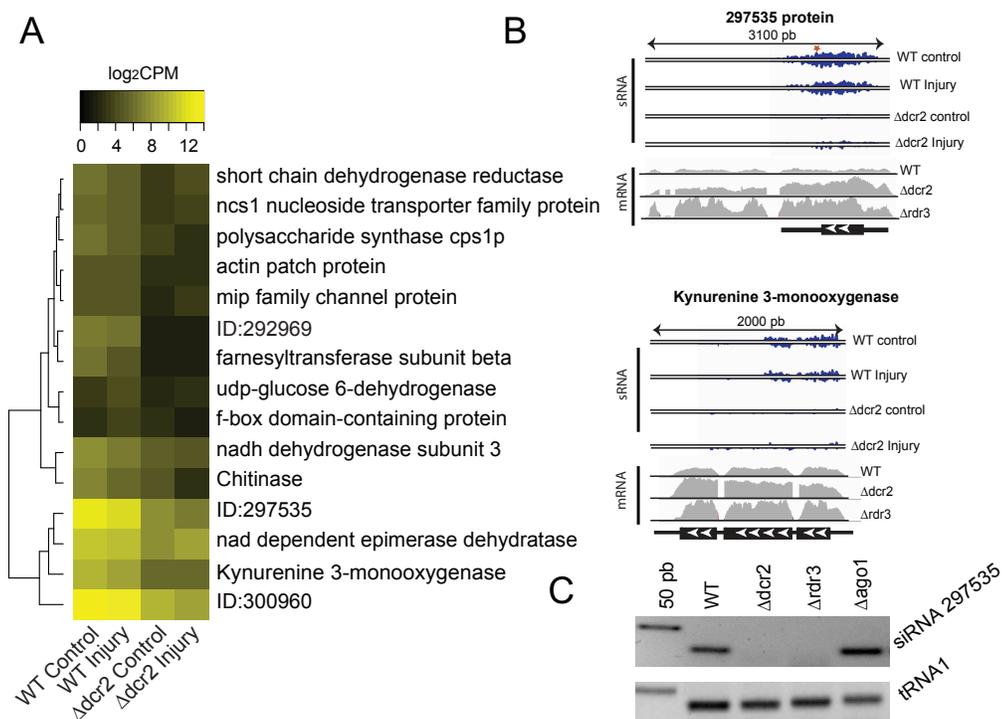


Figura 21. Los ex-siRNAs diferenciales entre la cepa WT y la mutante $\Delta dcr2$, provienen preferentemente de genes metabólicos. A) *Heatmap* de los ex-siRNAs con mayor cambio en la comparación WT vs $\Delta dcr2$. B) Visualización genómica de la acumulación de los ex-siRNA en dos regiones codificantes. C) *stem-loop* RT-PCR del ex-siRNA proveniente del transcrito ID:297535 en las cepas WT, $\Delta dcr2$, $\Delta rdr3$ y $\Delta ago1$, los fragmentos observados son de 72 bp. Un tRNA fue usado como control de carga. (Tomada de Villalobos-Escobedo *et al.*, 2019).

6.3.5. La expresión del gen *rdr3* y dos genes regulados por la RNAi es inducida durante el desarrollo asexual después del daño mecánico

Para determinar si los genes de donde provienen los ex-siRNAs son regulados durante el proceso de conidiación, se realizó una cinética hasta las 36 horas después del daño. En la **Figura 22A**, se muestra el curso temporal de la respuesta de una colonia de la cepa silvestre a la herida, donde se observa que no es sino hasta las 24 h donde ya se aprecia micelio aéreo y la conidiación en la zona del daño, y hasta las 36 h donde ya se aprecia que las conidias están completamente

pigmentadas y maduras. Al evaluar la expresión de los genes con mayor número de ex-siRNAs asociados (**Fig. 22B**), es claro que la Quinurenina 3-monoxigenasa al entrar al proceso de formación de conidios es significativamente reprimida, lo que correlaciona directamente con el perfil observado en el gen *rdr3*, el cual incrementa su expresión justamente en a las 24 y 36 h ($P < 0.05$). Esto sugiere que la mayor actividad de represión sobre los genes controlados se produce durante la conidiación. Sin embargo, no todos los genes que tienen asociados este tipo de ex-siRNAs cumplen con este patrón, ya que el gen 297535 el cual tiene un dominio F-box, no cambia significativamente su expresión en ningún punto del curso temporal (**Fig. 22B**). El nivel de expresión de este gen es muy bajo en todos los puntos, por lo que suponemos que siempre está bajo el control de la maquinaria de RNAi en el fondo silvestre.

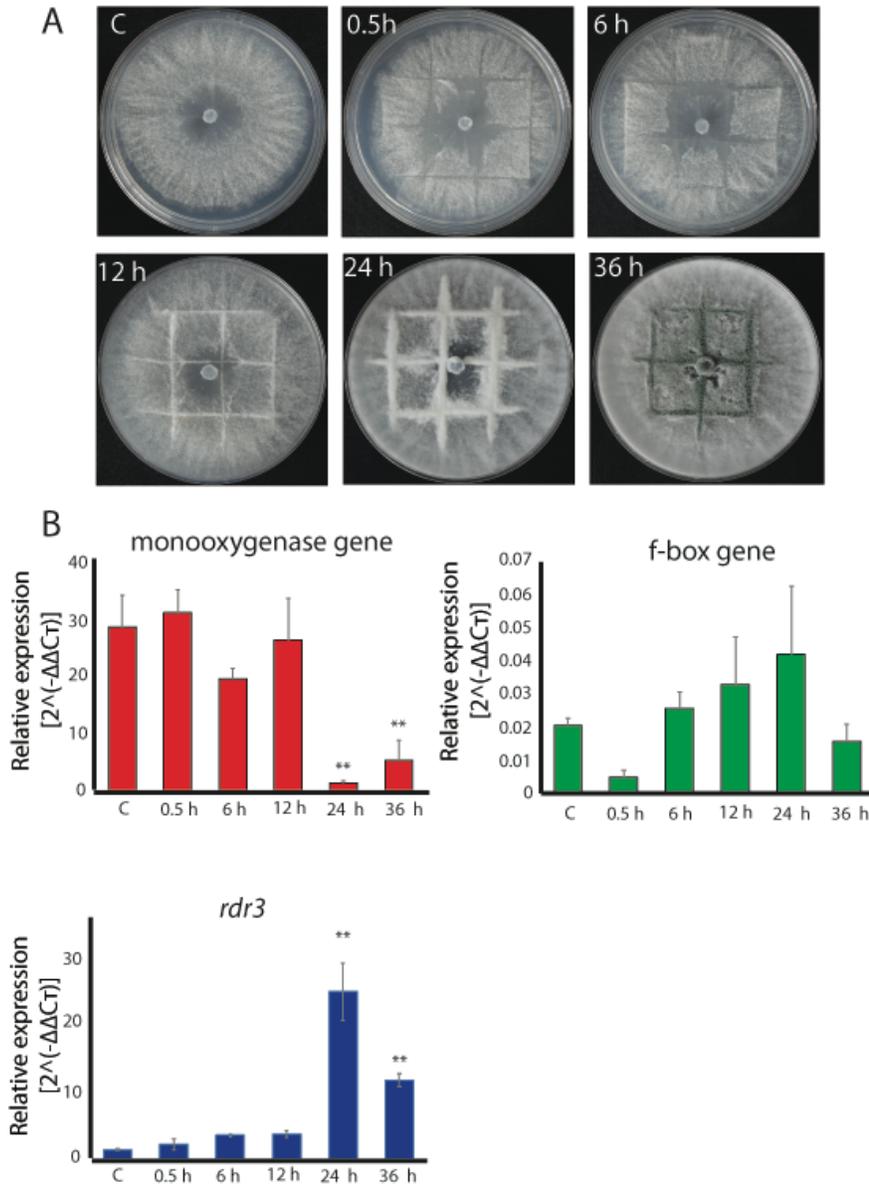


Figura 22.- Análisis de expresión de genes durante la conidiación. A) Seguimiento del proceso de conidiación después del daño mecánico. Las fotos del micelio van desde el tiempo 0 hasta las 36 horas después del daño. B) qPCR de la expresión de 2 genes silenciados vía la maquinaria de RNAi y el gen *rdr3*. Los asteriscos destacan donde existe expresión diferencial entre los tiempos evaluados. Una prueba de ANOVA, seguida de una prueba de Tukey fueron realizadas para determinar las diferencias significativas ($P < 0.05$). Un gen que codifica para la DNA polimerasa famB fue usado como control interno del qPCR.

6.4. Conclusión

Es evidente que existe un defecto drástico en la respuesta al daño en las mutantes de los genes *dcr2* y *rdr3*. En esta tesis determiné que claramente estos dos genes participan en la biogénesis de ex-siRNAs y regulan procesos íntimamente ligados con rutas de metabolismo de aminoácidos y la regulación del estado redox celular. Se puede suponer entonces que, para poder entrar al proceso de reproducción asexual disparado por el estrés, es necesario una detención metabólica de las vías de metabolismo de aminoácidos, podemos suponer que precursores son redirigidos para la biogénesis de material genético y además promover un incremento del poder reductor, que puede llevar a una activación de genes esenciales para la conidiación. Hasta ahora sabemos que las NADH oxigenasas (Nox1 y NoxR), participan en la producción de especies reactivas de oxígeno, usando NADPH para este proceso. La acumulación de ROS es esencial para iniciar la conidiación en respuesta a daño en *T. atroviride* (Hernandez-Oñate *et al.*, 2012), esto sugiere que la acumulación de poder reductor puede ser esencial para este proceso.

Por otro lado, el NADPH proporciona parte del poder reductor necesario para las reacciones de reducción en rutas biosintéticas. Por lo que propongo que los ex-siRNAs participan en la regulación de los procesos metabólicos que usan este poder reductor, redirigiendo su uso a la acumulación de ROS o incluso a biosintetizar componentes importantes como pigmentos o el material genético de los conidios. Por ejemplo, nosotros pudimos observar ex-siRNAs provenientes de genes metabólicos claves, como la Quinurenina 3-monoxigenasa, la cual al convertir L-quinurenina a 3-hidroxi-L-quinurenina, oxida NADPH a NADP⁺, y fue evidente que es el momento de la diferenciación celular a las 24 h cuando la represión sobre este gen se produce. Interesantemente, es en este momento cuando el gen *rdr3* tiene su mayor actividad, lo que sugiere que esta vía de silenciamiento puede regular la expresión de genes durante la conidiación. Sin embargo, nosotros ya podemos observar la regulación basal sobre estos procesos incluso sin estímulo, implicando que una regulación sobre estos procesos redox, es necesaria para mantener la homeostasis celular.

7. Los microRNA regulan la regeneración y la conidiación en respuesta a daño mecánico en *T. atroviride*

7.1. Introducción

En los animales y las plantas los microRNAs son esenciales para el desarrollo y para sobrevivir y adaptarse a estímulos ambientales. Sin embargo, por mucho tiempo en los hongos filamentosos no ha sido evidente el papel de este tipo de RNAs pequeños. En el 2010, Lee y colaboradores identificaron por primera vez RNAs pequeños provenientes de estructuras tallo-bucle similares a los microRNAs en *Neurospora crassa*. Sin embargo, al tener diferencias en las vías de biogénesis, ya que aunque similares, no son las mismas proteínas las que dan lugar a estas moléculas y también tienen diferencias a nivel estructural, ya que la mayoría de ellos proviene de precursores bastante cortos, por lo que estos sRNAs fueron nombrados *miRNA-like small RNAs* (milRNAs). Además, se demostró que los milRNAs de *Neurospora*, eran capaces de reprimir la expresión génica a nivel postranscripcional (Lee *et al.*, 2010). Esto inmediatamente hizo preguntarse qué función podrían jugar a nivel fisiológico. Interesantemente, a la fecha no ha sido establecido el papel de estas moléculas, en los hongos.

Recientemente se ha descubierto que este tipo de sRNAs son comunes en otros hongos filamentosos como *Fusarium graminearum* y *Metarhizium robertsii*. En estos organismos, los milRNA se han correlacionado con la regulación de la reproducción sexual y asexual (Son *et al.*, 2017; Meng *et al.*, 2017). Sin embargo, hasta el día de hoy, no existe una demostración experimental de la función fisiológica de ninguna de estas moléculas y, por lo tanto, no está claro si los milRNA, son tan importantes en los hongos como en otros eucariotes (Torres-Martínez & Ruiz-Vázquez, 2017; Villalobos-Escobedo *et al.*, 2016; Yang *et al.*, 2013). En este trabajo evalué el comportamiento de los tres milRNAs más abundantes en *T. atroviride* y determinamos que ellos parecen jugar un papel importante durante el proceso de desarrollo de este hongo. Además, se realizó un experimento de mutación por remplazo génico que permitió determinar que uno de estos milRNAs es esencial para la regeneración y el crecimiento de *T. atroviride*.

7.2. Materiales y Métodos

7.2.2. Cinéticas de crecimiento

El crecimiento radial de las cepas se evaluó en cajas Petri de 14 cm de diámetro y el crecimiento se midió a las 12, 24, 36, 48 y 60 horas después de la inoculación, a 28 °C en la oscuridad.

7.2.3. Predicción de microRNAs

Para la predicción inicial de microRNAs, se utilizó el software *miRDeep2* (Friedländer *et al.*, 2012), utilizando para esto un concatenado de todos los archivos *fastq* obtenidos de la secuenciación de las cepas WT y $\Delta dcr2$, esta última afectada en el gen *dicer2* (descrito en el capítulo anterior), con todos los parámetros predeterminados. Para poder determinar la expresión diferencial entre los microRNAs predichos, se cuantificó el número de lecturas asociadas a las regiones genómicas anotadas como productoras de microRNAs, usando el paquete *GenomicRanges* (Lawrence *et al.*, 2013). Las lecturas que no se asignaron a ninguna región con anotación se consideraron como de regiones intergénicas. Para analizar la clasificación funcional general de cada biblioteca, también anotamos lecturas de cada longitud posible (11-31 nucleótidos) y presentamos esto en una gráfica de barras (longitud de lectura, anotación y cantidad de lecturas asociadas). Utilizando la predicción de *miRDeep2* junto con la de *ShortStack*, identificamos los microRNAs con la mayor posibilidad de tener un papel regulador y que dependen de *dcr2* para su biogénesis.

7.2.3. Predicción de genes blanco de los miRNAs predichos

Los genes blanco de los 3 microRNAs diferenciales entre $\Delta dcr2$ y WT fueron predichos. Esta predicción se realizó utilizando el paquete *TargetFinder* (Fahlgren *et al.*, 2010), que alinea la secuencia de microRNAs contra todos los transcritos del

genoma (11816 genes predichos para *T. atroviride*). Este programa calcula una calificación del sitio usando una matriz de penalización ponderada por posición y se usa normalmente en la búsqueda de genes blanco en las plantas. Aunque el valor predeterminado de punto de corte del puntaje es 4, en este análisis decidimos usar un valor laxo de 8. Las secuencias evaluadas fueron, milRNA1: UGAAACCCCGGACAAACUUGCG, milRNA2: UUUUGCGAUGCCCAAUAUCUGU y milRNA3: UGUGAAGCUAAUCACUCGGUAUC. Que resultaron ser los milRNAs más abundante en la cepa silvestre y diferenciales en la comparación con la mutante de *dcr2*.

7.2.4. Generación de la mutante nula del milRNA2

La región contig_17:1,121,016-1,121,375 de una longitud de 349 nt fue reemplazada por un casete de resistencia a higromicina mediante la técnica de double-joint PCR (Yu *et al.*, 2004). Los oligonucleótidos usados para esta transformación se presentan en la **Tabla Suplementaria 4**. Los constructos de reemplazo se usaron directamente para la transformación de protoplastos por PEG de la cepa WT y las cepas transformantes se sometieron a cinco rondas de pases monospóricos en medio PDA con higromicina. A partir del evento de transformación, se obtuvieron 10 posibles transformantes y se realizó una PCR usando los anidados para verificar la mutación. Además, se realizó un análisis por Southern blot siguiendo técnicas estándar (Joseph & David, 2001). La enzima de restricción *NcoI* se usó para obtener el patrón de formación de bandas apropiado y el fragmento “río arriba” de la región del pre-milRNA2 se marcó con ³²P y se usó como sonda para la hibridación (figura S3).

7.3. Resultados y Discusión

7.3.1. Tres principales milRNAs producidos en *T. atroviride*

En el análisis global de la expresión diferencial de sRNAs entre las cepas WT y $\Delta dcr2$ obtenida de la secuenciación descrita en el apartado 5 fue evidente que la población de milRNAs se ve afectada principalmente por la ausencia de Dcr2. Un

análisis de expresión entre los datos de la cepa WT y la mutante $\Delta dcr2$ (**Fig. 23A**; FDR <0.05), mostró que hay tres principales milRNAs altamente expresados en la cepa silvestre, pero que están ausentes en la mutante $\Delta dcr2$. Además, como en el caso de los miRNAs de los animales, estos milRNAs tienen preferentemente un uracilo en el extremo 5' (**Fig. 23B**; Ha & Kim, 2014). Por otro lado, en la **Figura 23C**, se presenta una visualización de las regiones genómicas donde se produce la acumulación de las lecturas de los RNAs pequeños, usando el programa *IGV*, del milRNA1 y el milRNA2 (orden por abundancia), los cuales exhiben un perfil de acumulación de lecturas similar al de microRNAs de las plantas y los animales, donde existen dos picos separados por un valle (Kozomara & Griffiths-Jones, 2013). El milRNA1 maduro está codificado en la cadena negativa, mientras que el milRNA2 maduro está en la cadena positiva y hay un aumento en la expresión de pri-milRNAs en la mutante $\Delta dcr2$, lo que sugiere que estos pri-milRNAs son procesados por esta proteína. La evidencia antes expuesta de perfil transcripcional y similitudes con los microRNAs de los animales y las plantas, indica que estos milRNAs pueden ser funcionales para regular la expresión de genes.

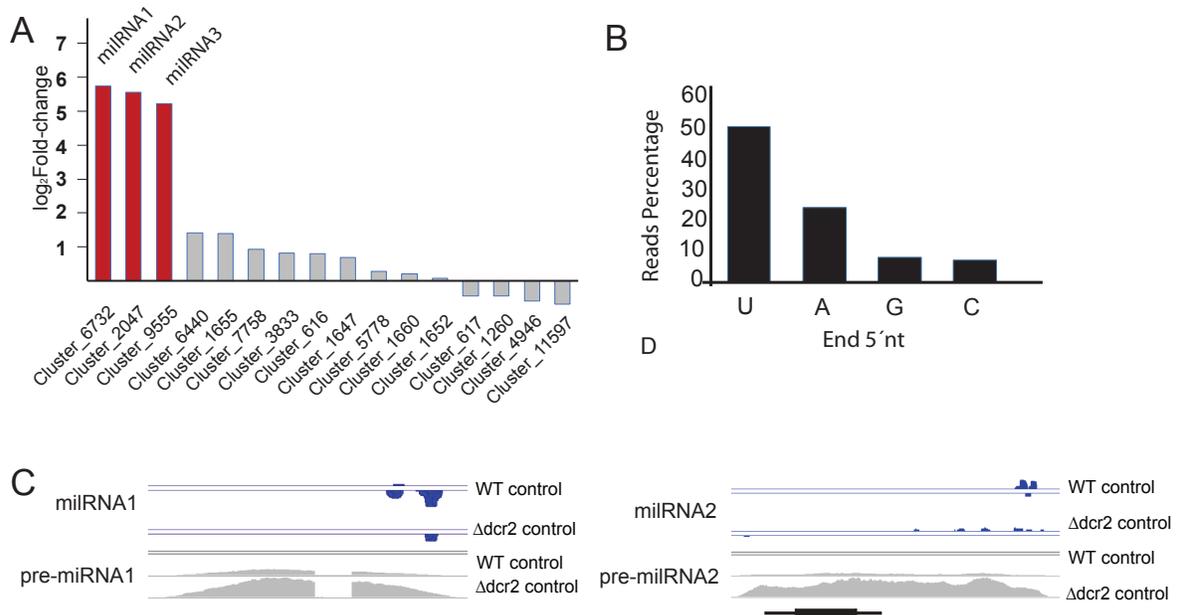


Figura 23.- Existen tres miRNA altamente expresados en *T. atroviride*. A) Grafica de barras que muestra la expresión diferencial de las regiones que dan lugar a miRNAs, esto en la comparación WT vs $\Delta dcr2$, datos concatenados, las barras rojas muestran los miRNAs inducidos significativamente (FDR <0.05). B) Preferencia de base de inicio en los miRNAs predichos. El porcentaje se calculó usando el número total de miRNAs predichos como el cien porciento. C) Visualización genómica de la distribución de miRNAs 1 y 2 (en azul los miRNAs y en gris los pri-miRNAs). (Modificada de Villalobos-Escobedo *et al.*, 2019).

7.3.2. Los microRNAs incrementan su expresión durante el desarrollo asexual disparado por el daño

Para establecer el papel de los tres miRNA principales producidos por Dcr2, se determinó su patrón de expresión a lo largo del tiempo. Esto se realizó durante 6 etapas del proceso de desarrollo asexual que conducen a la formación de conidios maduros al término de 36 h después del daño mecánico. Para esto se realizó la técnica de stem-loop RT-qPCR como se describió anteriormente (apartado 5). Aunque los tres miRNAs se expresan durante el crecimiento vegetativo, su expresión aumenta fuertemente cuando se producen conidióforos (24 a 36 h después del daño). El aumento drástico durante la diferenciación y la maduración de los conidios sugiere que estos sRNAs desempeñan un papel importante en la conidiación disparada por el daño mecánico (**Fig. 24**). Hasta este punto no sabemos si este efecto en la expresión de los miRNAs es causa o efecto, pero es interesante que sea en este punto el mayor punto de concentración para los tres miRNAs altamente expresados en la cepa WT.

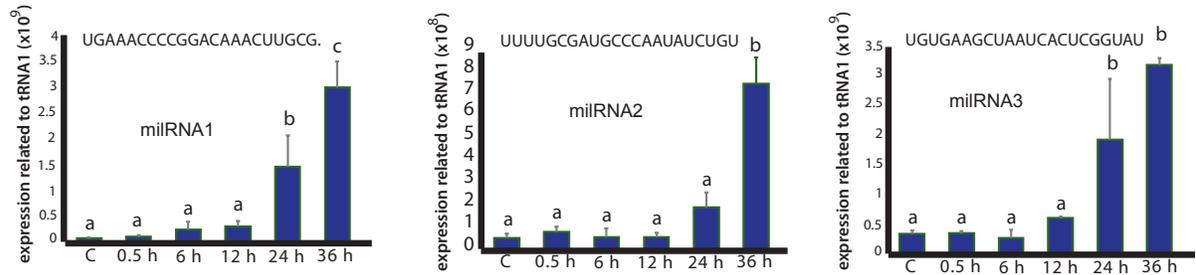


Figura 24.- Los miRNAs aumentan su expresión durante la proliferación y diferenciación celular desencadenadas por el daño mecánico. En las gráficas de barra se muestra un curso temporal de la expresión de miRNA1, miRNA2 y miRNA3 durante el desarrollo asexual, realizada mediante la técnica de *stem-loop* qPCR usando a un tRNA como control de carga. En la parte superior de la graficas se muestran las respectivas secuencias de cada miRNA evaluado. (Modificada de Villalobos-Escobedo *et al.*, 2019).

7.3.3. El miRNA2 participa en la regulación del ciclo celular

Dada la abundancia y la posible importancia de estos miRNAs en el desarrollo, realicé una predicción de genes blanco para cada uno de estos miRNAs usando el programa *TargetFinder* (Fahlgren *et al.*, 2010). Los blancos predichos consistieron en 29 genes para miRNA1, 173 para miRNA2 y 44 para miRNA3. Para determinar si los blancos de los miRNAs se inducen en ausencia de *dcr2*, un análisis de expresión diferencial entre la mutante $\Delta dcr2$ y la cepa WT a los 30 minutos de recibir daño fue realizado. Este análisis mostró que 1053 genes son inducidos y 1292 reprimidos (**Fig. 25**; FDR <0.05, sin usar un filtro de *fold-change*). Solo dos de los genes blanco predichos para miRNA1 se indujeron significativamente en esta comparación, mientras que 15 genes blanco de miRNA2 fueron inducidos y 24 reprimidos. Fue interesante que este cambio es marcado solo en respuesta al daño, ya que al hacer este análisis en la condición control, este cambio no fue evidente. Al analizar los blancos del miRNA3, 13 genes se expresaron diferencialmente, pero únicamente 2 parecen inducirse, incluso sin daño (Material suplementario). Así

podemos ver que aquellos genes posiblemente regulados por el miRNA2, incluso a este tiempo después del daño, parecen estar regulados negativamente como se puede observar en la **Figura 25**, donde se muestra la comparación de la expresión de los genes blanco en la mutante $\Delta dcr2$ y la cepa WT. En esta grafica se destacan únicamente los blancos del miRNA1 en azul y los blancos del miRNA2 en amarillo, mientras que los genes diferenciales en esta comparación están representados en puntos color verde. Varios de los genes blanco del miRNA2 codifican proteínas relacionadas con la fosforilación, tal como una histidina-serina fosfotransferasa y dos cinasas, como se puede observar en la **Tabla 2**. Uno de estos genes es homólogo del gen *chk2*, el cual ha sido descrito como un gen regulador negativo del ciclo celular, que fosforila al CDC25 para inhibirlo. Esta observación puede sugerir que la presencia del miRNA2 incentiva la progresión del ciclo celular (Zannini *et al.*, 2014; Matsuoka *et al.*, 1998).

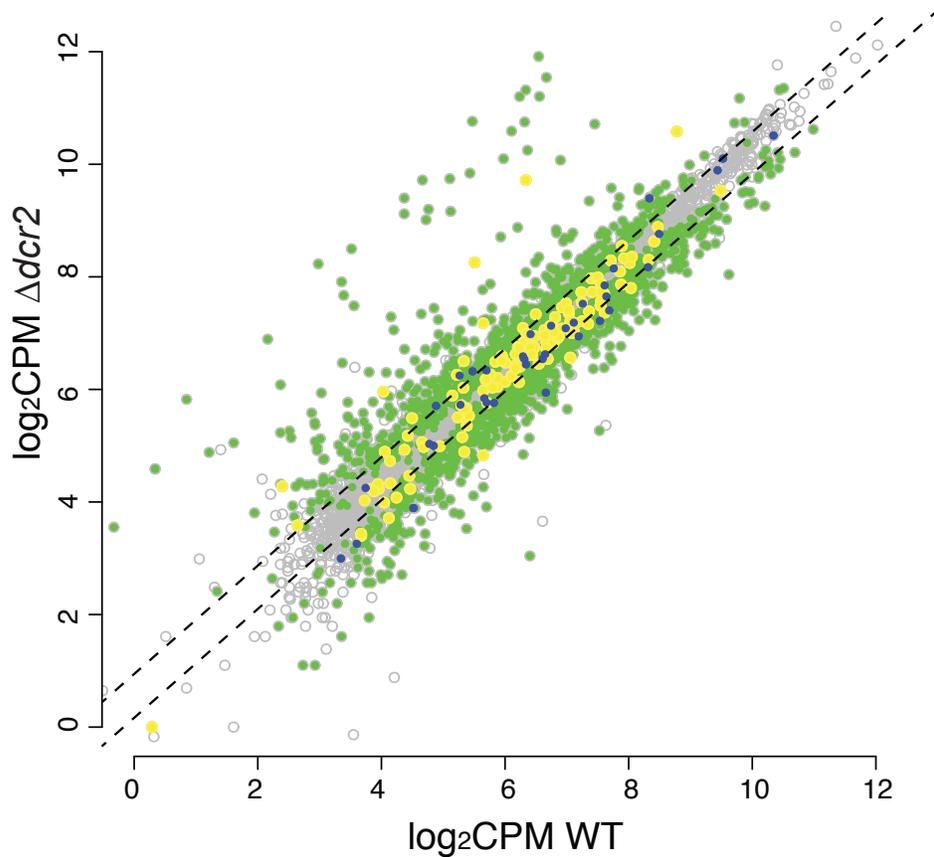


Figura 25.- Expresión diferencial de los genes blanco para miRNA1 y miRNA2. En la gráfica se muestra en la comparación transcriptómica entre la cepa mutante $\Delta dcr2$ y la WT en respuesta a daño mecánico. Los blancos para el miRNA1 están representados con puntos azules, mientras que los puntos amarillos representan a los blancos del miRNA2 y los verdes a aquellos genes diferenciales en esta comparación (FDR < 0.05). (Modificada de Villalobos-Escobedo *et al.*, 2019).

Tabla 2.- Valor del *fold-change* en log₂ positivo de los genes blanco para el miRNA2 inducidos en la comparación mutante $\Delta dcr2$ y cepa silvestre. En amarillo se destacan los valores significativamente diferentes en cada comparación $\Delta dcr2$ -control vs WT-control y $\Delta dcr2$ -daño vs WT-daño (FDR < 0.05). En la columna Nombre del gen, se muestra la anotación de los genes.

ID	Dcr2-C vs WT-C	Dcr2-I vs WT-I	Nombre del gen
id_297304	3.44	3.93	Transcription factor/CCAAT displacement protein CDP1
id_131874	3.23	0.97	C2H2-type Zn-finger protein
id_294361	2.88	3.02	rna-directed rna polymerase
id_302589	2.68	1.56	aaa family
id_297472	1.87	1.58	dephospho- kinase
id_224038	1.62	1.77	peroxisomal-coenzyme a synthetase
id_33117	1.38	1.78	hypothetical protein
id_298895	1.20	0.72	hypothetical protein
id_318101	0.94	1.01	ferric-chelate reductase
id_85646	0.56	0.61	kinase domain containing protein
id_252945	0.39	0.51	serine threonine-protein kinase chk2
id_291715	0.31	0.44	Nucleolar GTPase/ATPase p130
id_302435	0.28	0.44	Splicing coactivator SRm160/300, subunit SRm300
id_157172	0.10	0.80	heat shock protein 78
id_131680	-0.04	0.34	proteasome component c5

7.3.4. El miRNA2 regula el crecimiento y el desarrollo asexual en respuesta a daño.

Para determinar la función de miRNA2, la región genómica que da lugar al precursor de este miRNA se reemplazó por un casete de resistencia a higromicina. Se seleccionaron dos mutantes independientes y se confirmaron por PCR y *Southern blot* (**Fig. S2**). Para demostrar que nuestras dos mutantes perdieron la expresión de miRNA2, se realizó una stem-loop RT-PCR para los miRNA1, miRNA2 y miRNA3, en las cepas WT, $\Delta dcr2$, $\Delta dcr1\Delta dcr2$, $\Delta rdr3$, las dos mutantes del miRNA2 y dcr2C (**Fig. 26A**). Como se esperaba, no se detectó expresión para ninguno de los miRNAs en las cepas $\Delta dcr2$ y $\Delta dcr1\Delta dcr2$, y su expresión se restableció en la cepa dcr2C. No se alteró la expresión de ninguno de los tres miRNAs en la mutante $\Delta rdr3$, lo que indica que, como se esperaba, RdrP3 no

participa en la biogénesis de estos sRNAs y por lo tanto es específica para producir ex-siRNAs, como se demostró en el capítulo anterior. Cuando se evaluó la expresión de estos miRNAs en las mutantes de miRNA2, únicamente se perdió la expresión de miRNA2 y no de los otros dos. Esto implica que miRNA2 no está implicado en la regulación de la expresión de miRNA1, ni de miRNA3.

La caracterización de las cepas $\Delta dcr2$, $dcr2C$, $\Delta rdr3$ y las dos mutantes de miRNA2, indicó que hay un defecto en el crecimiento vegetativo de las mutantes de miRNA2 y la mutante $\Delta dcr2$ (**Fig. 26B** y **Fig. 26C**). Al hacer una cinética de crecimiento se observó una disminución significativa entre la tasa de crecimiento de la cepa WT y las mutantes $\Delta dcr2$ y $\Delta miRNA2$, alcanzando una diferencia del 40% a las 60 horas ($p < 0.05$). Curiosamente, la tasa de crecimiento de las mutantes $\Delta dcr2$ y $\Delta miRNA2$ es indistinguible (**Fig. 26C**). Por el contrario, no se observó diferencia significativa entre la WT y la mutante $\Delta rdr3$.

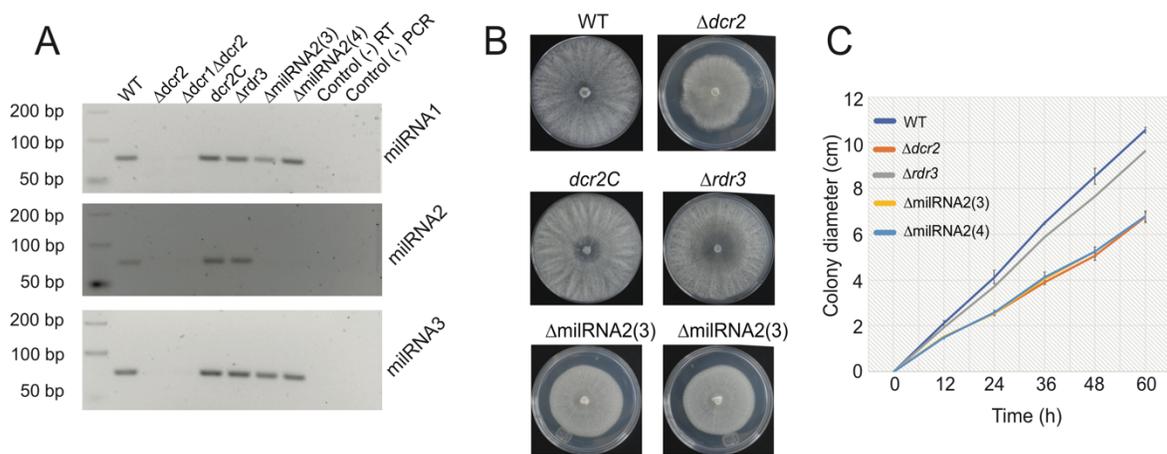


Figura 26.- Mutación específica del miRNA2 causa un defecto en el crecimiento. A) *Stem-loop* RT-PCR de los tres miRNAs más abundantes en las células de *T. atroviride* en los diferentes fondos genéticos evaluados, como controles negativos en la electroforesis se usaron el PCR sin RNA en el RT y el control negativo del PCR (sin cDNA). B) Comparación de fenotipo de crecimiento a las 72 horas de crecimiento de las cepas WT, $\Delta dcr2$, *dcr2C*, $\Delta rdr3$, $\Delta milR2(3)$ y $\Delta milR2(4)$. C) Cinética de crecimiento durante 60 horas de las cepas WT, $\Delta dcr2$, $\Delta milR2-3$ y $\Delta milR2-4$ creciendo en PDA, una prueba de Tukey fue realizada para determinar la diferencia estadística del crecimiento entre las cepas ($p < 0.05$). (Modificada de Villalobos-Escobedo *et al.*, 2019).

7.3.5. El *milRNA2* regula la capacidad de regeneración de las hifas

Debido al patrón de expresión de *milRNA2* y el de sus posibles genes blanco, decidimos analizar la respuesta de la mutante al daño, pero también su capacidad para producir conidios cuando crece bajo luz constante. La mutación de este *milRNA* afectó significativamente la producción de conidios en respuesta al daño, como en la mutante $\Delta dcr2$ (**Fig. 27A**). Sin embargo, las mutantes de *milRNA2* pudieron conidiar cuando se expusieron a luz constante, lo que sugiere que este defecto causado por la pérdida del *milRNA2*, es específico para la respuesta del daño mecánico. Por lo tanto, decidí evaluar la capacidad regenerativa como una respuesta específica al daño. La capacidad para regenerar de los mutantes $\Delta dcr2$ y $\Delta milRNA2$ se vio afectada de forma similar, mostrando una reducción significativa en comparación con la cepa WT (**Fig. 27B**). Sin embargo, este defecto no explica por completo el defecto en la conidiación, lo que nos llevó a pensar que la mutación del *milRNA2* afecta a genes vinculados a la conidiación.

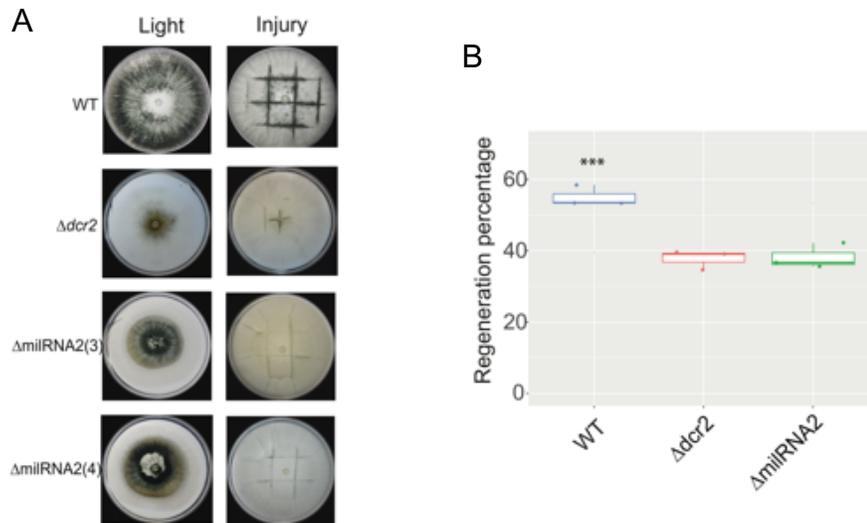


Figura 27.- Fenotipo de conidiación de las cepas mutantes del milRNA2 en respuesta a luz constante y daño mecánico. A) Conidiación en las cepas WT, $\Delta dcr2$ y las dos mutantes del milRNA2 después de crecer durante 72 horas en luz blanca constante y a las 36 horas del daño mecánico. B) Cuantificación de la regeneración de las hifas en las cepas WT, $\Delta dcr2$ y una mutante milRNA2. Una prueba de ANOVA, seguida de una prueba de Tukey fueron realizadas para determinar las diferencias significativas ($P < 0.05$). (Modificada de Villalobos-Escobedo *et al.*, 2019).

7.3.6. RNA-seq de la mutante del milRNA2

Para conocer qué transcritos son afectados en su expresión por la mutación de la región precursora del milRNA2, se realizó un experimento de RNA-seq tanto en la mutante milRNA2, como en la cepa WT, ambas sometidas a daño mecánico. En primer término, quisimos saber qué sucedía en la región que da lugar a este RNA pequeño. Para ello visualizamos la acumulación de transcritos en esta región, de los transcriptomas de la cepa WT, $\Delta dcr2$, $\Delta rdr3$ y la mutante del milRNA2. Como se puede observar en la **Figura 28A**, el transcrito precursor es de alrededor de 1400 pb y contiene a una región codificante con el ID: 160296. Con este análisis se pudo determinar que existe una acumulación baja de lecturas distribuidas uniformemente a lo largo del pri-milRNA2 en las cepas WT y $\Delta rdr3$. Sin embargo, la expresión de pri-milRNA2 se incrementa significativamente en las mutantes $\Delta dcr2$ y $\Delta milRNA2$, con un valor de log₂Fold-change de 2.3 y 2.1, respectivamente. Como era de esperar, la región de 349 pb que codifica para el pre-milRNA2 (**Tabla Suplementaria 4**), que se reemplazó en la mutante $\Delta milRNA2$, no tiene lecturas asociadas, confirmando que la mutación es precisa y que además esta mutación no causa la degradación de la pri-milRNA2, descartando que pueda ser esta una causa del fenotipo observado. Las lecturas de RNAs pequeños asociados al milRNA2 se acumulan en la región 3'UTR de pri-milRNA2 en la cepa WT y desaparecen en la mutante $\Delta dcr2$, como se observa en la figura superior en azul (**Fig. 28A**).

El análisis de expresión diferencial total en la comparación $\Delta milRNA2$ -Injury vs WT-Injury, mostró 1950 genes inducidos y 1553 genes reprimidos (**Fig. 28B**; FDR <0.05). En este análisis, 28 de los genes blanco predichos para milRNA2 fueron inducidos y 13 reprimidos en la $\Delta milRNA2$ con respecto la cepa WT (**Tabla 3**), esto en respuesta a daño. Dentro de los genes inducidos en la mutante $\Delta milRNA2$, encontré al chk2 quinasa, hpt1p y una histidina fosfotransferasa, que están relacionados con procesos de señalización. También encontré a los genes que codifican un factor de transcripción, una ARN polimerasa y la CDP1, los cuales regulan la expresión de genes y tienen el mismo perfil de expresión que en la cepa $\Delta dcr2$. Curiosamente, una serie de genes relacionados con el metabolismo de esteroides y la síntesis de fosfolípidos como la c-3 esteroles deshidrogenasa c-4

descarboxilasa y la Fosfatidilserina descarboxilasa están desregulados en esta mutante. Además, algunos genes se inducen específicamente en esta mutante, que no llegan a ser diferenciales en la cepa $\Delta dcr2$, como la Histidina cinasas *hhk6p* y la Hidstidina fosfotransferesa *hpt1p*, los cuales están involucrados en la señalización. Es posible que la mutación específica de este miRNA permita ver este comportamiento aun más claro de estos posibles genes blanco.

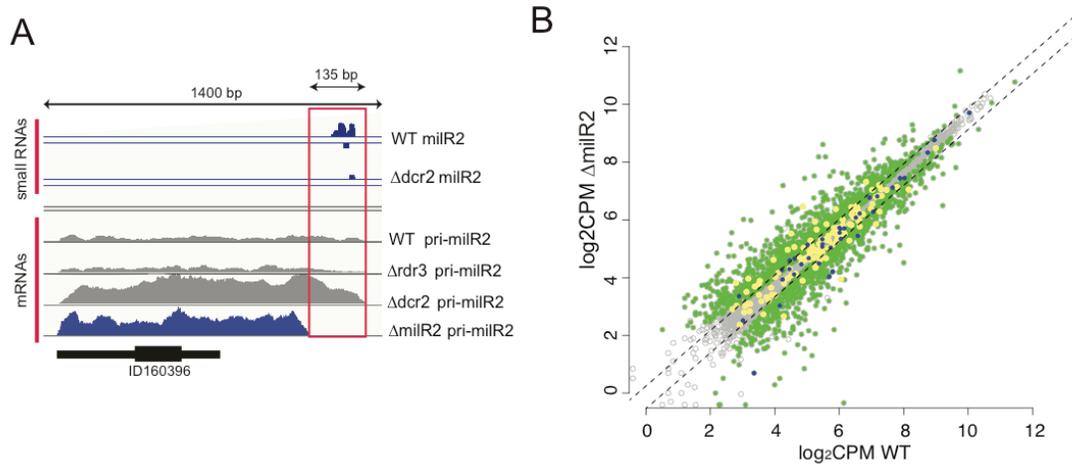


Fig. 28.- Expresión diferencial de genes en el fondo mutante del miRNA2. A) Comparación de la acumulación de lecturas del miRNA2 y pri-miRNA2 en la región genómica donde se realizó la mutación. En la figura se muestran dos valores de expresión diferencial del pri-miRNA2 en el fondo mutante *dcr2* y miRNA2 (FDR < 0.05). B) Perfil transcripcional de genes blanco en la mutante $\Delta miRNA2$, comparado con el perfil de expresión en la cepa silvestre. Los puntos verdes representan a los genes expresados diferencialmente, mientras que los puntos azules y amarillos representan a los genes blanco de miRNA1 y miRNA2, respectivamente. (Modificada de Villalobos-Escobedo *et al.*, 2019).

Tabla 3.- Valor del *fold-change* en \log_2 de los genes blanco para el miRNA2 inducidos en la comparación mutante $\Delta dcr2$ y $\Delta miRNA2$ contra la cepa WT. En amarillo se destacan los valores significativamente diferentes en cada comparación (FDR < 0.05).

ID	miRNA2-I vs WT-I	Dcr2-I vs WT-I	Nombre del gen
id_297304	2.72	3.93	Transcription factor/CCAAT displacement protein CDP1
id_294361	1.13	3.02	rna-directed rna polymerase
id_33117	0.87	1.78	hypothetical protein
id_297472	0.73	1.58	dephospho-kinase
id_318101	0.85	1.01	ferric-chelate reductase
id_85646	0.97	0.61	kinase domain containing protein
id_252945	1.51	0.51	serine threonine-protein kinase chk2
id_317135	1.00	0.48	c6 transcription factor
id_88984	0.72	0.47	histidine phosphotransferase hpt1p
id_89433	0.89	0.45	c-3 sterol dehydrogenase c-4 decarboxylase
id_302435	0.34	0.44	Splicing coactivator SRm160/300, subunit SRm300
id_131680	0.51	0.34	proteasome component c5
id_185227	0.50	0.28	hsp40 co-chaperone
id_297990	0.46	0.26	ring-box protein 1
id_129005	0.65	0.25	rna polymerase-associated protein
id_268387	0.77	0.24	acetylornithine deacetylase
id_38953	0.32	0.23	mediator of rna polymerase ii transcription subunit 7
id_146755	0.97	0.22	phosphatidylserine decarboxylase family protein
id_281328	0.33	0.20	hypothetical protein
id_47305	0.31	0.20	intracellular serine protease
id_79912	0.38	0.19	adaptor complexes medium subunit family protein
id_138587	1.91	0.18	flavin-binding monooxygenase
id_37369	1.60	0.17	acyl- n-acyltransferase
id_152868	1.02	0.13	histidine kinase hhk6p
id_238874	1.31	0.06	1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase
id_302018	0.56	0.05	mfs quinate transporter
id_164264	0.31	-0.01	camp-dependent protein kinase catalytic subunit
id_181383	1.96	-0.03	nacht and wd domain protein
id_156465	1.19	-0.06	duf221 domain-containing protein
id_315140	0.34	-0.06	kinesin related protein 1
id_152303	1.21	-0.10	duf323 domain protein
id_292337	0.48	-0.18	carbohydrate esterase family 3 protein
id_297977	0.37	-0.20	hypothetical protein
id_150261	1.47	-0.47	mfs transporter
id_78753	0.36	-0.60	hypothetical protein
id_256104	0.43	-0.61	nitrite reductase

7.3.7. La mutación de *dcr2* y *milRNA2* afectan los mismos procesos

Para tener una idea más clara de los cambios globales como producto de la mutación del *milRNA2*, realicé un análisis de enriquecimiento de procesos biológicos en la mutante, y se compararon con aquellos procesos biológicos afectados en las mutantes de la RNAi. Interesantemente, muchos procesos que están reprimidos en la mutante $\Delta dcr2$ también lo están en la mutante $\Delta milRNA2$, pero no en la $\Delta rdr3$, lo que sugiere que estos cambios se deben al control a través de este *milRNA* (**Fig. 29A**). Dentro de estos procesos se encuentran el metabolismo del fósforo y el catabolismo de compuestos organonitrogenados, así como el metabolismo de nucleótidos trifosfatados. Estos procesos están íntimamente relacionados con la señalización a través de cascadas de fosforilación. Al explorar los genes contenidos dentro de estas categorías funcionales afectadas, se encontró que los genes maestros del ciclo celular y la señalización para iniciar procesos de proliferación celular como STE, DCD24, DCD2, ppk30, Calcineurina y otros son, aunque de una manera sutil, reprimidos consistentemente tanto en la $\Delta dcr2$, como en la $\Delta milRNA2$, pero no en la mutante $\Delta rdr3$ (**Fig. 29B**).

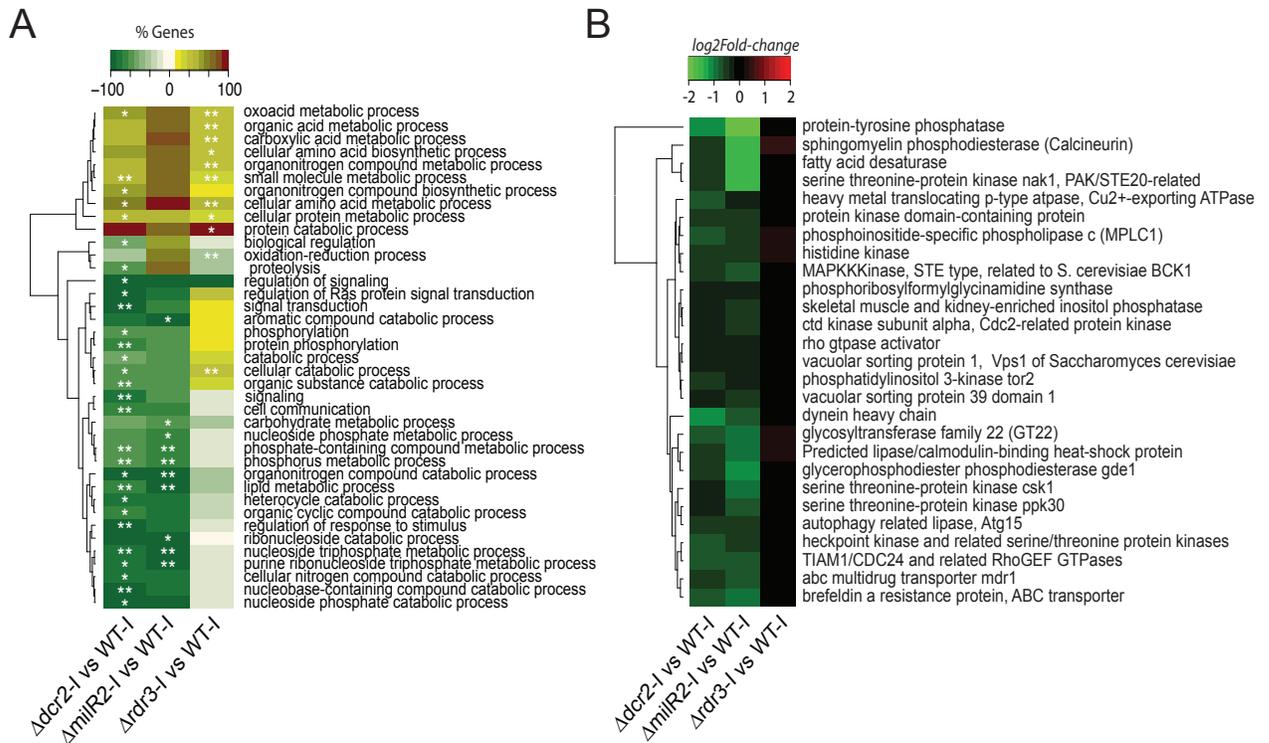


Figura 29.- Procesos Biológicos involucrados en señalización y ciclo celular son regulados por miRNA2. A) *Heatmap* agrupado del análisis de enriquecimiento de Proceso Biológico (FDR <0.01 **, FDR <0.05 *) en la comparación general de las mutantes $\Delta dcr2$, $\Delta milRNA2$ y $\Delta rdr3$ contra la cepa WT como control. B) Perfil de expresión diferencial de los genes afectados por la mutación de miRNA2 y *dcr2* (FDR <0.05). (Modificada de Villalobos-Escobedo *et al.*, 2019).

7.4. Conclusión

Con los resultados aquí presentados, pude concluir que, aunque existen varios microRNAs codificados a lo largo del genoma de *T. atroviride*, tres de ellos son altamente abundantes en la cepa silvestre. En el fondo mutante del gen que codifica para Dcr2, todos los milRNAs predichos están abatidos, lo que indica que son producto de la actividad de esta proteína. Sin embargo, en la biogénesis de este tipo de sRNAs, no participa la proteína Rdr3, lo que si sucede en el caso de los ex-siRNAs, por lo que se trata de dos vías que coparticipan en la respuesta al daño. Interesantemente, la expresión de los principales milRNAs incrementa drásticamente después del daño mecánico, llevando a la máxima acumulación en las etapas de diferenciación y maduración de conidios. Esto sugiere que los milRNAs pueden regular procesos implicados en el desarrollo desencadenado por el daño, lo que correlaciona con lo que se ha observado en *Fusarium graminearum* (Zeng *et al.*, 2018).

Como ya he mencionado, aunque implicados por perfiles de expresión, a la fecha poco se sabe de la función fisiológica de los milRNAs identificados en otros hongos filamentosos. Por esta razón decidí hacer mutaciones dirigidas a los tres microRNAs identificados con expresión diferencial entre la mutante $\Delta dcr2$ y la cepa silvestre. A pesar de que se realizaron varios intentos de transformación durante el desarrollo de este trabajo, únicamente se pudo obtener la mutante del milRNA2. Dado que las mutaciones se realizaron en regiones no codificantes, es probable que exista un impedimento a nivel de la estructura de la cromatina para llevar acabo la recombinación homóloga o que estas regiones son esenciales para la viabilidad del hongo, por lo que quizá sea necesario usar otras técnicas de mutaciones dirigidas como CRISPR/Cas9, la cual ya ha sido probada en *Trichoderma reesei* (Liu *et al.*, 2015). Además, se podría realizar la técnica de MIMIC, con la que es posible complementar a la mutante del milRNA2 y del gen *dcr2*, con un miRNA sintético (Jin *et al.*, 2015; Thomson *et al.*, 2013) para evaluar si efectivamente se puede rescatar el fenotipo usando un sRNA específico.

Sin embargo, pese a estos problemas, fue de mucho interés encontrar que los cambios fenotípicos de la mutante milRNA2 son similares a los observados en la

mutante $\Delta dcr2$. Además, los mismos procesos biológicos son afectados por ambas mutaciones, lo que puede indicar que los cambios observados por la ausencia de esta proteína son debido a que ya no se sintetiza el miRNA2. Esto nos lleva a sugerir que este microRNA es importante para el desarrollo y sobrevivencia de *T. atroviride*, ya que regula los procesos de ciclo celular y percepción de estímulos ambientales que posteriormente llevarán a la proliferación celular.

8. Discusión general

8.1. El sistema inmune innato de los hongos y la regeneración

En nuestro grupo hemos previamente descrito los mecanismos bioquímicos, genéticos y fisiológicos que intervienen en la respuesta a daño mecánico del hongo *T. atroviride*, el cual después de recibir el estímulo inicia la formación de una nueva hifa y posteriormente genera estructuras de reproducción asexual llamadas conidios (Hernández-Oñate *et al.*, 2012). Ahora sabemos que un mecanismo análogo al de plantas y animales es necesario para responder al daño en este hongo filamentoso (Hernández-Oñate & Herrera-Estrella, 2015). Es necesario un incremento en las especies reactivas de oxígeno (ROS) para poder disparar el desarrollo y formación de conidios. Además, un incremento de calcio intracelular y la señalización por la vía de Tmk1 son necesarios para el inicio de la regeneración (Medina-Castellanos *et al.*, 2018). En esta tesis realicé un análisis transcriptómico del efecto sobre las células dañadas de *T. atroviride* al remover el calcio usando el quelante BAPTA, así como al mutar las proteínas $\Delta tmk1$ y $\Delta tmk3$ (involucradas en dos principales vías por MAPKs), y al tratar el micelio de este hongo con ATP extracelular.

Usando una estrategia donde se compararon las librerías de datos transcriptómicos de las condiciones que permiten la regeneración (WT-daño y $\Delta tmk3$ -daño), contra aquellas que no lo hacen (WT-BAPTA y $\Delta tmk1$ -daño), pude determinar que el calcio intracelular después del daño y la señalización por la vía de la Tmk1, promueven la inducción de genes, los cuales nombré genes asociados a la regeneración (*Regeneration Associated Gene Set*, RAGS). Este grupo de genes se divide en 7

grupos por anotación funcional, de los cuales 6 están directamente involucrados en la proliferación celular y la regulación del ciclo celular. Dentro de estos grupos se encuentran dos genes del complejo de la condensina, así como el gen *ssu72* que en ratones regula el inicio del ciclo celular en respuesta a daño hepático (Kim *et al.*, 2016). También se encontraron varios genes del *minichromosome maintenance protein complex (mcm)*, los cuales son esenciales para la replicación del DNA, y que se ha observado que su expresión se incrementa durante la regeneración en otros modelos como planaria, ratón y ajolote (Monaghan *et al.*, 2012; Canhamero *et al.*, 2011; Salvetti *et al.*, 2000) y parecen ser esenciales para la proliferación celular (Lau *et al.*, 2010). El encontrar que estos genes participan en procesos tan relacionados con la regeneración, apoya la hipótesis de que todos ellos pueden ser importantes para llevar a cabo este proceso en hongos filamentosos.

Interesantemente, el séptimo grupo de genes codifica proteínas que contienen el dominio HET y presenta el mismo comportamiento transcripcional que los genes directamente involucrados en la proliferación celular antes mencionados. Los genes *het* han sido involucrados en procesos de anastomosis de hifas de hongos, donde dos individuos se reconocen y pueden fusionarse, resultando en la coexistencia de núcleos genéticamente diferentes en un citoplasma compartido, dando lugar a un individuo heterocarionte (Zhao *et al.*, 2015). En dichos procesos los productos de los genes *het* inducen la muerte celular programada a través de un proceso llamado aloreconocimiento (Glass *et al.*, 2006). Además de estos genes, en este grupo encontramos también dos factores de transcripción que contienen el homeodominio, que ha sido identificado en los factores de apareamiento. En *Neurospora crassa*, las proteínas HET interactúan con los factores de apareamiento para llevar a cabo el proceso de reconocimiento de incompatibilidad en el heterocarionte, llevando a la muerte celular. El aloreconocimiento es un proceso altamente conservado, desde hongos hasta humanos, este permite la distinción de tejido propio de material extraño y es el proceso que se activa durante el trasplante de órganos y que es funcional como sistema inmune para evitar infecciones por patógenos (Boehm, 2006).

Dentro de los genes RAGS también pude encontrar 14 genes que participan directamente en los procesos de muerte celular programada, que en animales se han identificado como parte del sistema inmune innato. Entre ellos se encuentra una caspasa, un receptor de fosfatidilserina, una proteína cinasa PITSLRE y la cinasa 1, de la vía de activación de apoptosis, que es un regulador central de este proceso. También pude observar la inducción del gen *3–5 exoribonucleasa cs/4*, el de una probable guanosina monofosfatasa sintetasa y de una fosfolipasa A2, importantes para los procesos de señalización en ataques por patógenos en las plantas y los animales (Lahti *et al.*, 1995; Fadok *et al.*, 2000; Song *et al.*, 2013). Estos resultados plantean una clara situación celular al momento de recibir un daño, potencialmente este daño puede ser causado por otro organismo, posiblemente un depredador, así estos procesos pueden actuar reconociendo si este daño puede causar alguna infección o combinación con material genético extraño, llevando a una muerte celular programada, lo que constituye una importante estrategia para contender contra las infecciones (Gonçalves *et al.*, 2017).

Otro grupo de genes identificados dentro de los RAGS, fueron dos helicasas tipo DEAD/H-box que junto con las proteínas HET, juegan un papel importante en detectar daño o invasión por material genético extraño proveniente de bacterias o virus (Dempsey *et al.*, 2015). En los animales y las plantas, existe un grupo de genes identificados como específicos de la respuesta inmune innata conocidos como los receptores de reconocimiento de patrones (PRRs), que detectan moléculas asociadas a patógenos, las cuales funcionan como señales de alerta (Heil & Land, 2014; Iwasaki & Medzhitov, 2015). Interesantemente, la arquitectura de las proteínas HET de los hongos guarda gran similitud con los genes PRR de las plantas y los animales, lo que sugiere que esta primera fase de detección de daño por patógenos esta conservada entre los organismos, aunque la respuesta posterior sea distinta (Heller *et al.*, 2018).

Por otro lado, evidencia bioquímica reciente, muestra que las proteínas NLR de los hongos, funcionan de manera muy similar a los receptores NLR de las plantas y los animales, los cuales son esenciales para la respuesta inmune innata en estos organismos (Heller *et al.*, 2018). Lo anteriormente expuesto sugiere que los hongos

tienen un sistema de respuesta inmune muy similar al de superiores. Además, indica que las proteínas HET identificadas en los hongos, participan en proteger a estos de patógenos, de la invasión con material genético extraño. Por lo que es de gran interés haber determinado que en *T. atroviride* estos genes se inducen en la respuesta al daño mecánico.

A la luz de la información proveniente del análisis transcriptómico, es posible proponer que en *T. atroviride* existe un sistema inmune innato que se activa en respuesta al daño y que promueve la regeneración. Este sistema es constituido por 22 genes y da pauta a pensar que esto sucede dentro de los hongos filamentosos en general. En los animales se ha observado que la activación del sistema inmune es importante para llevar a la regeneración, por ejemplo, en pez cebra e hidras (Lai *et al.*, 2017; Wenger *et al.*, 2014). Así postulo que existe un sistema Booleano que determina la entrada a la proliferación celular, permitiendo la regeneración, si el daño causado no representa una potencial infección y pérdida de la integridad genómica. Sin embargo, si este no es el caso, inmediatamente se puede iniciar un proceso de muerte celular programada. Lo antes descrito se esquematiza en la **Figura 30**.

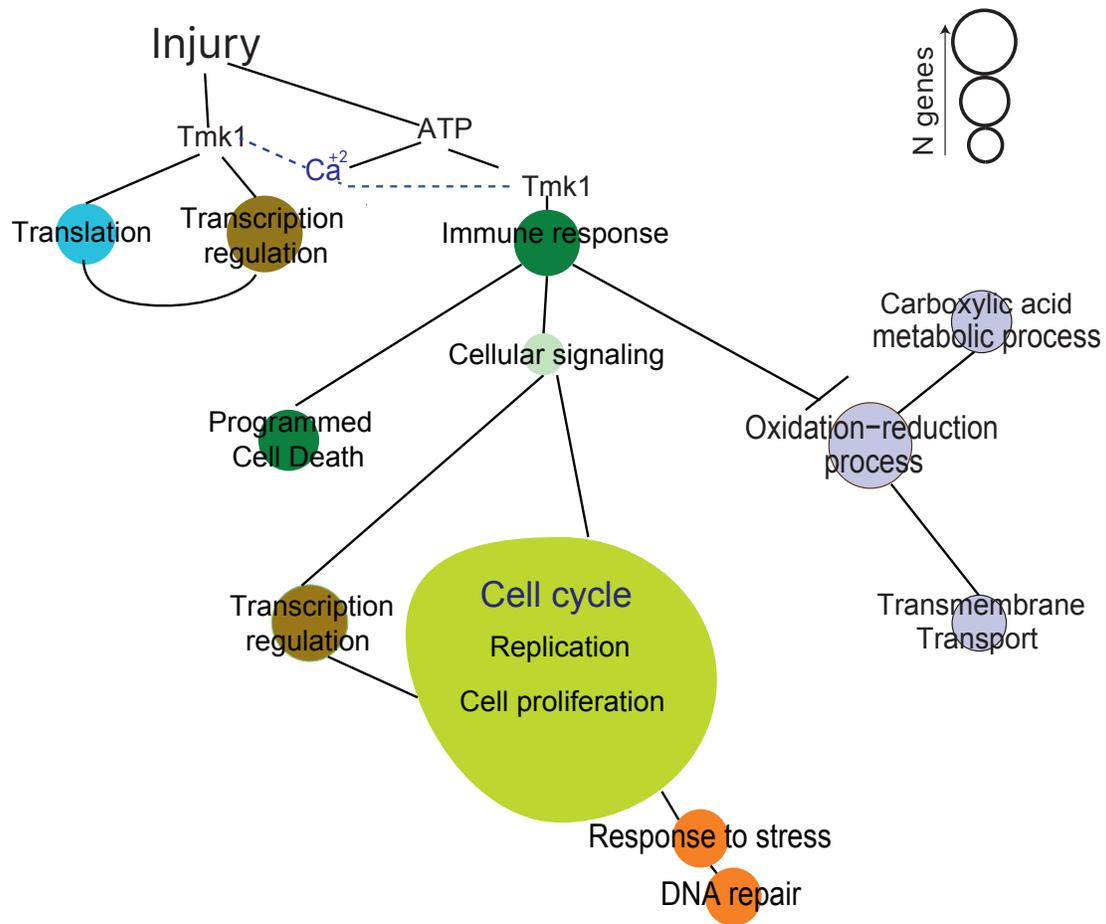


Figura 30.- Modelo de la respuesta molecular al daño. En el esquema se muestra la percepción y respuesta transcripcional río abajo, que lleva a la activación del ciclo celular para iniciar la regeneración o el proceso de muerte celular programada. (Modificada de Medina-Castellanos *et al.*, 2018).

8.2. El papel de los RNAs pequeños durante la regeneración

En esta tesis, además de describir a profundidad los cambios transcripcionales regulados, los principales patrones moleculares asociados a daño y las vías de percepción del daño mecánico, también estudié la regulación postranscripcional de estos cambios. Así que aquí describo las dos principales vías de regulación de la expresión de genes a nivel postranscripcional, las cuales tienen un papel importante durante la regeneración de las hifas y la conidiación. La primera depende de los ex-siRNAs, los cuales provienen de la degradación vía el RNAi de las regiones codificantes (Nicolás *et al.*, 2015). En *T. atroviride* estos se generan principalmente de genes que codifican proteínas importantes en el metabolismo de aminoácidos. Un ejemplo es la kinurenina 3-monooxigenasa, una de las enzimas más importantes en el catabolismo del triptofano (Smith *et al.*, 2016). En general, en este hongo, varios genes involucrados en el metabolismo que usan como cofactor al NADH o al NADPH, parecen estar bajo el control de ex-siRNAs, ya que observamos que de estos transcritos se producen los ex-siRNAs más abundantes. Por ello es probable que al mutar los genes que codifican *dcr2* y *rdr3*, se produzca un incremento en la expresión de genes que usan NADP o NADPH para la biosíntesis de compuestos como aminoácidos, que conduzca a una disminución del poder reductor celular, el cual está ligado a la capacidad de responder a diferentes tipos de estrés como el daño mecánico. Un ejemplo de ello es que las especies reactivas de oxígeno, importantes para poder llevar a cabo la conidiación en respuesta al daño en *T. atroviride*, son producidas por la NADPH oxidasa 1 (Nox1), usando como cofactor al NADPH (Hernández-Oñate *et al.*, 2012). Esto también sucede en ratones en respuesta al daño cerebral, donde la NOX2 puede regular la activación del inflamósoma (Ma *et al.*, 2017).

Es notable que los genes importantes para el mantenimiento del estado redox celular, se inducen tanto en el fondo mutante $\Delta dcr2$ como en el de $\Delta rdr3$. Tal es el caso del gen *nmral1*, que codifica la proteína HSCARG que a bajos niveles de NADPH se une a la argininosuccinato sintetasa (AS) y la inhibe. Esto lleva a la reducción de la formación de óxido nítrico, compuesto necesario para iniciar la

muerte celular programada en células humanas (Zhao *et al.*, 2008). Esto puede estar sucediendo también en *T. atroviride* y puede ser una de las causas del fenotipo observado en las mutantes de *dcr2* y *rdr3* en respuesta a daño. Además, dentro de los genes afectados por la mutación de *dcr2* y *rdr3*, están dos que codifican a proteínas con dominio HET y NACHT, ambas involucradas en muerte celular programada y que en *T. atroviride* nosotros relacionados con la regeneración. Esto indica que la vía de regulación por RNAs pequeños, afecta la expresión de los genes importantes para llevar a cabo la regeneración. Con este mismo perfil de inducción en las mutantes de la RNAi encontré a un gen que codifica una catalasa y otro la proteína COP9, reguladores negativos de la acumulación de ROS y oxilipinas respectivamente, que deben ser reprimidos para responder a daño (Tsitsigiannis & Keller, 2007). Lo anterior sugiere que ambos procesos, la acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y señalización por oxilipinas, están bajo la regulación por la RNAi.

Durante el desarrollo de esta tesis doctoral pude determinar que a pesar de que *dcr2* y *rdr3* regulan procesos similares, existen procesos regulados específicamente por *dcr2*, en donde *rdr3* no parece participar. Estos procesos principalmente son la señalización celular, el metabolismo del fósforo y de los lípidos. Dentro de este grupo de genes afectados específicamente por la mutación de *dcr2* encontramos algunos que codifican histidina cinasas, proteínas Rho y Ras, todos ellos reprimidos en la cepa $\Delta dcr2$, con respecto a la silvestre en respuesta al daño, las cuales participan en la señalización celular. Además, encontramos afectados genes que codifican la fosfolipasa C (PLC) y la fosfatidilinositol 3-cinasa (PI3K), las cuales son activadas por ambas vías de Rho y Ras (Seifert *et al.*, 2008). Estos genes a su vez catalizan la hidrólisis del fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP2) a diacilglicerol e inositol (1,4,5)-trisfosfato (PIP3), los cuales funcionan como segundos mensajeros para activar la proteína cinasa C y la movilización de calcio intracelular (Seifert *et al.*, 2008). Esto muestra un vínculo directo entre estas vías de señalización por lípidos y la acumulación del calcio, que hemos demostrado previamente es esencial para llevar a cabo la regeneración (Medina-Castellanos *et al.*, 2018), lo que puede explicar en parte el defecto observado en este proceso en la mutante $\Delta dcr2$. Por

otro lado, las proteínas PLC y PI3K se han visto involucradas como reguladores de la reorganización del citoesqueleto, la citocinesis y el crecimiento celular (Fukami *et al.*, 2010; Castellano & Downward, 2011).

Otro gen interesante que se ve reprimido por la mutación de *dcr2* es el *flba1*, que codifica una proteína G el cual participa directamente en la conidiación en hongos filamentosos como *Aspergillus nidulans* y *Beauveria bassiana* (Hick *et al.*, 1997; Fang *et al.*, 2008). Así al mutar a *dcr2* y por consiguiente afectar la expresión de estos genes, se produce una disminución del crecimiento polar, la conidiación y la regeneración de hifas en respuesta al daño (**Fig. 31**).

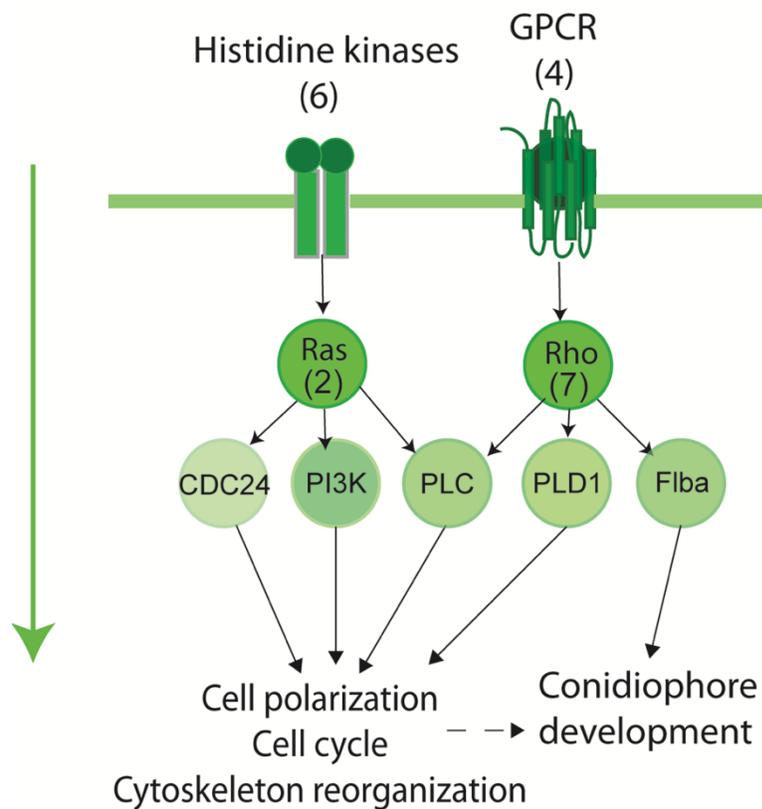


Figura 31. Modelo del mecanismo de señalización regulada por miRNAs. En el esquema se muestran las vías que se activan en respuesta al daño y que se ven afectadas por la mutación de *dcr2* y el miRNA2. (Modificada de Villalobos-Escobedo *et al.*, 2019). GPCR: Receptor acoplado a proteínas G, PLD1: Fosfolipasa D1, FLBA: Fluffy low brIA expression, PLC: Fosfolipasa C, PI3K: Fosfoinositol 3-quinasa, CDC24: Cell division control protein 24.

Un descubrimiento relevante de este trabajo fue determinar que la población de sRNAs más afectada por la mutación de *dcr2*, son los RNAs similares a microRNAs (miRNAs). Al evaluar la expresión de los tres miRNAs más abundantes durante el proceso de desarrollo disparado por el daño mecánico, determiné que la expresión de todos ellos incrementa fuertemente durante las etapas donde se producen los conidios. Por ello propongo que los miRNAs pueden estar involucrados en la regulación de los procesos de diferenciación.

Al mutar la región genómica que genera el segundo miRNA más abundante (miRNA2), se observaron defectos en el crecimiento, la regeneración y la conidiación, como sucede en la mutante $\Delta dcr2$. Esto sugiere que una parte de los defectos fenotípicos observados en la mutante $\Delta dcr2$, se puede deber a la ausencia de este miRNA. Al realizar un análisis transcriptómico de la mutante miRNA2, y compararlo con el perfil transcripcional de $\Delta dcr2$ y $\Delta rdr3$, pude determinar que el transcrito que da lugar a este RNA pequeño, este inducido tanto en las mutantes $\Delta dcr2$ y $\Delta miRNA2$, lo que sugiere que estos miRNAs provienen del procesamiento de la región tallo-asa del pri-miRNA por la Dicer2.

Por otro lado, los genes directamente involucrados en la comunicación celular al igual que en la mutante $\Delta dcr2$, están reprimidos en el fondo mutante $\Delta miRNA2$. Este resultado puede explicar en parte los defectos compartidos entre $\Delta dcr2$ y $\Delta miRNA2$.

La evaluación de la expresión de los genes blanco predichos para el miRNA2 usando el programa TargetFinder (Fahlgren *et al.*, 2010), mostró que estos se inducen tanto en la mutante $\Delta miRNA2$, como en la mutante $\Delta dcr2$, lo que confirma que están bajo este mecanismo de regulación negativa. Varios de estos posibles genes blanco están relacionados con la señalización por fosforilación, tal como una histidina cinasa, homóloga de *chk2* de mamíferos, que ha sido involucrada en la regulación del ciclo celular al fosforilar a la proteína CDC25. Esto implica que en ausencia del miRNA2, *chk2* puede afectar negativamente la progresión del ciclo celular (Matsuoka *et al.*, 1998; Zannini *et al.*, 2014).

El papel de los microRNAs durante el proceso de regeneración ha sido en los animales (Yu *et al.*, 2011; Nakasa *et al.*, 2010; Frith *et al.*, 2014; Aguirre *et al.*, 2014;).

En este sentido, recientemente se demostró que miR-183, se induce en larvas de pez cebra después del daño de células capilares cocleares y la inhibición de este miRNA, usando el morfolino-miR-183 (MO-183), resulta en la disminución de la regeneración este tejido (Kim *et al.*, 2018). miR-183 tiene como blanco al gen TAO cinasa 1, el cual regula la muerte celular programada y la apoptosis en células cocleares de rata, sugiriendo que miR-183 puede estimular la regeneración a través de la regulación de vías de señalización (Kim *et al.*, 2018). Esto correlaciona con nuestros datos transcriptómicos y sugiere que la regulación de la señalización por microRNAs es un fenómeno conservado desde hongos hasta animales para llevar a la regeneración.

En las plantas y los animales, los microRNAs juegan un papel esencial en el desarrollo y recientemente un trabajo en *Fusarium graminearum* sugiere que genes importantes para el desarrollo sexual están bajo la regulación de este tipo de RNAs pequeños (Zeng *et al.*, 2018). Sin embargo, en ese trabajo no se presenta evidencia que involucre a algún miRNA específico. A la fecha, en más de 10 especies de hongos filamentosos se han encontrado miRNAs, los cuales pueden estar regulando diversos procesos, pero no se ha encontrado un caso donde la mutación de uno de estos sRNAs afecte el desarrollo de los hongos hasta ahora estudiados, como en el caso de otros organismos (revisado por Villalobos-Escobedo *et al.*, 2016). Este hecho y la poca evidencia de conservación de los miRNAs entre los hongos, ha llevado a pensar que el papel de estas moléculas es de poca relevancia dentro de este reino. Sin embargo, los datos presentados en esta tesis aportan evidencia para pensar que algunos miRNAs pueden regular genes involucrados en el desarrollo y la regeneración de *T. atroviride*, lo que indica que es un tema relevante de evaluar en otros hongos filamentosos.

9. CONCLUSIONES GENERALES

1.- El incremento de la concentración de Ca^{2+} citosólico después del daño, es necesario para activar la transcripción de genes que llevarán a la replicación del DNA y la formación de conidios. Además, es necesario para el control transcripcional negativo de procesos metabólicos y la promoción de la acumulación de ROS, al reprimir genes que reducen estas moléculas.

2.- En la mutante *tmk1*, los procesos de replicación del DNA y el control de especies reactivas de oxígeno y procesos metabólicos están afectados al igual que en ausencia del Ca^{2+} , lo que correlaciona con el hecho de que ambas condiciones conducen a un defecto en la regeneración de las hifas. Suponemos entonces que la señalización por fosforilación y calcio inducen la activación de genes para llevar a cabo la replicación del material genético y el control metabólico, quizá vía algunos factores de transcripción activados tanto por fosforilación como por el incremento del calcio intracelular como es el caso de Crz1.

3.- El eATP también induce la expresión de genes involucrados en la replicación, el control del metabolismo de monosacáridos y ROS, procesos importantes para disparar la regeneración y la conidiación.

4.- La búsqueda específica de los genes asociados a la regeneración, usando una comparación de las librerías de RNA-seq de las condiciones que llevan a la regeneración, contra aquellas que no lo hacen, me permitió identificar los genes con mayor posibilidad de participar en la regeneración de las hifas después del daño.

5.- Los genes *dcr2* y *rdr3*, participan en la formación de conidios en respuesta al daño, mientras que *dcr2* tiene un papel adicional en el proceso de regeneración.

6.- La maquinaria de síntesis de RNAs pequeños, parece estar involucrada en la regulación de la expresión de genes involucrados en procesos metabólicos relacionados con aminoácidos y el estado redox celular.

7.- Los ex-siRNAs son generados con la coparticipación de *rdr3* y *dcr2*, mientras que en la biogénesis de los miRNAs solo es esencial el gen *dcr2*,

8.- Los ex-siRNAs están directamente involucrados en la regulación de genes metabólicos desde tiempos tempranos, mientras que los miRNA participan tanto en el crecimiento como en la diferenciación que lleva al desarrollo asexual.

9.- La mutación puntual de un solo miRNA afecta profundamente la biología de *T. atroviride*, reprime los procesos básicos como la proliferación celular y la reproducción asexual.

10. PERSPECTIVAS

1.- Es necesario determinar si los genes del sistema inmune innato son activados inmediatamente después del daño, para entrar en un proceso de muerte celular programada si material genético exógeno es percibido. Por ello propongo en primer término, analizar la expresión de estos genes incluso únicamente con la presencia de DNA exógeno extraño y posteriormente evaluar el fenotipo de mutantes de estos genes en presencia de organismos micófitos y DNA extraño.

2.- Recientemente se describió que la respuesta sistémica en plantas y el incremento del calcio es debido a unos transportadores de glutamato (*GLUTAMATE RECEPTOR– LIKE family*) similares a los de células nerviosas de animales (Toyota et al., 2018). Por lo que sería muy interesante determinar en primer término si estos genes existen en *T. atroviride* y si la respuesta a glutamato como en plantas y animales activa el incremento en la concentración de calcio y el sistema de respuesta inmune.

3.- Para determinar si los ex-siRNAs efectivamente regulan la relación NADPH/NADP⁺, se propone la cuantificación de ambos productos usando técnicas colorimétricas y enzimáticas. Además, pruebas de cuantificación de metabolitos en las mutantes de la RNAi durante la respuesta al daño, pueden llevar a determinar los procesos metabólicos regulados por ex-siRNAs.

4.- Considero que mutaciones puntuales sobre las regiones semilla de todos los miRNAs predichos, con ayuda de la técnica de CRISPR/Cas9, es importante para determinar el mecanismo de regulación de los microRNAs identificados en *T. atroviride*.

5.- Dado el fenotipo drástico de la mutante del miRNA2, se hace esencial realizar la complementación de esta región y además realizar un experimento de sobreexpresión de este miRNA y evaluar el fenotipo.

6.- Para determinar si el miRNA2, en verdad regula a nivel postranscripcional los genes blancos *in vivo*, un experimento usando un blanco sintético que contenga la región semilla de este miRNA que codifique para el gen GFP, nos permitirá determinar si en el fondo mutante miRNA2, el silenciamiento de este gen se produce en la cepa silvestre pero no en la mutante.

REFERENCIAS

- Aguirre, A., Montserrat, N., Zacchigna, S., Nivet, E., Hishida, T., Krause, M. N., Kurian, L., Ocampo, A., Vazquez-Ferrer, E., Rodriguez-Esteban, C., Kumar, S., Moresco, J. J., Yates, J. R. 3rd, Campistol, J. M., Sancho-Martinez, I., Giacca, M., Izpisua Belmonte, J. C. & Kumar, S. (2014). In vivo activation of a conserved microRNA program induces mammalian heart regeneration. *Cell Stem Cell*, 15(5), 589-604.
- Aguirre, J., & Lambeth, J. D. (2010). Nox enzymes from fungus to fly to fish and what they tell us about Nox function in mammals. *Free Radical Biology and Medicine*, 49(9), 1342-1353.
- Aguirre, J., Ríos-Momberg, M., Hewitt, D., & Hansberg, W. (2005). Reactive oxygen species and development in microbial eukaryotes. *Trends in microbiology*, 13(3), 111-118.
- Ameres, S. L., & Zamore, P. D. (2013). Diversifying microRNA sequence and function. *Nature reviews Molecular cell biology*, 14(8), 475.
- Arimura, G. I., & Maffei, M. E. (2010). Calcium and secondary CPK signaling in plants in response to herbivore attack. *Biochemical and biophysical research communications*, 400(4), 455-460.
- Arimura, G. I., Ozawa, R., & Maffei, M. E. (2011). Recent advances in plant early signaling in response to herbivory. *International Journal of Molecular Sciences*, 12(6), 3723-3739.
- Axtell, M. J., Westholm, J. O., & Lai, E. C. (2011). Vive la différence: biogenesis and evolution of microRNAs in plants and animals. *Genome biology*, 12(4), 221.
- Biggar, K. K., & Storey, K. B. (2015). Insight into post-transcriptional gene regulation: stress-responsive microRNAs and their role in the environmental stress survival of tolerant animals. *Journal of Experimental Biology*, 218(9), 1281-1289.
- Bi, J. L., & Felton, G. W. (1995). Foliar oxidative stress and insect herbivory: primary compounds, secondary metabolites, and reactive oxygen species as components of induced resistance. *Journal of Chemical Ecology*, 21(10), 1511-1530.
- Blair, C. D., & Olson, K. E. (2015). The role of RNA interference (RNAi) in arbovirus-vector interactions. *Viruses*, 7(2), 820-843.
- Boehm, T. (2006). Quality control in self/nonself discrimination. *Cell*, 125(5), 845-858.
- Brandes, R. P., Weissmann, N., & Schröder, K. (2014). Nox family NADPH oxidases: molecular mechanisms of activation. *Free Radical Biology and Medicine*, 76, 208-226.
- Bray, N. L., Pimentel, H., Melsted, P., & Pachter, L. (2016). Near-optimal probabilistic RNA-seq quantification. *Nature biotechnology*, 34(5), 525.
- Burge, S. W., Daub, J., Eberhardt, R., Tate, J., Barquist, L., Nawrocki, E. P., Eddy, S.R., Gardner, P.P., & Bateman, A. (2012). Rfam 11.0: 10 years of RNA families. *Nucleic acids research*, 41(D1), D226-D232.
- Calo, S., Shertz-Wall, C., Lee, S. C., Bastidas, R. J., Nicolás, F. E., Granek, J. A., Mieczkowski, P., Torres-Martínez, S., Ruiz-Vázquez, R.M., Cardenas, M.E., & Heitman, J. (2014). Antifungal drug resistance evoked via RNAi-dependent epimutations. *Nature*, 513(7519), 555.
- Canhamero, T., Reines, B., Peters, L. C., Borrego, A., Carneiro, P. S., Albuquerque, L. L., Cabrera, W. H., Ribeiro, O. G., Jensen, J. R., Starobinas, N., Ibañez, O. M. & De Franco M. (2011). Distinct early inflammatory events during ear tissue regeneration in mice selected for high inflammation bearing Slc11a1 R and S alleles. *Inflammation*, 34(5), 303-313.
- Carreras-Villaseñor, N., Esquivel-Naranjo, E. U., Villalobos-Escobedo, J. M., Abreu-Goodger, C., & Herrera-Estrella, A. (2013). The RNAi machinery regulates growth and development in the filamentous fungus *Trichoderma atroviride*. *Molecular microbiology*, 89(1), 96-112.
- Carthew, R. W., & Sontheimer, E. J. (2009). Origins and mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell*, 136(4), 642-655.
- Castellano, E., & Downward, J. (2011). RAS interaction with PI3K: more than just another effector pathway. *Genes Cancer*, 2(3), 261-274.
- Chang, C., Wu, P., Baker, R. E., Maini, P. K., Alibardi, L., & Chuong, C. M. (2009). Reptile scale paradigm: Evo-Devo, pattern formation and regeneration. *The International journal of developmental biology*, 53(5-6), 813.
- Chan, J. K., Glass, G. E., Ersek, A., Freidin, A., Williams, G. A., Gowers, K., Espirito Santo, A.I., & Feldmann, M. (2015). Low-dose TNF augments fracture healing in normal and osteoporotic

- bone by up-regulating the innate immune response. *EMBO molecular medicine*, e201404487.
- Corps, K. N., Roth, T. L., & McGavern, D. B. (2015). Inflammation and neuroprotection in traumatic brain injury. *JAMA neurology*, 72(3), 355-362.
- Crosby, L. M., & Waters, C. M. (2010). Epithelial repair mechanisms in the lung. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 298(6), L715-L731.
- Davis, M. P., van Dongen, S., Abreu-Goodger, C., Bartonicek, N., & Enright, A. J. (2013). Kraken: a set of tools for quality control and analysis of high-throughput sequence data. *Methods*, 63(1), 41-49.
- de Bekker, C., Bruning, O., Jonker, M. J., Breit, T. M., & Wösten, H. A. (2011). Single cell transcriptomics of neighboring hyphae of *Aspergillus niger*. *Genome biology*, 12(8), R71.
- de Haro, J. P., Calo, S., Cervantes, M., Nicolás, F. E., Torres-Martínez, S., & Ruiz-Vázquez, R. M. (2009). A single dicer gene is required for efficient gene silencing associated with two classes of small antisense RNAs in *Mucor circinelloides*. *Eukaryotic cell*, 8(10), 1486-1497.
- Delgado-Jarana, J., Sousa, S., Gonzalez, F., Rey, M., & Llobell, A. (2006). The Hog1 controls the hyperosmotic stress response in *Trichoderma harzianum*. *Microbiology*, 152(6), 1687-1700.
- Dempsey, A., & Bowie, A. G. (2015). Innate immune recognition of DNA: A recent history. *Virology*, 479, 146-152.
- Eichhorn, S. W., Guo, H., McGeary, S. E., Rodriguez-Mias, R. A., Shin, C., Baek, D., Hsu, S.H., Ghoshal, K., Villén, J., & Bartel, D. P. (2014). mRNA destabilization is the dominant effect of mammalian microRNAs by the time substantial repression ensues. *Molecular cell*, 56(1), 104-115.
- Eltzschig, H. K., Sitkovsky, M. V., & Robson, S. C. (2012). Purinergic signaling during inflammation. *New England Journal of Medicine*, 367(24), 2322-2333.
- Fadok, V. A., Bratton, D. L., Rose, D. M., Pearson, A., Ezekewitz, R. A. B., & Henson, P. M. (2000). A receptor for phosphatidylserine-specific clearance of apoptotic cells. *Nature*, 405(6782), 85.
- Fahlgren, N., & Carrington, J. C. (2010). miRNA target prediction in plants. In *Plant MicroRNAs* (pp. 51-57). Humana Press.
- Fang, W., Scully, L. R., Zhang, L., Pei, Y., & Bidochka, M. J. (2008). Implication of a regulator of G protein signalling (BbRGS1) in conidiation and conidial thermotolerance of the insect pathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *FEMS Microbiol Lett*, 279(2), 146-156.
- Farmer, E. E., Alméras, E., & Krishnamurthy, V. (2003). Jasmonates and related oxylipins in plant responses to pathogenesis and herbivory. *Current opinion in plant biology*, 6(4), 372-378.
- Farmer, E. E., & Ryan, C. A. (1992). Octadecanoid precursors of jasmonic acid activate the synthesis of wound-inducible proteinase inhibitors. *The Plant Cell*, 4(2), 129-134.
- Fernando, W. A., Leininger, E., Simkin, J., Li, N., Malcom, C. A., Sathyamoorthi, S., Han, M. & Muneoka, K. (2011). Wound healing and blastema formation in regenerating digit tips of adult mice. *Developmental biology*, 350(2), 301-310.
- Frith, J. E., Porrello, E. R., & Cooper-White, J. J. (2014). Concise Review: New Frontiers in MicroRNA-Based Tissue Regeneration. *Stem Cells Transl Med*, 3(8), 969-976.
- Fukami, K., Inanobe, S., Kanemaru, K., & Nakamura, Y. (2010). Phospholipase C is a key enzyme regulating intracellular calcium and modulating the phosphoinositide balance. *Prog Lipid Res*, 49(4), 429-437.
- Gailit, J., & Clark, R. A. (1994). Wound repair in the context of extracellular matrix. *Current opinion in cell biology*, 6(5), 717-725.
- Gfeller, A., Liechti, R., & Farmer, E. E. (2010). *Arabidopsis* jasmonate signaling pathway. *Sci. Signal.*, 3(109), cm4-cm4.
- Glass, N. L., & Dementhon, K. (2006). Non-self recognition and programmed cell death in filamentous fungi. *Current opinion in microbiology*, 9(6), 553-558.
- Gonçalves, A. P., Heller, J., Daskalov, A., Videira, A., & Glass, N. L. (2017). Regulated forms of cell death in fungi. *Frontiers in microbiology*, 8, 1837.
- Ha, M., & Kim, V. N. (2014). Regulation of microRNA biogenesis. *Nature reviews Molecular cell biology*, 15(8), 509.
- Heil, M. (2009). Damaged-self recognition in plant herbivore defence. *Trends in plant science*, 14(7), 356-363.

- Heil, M., & Land, W. G. (2014). Danger signals–damaged-self recognition across the tree of life. *Frontiers in Plant Science*, 5, 578.
- Heller, J., Clavé, C., Gladioux, P., Saupe, S. J., & Glass, N. L. (2018). NLR surveillance of essential SEC-9 SNARE proteins induces programmed cell death upon allorecognition in filamentous fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 201719705.
- Hernández-Oñate, M. A., Esquivel-Naranjo, E. U., Mendoza-Mendoza, A., Stewart, A., & Herrera-Estrella, A. H. (2012). An injury-response mechanism conserved across kingdoms determines entry of the fungus *Trichoderma atroviride* into development. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(37), 14918-14923.
- Hernández-Oñate, M. A., & Herrera-Estrella, A. (2015). Damage response involves mechanisms conserved across plants, animals and fungi. *Current genetics*, 61(3), 359-372.
- Hicks, J. K., Yu, J. H., Keller, N. P., & Adams, T. H. (1997). *Aspergillus* sporulation and mycotoxin production both require inactivation of the FadA Gα protein-dependent signaling pathway. *EMBO J*, 16(16), 4916-4923.
- Howe, G. A., & Schillmiller, A. L. (2002). Oxylipin metabolism in response to stress. *Current opinion in plant biology*, 5(3), 230-236.
- Iwasaki, A., & Medzhitov, R. (2015). Control of adaptive immunity by the innate immune system. *Nature immunology*, 16(4), 343.
- Jaffe, L. F. (2010). Fast calcium waves. *Cell calcium*, 48(2-3), 102-113.
- Jang, H. S., Han, S. J., Kim, J. I., Lee, S., Lipschutz, J. H., & Park, K. M. (2013). Activation of ERK accelerates repair of renal tubular epithelial cells, whereas it inhibits progression of fibrosis following ischemia/reperfusion injury. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1832(12), 1998-2008.
- Jedd, G. (2011). Fungal evo–devo: organelles and multicellular complexity. *Trends in cell biology*, 21(1), 12-19.
- Jendretzki, A., Wittland, J., Wilk, S., Straede, A., & Heinisch, J. J. (2011). How do I begin? Sensing extracellular stress to maintain yeast cell wall integrity. *European journal of cell biology*, 90(9), 740-744.
- Jiang, W. E. I. D. O. N. G., Middleton, K., Yoon, H. J., Fouquet, C., & Carbon, J. (1993). An essential yeast protein, CBF5p, binds in vitro to centromeres and microtubules. *Molecular and cellular biology*, 13(8), 4884-4893.
- Jin, H. Y., Gonzalez-Martin, A., Miletic, A. V., Lai, M., Knight, S., Sabouri-Ghomi, M., ... & Xiao, C. (2015). Transfection of microRNA mimics should be used with caution. *Frontiers in genetics*, 6, 340.
- Johnson, N. R., Yeoh, J. M., Coruh, C., & Axtell, M. J. (2016). Improved placement of multi-mapping small RNAs. *G3: Genes, Genomes, Genetics*, g3-116.
- Joseph, S., & David, W. R. (2001). Molecular cloning: a laboratory manual. *The Quarterly Review of Biology*, 76(3), 348-349.
- Junger, W. G. (2011). Immune cell regulation by autocrine purinergic signalling. *Nature Reviews Immunology*, 11(3), 201.
- Keller, T., Damude, H. G., Werner, D., Doerner, P., Dixon, R. A., & Lamb, C. (1998). A plant homolog of the neutrophil NADPH oxidase gp91phox subunit gene encodes a plasma membrane protein with Ca²⁺ binding motifs. *The Plant Cell*, 10(2), 255-266.
- Kim, C. W., Han, J. H., Wu, L., & Choi, J. Y. (2018). microRNA-183 is essential for hair cell regeneration after neomycin injury in zebrafish. *Yonsei Med J*, 59(1), 141-147.
- Kim, C. Y., Liu, Y., Thorne, E. T., Yang, H., Fukushige, H., Gassmann, W., Hildebrand, D., Sharp, R.E., & Zhang, S. (2003). Activation of a stress-responsive mitogen-activated protein kinase cascade induces the biosynthesis of ethylene in plants. *The Plant Cell*, 15(11), 2707-2718.
- Kim, M., & McGinnis, W. (2010). Phosphorylation of Grainy head by ERK is essential for wound-dependent regeneration but not for development of an epidermal barrier. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 201016386.
- Kim, S. H., Jeon, Y., Kim, H. S., Lee, J. K., Lim, H. J., Kang, D., Cho, H., Park, C. K., Lee, H. & Lee, C. W. (2016). Hepatocyte homeostasis for chromosome ploidy and liver function is regulated by Ssu72 protein phosphatase. *Hepatology*, 63(1), 247-259.

- Kozomara, A., & Griffiths-Jones, S. (2013). miRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data. *Nucleic acids research*, 42(D1), D68-D73.
- Kruszka, K., Pieczynski, M., Windels, D., Bielewicz, D., Jarmolowski, A., Szweykowska-Kulinska, Z., & Vazquez, F. (2012). Role of microRNAs and other sRNAs of plants in their changing environments. *Journal of plant physiology*, 169(16), 1664-1672.
- Lahti, J. M., Xiang, J., Heath, L. S., Campana, D., & Kidd, V. J. (1995). PITSLRE protein kinase activity is associated with apoptosis. *Molecular and cellular biology*, 15(1), 1-11.
- Lai, S. L., Marín-Juez, R., Moura, P. L., Kuenne, C., Lai, J. K. H., Tsedeke, A. T., Guenther, S., Looso, M., & Stainier, D. Y. (2017). Reciprocal analyses in zebrafish and medaka reveal that harnessing the immune response promotes cardiac regeneration. *Elife*, 6, e25605.
- Langmead, B., Trapnell, C., Pop, M., & Salzberg, S. L. (2009). Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. *Genome biology*, 10(3), R25.
- Lau, K. M., Chan, Q. K. Y., Pang, J. C. S., Li, K. K. W., Yeung, W. W., Chung, N. Y., Lui, P. C., Tam, Y. S., Li, H. M., Zhou, L., Wang, Y., Mao, Y., Ng, H. K. (2010). Minichromosome maintenance proteins 2, 3 and 7 in medulloblastoma: overexpression and involvement in regulation of cell migration and invasion. *Oncogene*, 29(40), 5475.
- Lawrence, M., Huber, W., Pages, H., Aboyoun, P., Carlson, M., Gentleman, R., ... & Carey, V. J. (2013). Software for computing and annotating genomic ranges. *PLoS computational biology*, 9(8), e1003118.
- Lee, H. C., Li, L., Gu, W., Xue, Z., Crosthwaite, S. K., Pertsemliadis, A., ... & Liu, Y. (2010). Diverse pathways generate microRNA-like RNAs and Dicer-independent small interfering RNAs in fungi. *Molecular cell*, 38(6), 803-814.
- Leonard, T. J., & Dick, S. (1968). Chemical induction of haploid fruiting bodies in *Schizophyllum commune*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 59(3), 745-751.
- Liao, Y., Smyth, G. K., & Shi, W. (2013). featureCounts: an efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features. *Bioinformatics*, 30(7), 923-930.
- Liu, R., Chen, L., Jiang, Y., Zhou, Z., & Zou, G. (2015). Efficient genome editing in filamentous fungus *Trichoderma reesei* using the CRISPR/Cas9 system. *Cell Discovery*, 1, 15007.
- Liu, Y., & Zhang, S. (2004). Phosphorylation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase by MPK6, a stress-responsive mitogen-activated protein kinase, induces ethylene biosynthesis in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 16(12), 3386-3399.
- Lulai, E. C., & Corsini, D. L. (1998). Differential deposition of suberin phenolic and aliphatic domains and their roles in resistance to infection during potato tuber (*Solanum tuberosum*L.) wound-healing. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 53(4), 209-222.
- Maffei, M. E., Mithöfer, A., Arimura, G. I., Uchtenhagen, H., Bossi, S., Berteaux, C. M., ... & Boland, W. (2006). Effects of feeding *Spodoptera littoralis* on lima bean leaves. III. Membrane depolarization and involvement of hydrogen peroxide. *Plant physiology*, 140(3), 1022-1035.
- Ma, M. W., Wang, J., Dhandapani, K. M., & Brann, D. W. (2017). NADPH oxidase 2 regulates NLRP3 inflammasome activation in the brain after traumatic brain injury. *Oxid Med Cell Longev*, 2017.
- Martin, P., & Leibovich, S. J. (2005). Inflammatory cells during wound repair: the good, the bad and the ugly. *Trends in cell biology*, 15(11), 599-607.
- Matsuoka, S., Huang, M., & Elledge, S. J. (1998). Linkage of ATM to cell cycle regulation by the Chk2 protein kinase. *Science*, 282(5395), 1893-1897.
- Medina-Castellanos, E., Esquivel-Naranjo, E. U., Heil, M., & Herrera-Estrella, A. (2014). Extracellular ATP activates MAPK and ROS signaling during injury response in the fungus *Trichoderma atroviride*. *Frontiers in plant science*, 5, 659.
- Medina-Castellanos, E., Villalobos-Escobedo, J. M., Riquelme, M., Read, N. D., Abreu-Goodger, C. and Herrera-Estrella, A. (2018). Danger signals activate a putative innate immune system during regeneration in a filamentous fungus. *PLoS Genet*.
- Mendoza-Mendoza, A., Pozo, M. J., Grzegorski, D., Martínez, P., García, J. M., Olmedo-Monfil, V., Cortés, C., Kenerley, C., & Herrera-Estrella, A. (2003). Enhanced biocontrol activity of *Trichoderma* through inactivation of a mitogen-activated protein kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(26), 15965-15970.

- Meng, H., Wang, Z., Wang, Y., Zhu, H., & Huang, B. (2017). Identification and functional analysis of Dicer and Argonaute genes involved in RNA interference in the entomopathogenic fungus *Metarhizium robertsii*. *Applied and environmental microbiology*, AEM-03230
- Monaghan, J. R., Athipposhy, A., Seifert, A. W., Putta, S., Stromberg, A. J., Maden, M., Gardiner, D. M. & Voss, S. R. (2012). Gene expression patterns specific to the regenerating limb of the Mexican axolotl. *Biology Open*, 1(10), 937-948.
- Mousavi, S. A., Chauvin, A., Pascaud, F., Kellenberger, S., & Farmer, E. E. (2013). GLUTAMATE RECEPTOR-LIKE genes mediate leaf-to-leaf wound signalling. *Nature*, 500(7463), 422.
- Nakasa, T., Ishikawa, M., Shi, M., Shibuya, H., Adachi, N., & Ochi, M. (2010). Acceleration of muscle regeneration by local injection of muscle-specific microRNAs in rat skeletal muscle injury model. *J Cell Mol Med*, 14(10), 2495-2505.
- Natarelli, L., & Schober, A. (2015). MicroRNAs and the response to injury in atherosclerosis. *Hämmostaseologie*, 35(02), 142-150.
- Nelson, G., Kozlova-Zwinderman, O., Collis, A. J., Knight, M. R., Fincham, J. R. S., Stanger, C. P., Renwick, A. & Read, N. D. (2004). Calcium measurement in living filamentous fungi expressing codon-optimized aequorin. *Molecular microbiology*, 52(5), 1437-1450.
- Nicolás, F. E., de Haro, J. P., Torres-Martínez, S., & Ruiz-Vázquez, R. M. (2007). Mutants defective in a *Mucor circinelloides* dicer-like gene are not compromised in siRNA silencing but display developmental defects. *Fungal Genetics and Biology*, 44(6), 504-516.
- Nicolas, F. E., Moxon, S., de Haro, J. P., Calo, S., Grigoriev, I. V., Torres-Martínez, S., Moulton, V., Ruiz-Vázquez, R.M., & Dalmay, T. (2010). Endogenous short RNAs generated by Dicer 2 and RNA-dependent RNA polymerase 1 regulate mRNAs in the basal fungus *Mucor circinelloides*. *Nucleic acids research*, 38(16), 5535-5541.
- Nicolás, F. E., Vila, A., Moxon, S., Cascales, M. D., Torres-Martínez, S., Ruiz-Vázquez, R. M., & Garre, V. (2015). The RNAi machinery controls distinct responses to environmental signals in the basal fungus *Mucor circinelloides*. *BMC genomics*, 16(1), 237.
- Noverr, M. C., Erb-Downward, J. R., & Huffnagle, G. B. (2003). Production of eicosanoids and other oxylipins by pathogenic eukaryotic microbes. *Clinical microbiology reviews*, 16(3), 517-533.
- Orozco-Cárdenas, M. L., Narváez-Vásquez, J., & Ryan, C. A. (2001). Hydrogen peroxide acts as a second messenger for the induction of defense genes in tomato plants in response to wounding, systemin, and methyl jasmonate. *The Plant Cell*, 13(1), 179-191.
- Orozco-Cardenas, M., & Ryan, C. A. (1999). Hydrogen peroxide is generated systemically in plant leaves by wounding and systemin via the octadecanoid pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(11), 6553-6557.
- Pittas, K., Vrachatis, D. A., Angelidis, C., Tsoucala, S., Giannopoulos, G., & Defteros, S. (2018). The role of calcium handling mechanisms in reperfusion injury. *Current pharmaceutical design*.
- Rämet, M., Lanot, R., Zachary, D., & Manfruelli, P. (2002). JNK signaling pathway is required for efficient wound healing in *Drosophila*. *Developmental biology*, 241(1), 145-156.
- Reithner, B., Schuhmacher, R., Stoppacher, N., Pucher, M., Brunner, K., & Zeilinger, S. (2007). Signaling via the *Trichoderma atroviride* mitogen-activated protein kinase Tmk1 differentially affects mycoparasitism and plant protection. *Fungal Genetics and Biology*, 44(11), 1123-1133.
- Reymond, P., Weber, H., Damond, M., & Farmer, E. E. (2000). Differential gene expression in response to mechanical wounding and insect feeding in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 12(5), 707-719.
- Robinson, M. D., McCarthy, D. J., & Smyth, G. K. (2010). edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics*, 26(1), 139-140.
- Robinson, J. T., Thorvaldsdóttir, H., Wenger, A. M., Zehir, A., & Mesirov, J. P. (2017). Variant review with the integrative genomics viewer. *Cancer research*, 77(21), e31-e34.
- Rusmin, S., & Leonard, T. J. (1978). Biochemical induction of fruiting in *Schizophyllum*: Isolation and preliminary purification of an inducing substance from *Agaricus bisporus* mushrooms. *Plant physiology*, 61(4), 538-543.
- Sagi, M., Davydov, O., Orazova, S., Yesbergenova, Z., Ophir, R., Stratmann, J. W., & Fluhr, R. (2004). Plant respiratory burst oxidase homologs impinge on wound responsiveness and development in *Lycopersicon esculentum*. *The Plant Cell*, 16(3), 616-628.

- Salveti, A., Rossi, L., Deri, P., & Batistoni, R. (2000). An MCM2-related gene is expressed in proliferating cells of intact and regenerating planarians. *Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists*, 218(4), 603-614.
- Savatin, D. V., Gramegna, G., Modesti, V., & Cervone, F. (2014). Wounding in the plant tissue: the defense of a dangerous passage. *Frontiers in plant science*, 5, 470.
- Sehm, T., Sachse, C., Frenzel, C., & Echeverri, K. (2009). miR-196 is an essential early-stage regulator of tail regeneration, upstream of key spinal cord patterning events. *Developmental biology*, 334(2), 468-480.
- Seifert, J. P., Zhou, Y., Hicks, S. N., Sondek, J., & Harden, T. K. (2008). Dual Activation of Phospholipase C- ϵ by Rho and Ras GTPases. *J Biol Chem*, 283(44), 29690-29698.
- Sharp, D. J., Rogers, G. C., & Scholey, J. M. (2000). Microtubule motors in mitosis. *Nature*, 407(6800), 41.
- Simkin, J., Han, M., Yu, L., Yan, M., & Muneoka, K. (2013). The mouse digit tip: from wound healing to regeneration. In *Wound Regeneration and Repair* (pp. 419-435). Humana Press, Totowa, NJ.
- Smith, J. R., Jamie, J. F., & Guillemin, G. J. (2016). Kynurenine-3-monooxygenase: a review of structure, mechanism, and inhibitors. *Drug Discov Today*, 21(2), 315-324.
- Song, J., Cho, K. J., Cheon, S. Y., Kim, S. H., Park, K. A., Lee, W. T., & Lee, J. E. (2013). Apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1) is linked to neural stem cell differentiation after ischemic brain injury. *Experimental & molecular medicine*, 45(12), e69.
- Son, H., Park, A. R., Lim, J. Y., Shin, C., & Lee, Y. W. (2017). Genome-wide exonic small interference RNA-mediated gene silencing regulates sexual reproduction in the homothallic fungus *Fusarium graminearum*. *PLoS genetics*, 13(2), e1006595.
- Stenzel, I., Hause, B., Maucher, H., Pitzschke, A., Miersch, O., Ziegler, J., Ryan, C.A. & Wasternack, C. (2003). Allene oxide cyclase dependence of the wound response and vascular bundle-specific generation of jasmonates in tomato—amplification in wound signalling. *The Plant Journal*, 33(3), 577-589.
- Taghiyar, L., Hosseini, S., Safari, F., Bagheri, F., Fani, N., Stoddart, M. J., Alini, M. & Eslaminejad, M. B. (2018). New insight into functional limb regeneration: A to Z approaches. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*.
- Tanaka, E. M., & Reddien, P. W. (2011). The cellular basis for animal regeneration. *Developmental cell*, 21(1), 172-185.
- Tang, D., Kang, R., Coyne, C. B., Zeh, H. J., & Lotze, M. T. (2012). PAMPs and DAMPs: signals that spur autophagy and immunity. *Immunological reviews*, 249(1), 158-175.
- Thomson, D. W., Bracken, C. P., Szubert, J. M., & Goodall, G. J. (2013). On measuring miRNAs after transient transfection of mimics or antisense inhibitors. *PloS one*, 8(1), e55214.
- Torres-Martínez, S., & Ruiz-Vázquez, R. M. (2017). The RNAi universe in fungi: a varied landscape of small RNAs and biological functions. *Annual review of microbiology*, 71, 371-391.
- Toyota, M., Spencer, D., Sawai-Toyota, S., Jiaqi, W., Zhang, T., Koo, A. J., Howe, G.A. & Gilroy, S. (2018). Glutamate triggers long-distance, calcium-based plant defense signaling. *Science*, 361(6407), 1112-1115.
- Tsai, H. F., Chang, Y. C., Washburn, R. G., Wheeler, M. H., & Kwon-Chung, K. J. (1998). The Developmentally Regulated alb1 Gene of *Aspergillus fumigatus*: Its Role in Modulation of Conidial Morphology and Virulence. *Journal of bacteriology*, 180(12), 3031-3038.
- Tsitsigiannis, D. I., & Keller, N. P. (2007). Oxylipins as developmental and host–fungal communication signals. *Trends in microbiology*, 15(3), 109-118.
- Varkonyi-Gasic, E., Wu, R., Wood, M., Walton, E. F., & Hellens, R. P. (2007). Protocol: a highly sensitive RT-PCR method for detection and quantification of microRNAs. *Plant methods*, 3(1), 12.
- Vénéreau, E., Ceriotti, C., & Bianchi, M. E. (2015). DAMPs from cell death to new life. *Frontiers in immunology*, 6, 422.
- Villalobos-Escobedo, J. M., Herrera-Estrella, A., & Carreras-Villaseñor, N. (2016). The interaction of fungi with the environment orchestrated by RNAi. *Mycologia*, 108(3), 556-571.
- Wenger, Y., Buzgariu, W., Reiter, S., & Galliot, B. (2014, August). Injury-induced immune responses in Hydra. In *Seminars in immunology* (Vol. 26, No. 4, pp. 277-294). Academic Press.

- Wu, D., & Smyth, G. K. (2012). Camera: a competitive gene set test accounting for inter-gene correlation. *Nucleic acids research*, 40(17), e133-e133.
- Wu, J., Hettenhausen, C., Meldau, S., & Baldwin, I. T. (2007). Herbivory rapidly activates MAPK signaling in attacked and unattacked leaf regions but not between leaves of *Nicotiana attenuata*. *The Plant Cell*, 19(3), 1096-1122.
- Yang, Q., Li, L., Xue, Z., Ye, Q., Zhang, L., Li, S., & Liu, Y. (2013). Transcription of the major *Neurospora crassa* microRNA-like small RNAs relies on RNA polymerase III. *PLoS genetics*, 9(1), e1003227.
- Yokoyama, H. (2008). Initiation of limb regeneration: the critical steps for regenerative capacity. *Development, growth & differentiation*, 50(1), 13-22.
- Young, M. D., Wakefield, M. J., Smyth, G. K., & Oshlack, A. (2010). Gene ontology analysis for RNA-seq: accounting for selection bias. *Genome biology*, 11(2), R14.
- Yu, J. H., Hamari, Z., Han, K. H., Seo, J. A., Reyes-Domínguez, Y., & Scazzocchio, C. (2004). Double-joint PCR: a PCR-based molecular tool for gene manipulations in filamentous fungi. *Fungal genetics and biology*, 41(11), 973-981.
- Yu, Q., Xu, N., & Li, M. (2012). Calcium homeostasis systems and calcium signaling pathways in *Candida albicans*--a review. *Wei sheng wu xue bao= Acta microbiologica Sinica*, 52(4), 422-428.
- Yu, Y. M., Gibbs, K. M., Davila, J., Campbell, N., Sung, S., Todorova, T. I., Otsuka, S., Sabaawy, H. E., Hart, R. P. & Schachner, M. (2011). MicroRNA miR-133b is essential for functional recovery after spinal cord injury in adult zebrafish. *Eur J Neurosci*, 33(9), 1587-1597.
- Zannini, L., Delia, D., & Buscemi, G. (2014). CHK2 kinase in the DNA damage response and beyond. *J Mol Cell Biol*, 6(6), 442-457.
- Zebelo, S. A., & Maffei, M. E. (2014). Role of early signalling events in plant-insect interactions. *Journal of Experimental Botany*, 66(2), 435-448.
- Zhao, J., Gladieux, P., Hutchison, E., Bueche, J., Hall, C., Perraudeau, F., & Glass, N. L. (2015). Identification of allorecognition loci in *Neurospora crassa* by genomics and evolutionary approaches. *Molecular biology and evolution*, 32(9), 2417-2432.
- Zhao, Y., Zhang, J., Li, H., Li, Y., Ren, J., Luo, M., & Zheng, X. (2008). An NADPH sensor protein (HSCARG) downregulates nitric oxide synthesis by association with argininosuccinate synthetase and is essential for epithelial cell viability. *Journal of Biological Chemistry*.
- Zeng, W., Wang, J., Wang, Y., Lin, J., Fu, Y., Xie, J., Jiang, D., Chen, T., Liu, H. & Cheng, J. (2018). Dicer-like proteins regulate sexual development via the biogenesis of perithecium-specific microRNAs in a plant pathogenic fungus *Fusarium graminearum*. *Front Microbiol*, 9.
- Zeilinger, S., & Omann, M. (2007). *Trichoderma* biocontrol: signal transduction pathways involved in host sensing and mycoparasitism. *Gene regulation and systems biology*, 1, GRSB-S397.

MATERIAL SUPLEMENTARIO

Tabla Suplementaria 1.- Datos de las bibliotecas de RNA-seq secuenciadas en el proyecto “*Perfil transcripcional de la regulación por DAMPs, muestra que el sistema inmune innato participa en la regeneración*”

Library	Number of reads	Reads pseudoaligned	% pseudoaligned	% GC	Mean Quality
ATP_R1	29,915,377	23,553,436	78.73	54	34
ATP_R2	32,748,259	26,476,053	80.85	53	34
ATP_R3	25,354,828	19,267,967	75.99	54	34
tmk1_C_R1	27,430,440	21,821,496	79.55	53	34
tmk1_C_R2	36,831,150	29,565,784	80.27	54	34
tmk1_C_R3	38,303,657	30,264,214	79.01	54	34
tmk1_I_R1	13,282,762	10,741,585	80.87	54	34
tmk1_I_R2	35,254,942	27,317,502	77.49	54	34
tmk1_I_R3	18,178,452	14,372,412	79.06	54	34
tmk3_C_R1	20,352,669	16,693,801	82.02	52	34
tmk3_C_R2	20,010,487	15,438,510	77.15	53	34
tmk3_C_R3	28,735,516	21,991,049	76.53	54	34
tmk3_I_R1	24,410,144	18,505,063	75.81	53	34
tmk3_I_R2	23,300,246	17,809,274	76.43	53	34
tmk3_I_R3	24,245,580	18,590,130	76.67	53	34
WT_bapta_R1	21,150,780	16,742,058	79.16	54	34
WT_bapta_R2	21,187,446	16,565,942	78.19	54	34
WT_bapta_R3	30,519,083	23,729,779	77.75	54	34
WT_C_R1	21,770,455	18,073,692	83.02	52	34
WT_C_R2	15,586,542	11,974,338	76.82	53	34
WT_C_R3	15,799,760	12,122,701	76.73	53	34
WT_I_R1	27,464,653	20,747,559	75.54	54	34
WT_I_R2	30,713,438	24,060,680	78.34	54	34
WT_I_R3	26,074,913	20,351,200	78.05	54	34
Total	608,621,579	476,776,225			
Average	25,359,232	19,865,676			

Tabla Suplementaria 2.- Datos de las bibliotecas de RNA-seq (mRNA) secuenciadas en el proyecto sobre el papel de la RNAi en respuesta a daño mecánico.

RNA-seq of response to injury in mutant background dcr2 (HiSeq Illumina)						
Library	Condition	Strain	Raw reads	Reads pseudoaligned	% pseudoaligned	% GC
WT_C_R1	control	Wild-type	18,423,897	14,982,726	81.32	51
WT_C_R2	control	Wild-type	18,378,557	14,849,752	80.80	53
WT_C_R3	control	Wild-type	22,663,385	18,033,711	79.57	53
WT_I_R1	Injury	Wild-type	16,592,949	13,297,645	80.14	53
WT_I_R2	Injury	Wild-type	13,233,037	10,210,180	77.16	53
WT_I_R3	Injury	Wild-type	17,607,149	14,025,959	79.66	53
dcr2_C_R1	control	dcr2 knockout	15,697,790	12,488,496	79.56	53
dcr2_C_R2	control	dcr2 knockout	12,048,181	9,728,939	80.75	53
dcr2_C_R3	control	dcr2 knockout	13,561,726	10,942,754	80.69	53
dcr2_I_R1	Injury	dcr2 knockout	22,530,567	18,136,146	80.50	53
dcr2_I_R2	Injury	dcr2 knockout	15,428,457	12,373,228	80.20	52
dcr2_I_R3	Injury	dcr2 knockout	19,599,252	15,663,456	79.92	53
Total			205,764,947	164,732,992		
Average			17,147,078.92	13,727,749.33		
RNA-seq of response to injury in mutant background rdr3 (Next-seq Illumina)						
Library	Condition	Strain	Raw reads	Reads pseudoaligned	% pseudoaligned	% GC
WT_C_R1	control	Wild-type	21,770,455	18,073,692	83.02	52
WT_C_R2	control	Wild-type	15,586,542	11,974,338	76.82	53
WT_C_R3	control	Wild-type	15,799,760	12,122,701	76.73	53
WT_I_R1	Injury	Wild-type	27,464,653	20,747,559	75.54	54
WT_I_R2	Injury	Wild-type	30,713,438	24,060,680	78.34	54
WT_I_R3	Injury	Wild-type	26,074,913	20,351,200	78.05	54
rdr3_C_R1	control	rdr3 knockout	34,159,269	27,133,935	79.43	54
rdr3_C_R2	control	rdr3 knockout	31,517,655	25,472,292	80.82	53
rdr3_C_R3	control	rdr3 knockout	38,211,870	29,894,130	78.23	54
rdr3_I_R1	Injury	rdr3 knockout	28,430,497	22,066,817	77.62	54
rdr3_I_R2	Injury	rdr3 knockout	29,798,021	23,249,992	78.03	53
rdr3_I_R3	Injury	rdr3 knockout	28,132,833	21,798,483	77.48	54
Total			327,659,906	256,945,819		
Average			27,304,992.17	21,412,151.58		
RNA-seq of response to injury in mutant background miRNA2 (Next-seq Illumina)						
Library	Condition	Strain	Raw reads	Reads pseudoaligned	% pseudoaligned	% GC
WT_I_R1	Injury	Wild-type	20,034,470	15,727,836	78.50	53
WT_I_R2	Injury	Wild-type	16,752,131	13,749,236	82.07	53
WT_I_R3	Injury	Wild-type	15,511,765	12,459,576	80.32	53
miRNA2_I_R1	Injury	miRNA2 knockout	18,775,876	15,098,128	80.41	53
miRNA2_I_R2	Injury	miRNA2 knockout	14,118,813	11,478,018	81.30	52
miRNA2_I_R3	Injury	miRNA2 knockout	9,367,183	7,591,414	81.04	53
Total			94,560,238	76,104,208		
Average			15,760,039.67	12,684,034.67		

Tabla Suplementaria 3.- Datos de las bibliotecas de RNAs pequeños (sRNA-seq) secuenciadas en el proyecto sobre el papel de la RNAi en respuesta a daño mecánico.

sRNA-seq of response to injury in mutant background dcr2 (MiSeq Illumina)						
Library	Condition	Strain	Raw reads	Trimmed reads	Unique mappers	Multimappers
WT_C_R1	control	Wild-type	857,521	750,254	405,619	213,920
WT_C_R2	control	Wild-type	867,210	772,038	430,190	223,569
WT_C_R3	control	Wild-type	510,910	485,585	252,963	161,906
WT_I_R1	Injury	Wild-type	932,667	891,819	567,021	168,299
WT_I_R2	Injury	Wild-type	818,358	766,440	492,465	139,281
WT_I_R3	Injury	Wild-type	877,476	813,393	410,969	248,278
dcr2_C_R1	control	dcr2 knockout	730,091	664,617	475,572	106,030
dcr2_C_R2	control	dcr2 knockout	508,989	421,307	151,193	154,898
dcr2_C_R3	control	dcr2 knockout	640,929	595,557	337,192	133,531
dcr2_I_R1	Injury	dcr2 knockout	703,656	644,254	384,010	140,316
dcr2_I_R2	Injury	dcr2 knockout	769,780	706,225	403,746	159,974
dcr2_I_R3	Injury	dcr2 knockout	740,176	636,779	302,297	161,549

Tabla Suplementaria 4.- Oligos de DNA diseñados para hacer los stem-loop RT-PCR y la mutante del miRNA2.

Primers for stem-loops		
name	sequence	nts
miR1RT	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACgcaagt	50
miR1F	CGCGtgaaaccccgacaa	19
miR2RT	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACacagat	50
miR2F	CGCGtttgcatgcccaat	21
miR3RT	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACataccg	50
miR3F	CGCGgtggaagctaatcact	20
TRNA1RT	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACTTATCT	50
TRNA1F	GCGCGGTTCAAATCCTCCCCTGG	23
S297535RT	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACTACGCC	50
S297535F	GCGCATTACAACCAAGAGTGA	21
URP	GTGCAGGGTCCGAGGT	16
Primers to perform the mutation by replacement of the miRNA2		
miRNA F tail	CCCAGCACTCGTCCGAGGGCAAAGGAATAGACCAAAGGTGAGTCCGAATC	50
miRNA R tail	CTCCTTCAATATCAGTTAACGTCGATCCTGTCTAATTTTGCGAAGCCC	48
Fnest	AGGTACTTATTCCTCATTGGCC	22
Rnest	GTCCGAAGTATCAGAGCTGC	20

Figura Suplementaria 1.- Análisis de enriquecimiento de categorías funcionales de la respuesta del micelio de *T. atroviride* a un pulso de ATP extracelular, comparado con la respuesta a daño.

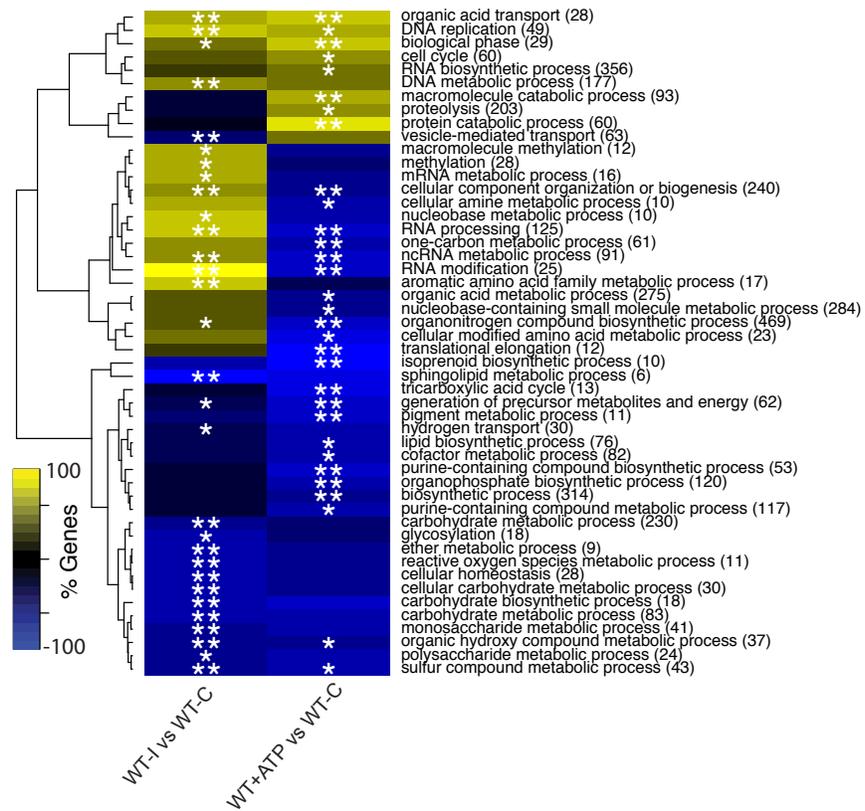
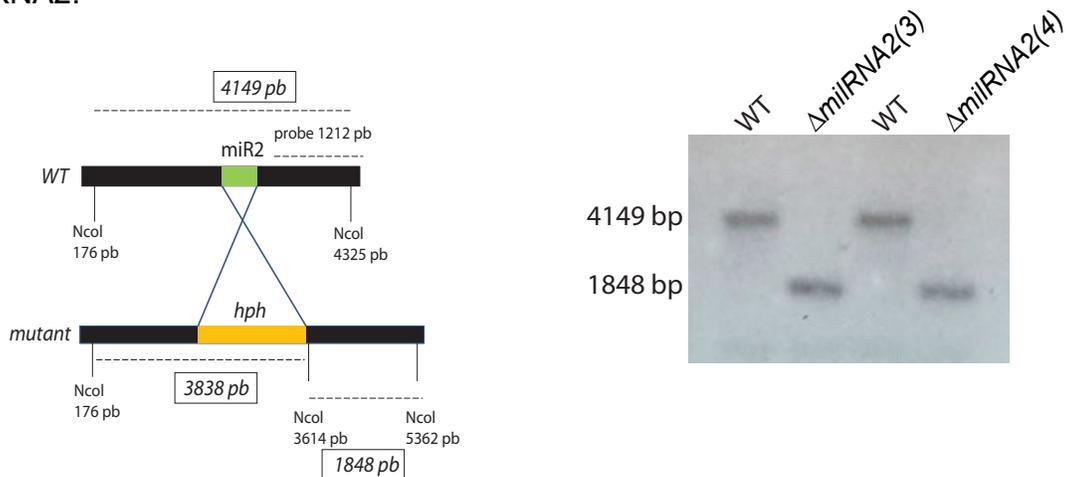


Figura Suplementaria 2.- Comprobación por Southern blot de la mutación del miRNA2.



Datos suplementarios:

Dato suplementario 1. Anotación funcional y valores del análisis de expresión de diferencial en la comparación WT-daño contra WT-control. La tabla contiene la lista de genes que son responsivos al daño (FDR < 0.05; Fold-change=1).

Dato suplementario 2. Anotación funcional y valores del análisis de expresión de diferencial en la comparación $\Delta dcr2$ -daño vs $\Delta dcr2$ -control. La tabla contiene la lista de genes que son responsivos al daño en la mutante del gen *dcr2* (FDR < 0.05; Fold-change=1).

Dato suplementario 3. Anotación funcional y valores del análisis de expresión de diferencial en la comparación $\Delta rdr3$ -daño vs $\Delta rdr3$ -control. La tabla contiene la lista de genes que son responsivos al daño en la mutante del gen *rdr3* (FDR < 0.05; Fold-change=1).

Dato suplementario 4. Anotación funcional de los genes de repuesta a daño exclusivos de la cepa WT. La tabla contiene la lista de genes responsivos a herida que son exclusivos de la WT en comparación con los perfiles transcripcionales de las mutantes $\Delta dcr2$ y $\Delta rdr3$.

Dato suplementario 5. Anotación funcional y valores del análisis de expresión de diferencial en la comparación $(\Delta dcr2 + \Delta rdr3)/2$ vs WT, tanto en respuesta a daño como en la condición control. La tabla contiene la lista de genes que tienen el mismo perfil de expresión en las mutantes de los genes *dcr2* y *rdr3* en comparación con la cepa WT, tanto de respuesta a daño como en la condición control (FDR < 0.05; sin filtro por *Fold-change*).

Dato suplementario 6. Anotación funcional y valores del análisis de expresión de diferencial en la comparación $\Delta dcr2$ vs WT, tanto en respuesta a daño como en la condición control. La tabla contiene la lista de genes diferenciales entre la cepa $\Delta dcr2$ y WT, creciendo en PDA y en respuesta al daño (FDR < 0.05; sin filtro por *Fold-change*).

Dato suplementario 7. Anotación funcional y valores del análisis de expresión de diferencial en la comparación $\Delta rdr3$ vs WT, tanto en respuesta a daño como en la condición control. La tabla contiene la lista de genes diferenciales entre la cepa $\Delta rdr3$ y WT, creciendo en PDA y en respuesta al daño (FDR < 0.05; sin filtro por *Fold-change*).

Dato suplementario 8. Intersección entre los genes reprimidos en la comparación $\Delta dcr2$ -daño vs WT-daño y los genes contenidos en la categoría funcional de comunicación celular. Esta tabla muestra el perfil de expresión de los genes anotados como de comunicación celular y como se comportan en la mutante $\Delta dcr2$, $\Delta rdr3$ y $\Delta milRNA2$ (FDR < 0.05; sin filtro por *Fold-change*).

Dato suplementario 9. Análisis de expresión diferencial de los RNAs pequeños en la comparación $\Delta dcr2$ vs WT. En esta tabla se muestra los valores de cambio de las regiones que producen RNAs pequeños y la anotación de la región genómica que los genera. Celdas que contienen los datos de los tres principales miRNAs son destacados en amarillo.

Dato suplementario 10. Análisis de expresión diferencial de los ex-siRNAs en la comparación $\Delta dcr2$ vs WT. La tabla muestra los valores de cambio de los ex-siRNAs codificados en el genoma de *T. atroviride* y la anotación de los genes de donde provienen, los valores negativos implica una disminución en la producción de estos sRNAs (FDR < 0.05; \log_2 fold-change = 1).

Dato suplementario 11. Análisis de expresión diferencial de los genes blanco de los tres principales miRNAs, tanto en la cepa $\Delta dcr2$, $\Delta milRNA2$ y WT. La tabla muestra los valores de cambio de los genes blanco para el miRNA1, miRNA2 y miRNA3, en la comparaciones $\Delta dcr2$ -control vs WT-control, $\Delta dcr2$ -daño vs WT-daño y $\Delta milRNA2$ -daño vs WT-daño.

Dato suplementario 12. Anotación funcional y valores del análisis de expresión de diferencial en la comparación $\Delta milRNA2$ vs WT, tanto en respuesta a daño como en la condición control. La tabla contiene la lista de genes diferenciales entre la cepa $\Delta milRNA2$ y WT, creciendo en PDA y en respuesta al daño (FDR < 0.05; sin filtro por *Fold-change*).