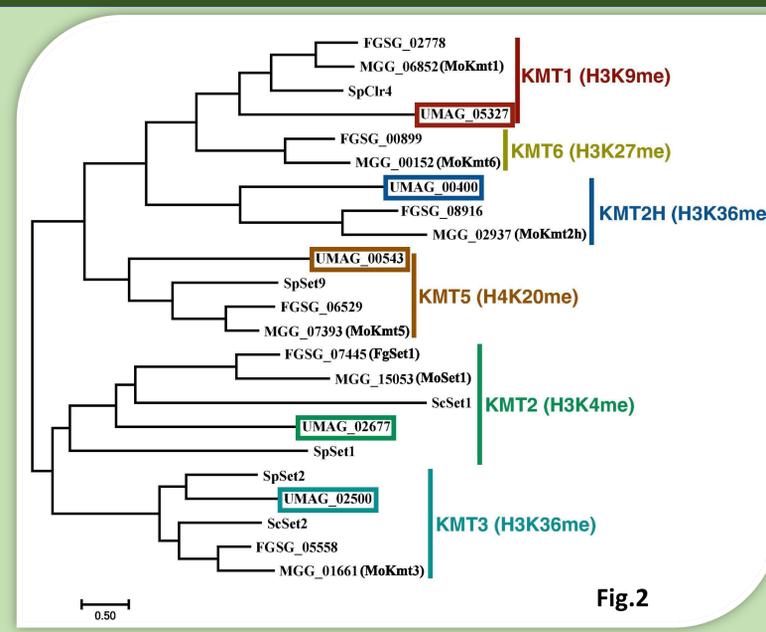
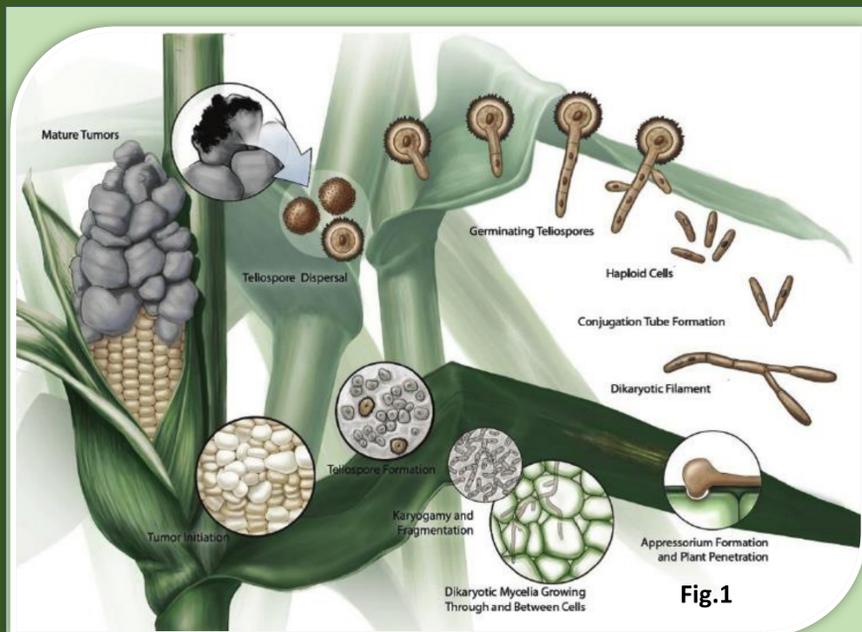
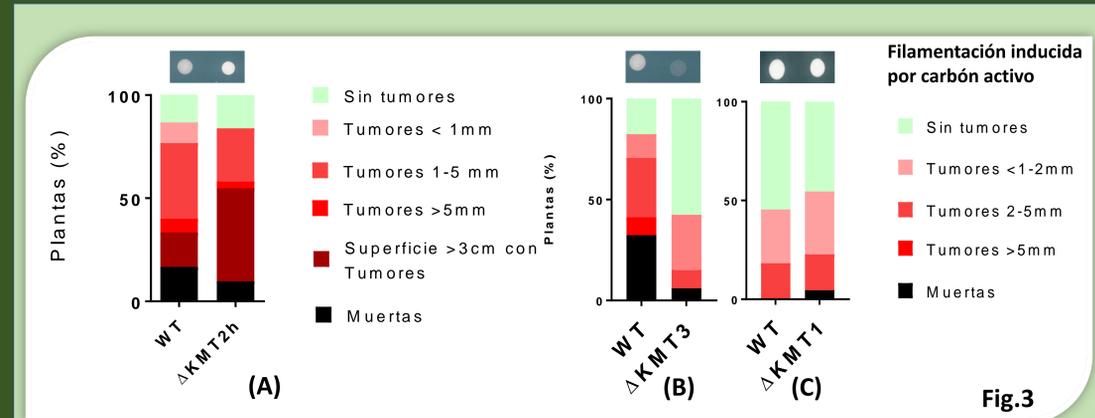


Ustilago maydis es un hongo patógeno biotrófico del maíz, es decir, invade a su huésped y crece a partir de él pero sin matarlo. Para poder llevar a cabo este tipo de interacción primero *U. maydis* debe penetrar en la planta y una vez conseguido se desarrollará en su interior. Durante el proceso de infección se verá sometido a numerosos cambios morfológicos (Fig. 1), los cuales se encuentran altamente regulados. Se ha demostrado que la metilación de las colas de la histona H3 tiene un gran impacto en el proceso de infección y de filamentación (1). En el siguiente trabajo nos hemos centrado en el estudio de las proteínas metiltransferasas de lisinas (KMT), más concretamente en la metilación del residuo 9 (lisina) de la histona H3 (H3K9) que es la marca representativa de la heterocromatina constitutiva (2,3), y además en la metilación del residuo 36 (lisina) de la histona H3 (H3K36) que se relaciona generalmente con un proceso activo de transcripción (4).

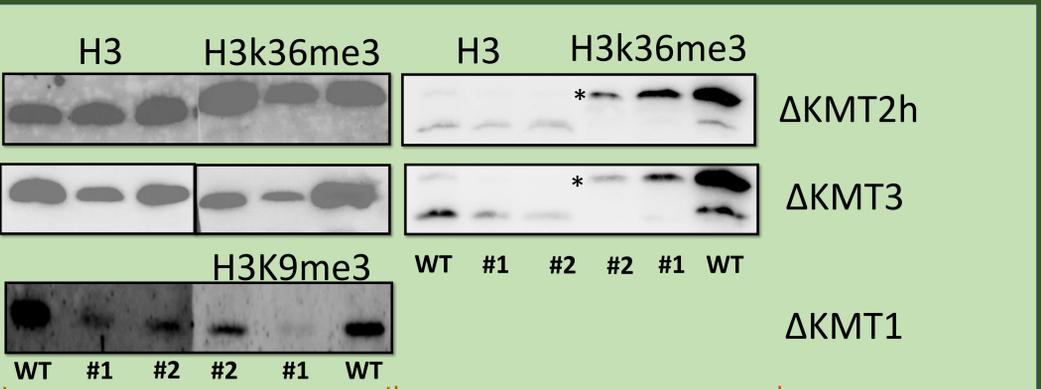


Mediante un estudio filogenético anterior (Fig 2) se descubrieron posibles genes de metiltransferasas. De todos los genes encontrados nos hemos centrados aquellos involucrados en la metilación de H3K9 y H3K36, el primero por su interés en la formación de heterocromatina constitutiva en un organismo sin los mecanismos necesarios para formarla y la segunda modificación porque tras deletar todos los genes, los relacionados con esta modificación fueron los únicos en mostrar un fenotipo interesante.

Importancia KMTs durante el proceso infectivo



Papel de las KMT en la metilación de histonas



| Ratios intensidad H3K36me3/H3 | Extracto purificado de histonas | | Extracto proteico total | |
|-------------------------------|---------------------------------|-----------------|-------------------------|-------|
| | Wt | ΔKMT3 | Wt | ΔKMT3 |
| Wt →0,406695712 | ΔKMT3 #1 →0,068496725 | Wt →0,251688189 | ΔKMT3 #1 →0,170326459 | |
| ΔKMT2h#1 →0,10912391 | ΔKMT3 #2 →0,097051535 | Wt →0,062324235 | ΔKMT1 #1 →0,170326459 | |
| | | | ΔKMT1 #2 →0,670039771 | |

* Banda inespecifica

Caracterización de la importancia de las KMTs en el proceso infectivo

Con el fin de saber a que niveles afectan estas KMTs durante el proceso infectivo se usarán distintos fondos genéticos. Todos los fondos genéticos que se explicarán a continuación se basan en la estirpe usada para las infecciones SG200, estirpe que se caracteriza por poseer las feromonas de reconocimiento de las cepas que podemos encontrar en la naturaleza, FB1 y FB2, ahorrándonos por ello tiempo de trabajo. Por otro lado tenemos el fondo genético CL13, que posee una deficiencia en la filamentación, y por tanto en la infección, con él podemos observar si una mutación concreta es capaz de complementar la deficiencia que posee. Para estudiar la filamentación in vivo y ver que estadio se encuentra afectado se usará el fondo genético AB33. En caso de que sea la formación de apresorios, y por consecuencia, la penetración de la planta el proceso que se vea afectado, se hará un estudio con los fluoróforos GFP y Cherry bajo el promotor de expresión AM1 que se expresa durante la formación del apresorio. Por último procederemos a la sobreexpresión de las KMTs mediante el uso de promotores de expresión constitutivos como es Otef o inducible como es Pit para observar como afecta al proceso infectivo.

| Gen | Fondos genéticos | | | | | | Sobreexpresión |
|-------|------------------|------|-----|-----|------|---------|----------------|
| | SG200 | Cl13 | FB1 | FB2 | AB33 | AM1-GFP | |
| KMT1 | ✓ | ✗ | ✗ | ✗ | ✗ | ✗ | ✗ |
| KMT2h | ✓ | ✓ | ✗ | ✗ | ✓ | ✓ | ✗ |
| KMT3 | ✓ | ✓ | ✓ | ✗ | ✓ | ✓ | ✗ |

Conclusiones

- Se observa como la ausencia de KMT2h y KMT3 tienen papeles contradictorios durante el proceso infectivo, provocando la ausencia del primero una mayor dispersión tumoral mientras que la carencia del segundo produce una reducción de la capacidad infectiva.
- En los experimentos de biología molecular se observa una reducción de la modificación H3K36me3 tanto en las estirpes carentes de KMT2h como en aquellas que no poseen KMT3.
- A pesar de que KMT1 no parece tener un papel durante el proceso infectivo de *Ustilago maydis*, la sola presencia de esta modificación en los ensayos western blot ya es interesante y merecería la pena averiguar que papel desempeña en este organismo.

Futuros objetivos

En vista de los resultados obtenidos hasta el momento, y a falta de confirmar la ausencia de la modificación H3K36 mediante un doble mutante de KMT2h y KMT3, parece interesante la realización de un Chip-Seq con intención de ver a que genes se unen KMT2h y KMT3. Por otro lado, la información que nos daría un RNA-Seq nos ayudaría a conocer que genes se desregulan en ausencia de estas dos KMT. Además, se realizarán estudios para averiguar que estadio de la infección se encuentra afectado en ausencia de estos genes mediante el uso de técnicas de microscopía fluorescente.

1. Elías-Villalobos, A., Barrales, RR e Ibeas, JI (2019). Factores de modificación de la cromatina en hongos patógenos de plantas: ideas de *Ustilago maydis*. Genética y biología fúngica. doi: 10.1016 / j.fgb.2019.04.006 (Fig. 2)

2. Rea, S., Eisenhaber, F., O'Carroll, D., Strahl, B.D., Sun, Z.-W., Schmid, M., Opravil, S., Mechtler, K., Ponting, C.P., Allis, C.D., Jenuwein, T., 2000. Regulation of chromatin structure by site-specific histone H3 methyltransferases. Nature 406, 593–599. <https://doi.org/10.1038/35020506>.

3. Nakayama, J., Rice, J.C., Strahl, B.D., Allis, C.D., Grewal, S.I.S., 2001. Role of histone H3 lysine 9 methylation in epigenetic control of heterochromatin assembly. Science (80-) 292, 110–113. <https://doi.org/10.1126/science.1060118>.

4. Freitag, M., 2017. Histone methylation by SET domain proteins in fungi. Annu. Rev. Microbiol. 71, 413–439. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-102215-095757>.

Fig 1. Saville, Barry & Donaldson, Michael & Doyle, C.. (2012). Investigating Host Induced Meiosis in a Fungal Plant Pathogen. 10.5772/30032.