



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

LAS VÍAS DE MAK-2 Y OS-2 DURANTE LAS TRANSICIONES MORFOGENÉTICAS DE LA
CONIDIACIÓN EN *NEUROSPORA CRASSA*.

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:
MARÍA ELENA PACHECO MARTÍNEZ

TUTOR PRINCIPAL
DR. WILHELM L. HANSBERG Y TORRES
Instituto de Fisiología Celular, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR
Dr. Roberto Coria Ortega
Instituto de Fisiología Celular, UNAM

Dr. Emilio Rojas del Castillo
Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

Ciudad de México, febrero, 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Agradecimientos

La presente investigación se realizó en el laboratorio 103 oriente del Instituto de Fisiología Celular bajo la tutoría del Dr. Wilhelm L. Hansberg y Torres.

Durante los estudios de maestría percibí una beca por parte del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) CVU 631675. Además, recibí financiamiento de parte del Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP) para asistir al IX Congreso de Biología Molecular y Celular de Hongos que tuvo lugar en octubre de 2015 en Puebla, México.

Al comité tutor que asesoró esta investigación:

Dr. Wilhelm L. Hansberg y Torres	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Dr. Roberto Coria Ortega	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Dr. Emilio Rojas del Castillo	Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

El jurado de examen estuvo constituido por:

Presidente	Dra. Marina Gavilanes Ruiz	Instituto de Química, UNAM
Vocal	Dr. Francisco Torres Quiroz	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Vocal	Dr. Carlos Leonardo Peraza Reyes	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Vocal	Dr. Roberto Hernández Fernández	Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM
Secretario	Dr. José Guillermo Aguilar Osorio	Instituto de Química, UNAM

A mi familia y amigos.

A Wanda, light of my life.

Índice

Lista de abreviaturas y acrónimos	5
Índice de figuras	6
Índice de tablas	7
Resumen	8
Introducción	10
1. Las especies reactivas del oxígeno, su formación e importancia en el desarrollo celular	10
2. Las NADPH oxidasas como fuente de ROS en las células	11
3. La diferenciación celular como respuesta al oxígeno	12
4. <i>N. crassa</i> como modelo experimental	13
5. La formación de conidios en <i>N. crassa</i> en respuesta a las ROS	15
6. Las ROS pueden activar a la proteína Ras	16
7. La conidiación cíclica en la cepa mutante <i>ras-1^{bd}</i>	17
8. Las vías de MAP cinasas en <i>N. crassa</i>	18
9. La vía de MAK-2	19
10. La vía de OS-2	21
11. Modelo propuesto sobre la regulación de los procesos de crecimiento/diferenciación	22
Hipótesis	24
Objetivos	25
Materiales y métodos	26
Cepas utilizadas	26
Generación de conidios de <i>N. crassa</i>	27
Crecimiento de <i>N. crassa</i>	28
Ensayo de exposición al estrés oxidante	28
Extracción de proteínas totales del micelio	28
Cuantificación de proteínas	29
Preparación de muestras para SDS-PAGE	29
Preparación de muestras de <i>S. cerevisiae</i>	29
Inmunodetección	30
Cuantificación de densidad de píxeles	30
Resultados	31
1. Fosforilación de OS-2 en presencia de estrés oxidante	31
1.1 Fosforilación de OS-2 y MAK-2 en la cepa silvestre y en <i>ras-1^{bd}</i>	32
1.2 Fosforilación de OS-2 y MAK-2 en la cepa silvestre	34
Minutos 0 a 30	34
Minutos 60 a 210	36
1.3 Fosforilación de OS-2 y MAK-2 en la cepa <i>ras-1^{bd}</i>	38
Minutos 0 a 30	38

Minutos 60 a 210	39
Discusión	42
Conclusiones	50
Perspectivas	51
Bibliografía	52

Lista de abreviaturas y acrónimos

GAPDH	gliceraldehído 3-P deshidrogenasa
HEPES	ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinaetanosulfónico
HRP	peroxidasa de rábano*
H ₂ O ₂	peróxido de hidrógeno
MAPK	MAP cinasas*
NOX	NADPH oxidasas
PAGE	electroforesis en gel de poliacrilamida*
PMSF	fluoruro de fenilmetilsulfonilo*
PVDF	polifluoruro de vinilideno*
RA	dominio de asociación a Ras*
ROS	especies reactivas del oxígeno*
rpm	revoluciones por minuto
SDS	dodecil sulfato de sodio*
SOD	superóxido dismutasa
Wt	cepa silvestre*

* según sus siglas en inglés

Índice de figuras

Figura 1. Ciclo de vida general de <i>Neurospora crassa</i> .	14
Figura 2. Estados morfogenéticos durante la diferenciación asexual de <i>N. crassa</i>	16
Figura 3. Conidiación cíclica de <i>ras-1^{bd}</i>	17
Figura 4. Reclutamiento cíclico de MAK-2 en la punta de los tubos de anastomosis de los conidios	20
Figura 5. Modelo teórico para explicar el papel de RAS-1 en el crecimiento y la diferenciación celular	22
Figura 6. Fosforilación de OS-2 en presencia de H ₂ O ₂ en las cepas Wt y <i>ras-1^{bd}</i>	31
Figura 7. Fosforilación de OS-2 durante las primeras dos transiciones morfogenéticas de la conidiación	32
Figura 8. Fosforilación de MAK-2 durante las primeras dos transiciones morfogenéticas de la conidiación	33
Figura 9. Valores promedio de la fosforilación de OS-2 en la cepa silvestre de los minutos 0-30	34
Figura 10. Valores promedio de la fosforilación de MAK-2 en la cepa silvestre de los minutos 0-30	35
Figura 11. Valores promedio de la fosforilación de OS-2 en la cepa silvestre de los minutos 60-210	36
Figura 12. Valores promedio de la fosforilación de MAK-2 en la cepa silvestre de los minutos 60-210	37
Figura 13. Valores promedio de la fosforilación de OS-2 en la cepa <i>ras-1^{bd}</i> de los minutos 0-30	38
Figura 14. Valores promedio de la fosforilación de MAK-2 en la cepa <i>ras-1^{bd}</i> de los minutos 0-30	39
Figura 15. Valores promedio de la fosforilación de OS-2 en la cepa <i>ras-1^{bd}</i> de los minutos 60-210	40
Figura 16. Valores promedio de la fosforilación de MAK-2 en la cepa <i>ras-1^{bd}</i> de los minutos 60-210	41

Índice de tablas

Tabla 1. Cepas de <i>Neurospora crassa</i> utilizadas en este proyecto y sus características	26
Tabla 2. Tendencia de la fosforilación de OS-2 y MAK-2 en la cepa silvestre	46
Tabla 3. Tendencia de la fosforilación de OS-2 y MAK-2 en la cepa <i>ras-1^{bd}</i>	47

Resumen

Neurospora crassa es un ascomiceto filamentoso de la familia Sordariaceae. Durante su ciclo de vida asexual pasa por tres transiciones morfogenéticas: de micelio en crecimiento a hifas adheridas, de hifas adheridas a micelio aéreo y de micelio aéreo a esporas asexuales (conidios). Previo a cada evento de diferenciación se ha detectado un aumento transitorio en los niveles de ROS (especies reactivas del oxígeno) denominado estado hiperoxidante tras el cual la célula se diferencia y vuelve a crecer (Hansberg & Aguirre, 1990). En el laboratorio se ha propuesto que la diferenciación celular es una respuesta al estrés oxidante, con cada transición morfogenética, la célula está más aislada del oxígeno ambiental y, una vez diferenciada, ésta puede volver a crecer. Aunque este fenómeno está descrito, aún no se han dilucidado los mecanismos que le indican a la célula cuándo es posible crecer y cuándo hay estrés y es necesario diferenciarse.

En el presente trabajo se exploraron las vías de MAP cinasas de MAK-2 y OS-2 como potenciales intermediarios en la transducción de estas señales. Dado que Ras está involucrada en la regulación del crecimiento, se encuentra río arriba de NOX que produce superóxido y podría interactuar físicamente con la vía de MAK-2, también se evaluó la fosforilación de estas proteínas en la cepa mutante *ras-1^{bd}*. Mediante inmunodetección se determinó que, durante el primer estado hiperoxidante (0-5 min de exposición al estrés oxidante) MAK-2, la vía asociada al crecimiento (Li, Bobrowicz, Wilkinson, & Ebbole, 2005; Pandey, Roca, Read, & Glass, 2004), se mantiene desfosforilada en la cepa Wt, mientras que OS-2, la vía asociada a respuesta a estrés (Noguchi *et al.*, 2007), presenta una fosforilación marcada. Esta correlación inversa es visible a grandes rasgos durante el resto del ensayo, que comprende el primer y segundo estado hiperoxidante y el comienzo de la formación del micelio aéreo. También se encontró que la fosforilación de OS-2 es más intensa y ocurre más rápido en *ras-1^{bd}* sugiriendo que la cepa es más sensible al estrés oxidante. Por otra parte, MAK-

2 se fosforila más y más rápido en la cepa Wt, sin embargo, en la mutante presenta una fosforilación sostenida del minuto 10 al 120 (después del primer estado hiperoxidante y antes del segundo).

Los resultados sugieren que durante el primer estado hiperoxidante hay una correlación negativa en la fosforilación de las MAP cinasas aunque después de este es difícil determinar con certeza si esta correlación existe en el segundo estado hiperoxidante debido a que, para este punto en el tiempo, las hifas se encuentran en distintas etapas del proceso de diferenciación y la acción de las MAP cinasas se encuentra desfasada.

Introducción

1. Las especies reactivas del oxígeno, su formación e importancia en el desarrollo celular.

Las especies reactivas del oxígeno (ROS por sus siglas en inglés) son aquellas que se forman por la excitación del oxígeno diatómico (O_2): oxígeno atómico (O), ozono (O_3), oxígeno singulete (1O_2); o por su reducción parcial: superóxido ($O_2^{\cdot -}$), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el radical hidroxilo (OH) (Hansberg 2007; Hansberg, 2008). El primer reporte de la producción de ROS en la cadena respiratoria se publicó en 1966 (Jensen, 1966; Murphy, 2009), posteriormente se demostró que las mitocondrias aisladas producen H_2O_2 (Loschen, Flohé, & Chance, 1971; Murphy, 2009) y, finalmente, se encontró que el H_2O_2 era generado por la dismutación del superóxido dentro de la mitocondria (Loschen, Azzi, Richter, & Flohé, 1974; Murphy, 2009). *Per se*, el superóxido y el H_2O_2 no son particularmente reactivos, ya que el superóxido sólo reacciona con otros radicales y el peróxido reacciona con el tiolato y también con algunos radicales, como el FeII. Así el superóxido reacciona con los centros Fe-S (fierro-azufre) de muchas enzimas, con lo que se libera el FeII y estas enzimas se inactivan. El FeII libre reacciona con el H_2O_2 produciendo el radical hidroxilo (o el ión ferrilo). Por otro lado, la luz en presencia de compuestos celulares coloridos (flavinas, porfirinas, quinonas, pterinas, cobalaminas) y el O_2 , forma el oxígeno singulete. El radical hidroxilo (o el ión ferrilo) y el oxígeno singulete son muy reactivos y pueden oxidar casi cualquier molécula celular y causar daño al DNA, inactivar proteínas y peroxidar los lípidos. Cuando la célula no puede contender con este daño, sobreviene la muerte celular. Para contrarrestar a las ROS, las células poseen varios mecanismos de defensa, que en conjunto constituyen la respuesta antioxidante. Los efectores más comunes de esta respuesta son las enzimas superóxido dismutasas, peroxirredoxinas, catalasas y peroxidasas, como la glutatión peroxidasa y la citocromo c peroxidasa. (Aguirre, Hansberg, & Navarro, 2006).

Aunque en ocasiones son dañinas, las ROS también se generan de manera deliberada y se han implicado en varios procesos celulares como el crecimiento, la apoptosis y la senescencia (Finkel, 2011). En las células de músculo liso de mamífero, la estimulación con el factor de crecimiento PDGF induce un aumento en el H_2O_2 intracelular que conlleva la fosforilación de algunas tirosinas. Este efecto puede a su vez ocurrir con la aplicación de una dosis no letal de H_2O_2 en ausencia de PGDF. En *Dictyostelium discoideum* el superóxido actúa como molécula de señalización para transitar del estado unicelular al de crecimiento multicelular durante la privación de nutrientes (Bloomfield & Pears, 2003), asimismo, las ROS también se asocian con el desarrollo de apresorios en *Alternaria alternata* durante la invasión de su hospedero (Shinogi, Suzuki, Kurihara, Narusaka, & Park, 2003).

Estas evidencias sugieren que las ROS sirven como moléculas señalizadoras, característica que se ha conservado en los distintos reinos celulares. Esto no es de sorprender dado que, por su naturaleza difundible, tanto el superóxido como el H_2O_2 son mensajeros ideales dentro de la célula. El H_2O_2 además puede atravesar la membrana plasmática, por lo que representa un efectivo mensajero intercelular (Takemoto, Tanaka, & Scott, 2007).

2. Las NADPH oxidasas como fuente de ROS en las células.

Además de la mitocondria durante la respiración, en las células existen enzimas que producen ROS, principalmente las NADPH oxidasas (NOX), las cuales forman superóxido a partir del NADPH y O_2 . Un ejemplo de estas enzimas es la Nox2, que ha sido ampliamente estudiada por su papel en la “explosión oxidativa” de los fagocitos de mamífero en respuesta a los patógenos microbianos (Takemoto *et al.*, 2007).

En los hongos filamentosos existen tres subfamilias de NOX (Aguirre, Ríos-Momberg, Hewitt, & Hansberg, 2005) que se asocian con distintos procesos de la diferenciación celular. Así la Nox1 (NoxA) regula la formación de los cuerpos fructíferos en *Aspergillus nidulans* (Lara-Ortíz, Riveros-Rosas, & Aguirre, 2003), la

formación de esclerocios en *Sclerotinia sclerotiorum* (Kim, Chen, Kabbage, & Dickman, 2011) y la formación de los tubos de anastomosis en las esporas asexuales (conidios) de *Botrytis cinerea* (Roca, Weichert, Siegmund, Tudzynski, & Fleissner, 2012). Nox2 (NoxB) se requiere para que el apresorio de *Magnaporthe grisea* pueda penetrar el tejido del huésped vegetal (Egan, Wang, Jones, Smirnoff, & Talbot, 2007) y también para la germinación de las esporas sexuales (ascosporas) en *Podospora anserina* (Malagnac, Lalucque, Lepère, & Silar, 2004). La Nox3 sólo está presente en algunos hongos pero aún se desconoce su función; en *P. anserina* tiene una función menor (Brun, Malagnac, Bidard, Lalucque, & Silar, 2009).

3. La diferenciación celular como respuesta al oxígeno.

Hansberg y Aguirre propusieron en 1990 que los estados hiperoxidantes causan la diferenciación celular y que ésta es una manera de la célula para contender con el estrés oxidante evadiendo el oxígeno ambiental. El estado hiperoxidante es una condición en la que la formación de las ROS en la célula es mayor a su capacidad para neutralizarlas (Hansberg & Aguirre, 1990). Esta hipótesis se basó originalmente en la detección de moléculas oxidadas, como el NAD(P)H y el glutatión, las enzimas glutamina sintetasa y glutamato deshidrogenasa y otras proteínas el inicio de cada transición morfogénica durante la diferenciación asexual de *Neurospora crassa* (Aguirre & Hansberg, 1986; Aguirre, Rodríguez, & Hansberg, 1989; Toledo, Noronha-Dutra, & Hansberg, 1991; Toledo & Hansberg, 1990). Según esta idea, el crecimiento y el estado diferenciado son condiciones estables en las que se mantienen niveles bajos de ROS intracelulares porque existe un balance entre su producción y su eliminación. El cambio de un estado a otro se da cuando ocurre un aumento transitorio en la concentración de las ROS, ya sea por causas endógenas o exógenas. Este estado transitorio es el estado hiperoxidante que, a su vez, induce la producción de enzimas antioxidantes. De esta manera, si la célula es capaz de contrarrestar el estado hiperoxidante, pasa al estado diferenciado donde puede volver a crecer, en caso contrario muere. Conforme pasa de un estado diferenciado a otro, siempre a través de un estado hiperoxidante, la célula se va aislando cada vez más del oxígeno ambiental y de los nutrimentos del

medio y llega un estado diferenciado en el cual ya no puede crecer. El regreso al crecimiento o proceso de germinación ocurre cuando se rompen las barreras que aíslan a la célula del medio ambiente y el agua con oxígeno entra en ella, produciendo un estado hiperoxidante que se resuelve cuando hay nutrimentos que la célula puede utilizar para reducir el oxígeno y de esta manera contender con el estrés oxidante e iniciar el crecimiento celular (Aguirre *et al.*, 2005; Hansberg & Aguirre, 1990; Hansberg *et al.*, 2008).

4. *N. crassa* como modelo experimental.

N. crassa es un hongo ascomiceto filamentoso de la familia Sordariaceae. Es heterotálico -tiene dos tipos sexuales- y su ciclo de vida presenta una fase sexual y asexual (fig. 1). En el ciclo asexual el micelio se genera a partir de los conidios, los cuales pueden contener uno o más núcleos (micro y macroconidios respectivamente). En condiciones adecuadas los conidios germinan y forman filamentos que crecen en las puntas. Cuando el medio no es propicio para el crecimiento, el hongo genera conidios que le permiten dispersarse y germinar en nuevos sustratos.

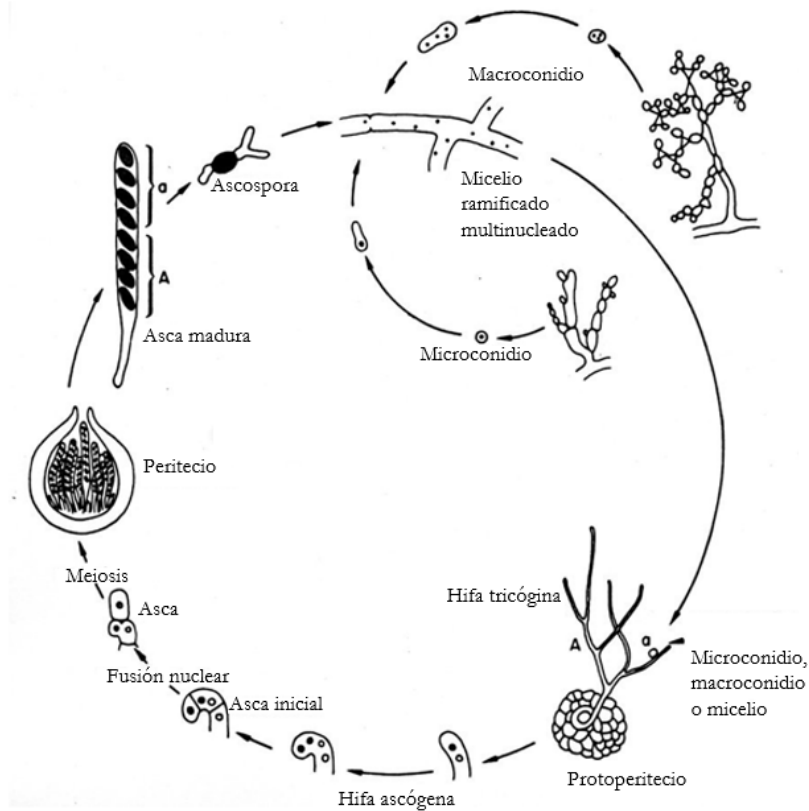


Fig. 1. Ciclo de vida general de *N. crassa*. A partir de un micelio en crecimiento se puede desencadenar la fase sexual o asexual. En la fase sexual el micelio genera al protoperitecio de donde emerge una hifa tricógina, que incorpora núcleos de conidios o de micelio del otro tipo sexual. Estos núcleos migran al interior del protoperitecio donde se forma una hifa ascógena en la cual coexisten dos núcleos, uno de cada tipo sexual. Cuando un núcleo de cada tipo sexual se aparta en un compartimento específico (crozier) se forma el asca inicial en el cual los núcleos se fusionan. Después de las dos divisiones meióticas y una mitosis subsiguiente el asca contiene ocho ascosporas. Las ascosporas maduras contienen muchos núcleos que provienen de uno solo, producto de la meiosis. Estas esporas sexuales salen disparadas del peritecio y después de un proceso de activación germinan para formar un micelio.

Modificado de (Griffiths & Raju, 2004).

N. crassa es haploide durante el ciclo asexual y sólo previo a la meiosis se forma una célula diploide. El hongo tiene siete cromosomas que contienen un genoma de 43 Mb y cerca de 10 mil genes (*Neurospora* Genome Basics, FGSC 2016) . Por su ciclo de vida sencillo y fácil manejo en el laboratorio, *N. crassa* es utilizado frecuentemente como organismo modelo de hongo filamentoso.

5. La formación de conidios en *N. crassa* en respuesta a las ROS.

Con el objetivo de entender la diferenciación celular, se utiliza el proceso de formación de los conidios de *N. crassa* como modelo experimental. Para inducir la conidiación, el hongo se hace crecer en medio líquido y, estando en la fase de crecimiento exponencial el cultivo, se filtra y la masa micelial resultante se expone al aire. Esta exposición es suficiente para iniciar el proceso de conidiación.

Para formar conidios el hongo debe pasar por tres etapas: la primera, durante los primeros 40 minutos las hifas en contacto directo con el aire se adhieren entre ellas mediante la secreción de carbohidratos (Hansberg *et al.*, 2008); posteriormente, entre las 2.5 y 12 horas de exposición se forma el micelio aéreo a partir de las hifas adheridas y, por último, entre las 8.5 y las 15 h de exposición al aire, en las puntas del micelio aéreo se forman los conidios (Toledo, Aguirre, & Hansberg, 1986). Previo a cada uno de estos cambios se registra en la célula un estado hiperoxidante (Toledo, Rangel, & Hansberg, 1995): al exponer el micelio al aire durante los primeros 5 minutos el cual se compensa con la adhesión de las hifas; luego a las 1.5 - 2 h de exposición se genera un nuevo estado hiperoxidante que se soluciona con la formación del micelio aéreo y finalmente, en el micelio aéreo, entre las 6.5 y las 8.5 h de exposición al aire el estado hiperoxidante se resuelve con la formación de los conidios (fig. 2).

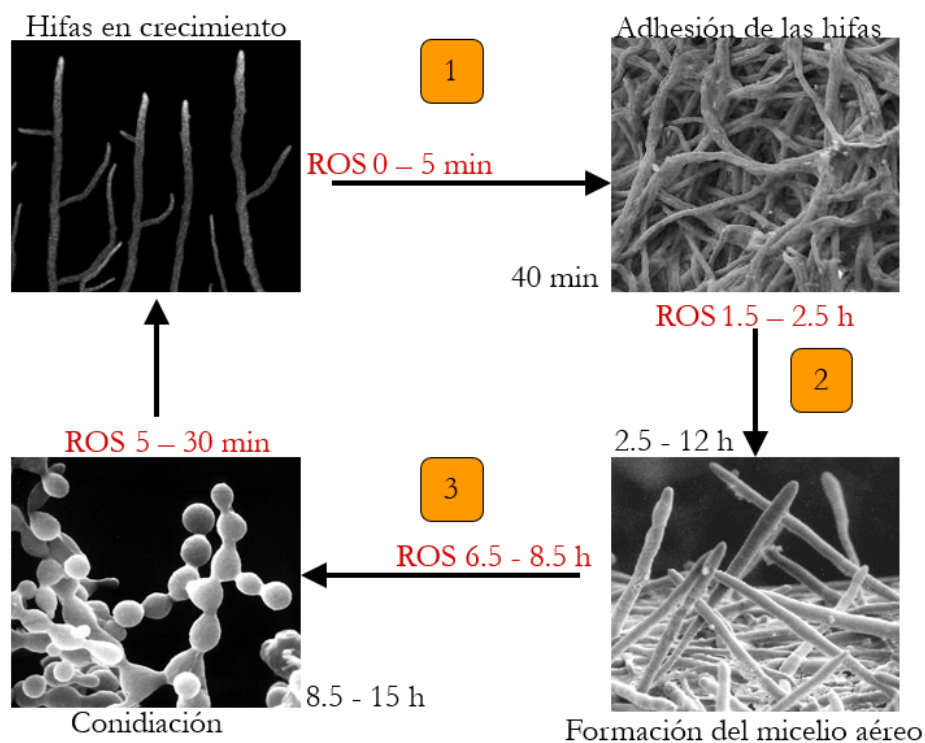


Fig. 2. Estados morfológicos durante la diferenciación asexual de *N. crassa*. Se muestra el tiempo en el que se forma cada estructura: hifas en crecimiento, hifas adheridas, micelio aéreo y formación de los conidios. En rojo se marca el tiempo durante el cual aumentan los niveles de ROS en la célula y en negro el periodo en el cual ocurre la diferenciación.

6. Las ROS pueden activar a la proteína Ras.

Las ROS pueden activar a la proteína Ras mediante la oxidación de alguna de sus cisteínas (Heo & Campbell, 2005). Las proteínas Ras son GTPasas pequeñas que fluctúan entre un estado inactivo (unidas a GDP) y uno activo (unidas a GTP) y es la forma activa la que interactúa con los efectores río abajo. Aunque las proteínas Ras presentan actividad de disociación de nucleótidos de guanina y de GTPasa, las tasas son bajas y por ello requieren de otros factores para poder transitar entre su estado de unión a GDP (inactivo)/GTP (activo). Para inactivar a Ras es necesaria una proteína GAP (GTPase activating protein) que estimula la actividad de GTPasa de Ras. Por otra parte, para su activación, se requiere de una proteína GEF (guanine nucleotide

exchange factor) para que Ras pierda afinidad por el GDP unido y se una con mayor afinidad el GTP. Ras presenta una cisteína que es oxidable en presencia de metales de transición y de H₂O₂, lo cual facilita la disociación de Ras-GDP (Heo & Campbell, 2006).

Para interactuar directamente con Ras, las proteínas requieren tener un dominio de asociación a Ras. En el genoma de *N. crassa* las únicas proteínas que presentan ese dominio son NRC-1 y STE-50 de la vía de MAK-2 y la adenilato ciclasa (fig.5). En el hongo *Colletotrichum trifolii*, la Rho GTPasa Rac es un elemento río abajo de Ras en una cadena de transducción de señales. Mediante Rac, Ras puede regular la morfogénesis de las hifas a través de dos vías paralelas: por la vía de MAK-2 y por la producción de ROS (Chen & Dickman, 2004). A su vez, las ROS activan la vía de respuesta al estrés OS-2 (Morigasaki, Shimada, Ikner, Yanagida, & Shiozaki, 2008; Ushio-Fukai, Alexander, Akers, & Griendling, 1998).

7. La conidiación cíclica en la cepa mutante *ras-1^{bd}*.

Existe una cepa mutante de RAS-1 conocida como *ras-1^{bd}* que posee la mutación puntual T79I (Belden *et al.*, 2007). La presencia de este alelo confiere un fenotipo que permite apreciar un patrón de conidiación rítmica. Este ritmo de crecimiento y conidiación se ha utilizado como modelo de un ritmo circadiano ya que, en las condiciones utilizadas (un medio de cultivo determinado, en agar, a 25 °C, en oscuridad y con aire restringido), el tiempo de un ciclo de crecimiento y conidiación (periodo) dura 22 h y este ciclo se mantiene en oscuridad continua.



Fig. 3. Conidiación cíclica de *ras-1^{bd}*. Cultivos en pista de la mutante *ras-1^{bd}* (arriba) y la cepa silvestre (abajo). El cultivo inicia en el extremo izquierdo y crece hacia la derecha. Las partes blancas corresponden a

las secciones donde el hongo está conidiando, en *ras-1^{bd}* cada 22 horas; en la cepa silvestre la conidiación ocurre en las partes más viejas (al inicio del cultivo, extremo izquierdo de la imagen). Modificada de (Belden *et al.*, 2007).

La mutante presenta un leve incremento en la tasa de intercambio GDP/GTP y un aumento en la transcripción de genes involucrados en el desarrollo asexual (Belden *et al.*, 2007), y en ella el factor de transcripción fluffy, necesario y suficiente para el desarrollo asexual (Bailey-Shrode & Ebbole, 2004) se expresa de manera periódica (Correa & Bell-Pedersen, 2002). Aunque este fenotipo se asocia con un ciclo circadiano, la adición al cultivo de un agente antioxidante, como la N-acetil cisteína, alarga el ciclo e incluso lo inhibe, mientras que la adición de un agente oxidante, como la menadiona o el Paraquat, lo acorta. A su vez, la cepa mutante nula de la superóxido dismutasa también presenta un fenotipo de conidiación periódica similar a *ras-1^{bd}* y reacciona de la misma manera a los agentes oxidantes y antioxidantes (Belden *et al.*, 2007; Chávez Canales, 2010; Yoshida, Maeda, Lee, & Hasunuma, 2008). Estas evidencias en conjunto sugieren que el estrés oxidante es determinante para regular la conidiación cíclica.

8. Las vías de MAP cinasas en *N. crassa*.

Las MAP cinasas (Mitogen Activated Protein kinases) son cinasas de serina/treonina involucradas en la transducción de señales. Estas vías están conservadas en una gran variedad de procesos fisiológicos de distintos organismos eucariontes (Cargnello & Roux, 2011). Las vías de MAP cinasas convencionales están compuestas por un conjunto de tres proteínas que actúan de manera secuencial: una cinasa de MAP2K (MAP3K) fosforila a una cinasa de MAPK (MAP2K) y ésta a la vez a una MAP cinasa (MAPK). La MAPK fosforilada puede actuar de dos maneras: entrar directamente al núcleo y promover la transcripción de genes o fosforilar a un factor de transcripción que promueva la activación de la transcripción de los genes blanco.

En *N. crassa* se han identificado tres de estas vías, que tienen ortólogos en levaduras y se considera que son equivalentes a las vías de integridad de la pared celular (CWI), la respuesta a feromonas (PR) y la osmorreguladora (OS) (Lichius *et al.*, 2012). En *N. crassa* se conocen como las vías de MAK-1, MAK-2 y OS-2 respectivamente.

9. La vía de MAK-2.

La vía de MAK-2 está conformada por la MAP3K, NRC-1; la MAP2K, MEK-2; y la MAPK, MAK-2; río abajo de esta vía se encuentra el factor de transcripción PP-1 (homólogo a Ste12p en levaduras). Esta vía juega un papel esencial en el desarrollo del hongo. Durante la anastomosis de los tubos germinales (CATs), que ocurre cuando los conidios se hacen germinar a una densidad alta, participa un mecanismo de reconocimiento celular que involucra a las MAPK y que se le conoce como “mecanismo ping-pong” o “diálogo celular”. Los conidios se reconocen y cada uno forma un tubo de anastomosis que crece el uno hacia el otro, indicando que ambas células reciben y responden a una señal. La respuesta involucra la concentración alternada de MAK-2 y la proteína SO en las puntas de los tubos germinales interactuantes. Cada fase dura entre 6 y 12 minutos y la acumulación de una u otra proteína ocurre en antifase en las puntas de los tubos de anastomosis que van a fusionarse (Fleissner, Leeder, Roca, Read, & Glass, 2009), sugiriendo que el comportamiento celular es coordinado previo al contacto físico y a distancia (Fleissner & Herzog, 2016) (fig. 4). El diálogo celular ocurre tanto en colonias maduras donde se fusionan las hifas crecidas como en la fusión de las germínulas, indicando que ambos procesos utilizan el mismo mecanismo (Dettmann, Heilig, Valerius, Ludwig, & Seiler, 2014; Fleissner & Herzog, 2016; Jonkers *et al.*, 2014). En la fusión de los tubos de anastomosis, MAK-2 se acumula en la punta de la hifa de manera oscilatoria y también alrededor del poro de fusión y dentro del núcleo (Fleissner *et al.*, 2009). Estas tres ubicaciones indican que MAK-2 actúa de tres maneras distintas durante la fusión celular. La acumulación en la punta del tubo la lleva a la membrana plasmática y, dado que la activación de las MAP cinasas ocurre comúnmente en la membrana, es

probable que esta concentración lleve a su activación (Lamson, Takahashi, Winters, & Pryciak, 2006). Aunque las señales y los receptores que median la interacción aún no se han esclarecido, sí se han identificado algunos factores que activan a la vía de MAK-2. Estos son STE-20, RAS-2 y CAP-1 del complejo de la adenilato ciclasa (Dettmann *et al.*, 2014). Dado que NRC-1, la MAP3K de esta vía, presenta un dominio de asociación a Ras, no se descarta que también pueda ser activada por RAS-1. A su vez, para que NRC-1 y Ras interactúen es necesaria una tercera proteína, STE-50, que también tiene un dominio de asociación a Ras y que funciona como proteína de acoplamiento (Dettmann *et al.*, 2014).

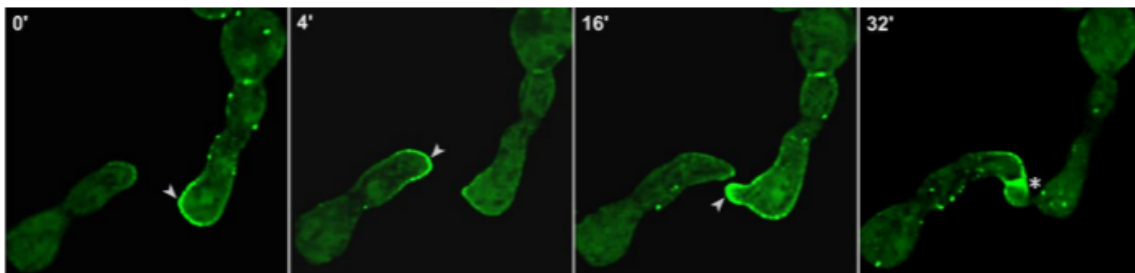


Fig. 4. Reclutamiento cíclico de MAK-2 en la punta de los tubos de anastomosis de los conidios. Se etiquetó MAK-2 con GFP. Se observa su reclutamiento en las puntas, del minuto 0 al 32, mientras los tubos crecen uno hacia el otro (flechas) y su acumulación en el poro de fusión (asterisco). Modificada de (Fleissner & Herzog, 2016).

Las mutantes de cualquiera de las cinasas de la vía son incapaces de fusionar sus hifas y carecen de tropismo positivo hacia ellas mismas (Bailey-Shrode & Ebbole, 2004; Heo & Campbell, 2005; Yoshida, Maeda, Lee & Hasunuma, 2008). También presentan una disminución en la tasa de crecimiento y no forman hifas tricóginas, que son esenciales para la reproducción sexual (Lichius *et al.*, 2012). Aunque todas las mutantes de MAP cinasas en *N. crassa* son incapaces de formar cuerpos fructíferos y, por lo tanto, son estériles femeninas, las mutantes de la vía de MAK-2 progresan más que las mutantes de las otras vías en la formación

del protoperitecio. Es importante mencionar que las mutantes de esta vía generan conidios durante el crecimiento (Li, Bobrowicz, Wilkinson, & Ebbole, 2005; Pandey, Roca, Read, & Glass, 2004), fenómeno que no ocurre en la cepa silvestre, y además el crecimiento del micelio aéreo está severamente afectado. Las cepa mutante $\Delta pp-1$ presenta desregulación en los genes relacionados con la fusión incluyendo *nox-1* y *nor-1*, *so* y los componentes de la vía de integridad de pared celular (Fleissner & Herzog, 2016).

10. La vía de OS-2.

La vía de OS-2 controla la respuesta a estrés osmótico, oxidante y calórico (Chen & Dickman, 2004; Morigasaki *et al.*, 2008). En *N. crassa* estas señales se transducen por la cinasa de histidina OS-1 al regulador de respuesta RRG-1 y de éste a la MAP3K OS-4, que activa a la MAP2K OS-5 y subsecuentemente a la MAPK OS-2 (Banno *et al.*, 2007). En *Schizosaccharomyces pombe*, la vía ortóloga se puede activar mediante la oxidación de la gliceraldehido 3-P deshidrogenasa (GAPDH) que promueve la interacción entre la MAP3K y el sistema de dos componentes (Morigasaki *et al.*, 2008). Las cepas $\Delta os-2$ son incapaces de crecer en medio hipertónico y son resistentes a los fungicidas de fenilpirrol (Maerz *et al.*, 2008). También se ha reportado lisis e hiperpigmentación de los conidios y esterilidad femenina (Noguchi *et al.*, 2007). En el patógeno *Botrytis cinerea* la vía ortóloga está relacionada con la diferenciación asexual y la patogenicidad (Segmüller, Ellendorf, Tudzynski, & Tudzynski, 2007). En contraste con la vía de HOG en las levaduras, que depende de dos sensores río arriba (la cinasa de histidina transmembranal Sln1p y una cinasa osmosensora de siete dominios transmembranales) (Li, Bobrowicz, Wilkinson, & Ebbole, 2005; Maerz *et al.*, 2008), la activación de esta vía en *N. crassa* depende únicamente de un sistema de dos componentes (Noguchi *et al.*, 2007).

La vía de OS-2 promueve la transcripción de *gcy-1* (glicerol deshidrogenasa), la *cat-1* (catalasa 1), *bli-3* (*blue light induced 3*), *ccg-1* y *9* (*clock controled genes 1* y *9*), *fbp-1* y *pck-1* (enzimas esenciales en la gluconeogénesis) y el factor de transcripción ATF-1 el cual es fundamental en la sobrevivencia de los conidios (Yamashita *et al.*, 2008).

11. Modelo propuesto sobre la regulación de los procesos de crecimiento/diferenciación.

En el presente proyecto nos interesa entender cómo se regula la inhibición del crecimiento (durante el estado hiperoxidante) y cómo, una vez que ocurre la transición morfogénica, se reanuda el crecimiento en el estado diferenciado. Para intentar explicar este fenómeno, en el laboratorio se propuso un modelo en donde RAS-1 es el interruptor del crecimiento/diferenciación mediante las vías de transducción de señales de MAK-2 (Erk, en mamíferos), OS-2 (p38, en mamíferos) y la adenilato ciclasa.

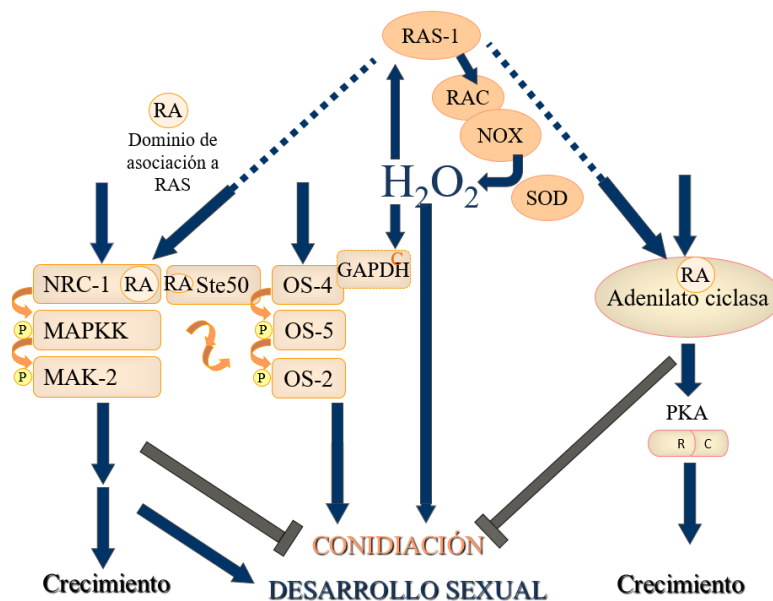


Fig. 5. Modelo teórico para explicar el papel de RAS-1 en el crecimiento y la diferenciación celular. Se propone a RAS-1 como orquestador del crecimiento y la diferenciación mediante tres posibles efectores: las MAP cinasas MAK-2 y OS-2 y la adenilato ciclasa. RAS-1 se activa mediante una señal río arriba y activa a RAC, conocido regulador de la NOX. La NOX produce superóxido que es dismutado a H_2O_2 por la enzima superóxido dismutasa. El H_2O_2 genera estrés oxidante en la célula y también podría activar a RAS-1 que activaría a la NOX, generando así un asa de retroalimentación positiva. El estrés oxidante activa a la vía de OS-2 que promueve la conidiación. Esta activación puede ser mediante la forma oxidada de la GAPDH, como en *S. pombe* (Morigasaki *et al.*, 2008), o por otra manera aún no descrita. RAS-1 también activa tanto a la vía de MAK-2

como a la adenilato ciclasa, ambas asociadas con el crecimiento y MAK-2 también relacionada con el desarrollo sexual.

Dada la posibilidad de que RAS-1 juegue un papel fundamental en la regulación del crecimiento y la diferenciación a través de las vías de MAK-2 y de OS-2, se evaluó la activación de estas vías no solamente en la cepa silvestre sino también en la cepa mutante *ras-1^{bd}* y se compararon los resultados de ambas cepas.

Hipótesis

Ante una tensión oxidante se debe activar la vía de OS-2. Una vez resuelto el estrés oxidante, la célula podrá crecer nuevamente con la desactivación de OS-2 y la activación de MAK-2.

Objetivo general

Analizar la activación de las vías de OS-2 y de MAK-2 durante las dos primeras transiciones morfológicas del proceso de conidiación en *N. crassa*.

Objetivos específicos

Determinar la fosforilación de OS-2 al añadir H₂O₂ a un micelio en crecimiento.

Determinar mediante inmunodetección la fosforilación de MAK-2 y de OS-2 en la cepa silvestre y en la cepa *ras-1^{bd}* durante las primeras 3.5 horas de exposición del micelio al aire que corresponden a la diferenciación del micelio adherido y del micelio aéreo durante la conidiación del hongo.

Materiales y métodos

- Cepas utilizadas:

N. crassa

Tabla 1. Cepas de *N. crassa* utilizadas en este proyecto y sus características. Las cepas se obtuvieron del Fungal Genetics Stock Center.

Gen	Fenotipo	Efectores conocidos y genes blanco
No aplica	Silvestre (cepa 74-OR231A)	-
NCU07024	Mutante de OS-2. Resistente a fungicidas de fenilpirrol. Incapaz de crecer en medio hipertónico. Pigmentación incrementada de macroconidios. Lisis de las hifas. Estéril femenino por incapacidad de producción de protoperitecios (Lichius <i>et al.</i> , 2012) y porque sus hifas no se fusionan entre ellas (Maerz <i>et al.</i> , 2008).	Uno de sus efectores es ATF-1 (Yamashita <i>et al.</i> , 2008). Promueve la expresión de genes de la síntesis del glicerol (<i>gcy-1</i> , <i>gcy-3</i> , y <i>dak-1</i>), de la gluconeogénesis (<i>fbp-1</i> and <i>pck-1</i>) (Noguchi <i>et al.</i> , 2007), <i>cat-1</i> , <i>bli-3</i> , <i>cvg-1</i> y <i>cvg-9</i> (Yamashita <i>et al.</i> , 2008).
NCU02393	Mutante de MAK-2. Crecimiento disminuido. Estéril femenino por ausencia de protoperitecios, poco crecimiento del micelio aéreo, forma conidios durante el crecimiento en un medio líquido y sus hifas no se fusionan (Li <i>et al.</i> , 2005;	A través de su efector PP-1 induce la expresión de: <i>ham-7</i> , <i>ham-11</i> , <i>ham-12</i> y malato deshidrogenasa (Leeder, Jonkers, Li, & Louise Glass, 2013).

Pandey *et al.*, 2004). Menor producción de conidios (Borkovich *et al.*, 2004).

NCU08823 *ras-1^{bd}*. Mutación puntual T79I en la zona de switch II. Conidiación incrementada. Conidiación cíclica cada aprox. 22 h. En presencia de estrés oxidante la germinación de conidios disminuye comparado a la cepa silvestre. La conidiación cíclica se puede inducir en la cepa silvestre en presencia de menadiona y esta misma en *ras-1^{bd}* acorta el periodo de conidiación. La presencia de N-acetilcisteína inhibe el fenotipo de bandeo (Belden *et al.*, 2007). El Paraquat también acorta el periodo de bandeo (Chávez Canales, 2010).

WC-1 es uno de sus blancos directos. Esta cepa presenta: Ligera reducción de la expresión de *sod-1* y *cat-3*. Aumento en la expresión de *fluffy* y otros genes “clock controlled”. Incremento en la transcripción de genes cuyos productos controlan el desarrollo asexual (Belden *et al.*, 2007).

Saccharomyces cerevisiae

BY4741 MATa *his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0* derivada de S288C. Cepa parental utilizada para el proyecto internacional de disrupción sistemática de genes de *S. cerevisiae*.

- Generación de conidios de *N. crassa*:

Para generar nuevos conidios, se inocularon 1×10^6 conidios en 100 ml de medio sólido Vogel-sacarosa-agar (1.5% sacarosa como fuente de carbono y 2% sales de Vogel) en un matraz de 500 ml con tapón de algodón para permitir el paso del aire. Se incubaron a 25°C en la oscuridad por tres días y subsecuentemente se

incubaron en presencia de luz a 30°C por dos días (Davis & de Serres, 1970). Los conidios se recuperaron mediante agitación con agua estéril a 4°C y filtración a través de un embudo con gasa doble; la suspensión de conidios se guardó en tubos Eppendorf de 1.5 ml y se almacenaron a -70°C.

- Crecimiento de *N. crassa*:

Se inocularon 1×10^6 conidios de *N. crassa* por ml de medio líquido Vogel-sacarosa y se cultivan a 30°C con agitación circular de 200 rpm durante 12 horas (fase exponencial del crecimiento). En el caso de las cepas mutantes de OS-2, MAK 2 y *ras-1^{bd}* la incubación se realizó por 15 horas debido a que presentan un crecimiento disminuido en comparación a la cepa Wt.

- Ensayo de exposición al estrés oxidante:

Se filtraron 15 ml del cultivo de micelio en crecimiento exponencial en un embudo Büchner con papel filtro Whatman No. 4 (GE Healthcare, Reino Unido) con una bomba de vacío y la masa micelial resultante se expuso al aire (estrés oxidante) durante los tiempos indicados. Posteriormente se recolectó el micelio expuesto y se empacó en un trozo de papel aluminio para congelarlo en nitrógeno líquido.

- Extracción de proteínas totales del micelio:

Al terminar el tiempo de exposición la muestra se congeló en nitrógeno líquido y posteriormente se molió en presencia de este último hasta obtener un polvo fino. El micelio pulverizado se precipitó en 2 ml de acetona 100% a -20°C y se dejó reposar una hora en frío. Para quitar la acetona se centrifugó a 7500 rpm/10 min/4°C y se decantó el sobrenadante. Para eliminar la acetona restante, la muestra se liofilizó durante una hora. Las proteínas se extrajeron con buffer de extracción: HEPES 50 mM pH 7.5, EDTA 2 mM, EGTA 2 mM, glicerol 10%, NaCl 100 mM, PMSF 1 mM, coctel de inhibidor de proteasas SigmaFAST a concentración 1x (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.).

- Cuantificación de proteínas:

Se cuantificó la cantidad de proteínas totales en los extractos de las muestras mediante el método del ácido bicinonínico (Thermo Scientific, Rockford, EE.UU.) y se midió la absorbencia de la muestra a 562 nm en un espectrofotómetro (Beckman DU 650, EE.UU.).

- Preparación de muestras para SDS-PAGE:

Se prepararon muestras con 1 µg de proteína/µl en un buffer de carga compuesto por 100 mM Tris-HCl pH 6.8, 4% SDS, 0.2% azul de bromofenol, 20% glicerol y 200 mM de β-mercaptoetanol.

- Preparación de muestras de *S. cerevisiae*:

Se tomó una colonia de *S. cerevisiae* y se incubó en 5 ml de medio YPD (glucosa 2%, extracto de levadura 1%, peptona 2%) a 30°C en agitación toda la noche. Se midió la densidad óptica del cultivo a 600 nm (Beckman DU 650, EE.UU.) y se calculó la concentración de cultivo necesaria para generar un inóculo de densidad óptica de 0.5, el cual se incubó 3 horas a 30°C en agitación hasta llegar a 1.5 de densidad óptica. Este inóculo se dividió en dos muestras, una que permaneció sin ser estresada y otra que fue estresada con un estímulo de 0.8 M NaCl durante cinco minutos. Posteriormente ambas muestras se fijaron con 300 µl de ácido tricloroacético (Sigma Aldrich) por cada ml de cultivo y se dejó precipitar por cinco minutos, después se centrifugaron las muestras a 13 mil rpm por cinco minutos, se decantó el sobrenadante y la pastilla se resuspendió con 1 ml de agua estéril y se volvió a centrifugar en las mismas condiciones. Se decantó el sobrenadante y a la pastilla se agregó 100 µl de buffer de lisis (Tris 62.5 M pH 6.8, SDS 2%, DTT 50 mM, glicerol 10% y azul de bromofenol 1%). Para romper las células se agregaron perlas de vidrio estériles a cada muestra, las cuales se agitaron en por cinco minutos y luego se eliminó por filtración la fase líquida. Las muestras se calentaron a 95°C por cinco minutos y se almacenaron a -20°C.

- Inmunodetección:

Las muestras se sometieron a SDS-PAGE en un gel al 12%. Para la determinación de OS-2 se cargaron 10 μg de proteína total por carril; para MAK-2 se cargaron 15 μg de proteína total por carril. Las proteínas se transfirieron a una membrana de PVDF (Immobilon-P transfer membrane, Merck Millipore Corporation Billerica MA, EE.UU.) por 40 min a 25 volts. Para comprobar que las proteínas se transfirieran adecuadamente la membrana se tiñó con rojo Ponceau (Sigma Aldrich). La membrana se bloqueó en una solución de albúmina sérica bovina al 3% durante 30 minutos y después se incubó con el anticuerpo. Para OS-2 se usaron los anticuerpos anti fosfo p38 (Cell Signalling Technology) y anti Hog1p (Santa Cruz Biotechnology) ambos a una dilución de 1:1500; para MAK-2 se utilizó anti fosfo p44/42 y anti p44/42 (Cell Signalling Technology), ambos a una dilución de 1:1500. En todos los casos se utilizó como anticuerpo secundario anti conejo IgG conjugado con HRP (Promega) a una dilución de 1:3000 para OS-2 y de 1:2000 para MAK-2. Para revelar la placa fotográfica se usó el sustrato Immobilon chemiluminiscent de HRP (Merck Millipore Corporation) según las especificaciones del fabricante. Para detectar la luminiscencia de las muestras de OS-2 se usaron las placas Carestream Medical X-ray film general purpose blue (Kodak) y para las muestras de MAK-2 se utilizó el fotodocumentador LI-COR. Para desnudar la membrana se hicieron dos lavados de glicina 100 mM pH 2.5 y dos en TBS 1x con tween 0.01% por 10 minutos cada uno.

- Cuantificación de la densidad de pixeles:

Para cuantificar la densidad de pixeles en las bandas, se escanearon las placas fotográficas (HP Scanjet G4050) y la imagen se guardó en formato Tiff. Se utilizó el software ImageJ (NIH, Bethesda, MD. EE.UU. dominio público) para obtener y procesar los datos.

Resultados

1. Fosforilación de OS-2 en presencia de estrés oxidante

Para determinar si el estrés oxidante activa a la vía de OS-2, se agregó 10 mM de H₂O₂ a un micelio en crecimiento y se verificó mediante inmunodetección la fosforilación de esta proteína después de diez minutos de exposición en la cepa Wt y *ras-1^{bd}* (fig. 6). La exposición al H₂O₂ desencadenó una marcada fosforilación de OS-2 en las células tratadas que contrasta con el estado no fosforilado de las células en crecimiento (sin estrés). Asimismo, se detecta la Hog1p fosforilada en la levadura tratada con estrés osmótico (como control positivo).

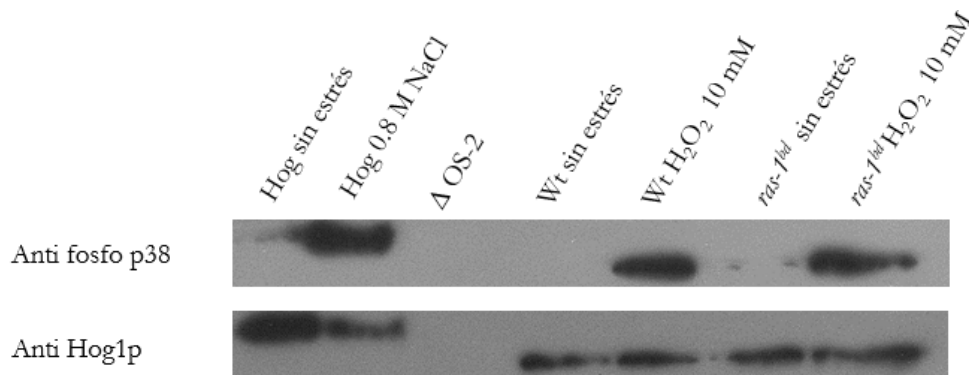


Fig. 6. Fosforilación de OS-2 en presencia de H₂O₂ en las cepas Wt y *ras-1^{bd}*. El micelio en crecimiento se trató con 10 mM de H₂O₂ durante 10 min. En el panel superior se muestra la detección de la proteína OS-2 fosforilada y en el panel inferior se muestra la proteína OS-2 total. Como control negativo se utilizó la cepa mutante $\Delta os-2$ y como control positivo se detectó a Hog1p proveniente de cultivos de levadura, uno en crecimiento y otro sometido a estrés osmótico con 0.8 M de NaCl por cinco min.

A continuación, se evaluó el comportamiento de esta MAP cinasa durante los dos primeros procesos de diferenciación celular, la adhesión de las hifas (0 – 30 min de exposición del micelio al aire) y el inicio del desarrollo del micelio aéreo (60 - 210 min), dos fases de la conidiación (de cero a 210 minutos de exposición al aire). También se determinó la fosforilación de MAK-2.

1.1 Fosforilación de OS-2 y MAK-2 en la cepa silvestre y en *ras-1^{bd}*

Se muestran las inmunodetecciones representativas de los ensayos realizados para obtener los datos de la proteína OS-2 y MAK-2 en la cepa silvestre y en la cepa mutante *ras-1^{bd}* (fig. 7, 8). Como controles para OS-2 se utilizaron muestras de *S. cerevisiae* sin estrés, sometida a 0.8 M de NaCl y la mutante nula de OS-2 de *N. crassa*. Para la MAK-2, los controles fueron extractos celulares de p44/42 sin fosforilar y fosforilado y la mutante nula de MAK-2 de *N. crassa*. De manera interesante, en el caso de OS-2 fosforilado en la cepa *ras-1^{bd}* se observó una doble banda durante los primeros minutos de exposición al aire de aproximadamente 45 kDa.

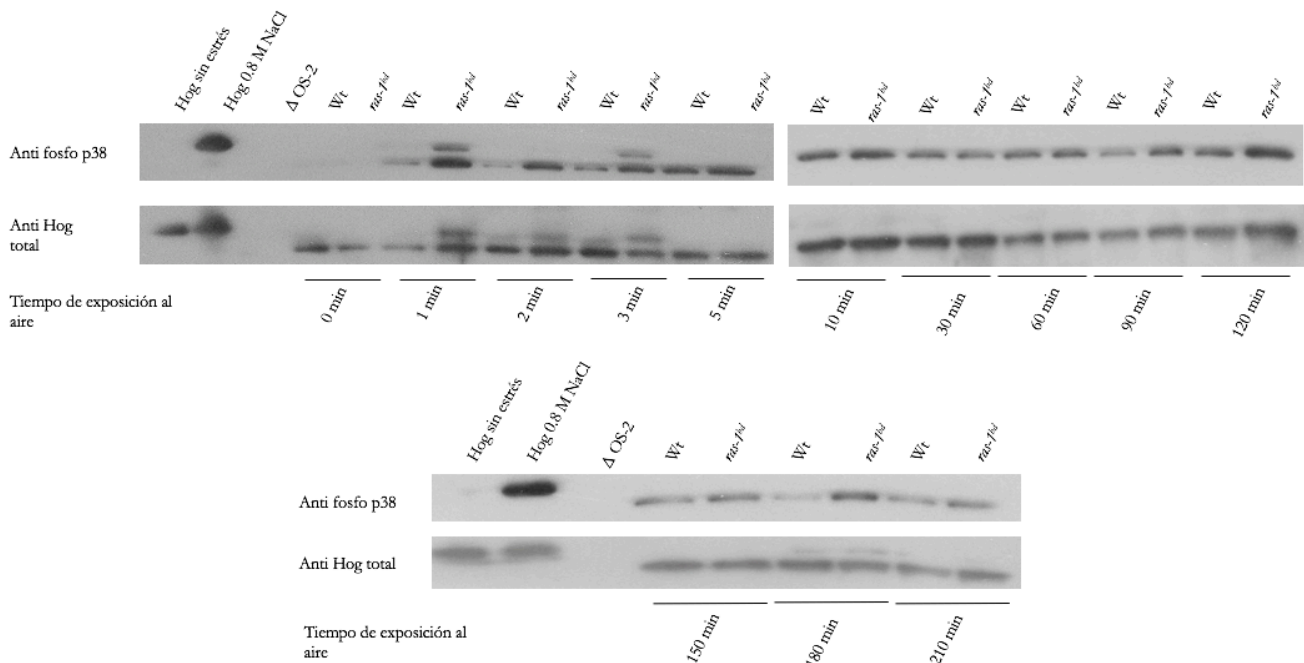


Fig. 7. Fosforilación de OS-2 durante las primeras dos transiciones morfogénicas de la conidiación. Se muestra una inmunodetección representativa. El panel superior corresponde a la OS-2 fosforilada

(detectada con el anticuerpo anti fosfo p38) y el inferior a la OS-2 total (detectada con anti Hog1p). Es notable que la fosforilación de OS-2 oscila a lo largo del tiempo y su intensidad es distinta en la cepa Wt y *ras-1^{bd}*. Las muestras de Hog1p sin estrés y con 0.8 M de NaCl provienen de *S. cerevisiae* y sirven como control negativo y positivo, respectivamente. La cepa $\Delta os-2$ también se utilizó como control negativo.

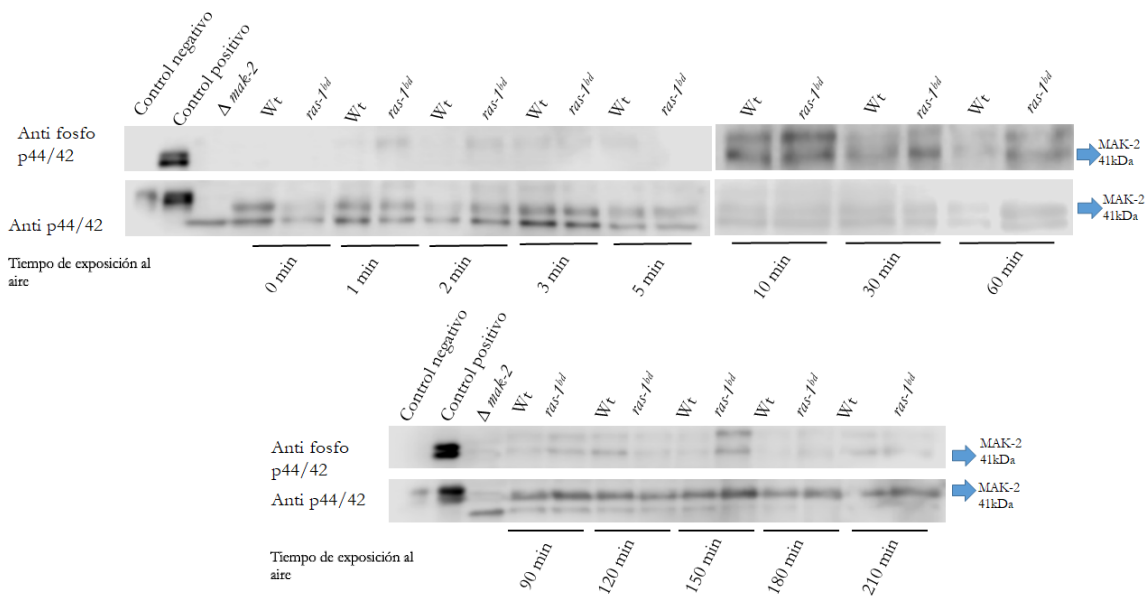


Fig. 8. Fosforilación de MAK-2 durante las primeras dos transiciones morfológicas de la conidiación. Se muestra una inmunodetección representativa. La barra superior corresponde a la MAK-2 fosforilada (detectada con el anticuerpo anti fosfo p44/42) y la inferior a la MAK-2 total (detectada con anti p44/42). La fosforilación no permanece constante durante la diferenciación celular y es evidente que hay variaciones entre las cepas Wt y *ras-1^{bd}*.

Para cuantificar la fosforilación de las proteínas, se utilizó el software ImageJ. Los datos se normalizaron con el control positivo de cada membrana (Hog 0.8 M NaCl para OS-2 y el control positivo para MAK-2) y posteriormente con la proteína total (anti Hog1p para OS-2 y anti p44/42 para MAK-2). Con el fin de mostrar más claramente los resultados, se decidió hacer dos gráficas, una de los minutos de 0 a 30 y otra de 60 a 210.

1.2 Fosforilación de OS-2 y MAK-2 en la cepa silvestre

Minutos 0 a 30

Durante el primer estado hiperoxidante (de 0 a 5 min) la fosforilación de OS-2 va en aumento. Sin embargo, la proteína continúa fosforilada hasta los 30 min (fig. 9), aun cuando el primer estado hiperoxidante ya finalizó.

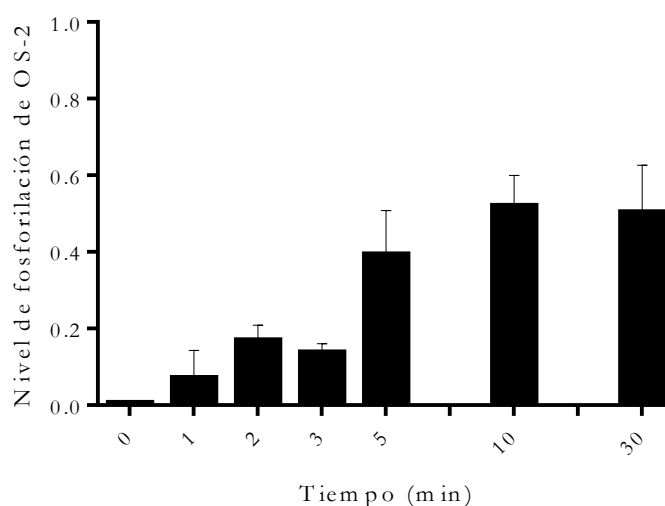


Fig. 9. Valores promedio de la fosforilación de OS-2 en la cepa silvestre de los minutos 0-30. Tras la exposición al aire, se extrajeron las proteínas de la muestra y, después de separarlas mediante PAGE, se determinó a través de una inmunodetección la forma fosforilada y el total de OS-2, por triplicado. Se cuantificó la señal en cada tiempo usando el software ImageJ. Se muestra el valor relativo de OS-2 fosforilado con respecto al del control positivo (Hog1p) y normalizado con respecto al nivel de OS-2 total. Las barras corresponden al error estándar de la media. Para graficar se utilizó el programa GraphPad Prism.

N=3.

En contraste, la proteína MAK-2 permanece con una fosforilación casi indetectable durante los primeros cinco minutos y, una vez terminado el primer estado hiperoxidante, la fosforilación aumenta al minuto 10 a su punto más alto en el ensayo (65%) y vuelve a abatirse en el minuto 30 (fig. 10).

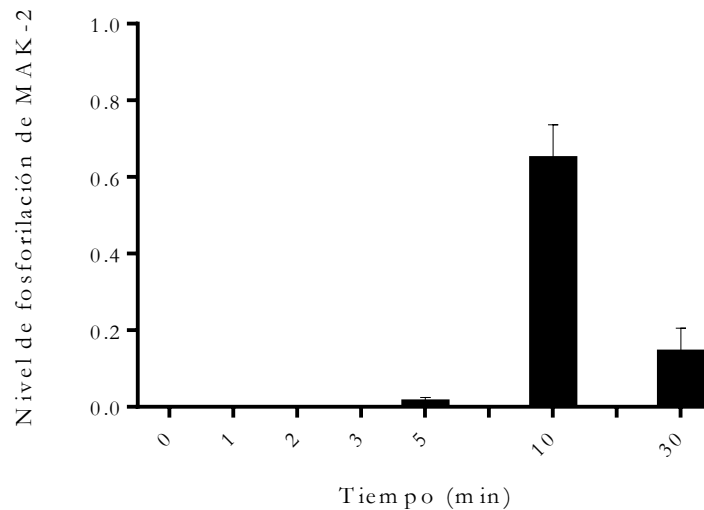


Fig.10. Valores promedio de la fosforilación de MAK-2 en la cepa silvestre de los minutos 0-30. Tras la exposición al aire, se extrajeron las proteínas de la muestra, se separaron mediante PAGE y se midió a través de una inmunodetección la forma fosforilada y el total de MAK-2, por triplicado. Se cuantificó la señal en cada tiempo usando el software ImageJ. Los valores de fosforilación están normalizados con respecto al control positivo y al valor de MAK-2 total. Las barras corresponden al error estándar de la media. Para graficar se utilizó el programa GraphPad Prism. N=3.

Al comparar el estado de fosforilación de estas dos proteínas en la primera parte del ensayo, en los minutos 0-5 OS-2 presenta niveles altos mientras que la MAK-2 tiene niveles bajos, en el minuto 10 ambas proteínas están parcialmente fosforiladas y en el minuto 30 sólo OS-2 continúa fosforilada.

Minutos 60 a 210

Tras haberse fosforilado durante el primer estado hiperoxidante y permanecer así a lo largo de los minutos 10 y 30, la fosforilación de OS-2 finalmente disminuye en el minuto 60. Para el minuto 90, alrededor del cual ocurre el segundo estado hiperoxidante, la fosforilación de OS-2 vuelve a aumentar (65% en relación al valor de Hog1p fosforilado). Posterior a este tiempo, la proteína se desfosforila y vuelve a tener un nivel de fosforilación mayor a 30% en relación al valor de Hog1p fosforilado (figs. 7 y 11).

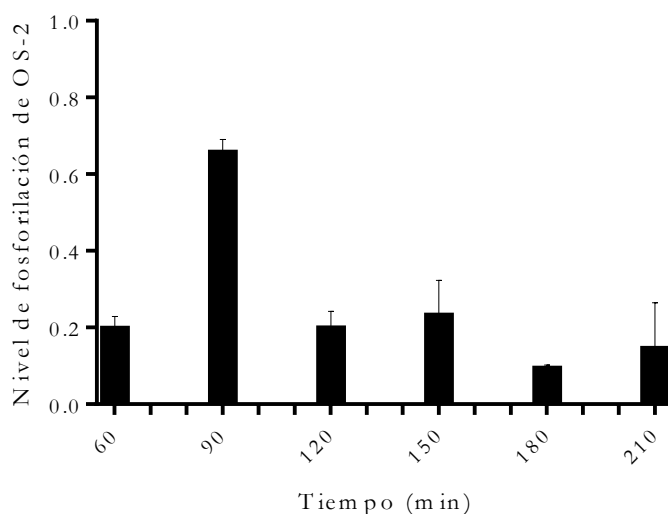


Fig. 11. Valores promedio de la fosforilación de OS-2 en la cepa silvestre de los minutos 60-210. Al minuto 90 se aprecia un aumento en la fosforilación de la OS-2 en la segunda parte del ensayo. Es alrededor de este tiempo cuando ocurre el segundo estado hiperoxidante. Se muestra el valor relativo de OS-2 fosforilado con respecto al del control positivo (Hog1p) y normalizado con respecto al nivel de OS-2 total.

Las barras de error corresponden al error estándar de la media. N=3.

Por otra parte, la fosforilación de MAK-2 presenta un perfil distinto. En el minuto 60, la MAK-2 aumenta su fosforilación (40%), misma que disminuye para el minuto 90 (segundo estado hiperoxidante) (15%). Posterior a este tiempo la fosforilación aumenta a los 120 (35%) y 150 min y disminuye a los 180 min, pero vuelve a aumentar a los 210 min (30%) (fig.12).

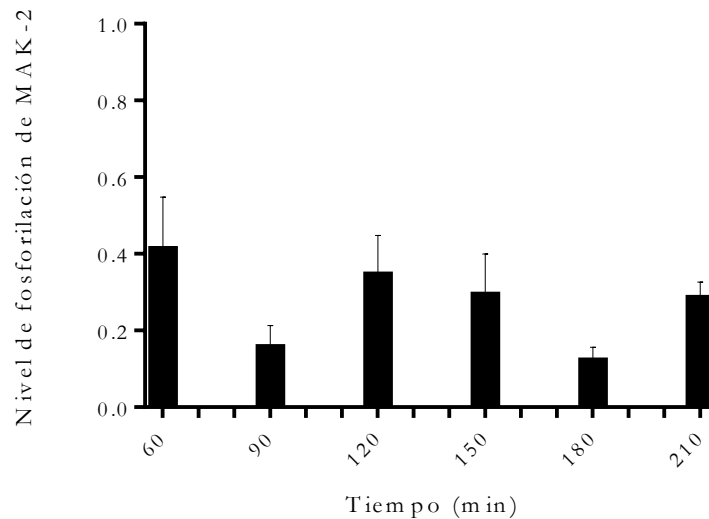


Fig. 12. Valores promedio de la fosforilación de MAK-2 en la cepa silvestre de los minutos 60-210. Se graficó la segunda parte del ensayo en el cual hay un comportamiento oscilante de la fosforilación de la cinasa. Los valores de fosforilación están normalizados con respecto al control positivo y al valor de MAK-2 total. Las barras corresponden al error estándar de la media. N=3.

En resumen, del minuto 60 al 120 hay una correlación inversa: la fosforilación en una proteína aumenta mientras que la otra baja, a los 90 min, cuando se genera el segundo estado hiperoxidante, la fosforilación de OS-2 está alta y baja la de MAK-2 y a los 120 min cuando la fosforilación de OS-2 baja, la de MAK-2 sube. Sin embargo, esta correlación inversa se pierde entre los 150 y 210 min.

1.3 Fosforilación de OS-2 y MAK-2 en la cepa *ras-1^{bd}*

Minutos 0 a 30

En el primer estado hiperoxidante, OS-2 se fosforila rápidamente y con mayor intensidad que en la cepa silvestre, alcanzando una fosforilación total en el minuto 5. Tras este primer estrés, el nivel de fosforilación desciende paulatinamente durante los minutos 10 y 30 (40% en relación al valor de Hog1p fosforilado) (fig. 13).

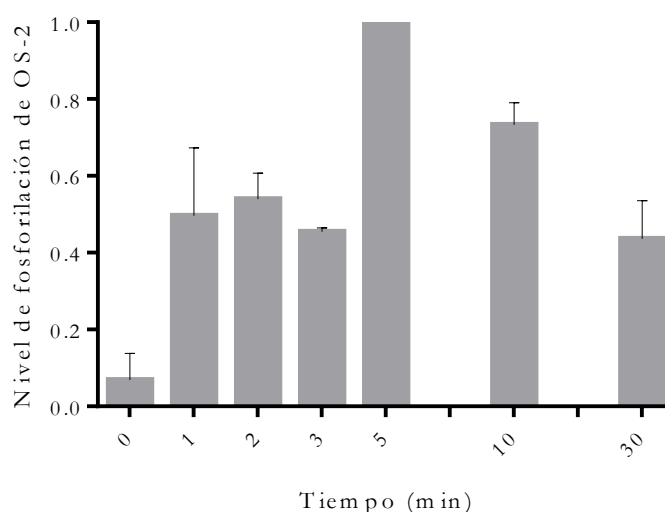


Fig. 13. Valores promedio de la fosforilación de OS-2 en la cepa *ras-1^{bd}* de los minutos 0-30. La fosforilación de OS-2 en esta cepa es más veloz que en la silvestre, sin embargo, también disminuye con mayor rapidez. Se muestra el valor relativo de OS-2 fosforilado con respecto al del control positivo (Hog1p) normalizado con respecto al nivel de OS-2 total. Las barras corresponden al error estándar de la media. N=3

La fosforilación de MAK-2 en *ras-1^{bd}* es prácticamente indetectable durante el primer estado hiperoxidante. Tras este, la proteína se fosforila progresivamente en el minuto 10 y el 30 (55%) (fig. 14).

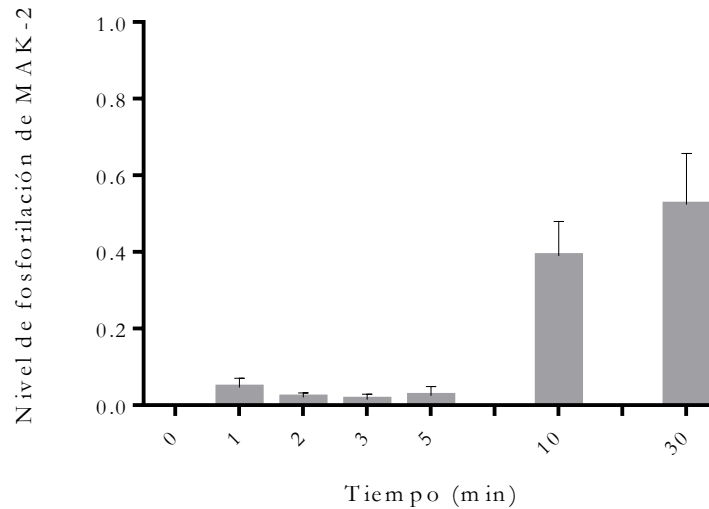


Fig. 14. Valores promedio de la fosforilación de MAK-2 en la cepa *ras-1^{bd}* de los minutos 0-30. La fosforilación de esta proteína es casi inexistente durante el primer estado hiperoxidante (0-5min). Una vez terminado, comienza progresivamente a fosforilarse. Los valores de fosforilación están normalizados con respecto al control positivo y al valor de MAK-2 total. Las barras corresponden al error estándar de la media. N=3.

Durante esta primera fase del ensayo, en el primer estado hiperoxidante, la fosforilación de OS-2 en la mutante *ras-1^{bd}* aumenta rápidamente, mientras que la de MAK-2 está prácticamente abatida. En esta mutante OS-2 se fosforila antes y en mayor proporción que en la cepa silvestre. También comienza a desfosforilarse con más rapidez en los minutos 10 y 30, tiempos en los que la silvestre aún está fosforilada. Una vez terminado el primer estado hiperoxidante, la MAK-2 se fosforila mientras que la OS-2 disminuye.

Minutos 60 a 210

En la segunda fase del ensayo, la fosforilación de OS-2 se mantiene del minuto 30 al 60 tras el cual disminuye levemente y se mantiene aproximadamente en un 35% de fosforilación por el resto del experimento con excepción de un ligero incremento al minuto 150 de 40% en relación al valor de Hog1p fosforilado (fig. 15).

Es notable que parece adelantarse en el minuto 60 a la fosforilación del minuto 90 de Wt que correspondería al segundo estado hiperoxidante.

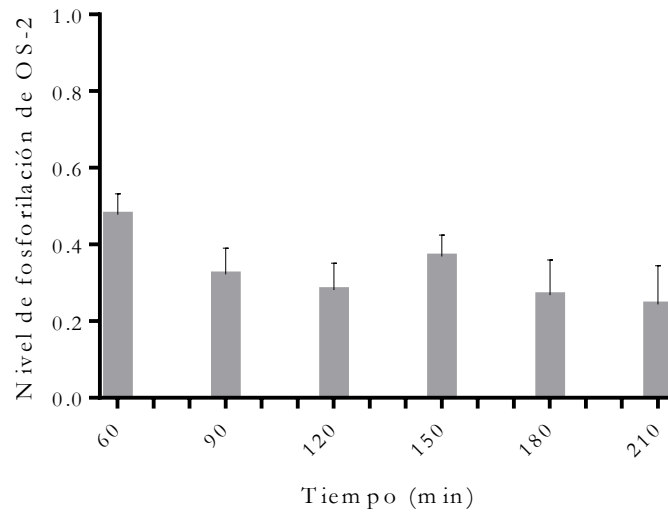


Fig. 15. Valores promedio de la fosforilación de OS-2 en la cepa *ras-1^{bd}* de los minutos 60-210. La fosforilación de OS-2 en esta cepa presenta un comportamiento distinto a la cepa silvestre. Se muestra el valor relativo de OS-2 fosforilado con respecto al del control positivo (Hog1p) normalizado con respecto al nivel de OS-2 total. Las barras corresponden al error estándar de la media. N=3.

En cuanto a MAK-2, tiene un nivel de fosforilación entre 45 y 55% a los minutos 60, 90 y 120 y decrece a los 150, 180 y 210 (fig. 16). El perfil de fosforilación de esta proteína en la segunda parte del ensayo contrasta con aquel de OS-2.

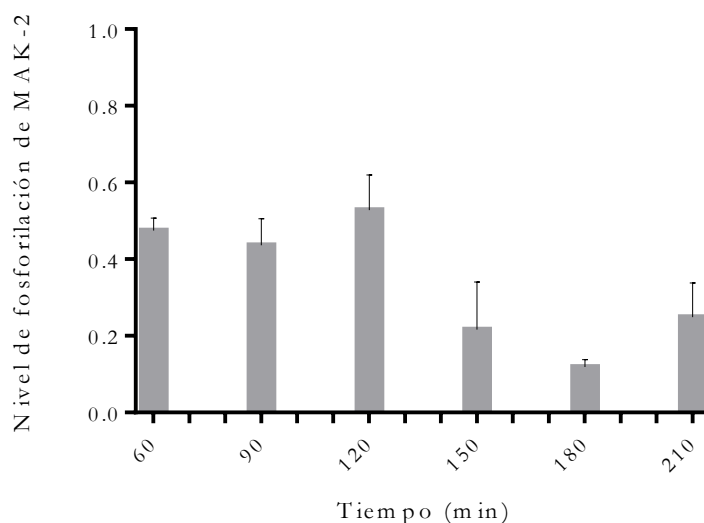


Fig.16. Valores promedio de la fosforilación de MAK-2 en la cepa *ras-1^{bd}* de los minutos 60-210. Los valores de fosforilación están normalizados con respecto al control positivo y al valor de MAK-2 total. Las barras corresponden al error estándar de la media.

En conclusión, la OS-2 después del incremento durante el primer estado hiperoxidante se mantiene parcialmente fosforilada (30% en relación al valor de Hog1p fosforilado) durante el segundo estado hiperoxidante. La MAK-2 se mantiene fosforilada 50% hasta los 120 min y luego baja entre los 150 y 210 min. Esto es, durante el segundo estado hiperoxidante no se detecta una correlación inversa en la fosforilación de estas dos cinasas en la mutante *ras-1^{bd}*.

Discusión

Previo a cada evento de diferenciación en el ciclo de vida asexual de *N. crassa* se registra un aumento en los niveles de las ROS intracelulares (Hansberg, De Groot, & Sies, 1993). Esta observación sugiere que la diferenciación celular es una respuesta al estrés oxidante o estado hiperoxidante (Aguirre *et al.*, 2005; Hansberg & Aguirre, 1990; Hansberg *et al.*, 2008). El estrés oxidante es necesariamente transitorio, sólo puede durar algunos minutos, so pena de que la célula muera. El estado redox celular se recupera con la diferenciación celular. Pensamos que la diferenciación celular aísla a la célula del oxígeno ambiental y que, con cada nuevo estado diferenciado durante el proceso de conidiación, la célula queda cada vez más aislada de éste. En los primeros estados diferenciados (menos aislados del medio ambiente) la célula puede crecer. Tal es el caso del micelio aéreo que crece recubierto de una pared celular hidrofóbica hasta que se genera un nuevo estrés oxidante que promueve que éste se transforme en conidios. Para que los conidios puedan volver a crecer se requiere romper las barreras que los aíslan del medio, con esto se genera un estrés oxidante en los conidios que, con la entrada de nutrientes y la activación de la respiración, les permite germinar y formar nuevamente hifas en crecimiento.

Es importante determinar cómo se transmite la señal del estrés oxidante y cómo se transmite la señal de que el estrés oxidante se ha controlado y que la célula puede volver a crecer. En este trabajo se exploró el patrón de fosforilación de dos MAP cinasas de *N. crassa*. Por una parte, la vía de OS-2, relacionada con la respuesta al estrés oxidante (Noguchi *et al.*, 2007) y por otra, la vía de MAK-2, relacionada con el crecimiento (Li *et al.*, 2005; Pandey *et al.*, 2004). A su vez, se evaluó si la GTPasa RAS-1 influye en la activación de estas vías, en vista de que esta proteína está involucrada en la regulación del crecimiento y la conidiación y que posiblemente interactúe físicamente con NRC-1 de la vía de MAK-2 y con la adenilato ciclasa, ambas relacionadas con el crecimiento. Además, la RAS-1 interactúa con Rac, que a su vez lo hace con la enzima NOX para activarla y generar superóxido, lo cual está relacionado con la conidiación en *C. trifolii* (Chen &

Dickman, 2004). Así, la medición de la fosforilación de las cinasas se hizo en la cepa silvestre y en la mutante *ras-1^{bd}*.

Comenzamos por comprobar que el estrés oxidante activa a la OS-2. Para esto añadimos una solución de 10 mM de H₂O₂ a un cultivo en crecimiento y después de diez minutos de exposición comprobamos que OS-2 estaba fosforilada, no así en la muestra control sin H₂O₂. Una vez determinado que la OS-2 se activa con el H₂O₂, proseguimos a explorar la fosforilación de esta cinasa en nuestro modelo de diferenciación celular.

En un cultivo en medio líquido con nutrientes, el crecimiento del hongo depende de la concentración del O₂ disuelta en el medio, que a la vez depende de la interfase líquido/aire y del consumo de O₂ por el hongo. Al filtrar el cultivo de *N. crassa*, las hifas pasan de una concentración de O₂ muy baja en el medio de cultivo (que no se detecta con el electrodo para O₂) a la concentración máxima ($\approx 200 \mu\text{M}$, dependiendo de la temperatura y la cantidad de solutos) en la película de agua que recubre las hifas expuestas directamente al aire. Las hifas responden adhiriéndose entre ellas y este proceso es relativamente rápido (40 min) (Toledo *et al.*, 1986). Por lo mismo, muchas hifas experimentan al mismo tiempo el estrés oxidante y también el control del estrés con la adhesión de las hifas, aunque existe un gradiente de concentración del O₂ entre las hifas más expuestas al aire en la superficie de la masa micelial y las hifas más alejadas de dicha superficie. Esta situación hace que el primer estado hiperoxidante se detecte con mayor intensidad y se circunscriba a los primeros minutos de exposición al aire, con un máximo a los 5 min, llegando otra vez al estado inicial a los 10 min.

Aun siendo el estrés oxidante más intenso y más sincrónico durante el primer estado hiperoxidante que en el segundo, la fosforilación de las dos cinasas es el promedio de una gran cantidad de células que no necesariamente experimentan la misma intensidad del estrés ni la experimentan al mismo tiempo. Así, aunque la correlación inversa en la fosforilación de las cinasas se observa en ambas cepas, es claro que los picos de fosforilación son más duraderos de lo esperado. Posiblemente se requiera hacer los experimentos en tiempos más cortos y éstos no serían los mismos para ambas cepas.

Por otro lado, la determinación de la fosforilación de las cinasas, medida por inmunodetección, tiene cierto grado de incertidumbre. Incluso haciendo los experimentos varias veces y cuidando de hacerlos exactamente de la misma manera, los resultados no son siempre satisfactorios y hay variaciones significativas en el nivel de fosforilación de las cinasas. Debido a lo anterior, los resultados de estos experimentos sólo permiten sacar conclusiones sobre los patrones globales de fosforilación de estas cinasas y no tienen la resolución necesaria para definir con precisión cambios finos en los niveles de fosforilación locales en tiempos determinados.

Durante el primer estado hiperoxidante la fosforilación de OS-2 aumenta desde el primer minuto llegando a un máximo a los 10 min en la Wt (50% fosforilada) y a los 5 min en la *ras-1^{bd}* (100% fosforilada). Después se mantiene parcialmente fosforilada en la Wt hasta los 60 min y en la *ras-1^{bd}* hasta los 30 min. Es notable que en la cepa *ras-1^{bd}* la OS-2 se fosforile con mayor intensidad y más rápido que en la cepa silvestre y también disminuya más rápido (tabla 2 y 3). Esta sensibilidad al estrés oxidante concuerda con la observación de nuestro laboratorio de que el Paraquat inhibe la germinación de los conidios de la cepa *ras-1^{bd}*, pero no así a los conidios de la Wt y, en presencia de estrés oxidante, los conidios de *ras-1^{bd}* germinan menos que los de la cepa silvestre (Belden *et al.*, 2007). La cepa *ras-1^{bd}* es más sensible al estrés oxidante que la cepa silvestre. Así, *ras-1^{bd}* produce durante la conidiación una mayor señal quimioluminiscente (>10 veces) que la cepa silvestre, como una medida de la formación de las ROS, y consecuentemente forma dos veces más micelio aéreo que la silvestre (Rangel y Hansberg, datos no publicados). Además, en condiciones sumergidas la cepa *ras-1^{bd}* produce tres veces más conidios que la cepa silvestre (Peraza Reyes, 2005).

A diferencia de OS-2, MAK-2 se fosforila más y más rápido en la Wt (65% a los 10 min) que en la *ras-1^{bd}* (50% hasta los 30 min) y decrece más rápido en la primera (15% a los 30 min) mientras que en la *ras-1^{bd}* se mantiene fosforilada (tabla 2 y 3).

También durante el segundo estado hiperoxidante, en la cepa *ras-1^{bd}* la OS-2 se fosforila antes (60 min) que la cepa silvestre (90 min), sugiriendo que el desarrollo de la cepa *ras-1^{bd}* va adelantado con respecto al de la cepa silvestre (tabla 2 y 3). Este segundo pico de fosforilación de la OS-2 es menos intenso en la mutante

que en la silvestre, aunque no podemos descartar que el pico de fosforilación haya ocurrido entre los 30 y los 60 min. Conforme la fosforilación de la OS-2 decrece, entre los 60 (50%) y los 120 min (30%), la fosforilación de MAK-2 se mantiene relativamente constante.

Un posible intermediario entre RAS-1 y la vía de OS-2 puede ser la GAPDH, que en *S. pombe* promueve la interacción entre el sistema de dos componentes y la MAP3K de la vía ortóloga de OS-2 (Morigasaki *et al.*, 2008). En nuestro modelo de estudio la MAK3K corresponde a la proteína OS-4. La función de intermediario ocurre cuando la GAPDH se oxida. En *N. crassa*, esperaríamos que la GAPDH se oxidara durante los estados hiperoxidantes donde aumentan los niveles de las ROS promoviendo así la fosforilación de OS-4 y, con ello, la subsecuente fosforilación de OS-2. En el laboratorio encontramos esta enzima oxidada en tres cisteínas, en el micelio expuesto al aire entre los 3 y los 10 min, pero la diferencia con el control negativo fue muy pequeña (Hansberg *et al.*, datos no publicados).

En la cepa silvestre, a los 10 min, la OS-2 está fosforilada y también la MAK-2. Lo mismo ocurre en la cepa *ras-1^{hd}*, aunque en esta cepa la fosforilación de OS-2 va a la baja y la de MAK-2 a la alta. Durante el segundo momento hiperoxidante en la cepa silvestre no hay fosforilación apreciable que coincida en ambas cepas, pero en la cepa *ras-1^{hd}*, a los 60 min, están parcialmente fosforiladas la OS-2 y también la MAK-2, aunque la primera va disminuyendo y la segunda subiendo. La falta de sincronía en la población de las células es una posible explicación. Conforme pasa el tiempo de exposición al aire, es posible que coexistan poblaciones de hifas que se encuentren en diferente estado dentro del proceso de conidiación. Así, entre los 60 y los 90 min, las hifas entran en estrés oxidante, dejan de crecer y forman micelio aéreo el cual comienza a crecer. Esto es, unas hifas estarán en estrés, otras diferenciándose y otras ya se diferenciaron y estarán creciendo. Aunado a la asincronía hay también muerte celular después de los 90 min. De esta manera se puede explicar que, después de los 60 min ambas MAPK estén parcialmente fosforiladas y que la relación con el estrés oxidante sea menos clara. Si se considera como ruido un valor de 0.2-0.3 de fosforilación de los 60 min en adelante, en la cepa silvestre sólo se registraría fosforilación de la OS-2 a los 90 min (65%), alrededor del cual ocurre

el segundo estado hiperoxidante. En la cepa *ras-1^{bd}* sólo estaría fosforilada la OS-2 a los 60 min (48%), 30 min antes que en la silvestre. Bajo estos parámetros, la fosforilación más importante de MAK-2 en la Wt ocurre a los 60 min (40%) y en la *ras-1^{bd}* entre los 60 y los 120 min (45-55%).

Tabla 2. Tendencia de la fosforilación de OS-2 y MAK-2 en la cepa silvestre. Las flechas hacia arriba y hacia abajo indican aumento o disminución de la fosforilación, respectivamente. La línea punteada marca el punto a partir del cual consideramos que se comienza a desfasar la reacción de las células al estrés oxidante. Dentro de los círculos se resaltan los tiempos y proteínas que estarían fosforilados si se considera un ruido de 0.3.

de 0.3.

		Wt	
		OS-2	MAK-2
1er edo. hiperoxidante →	Minuto		
	0-5	↑	-----
	10	↑	↑
	30	↑	↓
	60	↓	↑
2do edo. hiperoxidante →	90	↑	↓
	120	↓	↑
	150	↑	↓
	180	↓	↓
	210	↑	↑

Tabla 3. Tendencia de la fosforilación de OS-2 y MAK-2 en la cepa *ras-1^{bd}*. Las flechas hacia arriba y hacia abajo indican aumento o disminución de la fosforilación, respectivamente. La línea punteada marca el punto a partir del cual consideramos que se comienza a desfasar la reacción de las células al estrés oxidante. Dentro de los círculos se resaltan los tiempos y proteínas que estarían fosforilados si se considera un ruido de 0.3.

		<i>ras-1^{bd}</i>	
	Minuto	OS-2	MAK-2
1er edo. hiperoxidante →	0-5	↑	-----
	10	↓	↑
	30	↓	↑
	60	↑	↓
	90	↓	↓
	120	↓	↑
	150	↑	↓
	180	↓	↓
	210	=	↑

La fosforilación de la MAK-2 en la Wt presenta cierta oscilación después de los 60 min de exposición al aire. Hay casos en los cuales la respuesta celular apropiada ocurre dependiendo de la duración de la señal y una señal oscilatoria puede indicar que el estímulo continúa (Kholodenko & Birtwistle, 2009). Así, p53 se puede activar de manera oscilatoria, lo cual se ha interpretado como que la señal río arriba (daño al DNA) persiste (Lahav *et al.*, 2004). Dado que la expresión de p53 y la activación de las MAP cinasas alteran la expresión de un gran número de genes, la actividad sostenida de éstas *vs* su actividad en pulsos puede desencadenar respuestas distintas (Kholodenko & Birtwistle, 2009). Un efecto de este comportamiento se puede ver en las células PC12 de mamífero, en las cuales la activación prolongada de ERK (homóloga de MAK-2) resulta en diferenciación neuronal mientras que la activación temporal resulta en proliferación (Vaudry, Stork, Lazarovici, & Eiden, 2002).

El comportamiento de OS-2 durante el primer y segundo estado hiperoxidante concuerda con los resultados en la literatura: a más ROS mayor fosforilación de OS-2 y la consecuente diferenciación celular (Hansberg *et al.*, 1993). OS-2 se fosforila más intensamente y este proceso parece estar adelantado en la cepa *ras-1^{bd}*. Belden *et al.*, usando esta cepa como modelo de un ritmo circadiano, no encontraron que la cantidad de ROS intracelulares fuera significativamente mayor que en la cepa silvestre. Otros autores sin embargo encontraron que la luz aumenta las ROS en dicha cepa y que las ROS están asociadas con el ritmo de conidiación circadiano (Gyöngyösi & Káldi, 2014; Yoshida, Iigusa, Wang, & Hasunuma, 2011). Asimismo, las ROS pueden determinar el periodo de la conidiación cíclica (Chávez Canales, 2010; Gyöngyösi, Nagy, Makara, Ella, & Káldi, 2013). En nuestro laboratorio hemos observado mediante quimioluminiscencia que la cepa *ras-1^{bd}* genera más ROS que la cepa silvestre durante la conidiación.

El primer estado hiperoxidante se forma por la exposición de las hifas al aire con lo cual la OS-2 se fosforila. Durante el segundo estado hiperoxidante la fuente de las ROS es interna. En *N. crassa* se requiere la presencia de la NOX-1 para el desarrollo de hifas aéreas y para la conidiación, sugiriendo que la NOX-1 puede contribuir con la formación de las ROS durante la conidiación (Cano-Domínguez, Álvarez-Delfín, Hansberg, & Aguirre, 2008). Durante los primeros 15 minutos de exposición de las hifas al aire la carbonilación de proteínas aumenta en la célula y después decrece para volver a aumentar a los 90 minutos y decrecer a los 180 minutos (Toledo & Hansberg, 1990). El aumento en el contenido de carbonilos en proteínas totales posiblemente se debe al incremento en la concentración de ROS, ya sea mediante la oxidación directa de las cadenas laterales de los aminoácidos o por la generación de aldehídos formados por la peroxidación de ácidos grasos (Suzuki, Carini, & Butterfield, 2010). El primer pico de carbonilo disminuye a los 30 minutos y aumenta de nuevo a los 90 minutos sin ninguna manipulación externa, al igual que la fosforilación de OS-2. Lo mismo ocurre cuando se determinan las proteínas oxidadas en una o más cisteínas: el número de proteínas con cisteínas oxidadas aumenta de cero a 280 en 3 min, luego baja a 25 entre los 30 y los 60 min y vuelve a aumentar a los 90 min a 200 y después de este tiempo se mantienen oscilando entre 200 y 300 proteínas oxidadas (Hansberg *et al.*, datos no publicados). Asimismo, la quimioluminiscencia aumenta durante los

primeros minutos de exposición al aire, disminuye rápidamente y vuelve a aumentar antes de las dos horas de exposición al aire. Usando esta medición se pudo observar que hay un tercer momento hiperoxidante en el micelio aéreo, justo antes de la formación de los conidios (Hansberg *et al.*, 1993). Será interesante determinar la fosforilación de la OS-2 y de la MAK-2 durante la formación de los conidios.

Conclusiones

1. La cepa *ras-1^{bd}* reacciona con mayor rapidez e intensidad al estrés oxidante inicial.
2. Con excepción del primer estado hiperoxidante, MAK-2 y OS-2 nunca se encuentran totalmente desfosforiladas en las primeras 3.5 horas de exposición al aire.
3. En la cepa *ras-1^{bd}* MAK-2 presenta una fosforilación sostenida del minuto 10 al 120.
4. OS-2 continúa en aumento después del primer estado hiperoxidante hasta el minuto 30 y no aumenta de nuevo hasta el minuto 90, al comienzo del segundo estado hiperoxidante.
5. En la cepa mutante OS-2 alcanza su pico de fosforilación al final del primer estado hiperoxidante y disminuye progresivamente después de éste.
6. Es posible que durante el desarrollo asexual del hongo sea necesaria la acción conjunta de ambas MAP cinasas. Sin embargo, a partir del minuto 60 es difícil determinar un comportamiento preciso de las MAP cinasas debido a la pléyade de estados en los que se encuentran las distintas hifas.

Perspectivas

1. Queda por comprobarse si la fosforilación de estas cinasas tiene un efecto río abajo en la célula. Para demostrarlo hace falta medir la activación de efectores de estas vías, mencionados en la tabla 1.
2. Este trabajo sólo cubrió las dos primeras transiciones morfogénicas (hifas adheridas e inicio de la formación del micelio aéreo). Todavía queda por describir la fosforilación de estas cinasas hasta la etapa de formación de conidios.
3. Determinar la fosforilación de MAK-2 durante el crecimiento exponencial, en este trabajo no se encontró fosforilada (minuto cero de cada ensayo). Es posible que la señal sólo sea requerida al inicio del crecimiento.

Bibliografía

- Aguirre, J., & Hansberg, W. (1986). Oxidation of *Neurospora crassa* glutamine synthetase. *Journal of Bacteriology*, *166*(3), 1040–1045.
- Aguirre, J., Hansberg, W., & Navarro, R. (2006). Fungal responses to reactive oxygen species. *Medical Mycology*, *44*(SUPPL. 1), 101–107.
- Aguirre, J., Ríos-Momberg, M., Hewitt, D., & Hansberg, W. (2005). Reactive oxygen species and development in microbial eukaryotes. *Trends in Microbiology*, *13*(3), 111–8.
- Aguirre, J., Rodríguez, R., & Hansberg, W. (1989). Oxidation of *Neurospora crassa* NADP-specific glutamate dehydrogenase by activated oxygen species. *Journal of Bacteriology*, *171*(11), 6243–6250.
- Bailey-Shrode, L., & Ebbole, D. J. (2004). The fluffy Gene of *Neurospora crassa* Is Necessary and Sufficient to Induce Conidiophore Development. *Genetics*, *166*(4), 1741–1749.
- Banno, S., Noguchi, R., Yamashita, K., Fukumori, F., Kimura, M., Yamaguchi, I., & Fujimura, M. (2007). Roles of putative His-to-Asp signaling modules HPT-1 and RRG-2, on viability and sensitivity to osmotic and oxidative stresses in *Neurospora crassa*. *Current Genetics*, *51*(3), 197–208.
- Belden, W. J., Larrondo, L. F., Froehlich, A. C., Shi, M., Chen, C. H., Loros, J. J., & Dunlap, J. C. (2007). The band mutation in *Neurospora crassa* is a dominant allele of *ras-1* implicating RAS signaling in circadian output. *Genes & Development*, *21*(12), 1494–1505.
- Bloomfield, G., & Pears, C. (2003). Superoxide signalling required for multicellular development of *Dictyostelium*. *Journal of Cell Science*, *116*(16), 3387–3397..
- Borkovich, K. A., Alex, L. A., Yarden, O., Freitag, M., Turner, G. E., Read, N. D., ... Pratt, R. (2004). Lessons from the genome sequence of *Neurospora crassa*: tracing the path from genomic blueprint to

multicellular organism. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 68(1), 1–108.

Brun, S., Malagnac, F., Bidard, F., Lalucque, H., & Silar, P. (2009). Functions and regulation of the nox family in the filamentous fungus *Podospora anserina*: A new role in cellulose degradation. *Molecular Microbiology*, 74(2), 480–496.

Cano-Domínguez, N., Álvarez-Delfín, K., Hansberg, W., & Aguirre, J. (2008). NADPH oxidases NOX-1 and NOX-2 require the regulatory subunit NOR-1 to control cell differentiation and growth in *Neurospora crassa*. *Eukaryotic Cell*, 7(8), 1352–1361.

Cargnello, M., & Roux, P. P. (2011). Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 75(1), 50–83.

Chávez Canales, M. de J. (2010). *Modulación de la conidiación cíclica de Neurospora crassa por oxidantes y antioxidantes / tesis que para obtener el título de Biólogo, presenta María de Jesús Chávez Canales ; asesor Wilhelm Hansberg Torres*. Universidad Nacional Autónoma de México.

Chen, C., & Dickman, M. B. (2004). Dominant active Rac and dominant negative Rac revert the dominant active Ras phenotype in *Colletotrichum trifolii* by distinct signalling pathways. *Molecular Microbiology*, 51(5), 1493–507.

Correa, A., & Bell-Pedersen, D. (2002). Distinct signaling pathways from the circadian clock participate in regulation of rhythmic conidiospore development in *Neurospora crassa*. *Eukaryotic Cell*, 1(2), 273–280.

Davis, R. H., & de Serres, F. J. (1970). Genetic and microbiological research techniques for *Neurospora crassa*. *Methods in Enzymology*, 17, 79–143.

Dettmann, A., Heilig, Y., Valerius, O., Ludwig, S., & Seiler, S. (2014). Fungal Communication Requires the MAK-2 Pathway Elements STE-20 and RAS-2, the NRC-1 Adapter STE-50 and the MAP Kinase Scaffold HAM-5. *PLoS genetics*, 10(11), e1004762.

- Egan, M. J., Wang, Z.-Y., Jones, M. A., Smirnov, N., & Talbot, N. J. (2007). Generation of reactive oxygen species by fungal NADPH oxidases is required for rice blast disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *104*(28), 11772–11777.
- Finkel, T. (2011). Signal transduction by reactive oxygen species. *The Journal of Cell Biology*, *194*(1), 7–15.
- Fleissner, A., & Herzog, S. (2016). Signal exchange and integration during self-fusion in filamentous fungi. *Seminars in Cell and Developmental Biology* (Vol. 57, pp. 76-83). Academic Press.
- Fleissner, A., Leeder, A. C., Roca, M. G., Read, N. D., & Glass, N. L. (2009). Oscillatory recruitment of signaling proteins to cell tips promotes coordinated behavior during cell fusion. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *106*(46), 19387–19392.
- Griffiths, T., & Raju, N. (2004). Life Cycle. Retrieved from <http://www.fgsc.net/neurospora/sectionB2.htm>
- Gyöngyösi, N., & Káldi, K. (2014). Interconnections of Reactive Oxygen Species Homeostasis and Circadian Rhythm in *Neurospora crassa*. *Antioxidants & Redox Signaling*, *20*(18), 3007–3023.
- Gyöngyösi, N., Nagy, D., Makara, K., Ella, K., & Káldi, K. (2013). Reactive oxygen species can modulate circadian phase and period in *Neurospora crassa*. *Free Radical Biology and Medicine*, *58*, 134–143.
- Hansberg, W. (2008). Sección II: El dióxígeno y sus especies reactivas. En M. Konigsberg Fainstein & V. B. Torres Rodríguez (Eds.), *Radicales libres y estrés oxidativo: aplicaciones médicas* (pp. 25–46). Ciudad de México: El Manual Moderno.
- Hansberg, W., & Aguirre, J. (1990). Hyperoxidant states cause microbial cell differentiation by cell isolation from dioxygen. *Journal of Theoretical Biology*, *142*(2), 201–221.
- Hansberg, W., Aguirre, J., Ríos-Momberg, M., Rangel, P., Peraza, L., Montes de Oca, Y., & Cano-Domínguez, N. (2008). Chapter 15 Cell differentiation as a response to oxidative stress. *British*

Mycological Society Symposia Series, 27(C), 235–257.

Hansberg, W., De Groot, H., & Sies, H. (1993). Reactive oxygen species associated with cell differentiation in *Neurospora crassa*. *Free Radical Biology and Medicine*, 14(3), 287–293.

Heo, J., & Campbell, S. L. (2005). Superoxide anion radical modulates the activity of Ras and Ras-related GTPases by a radical-based mechanism similar to that of nitric oxide. *Journal of Biological Chemistry*, 280(13), 12438–12445.

Heo, J., & Campbell, S. L. (2006). Ras regulation by reactive oxygen and nitrogen species. *Biochemistry*, 45(7), 2200–2210.

Jensen, P. K. (1966). Antimycin-insensitive oxidation of succinate and reduced nicotinamide- adenine dinucleotide in electron-transport particles. I. pH dependency and hydrogen peroxide formation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Enzymology and Biological Oxidation*, 122(2), 157-166..

Jonkers, W., Leeder, A. C., Ansong, C., Wang, Y., Yang, F., Starr, T. L., ... Glass, N. L. (2014). HAM-5 Functions As a MAP Kinase Scaffold during Cell Fusion in *Neurospora crassa*. *PLoS Genetics*, 10(11), e1004783.

Kholodenko, B. N., & Birtwistle, M. R. (2009). Four-dimensional dynamics of MAPK information-processing systems. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine*, 1(1), 28-44.

Kim, H. -j., Chen, C., Kabbage, M., & Dickman, M. B. (2011). Identification and Characterization of *Sclerotinia sclerotiorum* NADPH Oxidases. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(21), 7721–7729.

Lahav, G., Rosenfeld, N., Sigal, A., Geva-Zatorsky, N., Levine, A. J., Elowitz, M. B., & Alon, U. (2004). Dynamics of the p53-Mdm2 feedback loop in individual cells. *Nature Genetics*, 36(2), 147–150.

Lamson, R. E., Takahashi, S., Winters, M. J., & Pryciak, P. M. (2006). Dual role for membrane localization in yeast MAP kinase cascade activation and its contribution to signaling fidelity. *Current Biology*, 16(6),

618–623.

- Lara-Ortíz, T., Riveros-Rosas, H., & Aguirre, J. (2003). Reactive oxygen species generated by microbial NADPH oxidase NoxA regulate sexual development in *Aspergillus nidulans*. *Molecular Microbiology*, *50*(4), 1241–1255.
- Leeder, A. C., Jonkers, W., Li, J., & Louise Glass, N. (2013). Early colony establishment in *Neurospora crassa* requires a MAP kinase regulatory network. *Genetics*, *195*(3), 883–898.
- Li, D., Bobrowicz, P., Wilkinson, H. H., & Ebbole, D. J. (2005). A mitogen-activated protein kinase pathway essential for mating and contributing to vegetative growth in *Neurospora crassa*. *Genetics*, *170*(3), 1091–104.
- Lichius, A., Lord, K. M., Jeffree, C. E., Oborny, R., Boonyarungsrit, P., & Read, N. D. (2012). Importance of MAP kinases during protoperithecial morphogenesis in *Neurospora crassa*. *PLoS One*, *7*(8), e42565.
- Loschen, G., Azzi, A., Richter, C., & Flohé, L. (1974). Superoxide radicals as precursors of mitochondrial hydrogen peroxide. *FEBS Letters*, *42*(1), 68–72.
- Loschen, G., Flohé, L., & Chance, B. (1971). Respiratory chain linked H₂O₂ production in pigeon heart mitochondria. *FEBS Letters*, *18*(2), 261–264.
- Maerz, S., Ziv, C., Vogt, N., Helmstaedt, K., Cohen, N., Gorovits, R., ... Seiler, S. (2008). The nuclear Dbf2-related kinase COT1 and the mitogen-activated protein kinases MAK1 and MAK2 genetically interact to regulate filamentous growth, hyphal fusion and sexual development in *Neurospora crassa*. *Genetics*, *179*(3), 1313–1325.
- Malagnac, F., Lalucque, H., Lepère, G., & Silar, P. (2004). Two NADPH oxidase isoforms are required for sexual reproduction and ascospore germination in the filamentous fungus *Podospora anserina*. *Fungal Genetics and Biology*, *41*(11), 982–997.

- Morigasaki, S., Shimada, K., Ikner, A., Yanagida, M., & Shiozaki, K. (2008). Glycolytic enzyme GAPDH promotes peroxide stress signaling through multistep phosphorelay to a MAPK cascade. *Molecular Cell*, 30(1), 108–13.
- Murphy, M. P. (2009). How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochemical Journal*, 417(1), 1–13.
- Neurospora Genome Basics. Retrieved December 1, 2016, from <http://www.fgsc.net/Neurospora/sectionB6.htm>
- Noguchi, R., Banno, S., Ichikawa, R., Fukumori, F., Ichiishi, A., Kimura, M., ... Fujimura, M. (2007). Identification of OS-2 MAP kinase-dependent genes induced in response to osmotic stress, antifungal agent fludioxonil, and heat shock in *Neurospora crassa*. *Fungal Genetics and Biology: FG & B*, 44(3), 208–18.
- Pandey, A., Roca, M. G., Read, N. D., & Glass, N. L. (2004). Role of a mitogen-activated protein kinase pathway during conidial germination and hyphal fusion in *Neurospora crassa*. *Eukaryotic Cell*, 3(2), 348–358.
- Peraza Reyes, C. L. (2005). *Caracterización genética y enzimática de una catalasa-peroxidasa de Neurospora crassa / tesis que para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biomedicas, presenta Carlos Leonardo Peraza Reyes ; asesor Wilhelm Hansberg Torres*. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Roca, G. M., Weichert, M., Siegmund, U., Tudzynski, P., & Fleissner, A. (2012). Germling fusion via conidial anastomosis tubes in the grey mould *Botrytis cinerea* requires NADPH oxidase activity. *Fungal Biology*, 116(3), 379–387.
- Segmüller, N., Ellendorf, U., Tudzynski, B., & Tudzynski, P. (2007). BcSAK1, a stress-activated mitogen-activated protein kinase, is involved in vegetative differentiation and pathogenicity in *Botrytis cinerea*. *Eukaryotic Cell*, 6(2), 211–221.
- Shinogi, T., Suzuki, T., Kurihara, T., Narusaka, Y., & Park, P. (2003). Microscopic detection of reactive

- oxygen species generation in the compatible and incompatible interactions of *Alternaria alternata* Japanese pear pathotype and host plants. *Journal of General Plant Pathology*, 69(1), 7–16.
- Suzuki, Y. J., Carini, M., & Butterfield, D. A. (2010). Protein Carbonylation. *Antioxidants & Redox Signaling*, 12(3), 323–325.
- Takemoto, D., Tanaka, A., & Scott, B. (2007). NADPH oxidases in fungi: Diverse roles of reactive oxygen species in fungal cellular differentiation. *Fungal Genetics and Biology*.
- Toledo, I., Aguirre, J., & Hansberg, W. (1986). Aerial growth in *Neurospora crassa*: Characterization of an experimental model system. *Experimental Mycology*, 10(2), 114–125.
- Toledo, I., & Hansberg, W. (1990). Protein oxidation related to morphogenesis in *Neurospora crassa*. *Experimental Mycology*, 14(2), 184–189.
- Toledo, I., Noronha-Dutra, A. A., & Hansberg, W. (1991). Loss of NAD(P)-reducing power and glutathione disulfide excretion at the start of induction of aerial growth in *Neurospora crassa*. *Journal of Bacteriology*. 173(10), 3243-3249.
- Toledo, I., Rangel, P., & Hansberg, W. (1995). Redox imbalance at the start of each morphogenetic step of *Neurospora crassa* conidiation. *Archives of biochemistry and biophysics*, 319(2), 519-524.
- Ushio-Fukai, M., Alexander, R. W., Akers, M., & Griendling, K. K. (1998). p38 Mitogen-activated Protein Kinase Is a Critical Component of the Redox-sensitive Signaling Pathways Activated by Angiotensin II. *Journal of Biological Chemistry*, 273(24), 15022–15029.
- Vaudry, D., Stork, P. J. S., Lazarovici, P., & Eiden, L. E. (2002). Signaling pathways for PC12 cell differentiation: Making the right connections. *Science*, 296(5573), 1648–1649.
- Yamashita, K., Shiozawa, A., Watanabe, S., Fukumori, F., Kimura, M., & Fujimura, M. (2008). ATF-1 transcription factor regulates the expression of *cgc-1* and *cat-1* genes in response to fludioxonil under

OS-2 MAP kinase in *Neurospora crassa*. *Fungal Genetics and Biology*, 45(12), 1562–1569.

Yoshida, Y., Iigusa, H., Wang, N., & Hasunuma, K. (2011). Cross-talk between the cellular redox state and the circadian system in neurospora. *PLoS ONE*, 6(12), e28227.

Yoshida, Y., Maeda, T., Lee, B., & Hasunuma, K. (2008). Conidiation rhythm and light entrainment in superoxide dismutase mutant in *Neurospora crassa*. *Molecular Genetics and Genomics*, 279(2), 193–202.