



UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

Instituto de Biología Funcional y Genómica

(USAL/CSIC)

La parada del ciclo celular en respuesta a la feromona
en el hongo fitopatogeno *Ustilago maydis*

Memoria presentada por Paola Bardetti para optar al grado de

Doctor en Biología.

Director de tesis: Prof. Dr. José Pérez-Martín

ABREVIATURAS 5

INTRODUCCIÓN 9

1. OBJETIVO DEL TRABAJO 11

2. U. maydis CICLO DE VIDA 12

3. FORMACIÓN DEL FILAMENTO INFECTIVO POR EL b-FACTOR 14

3.1 Control del desarrollo sexual y la patogenicidad en U.maydis 15

3.2 Arresto del ciclo celular desencadenado por el factor b. dieciséis

4 RESPUESTA DE FEROMONA Y ENLAZAR EN U.maydis 17

4.1 Vía de respuesta a la feromona y cascada de MAPK en U.maydis 18

4.2 La respuesta de las feromonas induce la formación de la estructura sexual 19

4.3 Arresto del ciclo celular inducido por feromonas en U. maydis 20

4.4 Transición G2 / M en U.maydis 21

5 RESPUESTA DE FEROMONA Y APAREAMIENTO EN S. cerevisae 22

5.1 Vía de respuesta a la feromona y detención del ciclo celular en S. cerevisae 22

MATERIAL Y MÉTODOS 25

1. CEPAS Y PLÁSMIDOS 27

2. CONDICIONES DE CRECER Y MEDIOS 31

2.1 Medios generales y condiciones de crecimiento 31

2.2 Regeneración de protoplastos y selección de transformantes 31

2.3 Condiciones de promotores inducibles y condicionales 32

3. MÉTODOS GENÉTICOS 32

3.1 Clonación de clonación y restricción 32

3.2 Extracción de ADN genómico de U. maydis 33

3.3 Reacción de PCR 33 3.4 transformación U. maydis 34

4. MÉTODOS DE EXPRESIÓN GENÉTICA 34

4.1 Extracción de RNA, síntesis de cDNA y PCR cuantitativa en tiempo real 34

5 MÉTODOS DE PROTEÍNA 35

5.1 Extracción de proteínas 35

5.2 Western blot 35

5.3 Desforre para western blot re-sondeo 36

6. ESPECTOMETRÍA DE MASA 36

6.1 Colección de células para el extracto de proteína cruda 36

6.2 Extracción de proteína cruda y purificación de proteínas GFP con trampa GFP 36

6.3 Digestión triptica y preparación de muestras para el análisis LC-MS / MS 37

6.4 Análisis LC-MS / MS 37

7 MICROSCOPIA 37

7.1 Visualización de núcleos y membranas nucleares 38

8. U.maydis STRAINS CONSTRUCTION 38

8.1 Generación de construcciones usando el sistema Golden Gate 41

8.2 Construcción de Clb2-HA 44

8.3 Construcción de Crk1-GFP 45

8.4 Construcción de Pcl12-cherry 45

8.5 Construcción de Pcl12-NVenus, Crk1-CVenus. 46

8.6 Construcción de Pcr1: Pcl12 46

8.7 Construcción de Pcr1: GFP-Cdc25 47

8.8 Construcción de Kap123TA-GFP 47

8.9 Generación de las cepas a1b1 gfp-cdc25 utilizando el sistema CRE / Lox 47

8.10 Generación de las cepas a1b1 Pcr1: fuz7DDKap123-ha nls-gfp crk1Δ, a1b1 Pcr1: fuz7DD Kap123-ha nls-gfp pcl12Δ, a1b1 Pcr1: fuz7DD Kap123-ha nls-gfp kpp2Δ. 49

RESULTADOS 51

1. INDUCCIÓN DE LA FEROMONA MAPK CASCADE CAUSA UNA

DETENCIÓN DE CICLO CELULAR G2 53

2. FOSFORILACIÓN INHIBIDOR WEE1-DEPENDIENTE DE CDK1 REQUERIDA PARA LA DETENCIÓN DEL CICLO DE LA CÉLULA DIFENDENTE *fuz7DD* 58
3. PHEROMONE Y B-FACTOR UTILIZAN UN MECANISMO DIFERENTE PARA ARRESTAR EL CICLO DE LA CELDA. 62
4. EL NIVEL DE PROTEÍNA CDC25 DISMINUYE EN LA INDUCCIÓN DE *fuz7dd*. 65
5. PCL12 SE REQUIERE PARA LA DISMINUCIÓN DE LOS NIVELES CDC25 ASÍ COMO LA DETENCIÓN DEL CICLO DE CELULAS G2. 68
6. CRK1 ES REQUERIDO PARA LA DISMINUCIÓN DE LOS NIVELES CDC25 ASÍ COMO LA DETENCIÓN DEL CICLO DE CELULAS G2. 72
7. PCL12 Y CRK1 INTERACTÚAN EN EL CITOPLÁSMA 75
8. LA SOBRE EXPRESIÓN DE PCL12 PUEDE INDUCIR EL ARRESTAMIENTO DEL CICLO CELULAR. 76
9. LA DETENCIÓN DEL CICLO CELULAR INDUCIDO *pcl12* REQUIERE FOSFORILACIÓN INHIBIDORA DE CDK1 78
10. CRK1 Y PCL12 INTERACTÚAN PARA CONTROLAR LA DETENCIÓN DE CICLOS CELULARES PERO NO PARA CONTROLAR LA FORMACIÓN DEL TUBO DE CONJUGACIÓN. 79
11. CDC25 NO DISMINUYE CUANDO SE LOCALIZA EN EL NÚCLEO. 80
12. EL IMPORTIN β KAP123 ES RESPONSABLE DE LA LOCALIZACIÓN CDC25. 81
13. IMPORTIN KAP123 PODRÍA SER UN OBJETO PF PCL12 / CRK1 COMPLEJO 82
14. EL KAP123 QUE NO PUEDE FOSFORILARSE NO PUEDE ARRESTAR EL CICLO DE LA CÉLULA 84

DISCUSIÓN 87

1. FEROMONAS INDUCEN LA DETENCIÓN DE CICLO CELULAR G2 EN *Ustilago maydis* 89

2. DETENCIÓN DE CICLO DE CÉLULAS DE FEROMONAS DE CRK1 Y PCL12 90

3. MECANISMO DE LA DETENCIÓN DEL CICLO CELULAR INDUCIDO POR LA FEROMONA 92

4. DETENCIÓN DEL CICLO DE CÉLULAS DEBIDO A LAS FEROMONAS Y DETENCIÓN DEL CICLO DEBIDO AL FACTOR DE TRASCRIPTON B 95

BIBLIOGRAFÍA 97

RESUMEN

Todas las células utilizan vías de transducción de señales para responder a cambios ambientales. Las cascadas de señalización están involucradas en la transmisión de un estímulo externo a objetivos intracelulares, lo que permite que las células se adapten a las nuevas condiciones. La comprensión de estas vías de señalización es fundamental para entender mecanismos importantes como el crecimiento celular, la diferenciación y la muerte celular. Dado que los hongos son organismos simples y sus vías de señalización interna se conservan evolutivamente, representan el mejor modelo para proporcionar información sobre estos procesos también en eucariotas superiores. Además, en las últimas décadas ha aumentado el conocimiento sobre las vías de señalización fúngicas y ha surgido su importancia para determinar la patogenicidad en patógenos humanos y de plantas (Zhao et al., 2007; Pérez-Nadales et al., 2014). Por esta razón, estas cascadas y sus dianas intracelulares a menudo se estudian para comprender el mecanismo de la patogenicidad y desarrollar compuestos que pueden detener la infección. *Ustilago maydis* es un fitopatógeno basidiomicetos que causa la

enfermedad del carbón en la planta de *Zea mays*, causando grandes pérdidas económicas (Topp et al., 2002). Gracias al desarrollo de técnicas que facilitan la manipulación genética y molecular, hoy en día *U. maydis* representa un buen modelo para estudiar la fitopatología (Bolker 2001, Kamper 2004, Terfruchte et al., 2014). Este hongo tiene una fase similar a la levadura saprófita no patógena y una fase patogénica que se desencadena por el apareamiento de dos células compatibles en respuesta a la feromona. La fusión da como resultado la formación de hifas infecciosas que pueden infectar plantas de maíz y causar tumor. En otras palabras, en *U. maydis* la virulencia está estrictamente asociada con la vida sexual y la señal de feromonas desencadena la activación del programa de virulencia. Para aparearse, *U. maydis* necesita formar las estructuras sexuales, llamadas tubo conjugativo y sincronizar el ciclo celular de ambas células en la misma fase. En el hongo ascomiceto no patógeno *S. cerevisiae*, el mecanismo de sincronización del ciclo celular inducido por feromonas está bastante bien caracterizado y da como resultado una parada del ciclo celular en la fase G1 (Chang y Herskowitz 1990). En *U. maydis* está ampliamente descrito que una cascada de MAPK conservada transmite la señal de feromonas, como ocurre en *S. cerevisiae*, pero no se comprende bien cómo esta cascada puede controlar la parada del ciclo celular. El objetivo de este estudio es dilucidar el mecanismo por el cual la señal de feromonas puede modular la maquinaria del ciclo celular a través de la cascada de MAPK en un hongo patógeno.

1. CICLO DE VIDA DE *U. maydis*

U. maydis tiene un ciclo de vida dimórfico. Durante la fase saprófita no patógena, las células haploides crecen en forma de levadura, dividiéndose por gemación. Para completar su ciclo de vida, *U. maydis* tiene que atravesar la fase patogénica en la cual crece como un micelio dicarionte dentro de la planta que puede producir esporas diploides. La transición a la

forma patógena comienza cuando dos células haploides del tipo de apareamiento opuesto se fusionan. El reconocimiento de estas células depende de un sistema de feromonas/receptores que consta de siete receptores de dominio transmembrana y pequeñas feromonas de lipopéptido (*pra1/2* y *mfa1/2*, respectivamente) codificadas en el locus bialélico tipo de apareamiento (Felbrugge, 2004). La señal de feromona activa da como resultado la formación de la estructura sexual, llamada tubo conjugativo, y una detención del ciclo celular en G2 (García-Muse et al., 2003). Estas estructuras aparecen en uno de los polos de las células, que crecen de forma polarizada siguiendo el gradiente de feromonas hasta que se fusionan. Tras la fusión de los dos tubos conjugativos, el filamento infectivo dicarionte comienza a formarse. Este cambio de desarrollo que da lugar a la formación de hifas está controlado por los factores de transcripción *bE/bW*, compuestos por dos subunidades separadas *bW* y *bE* codificadas en el locus del tipo de apareamiento *b* multialélico. La plasmogamia es fundamental para la funcionalidad del factor *b*, pues este factor sólo es activo como un heterodímero con subunidades derivadas de diferentes parejas de apareamiento. La hifa dicariótica crece sobre la superficie de la planta de manera polar acumulando todo el contenido celular en el polo de crecimiento, y dejando atrás secciones vacías vacuoladas (Steinberg y Pérez-Martin 2008). Este tipo de crecimiento permite al hongo encontrar el punto de entrada apropiado. Para penetrar con éxito en la epidermis de la planta, las hifas se hinchan en la punta generando una estructura llamada apresorio (Lanver et al., 2010). Una vez que el filamento entra en la planta, finalmente se libera el ciclo celular, pero el estado dicarionte del filamento en crecimiento se mantiene gracias a las estructuras de abrazadera. Posteriormente, la proliferación masiva y la fragmentación de la hifa ocurren dentro de la planta, dando como resultado la formación de tumores. Después de la cariogamia, se desarrollan teliosporas diploides negras y una vez que los tumores se secan y se rompen, el viento transporta las esporas maduras. En

condiciones favorables, las teliosporas germinan y liberan células haploides que cierran el ciclo de vida de *U. maydis* (Banuett 1995; Lanver et al., 2017).

2. RESPUESTA DE FEROMONA Y APAREAMIENTO EN *U. maydis*

En *U. maydis*, la virulencia está estrictamente asociada al desarrollo sexual. En los hongos capaces de reproducirse sexualmente, la señal de feromonas desencadena la respuesta de apareamiento. Este es un punto crucial para las células que tienen que decidir si detienen o no el ciclo celular, originan la estructura sexual y se fusionan. Cuando la feromona se une a los receptores, conduce a la activación de la cascada de MAPK que es capaz de regular la maquinaria del ciclo celular y, por lo tanto, detener la progresión del ciclo celular.

3 VÍA DE RESPUESTA A FEROMONAS Y CASCADA DE MAPK EN *U. maydis*

Las células haploides de *U. maydis* no son patógenas y crecen como una levadura, dividiéndose por gemación. Los componentes clave de la vía de señalización de feromonas son los receptores acoplados a proteína G, Pra1/2, siete receptores transmembrana situados en la membrana plasmática que reconocen la feromona peptídica a fin Maf1/Maf2. La activación del sistema de feromonas depende de la activación del módulo de cascada de MAPK conservado evolutivamente. Este módulo de transducción intracelular está compuesto por tres proteínas quinasas: MAPKKK Kpp4, MAPKK Fuz7 y MAPK Kpp2 (Muller et al., 2003). Además de la cascada MAPK, la vía PKA juega también un papel importante en respuesta a las señales externas. Estas dos cascadas integran señales nutricionales y de feromonas para controlar el desarrollo sexual. La integración de ambas señales se produce a través del factor de transcripción de caja HMG Prf1. (Kaffarnik et al., 2003). La fosforilación por PKA desencadena la expresión de los genes a, mientras que la fosforilación por MAPK y PKA induce la expresión de los genes b. (Heimel et al. 2010)

4.3 ARRESTO DEL CICLO CELULAR INDUCIDO POR FEROMONAS EN *U. MAYDIS*

Los hongos ascomicetes, como *S. cerevisiae* y *S. pombe*, detienen su ciclo celular en G1 en respuesta a la feromona (Chang y Herskowitz 1990; Davey y Nielsen 1994). Garcia-Muse y colaboradores han descrito que en *U. maydis* hay una parada del ciclo celular específica de G2 en respuesta a la feromona. Demostraron que las células receptoras, tratadas con feromonas sintéticas, podían formar la estructura sexual (tubo conjugativo) y estas células mostraban un contenido de ADN 2C. (Garcia-Muse et al., 2003).

4.4 Transición G2 / M en *U. maydis*

En *U. maydis*, la progresión del ciclo celular está regulada por la kinasa Cdk1 en complejo con ciclinas específicas. El complejo Cdk1-Cln1 está involucrado en la transición G1/S, el complejo Cdk1-Clb2 es específico para G2/M y el complejo Cdk1-Clb1 es requerido para ambas transiciones (Garcia-Muse et al., 2004; Castillo-Lluva y Pérez-Martín 2005). La transición G2/M ha sido ampliamente estudiada en *U. maydis*. Se ha descrito que la kinasa Wee1 cataliza la fosforilación inhibitoria del complejo Cdk1-Clb2, evitando la entrada en mitosis (Sgarlata y Pérez-Martín 2005). La fosfatasa Cdc25 elimina la fosforilación inhibitoria en el complejo Cdk1-Clb2 permitiendo el inicio de la mitosis (Sgarlata y Pérez-Martín 2005). En condiciones vegetativas, la entrada en la mitosis está regulada por la localización celular de Cdc25 (Mielnichuk y Pérez-Martín 2008). Cdc25 es retenido en el citoplasma por Bmh1, una proteína de la familia 14-3-3 (Pérez-Martín 2009). Cuando Cdc25 se mantiene fuera del núcleo, la transición G2/M se retrasa (Mielnichuk y Pérez-Martín 2008).

RESULTADOS

1. LA INDUCCIÓN DE LA MAPK CASCADE CAUSA UNA DETENCIÓN DE CICLO CELULAR G2

La respuesta de las feromonas en *U. maydis* resultó en la detención del ciclo celular en G2 (Garcia-Muse et al., 2003) y en la formación de la estructura sexual, el tubo conjugativo. Esta respuesta no depende sólo de las feromonas sino que implica la integración de señales celulares internas y ambientales, la mayoría de las cuales no son bien conocidas (Feldbrugge et al., 2004). Dado que estamos interesados en comprender cómo la cascada de MAPK dependiente de feromonas puede inducir la detención del ciclo celular, decidimos solventar el problema de la señalización mediante el uso de un alelo activado de MAPKK Fuz7. Este alelo, llamado fuz7DD, lleva dos mutaciones puntuales, lo que da como resultado S259D y T263D que imitan un alelo activo de Fuz7 (Muller et al., 2003). El promotor inducible PcrG1, que es activo en medio con arabinosa y reprimido en presencia de glucosa, controla su expresión. La inducción del alelo fuz7DD daba como resultado la formación del tubo conjugativo indistinguible del que resulta de la activación de las feromonas (Muller et al., 2003).

Para demostrar que la expresión de fuz7DD inducía una detención del ciclo celular en G2, el contenido de ADN se analizó mediante citometría de flujo. El control salvaje y una cepa con fuz7DD se analizaron en CMD y después de 2, 4, 6 horas de inducción del alelo fuz7DD (CMA). Observamos que las células fuz7DD que crecían en medio con arabinosa acumulaban contenido de ADN 2C.

Para discriminar si este contenido de ADN 2C correspondía a la fase G2 o mitosis, analizamos el contenido de los núcleos así como la integridad de la membrana nuclear ya que en *U. maydis* la envoltura nuclear se desmonta en la mitosis (Straube et al., 2003). Al inducir el alelo fuz7DD, las células mostraron un solo núcleo por célula con una membrana nuclear intacta que rodeaba el núcleo. Por lo tanto, podríamos concluir que las células que expresaban fuz7DD estaban detenidas en G2. Esta detención en G2 era equivalente a la detención observada al agregar la feromona (Garcia-Muse et al., 2003). Para revalidar nuestro sistema experimental, verificamos que la parada del ciclo celular G2 inducida por

fuz7DD era dependiente de los elementos que actúan por debajo de la MAPKK Fuz7. Para analizar si se requerían Kpp2 y Prf1 para la detención del ciclo celular inducido por la expresión de fuz7DD, se realizaron deleciones de los genes *kpp2* y *prf1*. El contenido de ADN se analizó mediante citometría de flujo. Los datos mostraron que Kpp2 era requerido para la detención del ciclo celular inducida por fuz7DD, mientras que Prf1 no afectaba a esta regulación del ciclo.

LA FOSFORILACIÓN DE CDK1 ES REQUERIDA PARA LA DETENCIÓN DEL CICLO

La transición G2/M en *U.maydis* está controlada por la fosforilación inhibitoria sobre el residuo Y15 de Cdk1 mediado por la kinasa Wee1 (Sgarlata y Pérez-Martin 2005). Usando un anticuerpo específico contra la fosforilación inhibitoria de Cdk1, observamos que tras la inducción del alelo fuz7DD, el nivel de fosforilación de Y15 aumentaba, sugiriendo que este mecanismo podría ser el responsable de la detención del ciclo celular G2.

Con el fin de estudiar el efecto de la fosforilación inhibitoria sobre la parada del ciclo celular G2, decidimos construir un alelo mutante de *cdk1*, llamado *cdk1AF*, en el que el sitio conservado de fosforilación fue reemplazado por un residuo no fosforilable, *cdk1AF*. Las células portadoras del alelo *cdk1* refractario a la fosforilación inhibitoria dieron como resultado filamentos que contenían varios núcleos, mostrando que las células no estaban paradas en ciclo celular. Este resultado indicó que la fosforilación inhibitoria de Cdk1 es necesaria para la parada del ciclo celular G2.

Decidimos analizar los niveles de proteína de los regulador de la transición G2/M tras la activación de fuz7DD. Para eso generamos tres cepas que contenían el alelo fuz7DD y las proteínas de fusión Cdc25-HA, Wee1-HA y Clb2-HA. Observamos que, tras la inducción del alelo fuz7DD, hubo los niveles de fosfatasa Cdc25 disminuían. Este resultado señalaba la bajada de los niveles de Cdc25 como la causa más probable de la detención del ciclo celular en G2.

Dado que la regulación por disminución de Cdc25 podría ser la causa de la parada del ciclo celular inducida por el alelo *fuz7DD*, nos preguntamos si la sobreexpresión de *cdc25* podría liberar el ciclo celular. Observamos que las células con una copia ectópica del gen *cdc25* bajo el control del promotor *crg1* eran capaces de detener el ciclo celular. Además, la producción de proteína Cdc25 aumentaba tras la inducción del alelo *fuz7DD*. Estos resultados ilustraron que disminución de los niveles de Cdc25 no era la única causa del arresto del ciclo celular.

Resultados previos de nuestro laboratorio (Flor-Parra et al., 2007) demostraban que la ciclina Pcl12, era necesaria para el crecimiento polar adecuado del tubo conjugativo y que la expresión de este gen era inducida por feromonas. Observamos que en ausencia de Pcl12, una vez inducido el *fuz7DD*, los filamentos producidos mostraban más de un núcleo por célula, lo que indicaba que se requería Pcl12 para la parada del ciclo celular inducida por *fuz7DD*. También analizamos el nivel de Cdc25 en mutantes de *pcl12*. Encontramos que los niveles de Cdc25 no disminuían, lo que sugiere que Pcl12 también podría ser necesaria para la disminución de Cdc25.

Decidimos buscar proteínas adicionales de Pcl12 que pudieran tener un papel en el arresto del ciclo celular inducido por el alelo *fuz7DD*. Para buscar posibles objetivos, realizamos experimentos de espectrometría de masas en colaboración con el Prof. Gerhard Braus de la Universidad de Goettingen (Alemania). Entre los objetivos específicos identificados, estaba la quinasa Cdk5, descrita como una CDK específica de Pcl12 y un regulador del transporte celular llamado Kap123, una β importina. Uno de los objetivos más representados fue también la quinasa Crk1 (Garrido y Pérez-Martin 2003).

Curiosamente, la quinasa Crk1 es un objetivo directo de la cascada de MAPK (Garrido et al., 2004). Para investigar la posibilidad de un papel de Crk1 en la regulación del ciclo celular, generamos el mutante de *crk1* en una cepa que porta el alelo *fuz7DD* y también analizamos los niveles de proteína Cdc25. Encontramos que con la activación de *fuz7DD*, los niveles

de Cdc25 no disminuyen y el ciclo celular no está parado en G2. Estos hallazgos indicaron que la quinasa Crk1, como ciclina Pcl12, era requerida para la parada del ciclo celular inducido por *fuz7DD*, así como para la regulación a la baja del nivel de Cdc25.

Los resultados anteriores sugieren que Crk1 y Pcl12 podrían ser interactuar en el control del arresto del ciclo celular dependiente de *fuz7DD*. Para comprender mejor dónde tiene lugar esta interacción, investigamos la localización subcelular de dicha interacción. Los resultados previos mostraron que Crk1 también se localiza en el núcleo en el citoplasma del filamento infeccioso (Bielska et al., 2014), mientras que Pcl12 se localiza sólo en el citoplasma (Flor-Parra et al., 2007). Se generó una cepa con de las proteínas de fusión Crk1-GFP, Pcl12-Cherry y el alelo *fuz7DD*. Una vez inducido *fuz7DD*, observamos que Crk1 se localizaba en el núcleo y a lo largo del tubo conjugativo. Pcl12 se localiza a lo largo del tubo conjugativo y no detectamos la señal en el núcleo previamente descrita para las hifas infecciosas. Finalmente, cuando fusionamos las dos señales, pudimos localizar algunas veces Crk1 y Pcl12 en puntos a lo largo del filamento, pero también pudimos detectar las señales individuales de Crk1 y Pcl12, lo que sugiere que complejos distintos coexisten en el citoplasma del tubos conjugativos.

Para verificar que Crk1 y Pcl12 interactuaban en el citoplasma, realizamos experimentos de BiFC. Esta técnica permite detectar la interacción de proteínas *in vivo* usando microscopía (Kerppola 2008, Miller et al., 2015). Cuando las células están formando el filamento tras la activación de *fuz7DD*, observamos una señal a lo largo del tubo conjugativo que confirma que la interacción entre Pcl12 y Crk1 ocurre en el citoplasma.

Durante este estudio, también notamos que la eliminación de *pcl12* o *crk1* en las células portadoras de *fuz7DD* afectaba la morfología del tubo conjugativo. Sin embargo, cuando generamos el doble mutante en una cepa que porta el alelo *fuz7DD*, observamos que la morfología del filamento se deterioraba más severamente que en los mutantes individuales,

lo que sugiere que Crk1 y Pcl12 podrían estar actuando en dos vías diferentes para controlar la morfología del filamento. Es importante tener en cuenta que el Pcl12 forma un complejo con la kinasa Cdk5 para controlar el crecimiento polar del tubo conjugativo inducido por el alelo fuz7DD (Castillo-Lluva et al., 2007; Flor-Parra et al., 2007). De la misma manera, la kinasa Crk1 requiere la activación de MAPKK Fuz7 para controlar la morfogénesis (Garrido et al., 2004). Creemos que Crk1 podría ser regulada diferencialmente por MAPKK Fuz7 para operar en morfogénesis y por Pcl12 para controlar la detención del ciclo celular, mientras que Pcl12 podría estar actuando en complejo con Cdk5 para controlar la morfogénesis y en complejo con Crk1 para controlar la parada del ciclo celular.

Se ha demostrado que en *U. maydis* el secuestro de Cdc25 en el citoplasma es un mecanismo que inhibe la transición G2/M (Mielnichuk et al., 2009). Dado que la disminución de los niveles de Cdc25 no fue la causa de la detención del ciclo celular inducida por el alelo fuz7DD, pero existía una correlación entre estos dos eventos, planteamos la hipótesis de que la retención de Cdc25 en el citoplasma podría provocar la detención del ciclo celular y su degradación. Para probar esta hipótesis, intentamos alterar el tráfico núcleo/citoplasma con el fin de retener Cdc25 en el núcleo. Para eso, primero verificamos si el tratamiento de las células que portan la proteína de fusión GFP-CDC25 con Leptomicina B (LMB), un compuesto que inhibe las exportaciones nucleares dirigidas a Exportina 1 (Crm1), mantiene Cdc25 en el núcleo de las células en gemación. Después de 30 minutos de tratamiento con Leptomicina B (100 ng / ml) (LMB), pudimos detectar la señal de Cdc25 en el núcleo.

Uno de los posibles interactores de Pcl12, clasificados por el análisis de Espectrometría de Masas, era un importina β de la subfamilia IMB4, que llamamos Kap123 (UMAG_15014) debido a la similitud de secuencia con la proteína correspondiente *S.cerevisiae*. El hecho de que Pcl12 interactuara con una importina llamó nuestra atención. En *U. maydis* hay siete

importinas β y solo una importina α , llamada Srp1. El β importina Kap123 (UMAG_15014) pertenece a la subfamilia IMB4. No se encuentran miembros de la subfamilia IMB3 en *U. maydis*. Sin embargo, se ha demostrado que en *C. cerevisiae* la importación de IMB4 puede sustituir a la función de IMB3 (Rout et al., 1997). Esto es importante porque en *S. pombe* se ha descrito que la importación nuclear de Cdc25 está regulada por una importación de la subfamilia IMB3 llamada Sal3 (Chua et al., 2002). Por todas estas razones, preguntamos si Kap123 podría tener un papel en la regulación de la localización de Cdc25. Generamos mutantes condicionales donde el promotor de *kap123* y *srp1* se intercambia con Pnar1, que se reprime en medio rico (YPD). La disminución de *kap123* y *srp1* apoya la idea de que estos genes son esenciales. Para estudiar si Kap123 y Srp1 estaban implicados en la localización de Cdc25, introducimos ectópicamente el alelo GFP-Cdc25 controlado por el promotor *crg1* en las cepas condicionales (el alelo endógeno apenas puede ser detectable).

Observamos que cuando regulamos *srp1*, Cdc25 fue capaz de localizar en el núcleo como en las células de control. Contrariamente, cuando se reprimía la expresión de *kap123*, no se podía observar la acumulación de Cdc25-GFP en el núcleo, lo que indica que Kap123 estaba implicado en el transporte de Cdc25 al núcleo.

Una posibilidad interesante era que Kap123 era un objetivo del complejo Crk1-Pcl12 y que la fosforilación podría interferir con la capacidad de la importina para translocar Cdc25 al núcleo. Para abordar esta hipótesis, primero verificamos si podíamos observar algún cambio en la movilidad de la proteína tras la inducción del alelo *fuz7DD*. Generamos una cepa que portaba la proteína de fusión Kap123-HA, que era funcional, y el alelo *fuz7DD*. Observamos que, tras la activación del alelo *fuz7DD*, hubo un cambio en la movilidad electroforética de Kap123, lo que sugiere una fosforilación tras la activación del alelo *fuz7DD*. Comprobamos si este cambio en la movilidad electroforética Kap123 dependía de Crk1 o Pcl12. Originamos dos cepas que carecían de *pcl12* y *crk1* y portan el alelo *fuz7DD*.

Después de cuatro horas de crecimiento en condiciones de inducción, los extractos proteicos de los mutantes *crk1* o *pcl12* descartaron un cambio en la movilidad de Kap123 que apoya la noción de que Crk1 y Pcl12 fueron necesarios para el cambio Kap123 cuando se induce el alelo *fuz7DD*. Además, verificamos si este cambio en la movilidad de Kap123 era dependiente de MAPK Kpp2. Para abordar esta cuestión, generamos una cepa que contiene la eliminación de *kpp2* y el alelo *fuz7DD*. En la condición inductora, no se detectó ningún cambio en la movilidad de Kap123, lo que ilustra que la fosforilación también era dependiente de Kpp2.

Debido a que el complejo Crk1-Pcl12 parece ser capaz de fosforilar la importación de Kap123, se buscaron sitios putativos de CDK en la secuencia de aminoácidos Kap123. Encontramos dos sitios putativos, 324DEDSPSR330 y 864KYYTPGR870, que decidimos mutar para generar dos alelos de *kap123* refractarios a la fosforilación. Pudimos intercambiar la treonina en la posición 867 con alanina, alelo *kap123T867A*, pero no logramos obtener la otra mutación. Curiosamente, la predicción de Kap123 mostró que el sitio de CDK que mutamos estaba localizado en la superficie de la proteína, una posición adecuada para interactuar con las proteínas de la carga. Para comprobar si la detención del ciclo celular inducida por el alelo *fuz7DD* se vio afectada por esta mutación, generamos una cepa que porta el alelo *fuz7DD* y el alelo refractario *kap123T867A*, como control de una cepa que porta la proteína de fusión Kap123-HA y el alelo *fuz7DD*. Curiosamente, se observó que cuando se inducía el alelo *fuz7DD*, las células no podían detener el ciclo celular, lo que ilustra que se requería la fosforilación de Kap123 para controlar la parada del ciclo celular inducido por *fuz7DD*. Además, verificamos si la mutación T867A afectaba la movilidad electroforética de Kap123 después de la inducción del alelo *fuz7DD*. Observamos que no hubo cambio en la movilidad de *kap123T867A*, lo que sugiere que la importina probablemente se fosforiló en este sitio CDK cuando el alelo *fuz7DD* estaba activo. Teniendo en cuenta que Kap123 afectó la localización de Cdc25, verificamos los

niveles de Cdc25 en las células que portaban el alelo refractario a la fosforilación de kap123T867A y el alelo fuz7DD. Tras la inducción del alelo fuz7DD, los niveles de Cdc25 no disminuyeron, lo que sugiere que se requirió la fosforilación de Kap123 para la degradación de Cdc25.

DISCUSSION

En este trabajo hemos investigado la parada del ciclo celular inducido por feromonas en el hongo fitopatógeno *U. maydis*. La virulencia en este hongo está estrictamente relacionada con el desarrollo sexual y el inicio del programa patogénico comienza cuando dos células compatibles no patógenas se aparean en respuesta a la feromona. Esta señal es percibida por receptores ubicados en la membrana plasmática y transmitidos en la célula a través de la vía MAPK. Esta cascada puede modular dos eventos fundamentales para el apareamiento: la formación del tubo conjugativo y la parada del ciclo celular. En este estudio nos hemos centrado en el mecanismo de detención del ciclo celular y cómo la cascada de MAPK puede gobernarlo. Los hallazgos más importantes serán discutidos en la siguiente sección.

A diferencia de *S. cerevisiae*, *U. maydis* no se aparea espontáneamente, pero el programa de apareamiento comienza cuando las células están en estado de inanición. Para eludir esta señalización nutricional utilizamos un alelo activado de MAPK Fuz7, fuz7DD, regulado por un promotor inducible (Muller et al., 2003). De esta forma, pudimos activar la vía MAPK sin agregar feromonas o células en crecimiento en condiciones de medios especiales. Después de la validación de la parada del ciclo celular G2 cuando el alelo fuz7DD está activo, se evaluó que la fosforilación inhibitoria de Cdk1 es parte del mecanismo de detención del ciclo celular inducido por la feromona. Esta reacción es catalizada por la quinasa Wee1, cuya actividad es fundamental para la parada del ciclo celular de las feromonas. Estos argumentos están de acuerdo con el mecanismo que opera durante la transición G2 / M en el que el nivel de la forma fosforilada de Cdk1 determina

la progresión en mitosis o un retraso en la fase G2 (Sgarlata y Pérez-Martin 2005). Cuando analizamos los niveles de proteína de los reguladores maestros G2 / M en presencia de una cascada de MAPK activa, observamos una disminución en los niveles de proteína Cdc25 de la fosfatasa. Cdc25 es necesario para eliminar el inhibir la fosforilación de Cdk1 y promover la entrada en la mitosis (Sgarlata y Pérez-Martin 2005). Paradójicamente, cuando sobreexpresamos Cdc25, suponiendo que las células podían reingresar al ciclo celular, observamos que el ciclo celular seguía detenido y no se detectaba disminución de los niveles de Cdc25. Este hallazgo nos llevó a pensar que otro mecanismo estaba involucrado en la parada del ciclo celular y que la regulación a la baja de Cdc25 estaba asociada con esta, pero no era la única causa. El resultado previo de que el reclutamiento citoplasmático de Cdc25 conduce a un aumento de la fosforilación inhibidora de Cdk1 asociada con un retraso en la transición G2 / M (Mielnichuk y Pérez-Martin 2008) y nuestra observación de que la localización nuclear Cdc25 evita su regulación negativa, indicó que La regulación en el mecanismo del tráfico citoplasmático Cdc25 podría operar en la parada del ciclo celular inducido por feromonas. El hallazgo de que la importina Kap123, un interactor de Pcl12, ordenado por Espectrometría de masas, estaba involucrado en la localización de Cdc25, y apoyó esta hipótesis. Cuando descubrimos que la movilidad electroforética de Kap123 cambió con la activación de la cascada MAPK y este cambio fue dependiente de Crk1 y Pcl12 consideramos la hipótesis de que el complejo Crk1-Pcl12 podría fosforilar la importancia de Kap123 y afectar la capacidad de transportar Cdc25 en el núcleo. La observación de que la forma Kap123 T867A refractaria a la fosforilación de CDK no cambiaba en la movilidad electroforética tras la activación de la cascada de MAPK y que las células portadoras de la proteína Kap123 T867A no fueron detenidas sostenía nuestra hipótesis. Además, demostramos que los niveles de Cdc25 no disminuían en presencia de Kap123 T867A. Siguiendo estos resultados, proponemos un modelo en el que, tras la activación de la cascada de MAPK, se forma el complejo Crk1-Pcl12. Este complejo

fosforila a la importina en Kap123 evitando la entrada al núcleo de Cdc25. La retención de Cdc25 en el citoplasma evita la progresión en la mitosis y promueve la detención del ciclo celular G2 debido al aumento de la fosforilación inhibitoria de Cdk1. En consecuencia, Cdc25 se acumulaba en el citoplasma donde estaba regulado por disminución (Fig.2)

CONCLUSIONES

- En *U. maydis*, la señal de feromonas induce el ciclo celular G2
- La detención del ciclo celular G2 inducida por feromonas requiere la fosforilación inhibitoria de Cdk1
- La disminución de Cdc25 depende de la activación de la cascada de MAPK
- La kinasa Crk1 relacionada con Cdk actúa en forma compleja con la ciclina Pcl12 para detener el ciclo celular en respuesta a la feromona.
- Crk1 es activado por MAPK Fuz7 para controlar la morfogénesis y por la ciclina Pcl12 para controlar la parada del ciclo celular de feromonas
- La β -importina, Kap123, es necesaria para la localización de Cdc25
- La β -importina, Kap123 es fosforilada por el complejo Crk1-Pcl12
- El alelo kap123T867A refractario a la fosforilación evita la detención del ciclo celular de las feromonas y la regulación a la baja de Cdc25.