

DETECCIÓN DE FOSFORILACIÓN EN RESIDUOS DE HISTIDINA/TIROSINA DURANTE EL CRECIMIENTO *in vitro* DE *Mycosphaerella fijiensis*, HONGO PATÓGENO DE BANANO

Brito-Argáez L¹., Chuc-Uc J¹., Canto-Canché B²., Tzec-Simá M²., Peraza-Echeverría S²., Peraza-Echeverría L²., Grijalva-Arango R²., Andrew J²., Rodríguez-García C²., Islas-Flores I¹.

¹Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas; ²Unidad de Biotecnología. Centro de Investigación Científica de Yucatán A.C., Calle 43 No. 130, colonia Chuburná de Hidalgo, c.p. 97200, Mérida, Yucatán, México. Tel. 999 9 42 83 30, ext. 225; e-mail:islasign@cicy.mx

Las proteínas cinasas de histidina (HPKs) son sistemas de transducción de señales, esenciales en la regulación de las respuestas a estímulos medioambientales, tales como cambios en la presión osmótica, el estrés oxidativo, la percepción de fungicidas y en la virulencia de los patógenos. A partir de *Neurospora crassa*, *Candida albicans* y *Aspergillus nidulans* se aisló la familia de genes *NIK1*, que codifica proteínas cinasa de histidina, la delección del gen *CaNIK1* en *Candida albicans* resultó en severos defectos en la formación de la hifa y en el abatimiento de la virulencia. En base a los resultados anteriores es posible sugerir que las histidinas cinasas pudieran ser un posible blanco para el control de los hongos patógenos.

En *Mycosphaerella fijiensis*, hongo patógeno de banano, nada se conoce acerca de la fosforilación en residuos de histidina/tirosina ni se ha descrito actividad de las proteínas cinasas pertenecientes a esta familia. En el presente trabajo se exploró la posibilidad de detectar la actividad de las cinasas de histidina/tirosina. Se cultivó *M. fijiensis* en medio V8 líquido durante un ciclo de 21 días, se colectó el micelio cada tres días, se maceró en presencia de nitrógeno líquido y se colectó la proteína soluble.

Ensayos de fosforilación utilizando [³²P-γ]-ATP y la proteína intracelular (20 µg) extraída de las muestras colectadas a través del ciclo de cultivo, mostraron que en los días 3 y 6 de cultivo es donde ocurre es la mayor actividad de cinasa. La utilización de los sustratos exógenos Histona H1 y la proteína básica de la mielina (MBP), mostró que las cinasas endógenas de *M. fijiensis* pueden fosforilar a la MBP, pero no a la Histona H1. Los ensayos de fosforilación en residuos de histidina/tirosina utilizando la proteína intracelular de los días 3 y 6 y el compuesto NH125, un inhibidor de la actividad de EnvZ, una histidina cinasa de *Escherichia coli* y de la cinasa de eEF-2, no afectó el nivel de fosforilación en los sustratos endógenos de *M. fijiensis*. Después de aplicar un tratamiento alcalino a las proteínas fosforiladas de los días 3 y 6 se detectó que una proteína de ~130 kDa permaneció fosforilada; la inmunodetección con un anticuerpo monoclonal contra fosfotirosina dio reacción positiva con el mismo polipéptido. Dicho resultado sugiere que en *M. fijiensis* al menos una proteína se fosforila en residuos de histidina/tirosina. Estos ensayos sientan las bases para la detección de la fosforilación en residuos de histidina/tirosina en la proteína intracelular de *M. fijiensis*.

Trabajo Financiado por CONACyT, proyecto No. 45788-Z