

ACTIVIDAD CIRCADIANA DE LA ENZIMA SUCCINATO DESHIDROGENASA EN *Neurospora crassa*

Circadian Rhythm in Succinate Dehydrogenase Activity in *Neurospora crassa*

CLAUDIA PATRICIA ÁLVAREZ BARÓN
Instituto de Genética, Facultad de Medicina,
Universidad Nacional de Colombia.

Presentado en marzo 23 de 2004, aceptado en agosto 26 de 2004

RESUMEN

Neurospora crassa es un modelo de ritmicidad circadiana ampliamente estudiado. El metabolismo de este hongo es controlado por múltiples factores que incluyen el desarrollo, las características del medio y el reloj circadiano. El estudio de la regulación circadiana del metabolismo en este hongo podría estar enmascarado por el uso de medios restrictivos que suprimen su crecimiento y desarrollo. En el presente trabajo se estudió la variación en el tiempo de la actividad de la enzima Succinato Deshidrogenasa durante 24 horas en medio completo sin restricción para la conidiación en cepas de *Neurospora crassa* rítmica y arrítmica. Se encontró una variación circadiana en la actividad enzimática de la cepa rítmica con valores altos en las horas correspondientes a la noche y bajos durante el día. Este hallazgo resalta la importancia de profundizar en el estudio del control circadiano sobre el metabolismo de este hongo, con base en la existencia de vías de regulación múltiples sobre las enzimas del metabolismo y de mecanismos post-transcripcionales y transcripcionales de control circadiano.

Palabras clave: ritmos circadianos, *Neurospora crassa*, Succinato Deshidrogenasa.

ABSTRACT

Neurospora crassa is a widely studied model of circadian rhythmicity. In this fungus, metabolism is controlled by multiple factors which include development, medium characteristics and the circadian clock. The study of the circadian control of metabolism in this fungus could be masked by the use of restrictive media that inhibit growth and development. In this report, the presence of a circadian rhythm in the activity of the enzyme Succinate Dehydrogenase in *Neurospora crassa* is demonstrated. Rhythmic and arrhythmic *Neurospora* strains were grown in complete medium without conidiation restriction. A circadian change in the enzymatic activity was found with high values in hours corresponding to the night and a low level during the day. This finding highlights the importance of deeper studies in the circadian control of metabolism in this fungus, given the existence of multiple pathways of regulation of metabolic enzymes and a circadian clock control at the transcriptional and post-transcriptional levels.

Keywords: circadian rhythms, *Neurospora crassa*, Succinate Dehydrogenase.

INTRODUCCIÓN

Los seres vivos poseen relojes endógenos que les permiten anticiparse a los cambios propios del día y la noche (Dunlap, 1993). Estos relojes llamados circadianos (circa-cerca, diem-día), han sido caracterizados desde el punto de vista molecular en organismos como la drosophila, *Neurospora crassa* y varios modelos murinos (Dunlap, 1993; Dunlap, 1999). *Neurospora crassa* es un hongo filamentoso de la clase ascomyceta, que exhibe ciclos de desarrollo sexual y asexual (Alexopoulos y Mims, 1979). Durante su desarrollo asexual, produce esporas conocidas como conidias con intervalos cercanos a las 24 horas, que son transportadas por el aire para crear focos de crecimiento vegetativo (Davis y De Serres, 1970). El carácter circadiano de este fenotipo y el hallazgo incidental en 1953 de la cepa band, que posee la propiedad de extender su micelio de forma horizontal en cultivo sólido formando a su paso bandas características del estadio de desarrollo (Bell-Pedersen, 2000), sugirieron desde muy temprano las bondades de este modelo para descifrar el mecanismo de medición temporal (Pittendrigh *et al.*, 1959).

Los sistemas circadianos constan de un oscilador endógeno que funciona en ausencia de claves medioambientales, entradas sincronizadoras que encarrilan el reloj de manera que se acople a duraciones variables del fotoperíodo, y salidas que traducen la oscilación del reloj en cambios fisiológicos (Dunlap, 1999). En *Neurospora crassa*, el oscilador está formado por bucles de autorregulación negativa entre el gen *frequency* y los genes *White collar 1* y *2* con sus respectivas proteínas (revisado en Bell-Pedersen, 2000; Merrow *et al.*, 2001). De una manera poco conocida la oscilación de los elementos moleculares del reloj afecta la expresión de genes relacionados con el desarrollo y el metabolismo del hongo. Aunque se ha hecho énfasis en el nivel transcripcional de control (Bell-Pedersen *et al.*, 1996; Zhu *et al.*, 2001), existen evidencias de que la influencia del reloj podría extenderse al dominio post-transcripcional en este y otros modelos (Fagan *et al.*, 1999; Bell-Pedersen, 2000). El apoyo de un control circadiano del metabolismo partió de hallazgos en la década de 1960 de cambios en la actividad de varias enzimas del metabolismo intermediario durante el desarrollo asexual (Peduzzi y Turian, 1972; Stine, 1979) y, posteriormente, de dos genes relacionados con el metabolismo en tamizajes para genes controlados por el reloj: Metalotioneína de Cobre y Gliceraldehído 3-fosfato Deshidrogenasa (Bell-Pedersen *et al.*, 1996; Shinohara *et al.*, 1998). Dado que los cambios propios del desarrollo asexual son sincrónicos con los dados por el reloj circadiano, el estudio del efecto del reloj circadiano sobre las enzimas del metabolismo que varían con el desarrollo ha sido realizado utilizando medios con concentraciones de fuentes de carbono que inhiben el desarrollo y el crecimiento (Nakashima, 1981). Sin embargo, varios estudios han indicado que el efecto del reloj se interconecta con otros niveles de regulación como la luminosidad, la nutrición, el estrés osmótico y el desarrollo asexual (Bell-Pedersen *et al.*, 1996; Loros, 1998; Aign y Hoheisel, 2003), de manera que es posible sugerir que el análisis del control circadiano sobre el metabolismo se ha visto enmascarado por

el uso de medios con nutrientes limitados. De hecho, se ha encontrado un efecto de la depleción de fuentes de carbono sobre la expresión de la enzima Succinato Deshidrogenasa en *Saccharomyces cerevisiae* (Prieto *et al.*, 2000), y numerosos reportes señalan un efecto de la misma sobre el desarrollo de *Neurospora crassa* (Ebbole, 1998). La Succinato Deshidrogenasa es un complejo enzimático que hace parte de la interfaz entre la cadena respiratoria y el ciclo de los ácidos tricarbóxicos. Esta enzima acopla la oxidación del succinato a fumarato a la reducción de una molécula de ubiquinona, sin la traslocación de protones a la matriz mitocondrial (Joseph-Horne *et al.*, 2001). Es crítica en el metabolismo aeróbico en eucariotas y procariotas y está sujeta a una regulación estrecha debido a que participa en el cambio del metabolismo anaeróbico al aeróbico y amortigua la generación de radicales libres de oxígeno en la mitocondria en condiciones aeróbicas (Hederstedt, 2003). La regulación de esta enzima ha sido ampliamente estudiada en *Saccharomyces cerevisiae*, particularmente en lo relacionado al efecto de la glucosa sobre la transcripción de la subunidad 2 y la estabilidad del mRNA (Scheffler, 1998).

A pesar de que son pocos los estudios que resaltan la importancia de la regulación de esta enzima en hongos de la clase ascomiceta, las características mencionadas y estudios que detallan su variación con el desarrollo asexual en *Neurospora* (Stine, 1979) hacen importante el análisis de su regulación temporal en el hongo. En el presente trabajo se demuestra la variación circadiana de la actividad de la enzima Succinato Deshidrogenasa en cultivos de *Neurospora crassa* *bd, frq¹⁰* y *bd, frq⁷*, crecidos en medios con concentración de carbono permisiva para la conidiación.

MATERIALES Y MÉTODOS

CEPAS DE *Neurospora Crassa*

Cepas de *Neurospora crassa* *bd, frq¹⁰* y *bd, frq⁷*, donadas por el Departamento de Genética del Dartmouth Medical School, fueron cultivadas según métodos estándar en medio simple de Vogel utilizando sacarosa como fuente de carbono (Davis y De Serres, 1970). Para el cultivo líquido de discos de micelio se empleó el protocolo descrito en Nakashima (1981), pero con transferencia de discos de micelio a medio con concentración de sacarosa del 2% que permite el desarrollo vegetativo. La mutación *band* permite la visualización fácil del patrón de bandas de conidiación sin afectar el reloj circadiano de *Neurospora*, razón por la que todos los estudios publicados acerca del reloj circadiano de este hongo, toman la cepa *bd* como silvestre (Bell-Pedersen, 2000). La cepa *bd, frq¹⁰*, es un mutante de pérdida de función para el locus *frequency* que exhibe un patrón de bandas arrítmico en cultivo sólido y es arrítmico para todos los demás fenotipos circadianos reportados; *bd, frq⁷* es un mutante que exhibe un período de oscilación circadiana molecular y fenotípica de 29 horas a 25° C (Aronson *et al.*, 1994). El reloj de la cepa *bd, frq⁷* es totalmente funcional bajo las condiciones del presente estudio y la localización de su mutación en el locus *frequency* está claramente definida, razones por las que es posible estudiarla como cepa rítmica. Los cultivos fueron crecidos en luz constante durante 12 a 24 horas y sincronizados mediante transferencia a luz roja constante a una temperatura también constante de 25° C

(Dharmananda y Feldman, 1979). Los materiales empleados para el cultivo, la medición de la actividad enzimática y la cuantificación de proteínas fueron adquiridos de Sigma y Merck.

CONTROL DEL RITMO CIRCADIANO

La fase de oscilación de los cultivos fue valorada transfiriendo un disco de micelio en cada hora analizada y al momento de la sincronización a tubos horizontales con medio sólido, y evaluando el patrón de bandas de conidiación según se describe en Dharmananda y Feldman (1979), (Fig. 1). El surgimiento de la primera banda de conidiación indica la fase del ritmo en que se transfirió el disco. El marcaje del frente de crecimiento, la transferencia a tubo horizontal y la homogenización del tejido se realizaron bajo luz roja de 25 watts que no afecta el reloj de *Neurospora crassa* (datos no presentados) y que estuvo presente durante todo el cultivo.

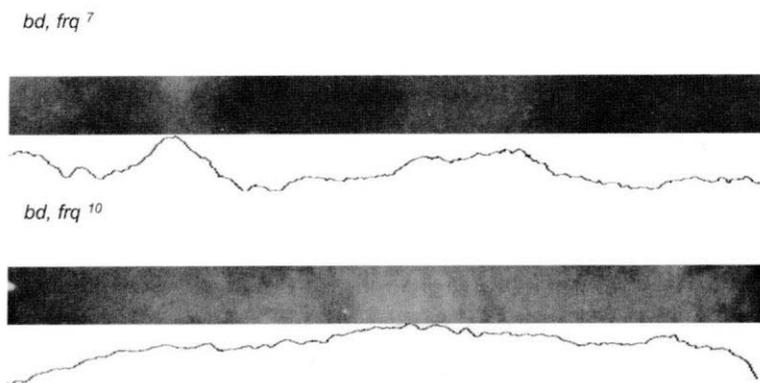


Figura 1. Ejemplo del patrón de bandas de conidiación exhibido en cultivo en tubos horizontales por las cepas de *Neurospora crassa* estudiadas y de su medición por densitometría. Cada imagen corresponde a la fotografía de un tubo con medio sólido en cuyo extremo izquierdo se ha sembrado un disco de micelio. Con el paso de las horas el micelio se extiende hacia el otro extremo dejando a su paso bandas de conidiación. Observe que el claro patrón de bandas en la cepa rítmica no se observa en la cepa arrítmica. Los intervalos estimados de aparición de las bandas en la cepa rítmica correspondieron a su período endógeno.

ENSAYO ENZIMÁTICO

La disrupción del micelio para la medición enzimática se llevó a cabo mediante la homogenización del tejido por dos minutos a 4° C. El material homogenizado se depositó luego en tubos para centrifuga de 1,5 ml, se centrifugó a 700 g por 20 minutos y se analizó el sobrenadante (Stine, 1979). La actividad enzimática fue evaluada a través de la medición espectrofotométrica, a una longitud de onda de 600 nm, de la velocidad de reducción del aceptor de electrones artificial 2,4 dicloroindolifenol (DCIP) después de la adición de Succinato de Sodio y del extracto según se describe en Bregman (1996), con las siguientes modificaciones: se utilizó KCN 0,03 M para bloquear la cadena de electrones y una concentración de sustrato del 1%. Se empleó

un espectrofotómetro Bacharach Modelo 35 de Perkin Elmer. La velocidad de reducción del DCIP fue seguida durante tres minutos en el ensayo con discos de micelio y durante un minuto en el ensayo con micelio y conidias. Los datos obtenidos en ambos casos fueron ajustados a una línea recta para evaluar la disminución en la absorbancia por unidad de tiempo. La actividad enzimática se ajustó a la cantidad de proteína en la fracción analizada según su determinación mediante el método de Lowry modificado usando como patrón albúmina sérica bovina (Schacterle y Pollack, 1973).

DETERMINACIÓN DE OSCILACIONES DE LA ACTIVIDAD DE LA ENZIMA SUCCINATO DESHIDROGENASA
Para determinar el período de oscilación de la actividad enzimática se sincronizaron cultivos crecidos en medio permisivo para la conidiación y se analizó la actividad enzimática a partir de extractos de discos de micelio obtenidos cada hora circadiana durante 24 horas circadianas empezando en la primera hora tras la transferencia. Los discos de micelio se depositan en el fondo del medio sin contacto con el aire, esto retarda el inicio de la conidiación y permite analizar cosechas de micelio sin esporas. La hora de la transferencia a oscuridad es definida como la hora circadiana 12. Una hora circadiana se define a través de una normalización del período endógeno de determinada cepa a 24 horas (hora circadiana = período endógeno/24). El período de la cepa arrítmica se ajustó según aquel de la cepa de período largo para controlar el efecto del tiempo en cultivo. Cada ensayo se realizó por duplicado y se realizó un ensayo separado por cada cepa. Para determinar la persistencia del patrón observado en muestras de micelio y conidias con mayor tiempo en cultivo se realizaron repeticiones de las horas circadianas correspondientes a zonas valle y cresta determinadas en el ensayo descrito arriba. En este caso, se analizó el conjunto de micelio y conidias obtenidos del cultivo en tubos de vidrio con 15 ml de medio permisivo para la conidiación. Las repeticiones fueron pareadas por el tiempo en cultivo a la hora del análisis. Los cultivos fueron transferidos a luz roja constante de manera que, a la hora de ser analizados, hubieran permanecido un mínimo de 24 horas bajo esta condición. El tiempo de cultivo se ajustó mediante las horas en luz constante.

ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS

La significancia estadística de las oscilaciones en 24 horas y de la diferencia entre los valores alto y bajo de las oscilaciones observadas en la actividad enzimática se evaluaron mediante ANDEVA de una vía y prueba de Tukey para identificar diferencias significativas entre las horas circadianas con un α de 0,05. El análisis de los datos se realizó mediante los programas EXCEL XP y SAS 8,0. La graficación de los resultados y el suavizado gráfico de los datos obtenidos de la medición en 24 horas se realizaron mediante el programa ORIGIN 5,0. La evaluación por densitometría del patrón de bandas en medio sólido se realizó mediante el programa Image J. Debido a que la medición de una sola oscilación no permite el uso de herramientas matemáticas para un análisis espectral completo, los resultados en 24 horas fueron analizados mediante ANDEVA de una vía para probar la significancia del efecto del tiempo sobre la actividad enzimática y la inspección cualitativa de la variación. Se escogió como filtro gráfico la Transformada rápida de Fourier porque permitió la visualización más clara de la oscilación encontrada.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La reducción del DCIP durante los tres primeros minutos después de agregar el extracto se ajustó a una línea recta con pendiente negativa obteniéndose en todos los casos analizados coeficientes de correlación $> 0,9$. La actividad enzimática fue definida como la reducción del DCIP por unidad de tiempo por cantidad de proteína analizada. Los datos obtenidos de la medición de la actividad enzimática cada hora durante 24 horas circadianas en cultivos sincronizados, fueron analizados cualitativamente empleando como filtro la Transformada Rápida de Fourier (Figs. 2A y 2B). Se obtuvo un patrón circadiano claro para la cepa rítmica con $p = 0,0002$ para un efecto de la hora circadiana sobre la actividad enzimática con pico en la hora circadiana 14 y valle en la hora circadiana cuatro en los datos no filtrados. Para la cepa arrítmica no se obtuvo un patrón de oscilación circadiana claro ni un efecto significativo de la hora circadiana sobre la actividad enzimática ($p > 0,05$).

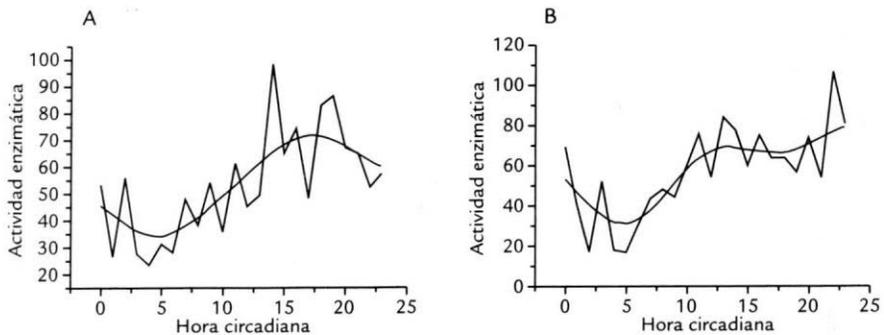


Figura 2. A. Oscilación circadiana en la actividad de la enzima Succinato Deshidrogenasa en la cepa rítmica. Los datos corresponden a la media aritmética de dos observaciones en cada hora circadiana. La actividad enzimática corresponde a la disminución en la absorbancia a 600 nm por minuto por gramo de proteína. La línea punteada resulta de emplear la Transformada Rápida de Fourier para suavizar gráficamente los datos. B. Actividad de la enzima Succinato Deshidrogenasa en la cepa arrítmica en 24 horas circadianas. La curva suavizada no presenta el aspecto de una variable circadiana.

Los discos de micelio transferidos a tubos horizontales en cada hora analizada permitieron identificar diferencias en la localización de la primera banda de conidiación correspondientes a la fase predicha por el tiempo después de la transferencia a luz roja constante. Para determinar la persistencia del patrón observado en muestras de micelio y conidias con mayor tiempo en cultivo se diseñó un experimento en el que se tomaron mediciones repetidas de la actividad enzimática en las horas circadianas cuatro y 16, correspondientes a zonas extremas observadas en el ensayo descrito arriba. Para controlar el efecto del tiempo de cultivo se manipuló la hora de transferencia a oscuridad de manera que, a la hora de hacer la determinación de la actividad, los cultivos tuvieran tiempos de crecimiento que se pudieran parear. Los tiempos en cultivo pareados tuvieron un rango de 24 a 32 horas. Las condiciones de cultivo fueron modificadas para obtener una cantidad de micelio y conidias suficiente en tiempos de cultivo cortos. Según la hora a ser analizada se realizaron las transferencias entre 24 y 12 horas de crecimiento en luz, temperatura y agitación constantes. En la cepa rítmica

se realizaron nueve repeticiones para la hora circadiana 16 y 22 para la hora circadiana cuatro. De la cepa arrítmica, ajustando el período de oscilación a 24 horas, se obtuvieron 15 repeticiones para cada hora circadiana. Se identificó una diferencia significativa entre la actividad enzimática medida a la hora circadiana 16, con media y desviación estándar de $86,6 \pm 15,9$ y a la hora cuatro, con media de $61,1 \pm 17,6$, para una p de 0,008 en la cepa rítmica. En la cepa arrítmica no se observó diferencia significativa entre las horas circadianas estudiadas ($p = 0,2654$) (Figs. 3A y 3B).

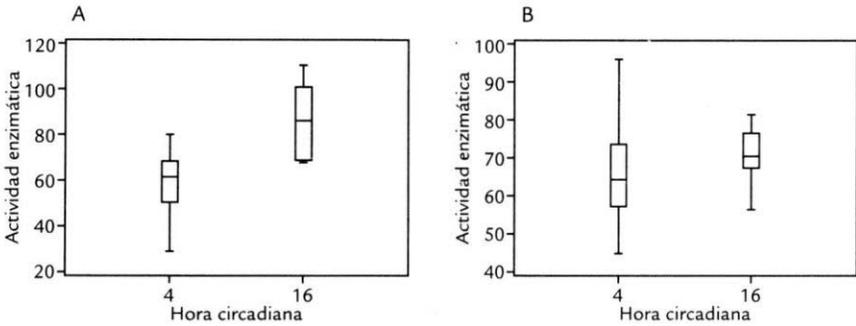


Figura 3. A. Diagrama de cajas de la actividad enzimática medida en las horas circadianas 4 y 16 en la cepa rítmica. La actividad enzimática corresponde a la disminución en la absorbancia a 600 nm en el primer minuto por gramo de proteína. B. Diagrama de cajas de la actividad enzimática medida en las horas circadianas cuatro y 16 en la cepa arrítmica. Las barras de error indican la elevada variación entre la actividad enzimática de los cultivos analizados en cada hora. Dado que se trata de cultivos sincronizados bajo las mismas condiciones de la cepa rítmica, cuya única diferencia respecto a ésta es la presencia de un oscilador circadiano no funcional, esta variación soporta la existencia de una actividad arrítmica de la enzima en esta cepa.

Finalmente se realizó un análisis de bloques controlando el tiempo de cultivo al momento de realizar la medición. Se lograron cruzar 12 de las unidades obtenidas para la cepa rítmica en el mismo experimento analizado arriba. Bajo estas condiciones se mantuvo la significancia estadística de la diferencia entre la actividad medida en el día y la noche subjetivas para la cepa rítmica con medias respectivas de $41,8 \pm 11,9$ y $87,4 \pm 17,1$ ($p = 0,0035$) para el efecto de la hora circadiana (Fig. 4). El tiempo en cultivo no tuvo un efecto significativo sobre la actividad enzimática ($p > 0,05$).

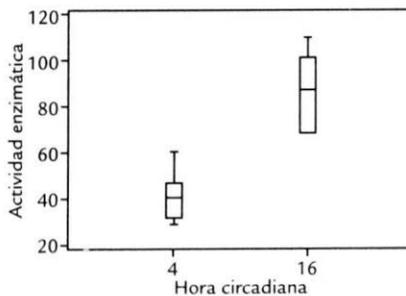


Figura 4. Diagrama de cajas de la actividad enzimática medida en las horas circadianas cuatro y 16 para la cepa rítmica, pareada por el tiempo en cultivo.

- DUNLAP J.C. 1999. Molecular Bases for Circadian Clocks. *Cell*. 96: 271-290.
- EBBOLE D.J. 1998. Carbon Catabolite Repression of Gene Expression and Conidiation in *Neurospora crassa*. *Fungal Genetics and Biology*. 25: 15-21.
- FAGAN T., D. MORSE, W. HASTINGS. 1999. Circadian Synthesis of a Nuclear-Encoded Chloroplast Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase in the Dinoflagellate *Gonyaulax Polyedra* is Translationally Controlled. *Biochemistry*. 38: 7.689-7.695.
- HEDERSTEDT L. 2003. Complex II Is Complex Too. *Science*. 299: 671-672.
- JOSEPH-HORNE T., D.W. HOLLOWAY, P.M. WOOD 2001. Fungal Respiration: A Fusion of Standard and Alternative Components. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1.504: 179-195.
- LOROS J.J. 1998. Time at the End of the Millennium: The *Neurospora* Clock. *Current Opinion in Microbiology*. 1: 698-706.
- MERROW M., T. ROENNEBERG, G. MACINO, L. FRANCHI. 2001. A Fungus Among us: The *Neurospora crassa* Circadian System. *Seminars in Cell and Developmental Biology*. 12: 279-285.
- NAKASHIMA H. 1981. A Liquid Culture Method for the Biochemical Analysis of Circadian Clock in *Neurospora crassa*. *Plant and Cell Physiol*. 22 (2): 231-238.
- PEDUZZI R., G. TURIAN. 1972. Recherches sur la différenciation conidienne de *Neurospora crassa*. *Ann. Inst. Pasteur*. 122: 1.081-1.097.
- PITTENDRIGH C.S., V.G. BRUCE, N.S. ROSENSWEIG, M. RUBIN. 1959. Growth Patterns in *Neurospora*. *Nature*. 164 (4.681): 169-170.
- PRIETO S., B.J. DE LA CRUZ, I.E. SCHEFFLER. 2000. Glucose-Regulated Turnover of mRNA and the Influence of Poly (A) Tail Length on Half-life. *The Journal of Biological Chemistry*. 275 (19): 14.155-14.166.
- SCHACTERLE G., R. POLLACK. 1973. *Analytical Biochemistry*. 51: 654-655.
- SCHEFFLER I.E. 1998. Molecular Genetics of Succinate: Quinone Oxidoreductase in Eukaryotes. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*. 60: 267-315.
- SHINOHARA M.L., J.J. LOROS, J.C. DUNLAP. 1998. Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase Is Regulated on a Daily Basis by the Circadian Clock. *The Journal of Biological Chemistry*. 273 (1): 446-452.
- STINE G.J. 1979. Enzyme Activities During the Asexual Cycle of *Neurospora crassa*. I. Succinic Dehydrogenase. *Canadian Journal of Microbiology*. 13: 1.203-1.210.
- ZHU H., M. NOWROUSIAN, D. KUPFER, H.V. COLOT, H.V. BERROCAL-TITO, H. LAI, D. BELL-PEDERSEN, B.A. ROE, J.J. LOROS, J.C. DUNLAP. 2001. Analysis of Expressed Sequence Tags from Two Starvation, Time-of-Day-Specific Libraries of *Neurospora crassa* Reveals Novel Clock-Controlled Genes. *Genetics*. 157 (3): 1.057-1.065.