

109
2es.



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**CARACTERIZACION DE UN GEN DE
CATALASA DE A. nidulans.**

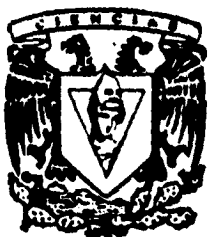
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

B I O L O G A

P R E S E N T A :

ROSA ESTELA NAVARRO GONZALEZ



MEXICO, D. F.



**FACULTAD DE CIENCIAS
SECCION ESCOLAR**

1995

FALLA DE ORIGEN

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

M. EN C. VIRGINIA ABRIN BATULE
Jefe de la División de Estudios Profesionales
Facultad de Ciencias
Presente

Los abajo firmantes, comunicamos a Usted, que habiendo revisado el trabajo de Tesis que realiz(ó)ron la pasante(s) Rosa Estela Navarro González

con número de cuenta 8719993-2 con el Título: Caracterización de un gen de catalasa de A. nidulans.

Otorgamos nuestro **Voto Aprobatorio** y consideramos que a la brevedad deberá presentar su Examen Profesional para obtener el título de Biólogo.

GRADO	NOMBRE(S)	APELLIDOS COMPLETOS	FIRMA
Dr.	Jesús	Aguirre Linares	
Director de Tesis Dr.	Wilhelm	Hansberg Torres	
M. en C.	Juan Carlos	Gaytan Oyarzun	
M. en C.	Victor Manuel	Valdés López	
Suplente M. en C.	Luisa	Alba Lois	
Suplente			

Especialmente a Carmen González (mi mamá) por todo el esfuerzo que ha hecho, por consentirme tanto y apoyarme siempre.

A la memoria de Rafael Navarro (mi papá) porque estoy segura que te hubiera dado mucho gusto ver este trabajo.

A mis hermanos Carmen por ser tan buena amiga y apoyarme tanto, a Javier por consentirme y ayudarme, a Rafael por la inspiración en la carrera científica y por los consejos y a Lupe por ayudarme en mis primeras tareas.

A mis sobrinitos Talia, Rafa, Karina y Edgar por todos los ratos de diversión.

A Ernesto Maldonado por estar siempre conmigo.

Este trabajo se realizó bajo la dirección del Dr. Jesús Aguirre Linares en el Departamento de Microbiología del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM.

Agradezco la ayuda de la Biol. Olivia Sánchez en el aislamiento de la clona genómica del gen *catD* y la construcción del plásmido pOSIA.

Agradezco al Dr. Wilhelm Hansberg la ayuda en la elaboración de los geles de actividad de catalasa y sus valiosas críticas a lo largo de este trabajo.

Agradezco a los miembros del jurado Dr. Jesús Aguirre, Dr. Wilhelm Hansberg, M. en C. Luisa Alba, M. en C. Víctor Valdés y M. en C. Juan Carlos Gaytán por brindarme parte de su tiempo, así como sus valiosos y estimulantes comentarios durante la revisión de este trabajo.

Agradezco a la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) de la UNAM por la beca otorgada a la autora de este trabajo.

Agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México. "Nuestra Máxima Casa de Estudios".

Agradezco al Dr. Jesús Aguirre por permitirme aprender en su laboratorio, por poner en mis manos un proyecto tan interesante, por formar en mi una conciencia crítica y por tener un laboratorio tan agradable para trabajar.

Agradezco al Dr. Wilhelm Hansberg por el interés en este proyecto, por sus conversaciones y discusiones tan interesantes y agradables.

Agradezco a mi hermano Rafael Navarro por aceptarme en su laboratorio, por ayudarme con mis tareas de la Facultad, por enseñarme el mundo científico, por ser tan comprensivo y tan paciente conmigo cuando intente ayudarlo en sus simulaciones por computadora y por todo el apoyo que me ha dado.

Agradezco a Rosalinda Tapia, Olivia Sánchez y Laurita Kawasaki por ser tan buena onda conmigo, por consolarme en mis momentos de depre, por todos los momentos de diversión y ayudarme en mi trabajo diario del laboratorio con esos pequeños y a veces gigantes detallitos.

Agradezco a Isaac Skromne, Mónica Magidín, Denhi Schnabel y Maura Cárdenas por ser tan buenos compañeros de laboratorio y hacer un ambiente agradable. A Fernando Lledías por soportarme con todas esas preguntas y dudas experimentales con los geles de catalasa y por ser tan buena onda. También agradezco a Lino Díaz porque siempre esta dispuesto a ayudar y por las porras cuando leía mis "planas" de secuencia.

Agradezco a mis amigos de siempre Luis y Consuelo por soportarme toda la carrera y un poquito más haciéndoles mal tercio, por la complicidad en los equipos y tareas, por apoyarme y darme ánimos y por tantos detalles más. A mi amiga América Quintero por ser tan comprensiva y por echarme tantas porras.

Agradezco a Ernesto Maldonado por darme tanto apoyo en la carrera y en la elaboración de este trabajo, por estar al lado en los momentos difíciles y propiciar los alegres.

Agradezco a José Luis Reyes y Andrés Campos por enseñarme a dar mis primeros pasos en la Biología Molecular, por su agradable compañía y apoyo.

INDICE

Introducción	1
Diferenciación celular	1
La esporulación asexual en <i>Aspergillus nidulans</i> como modelo de diferenciación celular	2
Tensión oxidativa	7
Producción y regulación de especies de oxígeno reactivas (EOR) en sistemas biológicos	8
Regulación de catalasas	11
Objetivos	13
Materiales y Métodos	14
Cultivos conidiantes en medio líquido	14
Medio de cultivo para <i>Escherichia coli</i>	14
Hibridación tipo Southern Blot	15
Hibridación tipo Northern Blot	19
Ensayos de actividad para catalasa	20
Búsqueda de <i>catD</i> en una biblioteca genómica	22
Purificación de cósmidos que contenían a <i>catD</i>	23
Costrucción de plásmidos	23
Secuencia	25
Resultados y Discusión	30
Estrategia de secuencia	30
El gen <i>catD</i> presenta alta similitud con secuencias de catalasas	32
Existen por lo menos dos catalasas en el hongo <i>A. nidulans</i>	35
Regulación de <i>catD</i> durante el desarrollo	41
Existe un homólogo de <i>catD</i> en <i>Neurospora crassa</i>	42
Conclusiones y Perspectivas	45
Bibliografía	46

INTRODUCCION

I. DIFERENCIACION CELULAR.

El estudio de la formación de un organismo multicelular a partir de una sola célula es un problema interesante. Los procesos que ocurren en una célula para formar otro tipo celular son muy complejos y como extrapolación del modelo de regulación de la expresión genética del operón de lactosa, publicado por Jacob y Monod en el año de 1961, la diferenciación celular se consideró como una consecuencia de la expresión secuencial y diferencial de genes. A partir de este momento el problema de cómo se inicia la diferenciación celular se enfocó a entender cuáles son las señales que inician y regulan la expresión genética durante el proceso. Para entender los complejos mecanismos de diferenciación celular y su regulación genética es conveniente tomar modelos sencillos y manipulables genéticamente. Existen varios modelos experimentales de diferenciación celular en bacterias, hongos, protoctistas, platelmintos, insectos y células de mamíferos. Entre los modelos eucariotes más estudiados se encuentra la esporulación en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (Fantès, 1989), la esporulación asexual en el hongo *Aspergillus nidulans*, la esporulación y la formación del cuerpo fructífero en el pseudoplasmodio *Dyctostelium discoideum* (Gross, 1994) y la embriogénesis en la mosca de la fruta *Drosophila sp* (Scott y Carroll, 1987).

Los procesos de diferenciación celular no son privativos de los organismos eucariotes sino que también se observan en procariotes. Entre los modelos procariotes más estudiados se encuentran; la formación de cuerpos fructíferos y esporas en myxobacterias (Shimkets, 1990), la esporulación en *Streptomyces sp* (Chater, 1989) y en *Bacillus subtilis* (Losick *et al.*, 1986). Se puede considerar como una diferenciación celular la fase estacionaria de crecimiento de la bacteria *Escherichia coli*. Este organismo está adaptado para resistir diversas condiciones adversas. Si en el medio en el que se encuentra la bacteria escasean los nutrientes, se provocan cambios drásticos en la fisiología y la morfología celular. Las células de la fase estacionaria tienen una forma esférica y pequeña, son resistentes a múltiples tipos de tensión metabólica, sintetizan glucógeno y sobreviven a períodos largos de hambruna (Hengge-Aronis, 1993).

En microorganismos el estímulo principal para inducir la diferenciación celular es la privación de nutrientes u otro tipo de tensión metabólica.

En 1990 Hansberg y Aguirre publicaron una hipótesis de la diferenciación celular que propone que los distintos tipos de tensión del medio ambiente desembocan en una tensión oxidativa y que la diferenciación se produce como una respuesta para contener

con dicha tensión. Esta proposición esta basada en estudios realizados en el hongo filamentoso *Neurospora crassa*. Si un cultivo líquido de este ascomiceto se filtra y la masa de hifas se expone al aire, se observa que las hifas en contacto directo con el aire se adhieren entre sí formando un tejido en cuestión de minutos. Posteriormente, cuando han pasado tres horas en una fase aérea se observa que de las hifas adheridas, salen hifas aéreas que crecen y se ramifican durante unas nueve horas. Luego, de las hifas aéreas salen conidióforos y estas estructuras finalmente dan origen a las esporas asexuales. La conidiación también se puede inducir en líquido al privar al hongo de nutrientes con aireación intensa (Hansberg y Aguirre, 1990).

Usando el sistema de exposición directa del micelio al aire se observó que la actividad de las enzimas glutamina sintetasa y de la glutamato deshidrogenasa biosintética desaparecían en el micelio adherido mientras en las hifas no adheridas, que quedaban por debajo de la capa de hifas adheridas, la actividad de esta enzimas se preservaba. (Cárdenas y Hansberg, 1984). En un análisis posterior se observó que la glutamina sintetasa de este hongo se inhibía por una oxidación específica que la hacía más susceptible a la degradación por proteasas (Aguirre y Hansberg, 1986). La glutamato deshidrogenasa biosintética también se oxida pero requiere unir un quelato de fierro (Aguirre *et al.*, 1989). La oxidación de la glutamato deshidrogenasa biosintética junto con otros datos de la oxidación total de proteínas y la pérdida del poder reductor, así como los cambios en la actividad de las catalasas y las superóxido dismutasas (datos no reportados) llevó a los autores a proponer la hipótesis de que un estado hiperoxidante inestable determina las transiciones entre los estados estables del crecimiento y la diferenciación (Aguirre y Hansberg, 1990).

II. LA ESPORULACION ASEXUAL EN *Aspergillus nidulans* COMO MODELO DE DIFERENCIACION CELULAR.

Aspergillus nidulans (*A. nidulans*) fue introducido por el Dr. Guido Pontecorvo de la Universidad de Glasgow, Escocia en 1946. Pontecorvo sugirió este hongo como un modelo experimental para explorar el funcionamiento de los genes, la heterocariosis y los mecanismos de recombinación en eucariotes inferiores. *A. nidulans* es un hongo ascomiceto, es decir, que produce esporas sexuales en unas bolsas o sacos llamadas ascas, es saprófito y puede ser aislado del suelo. Las técnicas para utilizar a *A. nidulans* en estudios de genética se mencionan en una publicación de Pontecorvo *et al.* en 1953 y más recientemente en una de Jonh A. Clutterbuck en 1974. *A. nidulans* es un buen

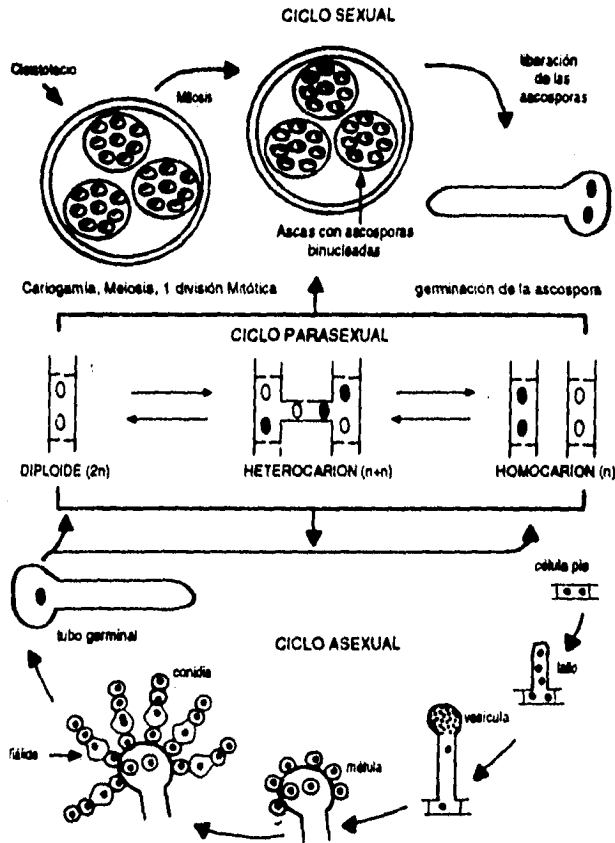


FIGURA 1.

Ciclo de vida de *Aspergillus nidulans*.

El micelio vegetativo consiste de células filamentosas llamadas hifas, las cuales crecen apicalmente y por ramificación sub-apical (parte central de la figura). El conjunto de hifas o micelio puede contener un solo tipo de núcleos, en cuyo caso se llama homocariote o núcleos diferentes, que se denomina heterocariote. En ocasiones, núcleos genéticamente diferentes se fusionan formando cepas diploides. La pérdida espontánea de una o más cromosomas causa la formación de haploides recombinantes (con cromosomas de ambas cepas haploides parentales). Este proceso se define como ciclo parasexual. El ciclo sexual (parte superior) lleva a la producción de ascas en cuerpos fructíferos llamados cleistotecios. Dentro de las ascas se encuentran las ascosporas. La fase asexual del ciclo se esquematiza en la parte inferior de la figura, en este proceso una célula pie comienza a formar un tallo que se ensancha en la parte superior formando el conidióforo, el cual consiste de una vesícula multinucleada, la cual por gemación produce mètulas, las cuales a su vez producen filídes y éstas dan finalmente origen a las conidias (Aguirre, 1992).

sistema experimental porque combina algunas ventajas experimentales de procariotes, con la complejidad del desarrollo eucariote. *A. nidulans* es un eucariote sencillo, capaz de crecer rápidamente en una gran variedad de medios de cultivo, líquidos o sólidos, su tiempo de duplicación es de aproximadamente 2.5 h, es fácil de manipular para inocular medios de cultivo, ya que forma colonias compactas e individuales. Es un organismo homotático, en cuyo ciclo de vida coexisten una fase sexual (ascopogonogénesis) y una fase asexual (conidiogénesis) (Figura 1). Las conidias o esporas asexuales son uninucleadas, lo cual permite la mutagénesis directa de la conidia y el aislamiento subsecuente de clonas o individuos idénticos a partir de la cepa a la que se ha introducido DNA (cepa transformante) o cualquier otro tipo de mutación genética (Aguirre, 1992). Otra ventaja que presenta este microorganismo es que el tamaño de su genoma es relativamente pequeño (2.4×10^7 pares de bases) (Ward, 1991). Además se pueden aislar una gran cantidad de mutantes con requerimientos nutricionales y mutaciones morfológicas, lo cual ha permitido elaborar un mapa genético con más de 400 loci (Brody *et al.*, 1991).

El ciclo asexual de este hongo se completa en 48 horas. Para comprenderlo mejor, se puede dividir en cinco etapas fundamentales que se ilustran en el figura 2. En la etapa A, la conidia germina (3-6 horas) formando hifas que comienzan a penetrar en el sustrato y forman una colonia madura de aproximadamente 30 mm en dos días a 37 ° C. Algunas hifas forman septos que delimitan un compartimento llamado célula pie, a partir de la cual se forma una célula tallo. Esta crece elongándose apicalmente hasta que alcanza una altura de cerca de 100 μm . Existe una gran proliferación de estructuras de Golgi y de vesículas apicales en la punta de la hifa que probablemente contribuya a la formación de pared y membrana celular.

En la etapa B, la célula del tallo deja de elongarse en forma apical para ensancharse en la punta y formar una vesícula con un diámetro aproximado de 10 μm . Durante la etapa III se forman numerosas gemaciones a lo largo de la superficie del conidióforo formando las métulas (aproximadamente de 5-7 μm). La etapa C se caracteriza por la formación de las fiálides que surgen a partir de un abultamiento en la punta de las métulas. Cada núcleo de la métula sufre una división mitótica y uno de los núcleos entra a la fiálide. Finalmente, en la etapa D se forman las conidias. De cada punta de la fiálide se forma una gemación y por medio de una división mitótica del núcleo de la fiálide se provee de un núcleo a cada conidia. El núcleo de la conidia se detiene en la fase G1 del ciclo celular. Una vez que la conidia alcanza un diámetro de aproximadamente 3 μm se forma un septo entre la fiálide y la conidia. Numerosas divisiones de las fiálides forman una cadena de conidias.

Las conidias se caracterizan por la acumulación de un pigmento verde, lo cual permite seguir el proceso de conidiación fácilmente. Con la germinación de las conidias, se establece un nuevo ciclo (Etapa E).

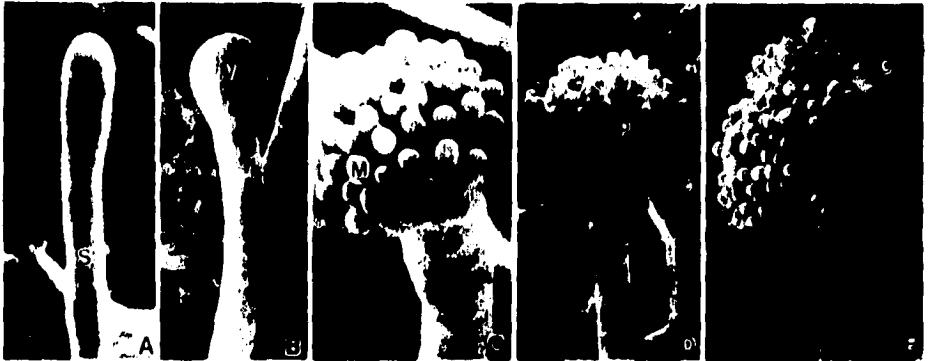


FIGURA 2.

Microscopía electrónica de barrido mostrando los distintos estados en el desarrollo del conidióforo de *A. nidulans*

En el panel A se muestra la formación del tallo (S) del conidióforo a partir de una célula pie que crece en forma apical. B, a partir de un ensanchamiento en la parte superior de la célula tallo, se forma una vesícula (V). C, de la vesícula salen varios brotes que constituyen las métulas (M). Un núcleo proveniente de una división mitótica sincrónica entra en cada métula. D, las métulas crecen hasta dividirse y dar origen a una segunda generación de células llamadas fialides (P). E, las conidias se forman a partir de las divisiones mitóticas del núcleo de la fialide. Las esporas o conidias (C) alcanzan la madurez cuando ocupan aproximadamente el quinto lugar en la cadena de las esporas (Mims *et al.*, 1988).

Se han caracterizado en *A. nidulans* una gran cantidad de mutantes afectadas en el proceso de esporulación. Algunos de estos genes corresponden a genes reguladores que activan o reprimen una serie de genes y que actúan a diferentes tiempos y niveles.

Entre los genes reguladores del proceso de conidiación destacan *brlA*, *abaA* y *wetA* los cuales fueron definidos y caracterizados por Clutterbuck (Yager, 1992) (Figura 3) y posteriormente se clonaron y secuenciaron (Johnstone *et al.*, 1985; Boylan *et al.*, 1987; Adams *et al.*, 1988; Mirabito *et al.*, 1989; Miller *et al.*, 1991; Marshall y Timberlake, 1991).

El gen *brlA* ("bristle" en inglés o cerda en español) es el gen identificado que actúa más temprano y se requiere continuamente durante la conidiación, desde la formación de la vesícula hasta la formación de las conidias (Mirabito *et al.*, 1989). Las

mutaciones en el gen *brlA* detienen el desarrollo del conidióforo antes de la formación de la vesícula y el crecimiento vegetativo y la reproducción sexual no se ven afectados (Figura 3-B). La expresión forzada del gen *brlA* causa la formación de conidias en la punta de las hifas en un cultivo líquido. La secuencia de *brlA* tiene homología con los factores transcripcionales del tipo dedos de zinc. Este gen no se transcribe en el micelio ni en las esporas (Aguirre, 1992).

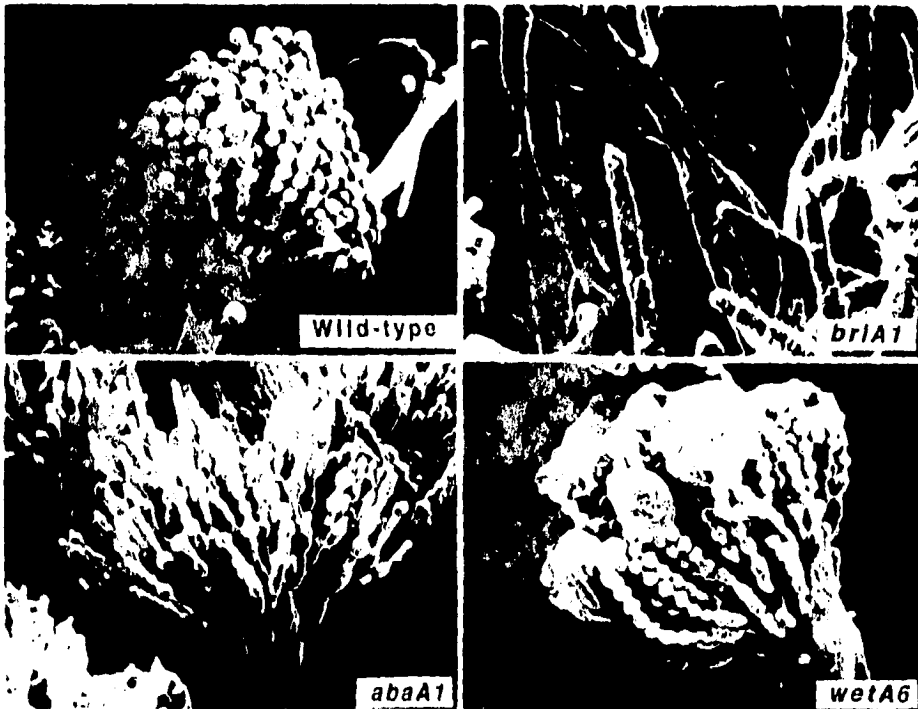


FIGURA 3.

Microscopía electrónica de barrido de conidióforos de la cepa silvestre y mutantes afectadas en la conidiación.

Las mutantes en *brlA* producen solo tallos del conidióforo y están bloqueadas para continuar con el proceso de la esporulación. Las mutantes en el gen *abaA* producen inicialmente conidióforos normales pero las métulas no pueden producir filídes y produce una cadena de células parecidas a las métulas. Las mutantes en *wetA* producen conidióforos normales e inicialmente esporas normales; sin embargo, las conidias se hinchan y autolisan (Tomado de Boylan *et al.*, 1987).

El gen *abaA* se define así por su nombre en inglés "abacus", (abaco; Figura 3C) codifica para una proteína reguladora que se une al DNA. Su mutación provoca que el desarrollo del conidióforo llegue hasta la formación de vesículas y médulas reiteradas que asemejan las cuentas de un abaco (Marshall y Timberlake, 1991).

wetA (húmedo), es otro gen importante para la esporulación, que al mutarlo provoca la formación de un conidióforo normal en el cual las conidias no alcanzan la madurez (Figura 3-D) debido a que se hidratan con facilidad y se lisan. La inducción forzada de este gen causa la expresión de algunos genes específicos de las conidias, lo cual apoya su posible papel de gen regulador. La secuencia de este gen no se parece a ningún otro reportado anteriormente (Marshall y Timberlake, 1991).

III. TENSION OXIDATIVA.

El oxígeno es el elemento más abundante en la corteza terrestre, su abundancia atómica corresponde al 53.8% y aproximadamente el 21% del aire seco es de oxígeno (Halliwell y Gutteridge, 1989).

Se considera que a partir de la acumulación del dióxigeno en la atmósfera se formó la capa de ozono en la estratósfera que protege a los seres vivos de las radiaciones ultravioletas del sol. La aparición del dióxigeno permitió la dispersión de los organismos primitivos en el planeta. Sin embargo, el dióxigeno y los productos de la reducción parcial del mismo son muy dañinos para la célula. Por esta razón debieron de aparecer mecanismos de defensa de la célula contra estas especies reactivas de oxígeno.

La familiaridad con la que usamos el oxígeno en nuestra vida diaria y la frecuencia con la que se usa en los tratamientos de terapia en hospitales no nos hace advertir sus efectos tóxicos. Las plantas crecen mejor a menos concentración de oxígeno en la atmósfera. El oxígeno en concentraciones mayores a las requeridas causa efectos dañinos en plantas, animales, y bacterias. En protozoarios, ratones, peces, conejos e insectos se ha observado que el tiempo de sobrevivencia, disminuye de manera logarítmica con el aumento de la presión de oxígeno (Halliwell y Gutteridge, 1984).

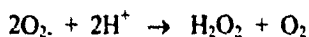
En 1954, Rebecca Gershman y Daniel L. Gilbert propusieron que el daño provocado por el dióxigeno provenía de la formación de radicales libres. Esta hipótesis fue desarrollada más tarde por Fridovich (1975, 1978, 1983; tomado de Halliwell y Gutteridge, 1984) en la teoría del superóxido. La hipótesis propone que la formación del superóxido *in vivo* es el factor más importante en la toxicidad del oxígeno (Halliwell y Gutteridge, 1984).

A) Producción y regulación de las especies de oxígeno reactivas (EOR) en los sistemas biológicos.

Las especies de oxígeno reactivas (EOR) son especies de oxígeno que son más inestables que el dióxígeno en su estado basal de energía. Algunas de estas EOR son radicales. Los radicales se definen como una especie que tiene electrones desapareados. Esta definición incluye al mismo oxígeno molecular, que tiene dos electrones desapareados, cada uno localizado en un orbital π^* diferente. Estos dos electrones tienen el mismo giro por lo que se restringe la posibilidad de captar electrones puesto que deben ser de giro contrario. A esta disminución de la reactividad debida al giro de los electrones se denomina restricción por "spin" o de giro.

Una manera de incrementar la toxicidad del oxígeno es excitar uno de sus electrones desapareados de tal forma que cambie de giro y con ello se elimine la restricción del "spin". El dióxígeno excitado se le conoce como oxígeno en cambio de giro (o singulete). Existen dos formas de oxígeno en singulete. El primero de ellos es el oxígeno en singulete que no tiene electrones desapareados y no es un radical. Este es de suma importancia en los sistemas biológicos ya que se encuentra en los pigmentos, como la clorofila, iluminados en presencia de oxígeno, así como en la retina de los mamíferos. El segundo estado de oxígeno en singulete decae rápidamente a su estado basal antes de que pueda reaccionar (Halliwell y Gutteridge, 1984).

Cuando un electrón entra en los orbitales de la molécula de dióxígeno, el producto que se forma es el radical superóxido O_2^- . Los radicales superóxido se forman en todas las células aerobias, principalmente por la salida de electrones de las cadenas de transporte de electrones (Halliwell y Gutteridge, 1984). La captación de un electrón por el radical superóxido genera un ión peróxido. Esta molécula no es un radical, ya que no tiene electrones desapareados, y está protonada a pH fisiológico formando el peróxido de hidrógeno (H_2O_2). En soluciones acuosas el radical superóxido produce una reacción llamada dismutación en la cual se forma H_2O_2 más O_2 . El grado de dismutación es más rápido a pHs ácidos. La reacción se describe a continuación:



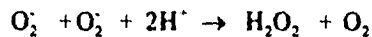
Los radicales hidroxilo ($\cdot OH$) son producidos por la fisión homolítica entre dos moléculas de oxígeno con la molécula de peróxido de hidrógeno. Esta reacción se produce en presencia de calor o con radiación ionizante. Una mezcla de peróxido de

hidrógeno y una sal de hierro (II) también forma radicales hidroxilo. A esta reacción se le conoce como la reacción de Fenton (Halliwell y Gutteridge, 1984).

El peróxido de hidrógeno no es tan reactivo, por lo que es capaz de difundir libremente a todos los compartimentos celulares. El mayor efecto tóxico del H_2O_2 proviene de la formación del radical hidroxilo por medio de la reacción del H_2O_2 con los metales de transición (Fe II, Cu I). Este radical es uno de los compuestos más reactivos que se conocen, reacciona en microsegundos con cualquier molécula vecina. Cuando reacciona con proteínas y ácido nucleicos, produce: proteínas modificadas, ruptura de las cadenas polipeptídicas, polímeros de proteínas, bases modificadas, rupturas en una o en las dos hebras de DNA, uniones DNA-proteína, etc (Halliwell y Gutteridge, 1984).

La cadena de toxicidad se inicia con el radical superóxido que al dismutar espontáneamente o por la enzima superóxido dismutasa produce peróxido de hidrógeno y éste a su vez produce el radical hidroxilo y secundarios. El daño celular que provocan las EOR se puede evitar eliminando los radicales superóxido, el peróxido de hidrógeno con enzimas específicas y uniendo los metales de transición de manera que no puedan reaccionar.

Las superóxido dismutasas (SOD) son enzimas que se encuentran en casi todos los organismos aerobios y anaerobios y están encargadas de la protección celular contra el radical superóxido (O_2^-) catalizando su descomposición a oxígeno molecular y peróxido de hidrógeno. Esta reacción ocurre por la reducción y oxidación alternada de los metales que tiene esta enzima como cofactores (Cu, Zn, Mn o Fe). La reacción que se lleva a cabo es la siguiente:

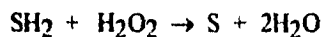


Existen varias familias de SOD las cuales se definen dependiendo del cofactor que tienen en su sitio activo (Roberts et al., 1991).

Existen dos clases de enzimas encargadas de la detoxificación del peróxido de hidrógeno: las catalasas y las peroxidasas. Las catalasas llevan a cabo la siguiente reacción:



mientras que las peroxidasas realizan la reacción:



en la cuál SH₂ es un substrato aceptor de electrones. El oxígeno que se produce en la primera reacción está en estado basal; no se detecta actividad de oxígeno en singulete.

Casi todas las células aeróbicas presentan actividad de catalasa. Sin embargo, algunas no la poseen, tales como las bacterias *Bacillus popilliae*, *Mycoplasma pneumoniae*, el alga verde *Euglena*, varios helmintos parásitos y la cianobacteria *Gloeocapsa*. Un pequeño número de organismos anaerobios presentan actividad de catalasa, como *Propionibacterium shermanii*. En los animales, las catalasas se presentan en la mayoría de los órganos del cuerpo, aunque están acumuladas preferencialmente en el hígado y los eritrocitos (Halliwell y Gutteridge, 1989).

La mayoría de las catalasas purificadas tienen cuatro subunidades polipéptidicas, cada una contiene un grupo hemo (Fe III) en el sitio activo. Las catalasas de mamíferos y algunas de microorganismos presentan en las subunidades unida una molécula de NADPH, la cual ayuda a estabilizar a la enzima (Halliwell y Gutteridge, 1989).

La estructura tridimensional de la catalasa del hígado de bovino (*Bos taurus*) ha sido determinada por cristalografía de rayos X a una resolución de 2.4 Å (Murthy *et al.*, 1981). La estructura terciaria consiste de cuatro dominios: un brazo amino terminal extendido con estructura no globular, el cuál estabiliza la estructura cuaternaria; un barril beta de ocho láminas antiparalelas, condicionando los residuos en un lado distal del grupo hemo; un dominio laminar alrededor de la subunidad exterior incluyendo el ligando del grupo hemo y una estructura α -hélice, ensamblando la E, F, G, y H de las globulinas. El residuo de tirosina 357 es el sitio de unión del grupo hemo y otros aminoácidos distales importantes para esta unión, son la histidina 74 y la asparagina 147 (Esta numeración corresponde a la secuencia del hígado de bovino reportada por Schroeder, *et al.*, 1981).

La actividad de la catalasa en plantas y animales está localizada en un compartimento subcelular formado por una sola membrana conocido como peroxisoma. También se conocen catalasas citoplásmicas como la CTT1 de la levadura *Saccharomyces cerevisia* (Zitomer y Lowry, 1992). Los peroxisomas derivan su nombre del hecho de que algunas de las enzimas que contienen (especialmente oxidasas) generan peróxido de hidrógeno. La catalasa que se encarga de eliminarlo, se encuentran en este compartimento (Subramani, 1993). La β -oxidación de los ácidos grasos de cadenas largas se realiza en los peroxisomas, los cuales también participan en la síntesis del colesterol y de las purinas, el catabolismo de los amino ácidos, la utilización del glioxalato, el metabolismo de las prostaglandinas, la biosíntesis de la penicilina, etc. Los peroxisomas de las plantas también juegan un papel importante en la fotorrespiración (Subramani, 1993).

B) Regulación de catalasas.

Se han reportado en la literatura casos de organismos que cuentan con más de una catalasa. En *Escherichia coli* se ha comprobado genéticamente la existencia de dos catalasas reguladas diferencialmente durante el crecimiento de este organismo. Una de las catalasas denominada HPI tiene actividad de peroxidasa y de catalasa (Triggs-Raine *et al.*, 1988). Esta enzima se induce durante la fase de crecimiento logarítmico de este organismo. La otra catalasa de *E. coli* es la HPII y se induce durante la fase estacionaria (von Ossowski *et al.*, 1991). Hengge-Aronis (1992) sugirió que la fase estacionaria de crecimiento de *E. coli* equivale a un estado diferenciado, ya que, las células adoptan una morfología similar a la de las esporas y expresan genes específicos de este estado. Estas dos catalasas responden a diferentes estímulos.

La catalasa HPI se induce con peróxido de hidrógeno. El gen regulador *oxyR* regula la transcripción de genes inducibles por peróxido de hidrógeno y está involucrado en la síntesis de aproximadamente 8 proteínas, entre las que se encuentra el gen *katG* que codifica para la catalasa HPI (Demple y Amábile-Cuevas, 1991). Este gen es inducible por acetato y ácidos grasos (Mukhopadhyay y Schellhom, 1994).

La catalasa HPII se induce durante la fase estacionaria de crecimiento y depende de un factor sigma específico de esta fase, el factor *rpoS* (Hengge-Aronis, 1993). El gen *katE* que codifica para la catalasa HPII no se induce por H₂O₂. Originalmente se había propuesto que la inducción de estas dos catalasas era independiente y que la catalasa HPI no era inducible por *rpoS*. Pero recientemente se encontró que *rpoS* es regulador de la catalasa HPI a través de una vía independiente del H₂O₂, ya que la mutación del gen *rpoS* causa un decremento significativo en la producción de la catalasa HPI (Ivanova *et al.*, 1994).

Para la bacteria *Bacillus subtilis* se han reportado dos catalasas mediante evidencia bioquímica y genética. La catalasa I, codificada por el gen *katA*, el cual ha sido clonado y secuenciado (Bol y Yasbin, 1991), se induce durante la fase preestacionaria de crecimiento, por peróxido de hidrógeno y por ascorbato (Bol y Yasbin, 1990). Otra catalasa que se induce durante la fase de esporulación de este organismo se ha detectado con análisis bioquímicos (Loewen y Switala, 1987).

En organismos eucariotes, como la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, existe evidencia genética de la presencia de dos catalasas (Zitomer y Lowry, 1992). La catalasa típica, llamada CTTI, es una enzima citosólica que se encuentra regulada por oxígeno a través del grupo hemo, por limitación de nutrientes mediante AMP cíclico, por choque de calor, hiperosmolaridad y por cobre (Belazzi *et al.*, 1991; Jungmann *et al.*, 1993;

Schüller *et al.*, 1994). La catalasa atípica CTA1 es una enzima peroxisomal regulada por oxígeno a través del grupo hemo y por ácidos grasos (Zitomer y Lowry, 1992).

En el hongo filamentoso *Neurospora crassa* existe evidencia genética y evidencia bioquímica de la existencia de tres catalasas. La catalasa Cat-1 está presente durante la fase de crecimiento rápido del micelio, se induce con paraquat (compuesto que provoca la producción de superóxido y consecuentemente peróxido de hidrógeno) y por choque de calor. La catalasa Cat-2 está ausente en el micelio en crecimiento y se expresa en la fase estacionaria y en niveles bajos en las conidias. También se induce considerablemente durante un choque de calor. La catalasa Cat-3 es predominante en las esporas asexuales (Chary y Natvig, 1989). Recientemente Lledías y Hansberg han encontrado que existe una modificación bioquímica de la catalasa Cat-3 en la catalasa Cat-3' y Cat-1 y que una Cat-X y la Cat-2 se encuentra en el micelio aéreo, en las conidias y en condiciones de tensión metabólica (Lledías y Hansberg, en preparación).

En *Aspergillus niger* se han definido genéticamente dos catalasas. La catalasa *catR* ha sido clonada y secuenciada. Mientras que por hibridación cruzada con el gen de la catalasa CTA1 de levadura, se aisló otro gen al cual se designó *catA*. La expresión de este gen se induce por ácidos grasos por lo que se piensa que la enzima puede ser peroxisomal (Fowler *et al.*, 1993).

En el maíz se ha demostrado genéticamente la presencia de tres catalasas reguladas diferencialmente durante el desarrollo. El RNA mensajero de Cat1 se encontró en el escutelo, endospermo, grano inmaduro, hojas y epicotiledones. El mensaje de Cat2 se encontró principalmente en el escutelo después de la germinación y en bajas concentraciones se encontró en hojas y epicotiledones. Finalmente, el mensaje de Cat3 se detectó principalmente en epicotiledones, en hojas y escutela. También se ha visto que la expresión de Cat3 esta regulada por un ritmo circadiano (Redinbaugh *et al.*, 1990).

OBJETIVOS

La hipótesis sugerida por Hansberg y Aguirre en 1990 propone que la diferenciación celular en microorganismos esta precedida por un estado de tensión oxidativa. Por ello, resultó significativo que la secuencia parcial de un transcrito aislado como específico de la esporulación asexual en *A. nidulans*, (CAN5), mostrara semejanza con los genes de catalasa. El presente trabajo es parte de un proyecto más amplio dirigido a estudiar el papel de las catalasas en la diferenciación de *A. nidulans*, *N. crassa* y *B. cereus*.

En el trabajo de esta tesis nos propusimos los siguientes objetivos:

- I. La caracterización de un gen del hongo *A. nidulans* que tiene similitud parcial con los genes de catalasa y que fue aislado como un transcrito inducido durante la esporulación asexual de este hongo (CAN5).

- II. Determinar el número de catalasas presentes en *A. nidulans* y su regulación durante la esporulación asexual.

MATERIALES Y METODOS

CULTIVOS CONIDIANTES SINCRONICOS EN MEDIO SOLIDO

El medio de cultivo empleado para crecer *A. nidulans* es el descrito por Käfer (1977) adicionado con los requerimientos necesarios para cada cepa. En este trabajo se utilizó la cepa silvestre FGSC-26 (Fungal Genetics Stock Center No. 26) que tiene un genotipo biA1, veA1; esto quiere decir respectivamente que la cepa contiene una mutación que hace que requiera biotina para crecer y otra mutación para esporular sin la necesidad de luz. Los medios de cultivo y el material se esterizaron a una presión de 1.4 Kg/cm², 121° C por 20 minutos.

Los cultivos de *A. nidulans* de la cepa silvestre FGSC-26 se crecieron según la técnica de Law y Timberlake (1980) con las modificaciones de Aguirre, *et al.* (1990). Los medios se inocularon a una concentración de 5×10^5 conidias/ml en un matraz Erlenmeyer y se incubaron a 37° C, por 18 h, con una agitación constante de 300 rpm.

Para inducir la conidiación los cultivos se expusieron al aire de la siguiente manera: 100 ml del cultivo líquido se filtraron por vacío en papel Whatman No. 1 quitando todo el medio que fuera posible. El filtro con las hifas adheridas se depositó en una charola que contenía el mismo medio solidificado con agar. Las charolas se cubrieron con papel aluminio y se incubaron a 37° C. Se tomaron muestras a las 18 h de crecimiento en líquido y a las 6, 12 y 25 h después de exponerse al aire. Las muestras se secaron con toallas absorbentes y se congelaron en nitrógeno líquido (-70° C). Posteriormente se liofilizaron las muestras por 4 horas.

MEDIO DE CULTIVO PARA *Escherichia coli*

El medio de cultivo que se empleó para *E. coli* (Medio de Luria-Bertani) se realizó según el protocolo de Sambrook *et al.* (1989). El procedimiento fue el siguiente:

Por litro:

A 950 ml de agua desionizada:

bacto-triptona	10 g	1%
bacto-extracto de levadura	5 g	0.5%
NaCl	10 g	1%
Agar		2%

Se agitó hasta que se disolvió y se aforó a un litro (el agar se agrega al final). Se esterilizó por 20 minutos a 1.4 Kg/cm².

Antibióticos

LB + ampicilina	75 µg/ml
LB + tetraciclina	50 µg/ml

Se preparó una solución madre de ampicilina 25 mg/ml en etanol y se añadió al medio estéril (dejándolo enfriar un poco) a una concentración final de 75 µg/ml.

HIBRIDACION TIPO SOUTHERN BLOT

I. Extracción del DNA de *Aspergillus nidulans* y *Neurospora crassa*.

Para extraer el DNA de *A. nidulans* se inocularon con la cepa FGSC-26 10 cajas Petri conteniendo 30 ml de medio mínimo líquido con biotina y se incubaron por 18 horas. El micelio se colectó, se quitó el exceso de agua con toallas absorbentes y se congeló en nitrógeno líquido. Se secaron en una liofilizadora al vacío por 4 horas ("Speed vac" SAVANT). El micelio se molió hasta que se formó un polvo muy fino.

El DNA de *N. crassa* fue extraído de polvos de acetona a partir de una muestra obsequiada por el Dr. Wilhelm Hansberg del Instituto de Fisiología Celular.

Buffer de extracción:

50 mM EDTA

0.2% SDS

Antes de usar agregar 1 µl/ml de DEPC (Dietilpirocarbonato).

El micelio en polvo (aproximadamente 400 µl en un tubo eppendorf) se resuspendió perfectamente en 600 µl del buffer de extracción y se calentó a 68° C por 30 minutos. Después del tiempo de incubación se centrifugó 5 minutos a temperatura ambiente. Se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo y se agregaron 50 µl de acetato de potasio pH 4.2, se agitó suavemente y se incubó 8 minutos en hielo. Posteriormente se centrifugó 5 minutos a temperatura ambiente para eliminar el dodecilsulfato de potasio (K-DS) precipitado. El sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo y se le agregaron 600 µl de isopropanol, se mezcló muy bien y se centrifugó 5 minutos a temperatura ambiente. La pastilla fue resuspendida en 300 µl de TE 1X pH 8 y se calentó a 68° C para ayudar a que se disolviera. El DNA se precipitó agregando 800 µl de etanol absoluto y 15 µl de cloruro de litio 10 M. Se mezcló y se incubó a 4° C por 5 min. Finalmente se centrifugó 5 minutos a temperatura ambiente, se lavó con 500 µl de etanol al 70%, se secó la pastilla y se resuspendió en 200 µl de TE.

II. Digestión de DNA de *A. nidulans* y *N. crassa*.

Antibióticos

LB + ampicilina	75 µg/ml
LB + tetraciclina	50 µg/ml

Se preparó una solución madre de ampicilina 25 mg/ml en etanol y se añadió al medio estéril (dejándolo enfriar un poco) a una concentración final de 75 µg/ml.

HIBRIDACION TIPO SOUTHERN BLOT

I. Extracción del DNA de *Aspergillus nidulans* y *Neurospora crassa*.

Para extraer el DNA de *A. nidulans* se inocularon con la cepa FGSC-26 10 cajas Petri conteniendo 30 ml de medio mínimo líquido con biotina y se incubaron por 18 horas. El micelio se colectó, se quitó el exceso de agua con toallas absorbentes y se congeló en nitrógeno líquido. Se secaron en una liofilizadora al vacío por 4 horas ("Speed vac" SAVANT). El micelio se molió hasta que se formó un polvo muy fino.

El DNA de *N. crassa* fue extraído de polvos de acetona a partir de una muestra obsequiada por el Dr. Wilhelm Hansberg del Instituto de Fisiología Celular.

Buffer de extracción:

50 mM EDTA

0.2 % SDS

Antes de usar agregar 1 µl/ml de DEPC (Dietilpirocarbonato).

El micelio en polvo (aproximadamente 400 µl en un tubo eppendorf) se resuspendió perfectamente en 600 µl del buffer de extracción y se calentó a 68° C por 30 minutos. Después del tiempo de incubación se centrifugó 5 minutos a temperatura ambiente. Se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo y se agregaron 50 µl de acetato de potasio pH 4.2, se agitó suavemente y se incubó 8 minutos en hielo. Posteriormente se centrifugó 5 minutos a temperatura ambiente para eliminar el dodecilsulfato de potasio (K-DS) precipitado. El sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo y se le agregaron 600 µl de isopropanol, se mezcló muy bien y se centrifugó 5 minutos a temperatura ambiente. La pastilla fue resuspendida en 300 µl de TE 1X pH 8 y se calentó a 68° C para ayudar a que se disolviera. El DNA se precipitó agregando 800 µl de etanol absoluto y 15 µl de cloruro de litio 10 M. Se mezcló y se incubó a 4° C por 5 min. Finalmente se centrifugó 5 minutos a temperatura ambiente, se lavó con 500 µl de etanol al 70%, se secó la pastilla y se resuspendió en 200 µl de TE.

II. Digestión de DNA de *A. nidulans* y *N. crassa*.

Se digirieron 12 μ l de DNA (aproximadamente 10 μ g) de cada organismo con las enzimas de restricción PstI y BamHI. La mezcla de digestión fue la siguiente:

H ₂ O	4 μ l
Buffer	2 μ l
DNA	12 μ l
Enzima	2 μ l

La digestión se realizó por 3 ½ horas y las muestras se corrieron en un gel de agarosa TAE al 1% a 80 Volts por 4 horas. Cuando la corrida del gel concluyó, se cortó un extremo del gel para reconocer su orientación y se marcó con una pipeta Pasteur cada una de las bandas de los marcadores de peso molecular (fago λ digerido con Hind III).

III. Transferencia del gel.

Para desnaturalizar el DNA, el gel se incubó en 0.25 N de HCl por 15 minutos a temperatura ambiente y con agitación constante. Esta incubación causa rupturas en el DNA a nivel del enlace fosfodiéster, fragmentándolo en pedazos más pequeños, lo cual facilita su transferencia a la membrana de Nylon. Se enjuagó 3 veces con agua y se incubó 30 minutos en una solución desnaturalizante de 1.5 M NaCl y 0.5 M NaOH. El hidróxido de sodio desnaturaliza al DNA y el cloruro de sodio estabiliza las cargas permitiendo que permanezca desnaturalizado. Se enjuagó 3 veces con agua destilada y finalmente se incubó en una solución neutralizante: 1.5 M NaCl y 0.5 M Tris-HCl pH 7, en este paso se neutraliza el hidróxido de sodio y se impide la degradación total del DNA.

El gel se transfirió a una membrana de nitrocelulosa con soporte de nylon Hybond-N (Amersham, Inglaterra). Para realizar la transferencia se colocó en un recipiente buffer 20X SSC (3 M NaCl y 0.3 M Ácido Cítrico pH 7), encima del recipiente se colocó un vidrio largo, encima de éste se colocaron 2 filtros largos que se mojaron en el buffer y permanecieron sumergidos de cada lado en el buffer formando un puente. Se colocó el gel invertido con cuidado de no formar burbujas. Se puso la membrana de nylon con cuidado (una vez que la membrana ha tocado el gel ya no se puede despegar). A las orillas del gel se puso plástico Parafilm para eliminar el contacto entre el filtro y el papel absorbente evitando que el buffer suba por las orillas. Se colocaron 2 pedazos de papel filtro (humedecidos en buffer) por arriba de la membrana y después se pusieron 6 pedazos de papel filtro seco encima de ellos. Se pusieron

aproximadamente 10 cm de papel absorbente encima de los filtros, después un vidrio y para hacer presión, un matraz de 500 ml con 250 ml de agua (Timberlake, 1980; Sambrook, *et al.*, 1989).

Esta preparación se dejó a temperatura ambiente toda la noche. Al otro día se removieron los papeles filtro de la transferencia. Se marcaron con un lápiz los pesos moleculares y los pozos en la membrana de Nylon. Se dejó secar la membrana completamente al aire y finalmente, se introdujo en una bolsa para hibridar y se expuso a radiación con luz ultravioleta, en un transiluminador por 5 minutos para unir covalentemente el DNA a la membrana.

IV. Preparación de la sonda.

La sonda se extrajo de la clona de cDNA CAN5 digiriéndola con la enzima PstI (Clonada en el plásmido pBR329 como un fragmento PstI). La digestión de CAN5 con PstI se corrió en un gel de agarosa al 1% TAE y el fragmento de 1.8 kb se aisló con un método rápido de purificación de DNA (The GeneClean kit Bio 101 Inc. La Jolla, CA). Al fragmento de agarosa se le agregaron 500 μ l de NaI 6 M y se incubó a 55° C hasta que se disolvió la agarosa. Se agregaron 5 μ l de perlas de sílica (Glass Milk) y se incubó en hielo por 5 minutos. Se centrifugó 5 min. y la pastilla se resuspendió en 300 μ l de solución "New Wash" y se centrifugó. Este lavado se repitió dos veces. Finalmente se centrifugó, se dejó secar la pastilla y se resuspendió en 20 μ l de TE pH 8.

Para marcar la sonda de CAN5 PstI se utilizó un juego de cebadores al azar (Random Primers DNA Labeling System de GIBCO BRL Life Technologies Inc., N.Y., U.S.A.). Durante todo el proceso se tomaron las medidas necesarias de seguridad para radioactividad. Aproximadamente 100 ng de DNA se disolvieron en agua y se hirvieron por 5 minutos para desnaturalizarlo. Inmediatamente después se incubó en hielo para mantener desnaturalizado el DNA y se procedió según el fabricante. Para eliminar los nucleótidos no incorporados, se filtró la mezcla de reacción (a la mezcla se le agregaron 45 μ l de TE) por un minicolumna de Sephadex G-50 (Penefsky, 1977). A la sonda se le agregaron 500 μ l de DNA de esperma de salmón. Antes de poner a hibridar se hirvió por 5 minutos.

V. Hibridación.

La membrana se puso a prehibridar por 1 hora a 65° C en solución de hibridación y 600 µl de solución de espermatozoos de salmón (antes de agregar se hirvió por 5 minutos) en una bolsa de plástico.

Solución de Hibridación

5X	Solución Denhardt's 10X
5X	20X SSC
50 mM	2 M Na-Fosfato pH 6.5
0.2%	SDS 10X

Solución Denhardt's 100X

2%	Ficoll
2%	PVP
2%	BSA

20X SSC

3 M	NaCl
0.3 M	Ac. Cítrico

Cuando el tiempo de prehibridación ha concluido, se abrió la bolsa y se descartó la solución. Se puso nueva solución de hibridación y se agregó la sonda desnaturalizada. Se incubó toda la noche a 65° C con agitación constante.

Pasado este tiempo, se descarta el líquido como desecho radioactivo. La membrana se lavó con 100 ml de 2X SSC y 0.1% de SDS por 30 minutos a 65° C. Al terminar la incubación el líquido se descartó y la membrana se partió a la mitad ya que tenía repetidos los carriles para poder lavar una membrana en alta severidad y otra en baja severidad. Una membrana se lavó en alta severidad, esto es baja sal y alta temperatura. Se incubó en 0.15X SSC y 0.1% SDS por 30 minutos a una temperatura de 65° C. Otra membrana se lavó en baja severidad, esto es alta sal y baja temperatura. Se incubó a temperatura ambiente por 30 minutos en una solución de 0.5X SSC y 0.1% de SDS. Al concluir la incubación se descarta el líquido y sin que se secan totalmente las membranas se envolvió en plástico y se puso a exponer en un estuche con una pantalla amplificadora y una placa autorradiográfica (X-OMAT de Kodak) durante la noche. Al otro día se reveló y se observaron los resultados. Una vez que la placa autorradiográfica se secó, se marcaron las posiciones de los marcadores de peso molecular y los pozos donde se cargaron las muestras.

HIBRIDACION TIPO NORTHERN BLOT

La extracción de RNA se realizó con el estuche "RNaid Plus Kit" (BIO 101, La Jolla, CA U.S.A.).

I. Obtención de Muestras.

Las muestras que se usaron para extraer RNA fueron tratadas con cuidado para evitar que el RNA se degradara y se manipularon lo menos posible. Todos los materiales fueron tratados con agua con dietilpircarbonato (DEPC) al 0.1%. Se agregó el DEPC al agua, se agitó vigorosamente, se dejó reposando toda la noche y se autoclaveó.

Las muestras se obtuvieron como se describió en Materiales y Métodos de este trabajo en la sección de Cultivos Sincrónicos. Las muestras de esporas se extrajeron de la siguiente manera:

La cepa silvestre FGSC-26 se inoculó a confluencia en cajas Petri con medio mínimo y biotina, se incubó a 37° C por 5 días. Las esporas de 3 cajas se colectaron raspando las cajas Petri con una asa de metal y una solución de Tween (0 al 0.01%. La suspensión de esporas se filtró por Miracloth (Calbiochem), el filtrado se centrifugó y se resuspendió en agua. Este lavado se repitió 2 veces más para eliminar el Tween. Las esporas se resuspendieron en 500 µl de solución de lisis (contiene guanidina un agente desnaturizante para proteínas muy potente), se pusieron en un tubo de ensaye de vidrio y se les agregó un volumen semejante de perlas de vidrio. Se agitaron en un Vortex por un minuto y se incubaron un minuto en hielo. Este procedimiento se repitió 7 veces más. Al terminar las muestras se centrifugaron (centrifuga clínica 2 000 rpm) y se colectaron con una pipeta Pasteur y se transfirieron a en un tubo para microcentrifuga.

El resto de las muestras se resuspendieron en 600 µl de solución de lisis y a partir de este punto la muestra de esporas y de micelio fueron tratadas de la misma manera. Se agregaron 600 µl de fenol ácido, se mezcló con vortex, se agregaron 300 µl de cloroformo alcohol isoamílico y se incubó en hielo por 15 minutos.

II. Purificación de RNA.

Las muestras se centrifugaron (4° C) a 10 000 x g por 20 minutos. El RNA se queda en la fase acuosa y el DNA y proteínas quedan atrapados en la interfase y botón. La fase acuosa se transfirió a un tubo nuevo, se extrajo 2 veces con medio volumen de cloroformo alcohol isoamílico y se centrifugó 2 minutos a 12 000 g. Se transfirió la fase

superior a un tubo nuevo y se agregó RNA MATRIX (1 μ l por μ g de RNA), se agitó por 30 segundos y se incubó a temperatura ambiente por 5 minutos. Se centrifugó 1 minuto a 12 000 g. El botón se resuspendió en 300 μ l de RNA WASH. Se centrifugó un minuto a 12 000 g y se removió el sobrenadante. El paso anterior se repitió una vez más. Se removió todo el líquido posible y se resuspendió en agua tratada con DEPC. El RNA se cuantificó en un espectrofotómetro y finalmente las muestras se almacenaron a -70° C.

III. Electroforesis del RNA.

La electroforesis de RNA se realizó en geles desnaturalizantes de agarosa con formaldehído (Sambrook, *et al.*, 1989). Para 100 ml de gel se agregaron 1 g de agarosa, 17.8 ml de formaldehído al 37%, 10 ml de MOPS 10X y se aforó a 100 ml con agua desionizada. Las muestras se prepararon en condiciones desnaturalizantes. Para 25 μ g de RNA en un volumen final de 25 μ l se agregaron 2.5 μ l de MOPS, 12.5 μ l de formamida, 4.5 g de formaldehído, 2 μ l de bromuro de etidio (1 μ g/ml), 4 μ l de colorante 10X y se agregó agua (DEPC) hasta alcanzar un volumen de 25 μ l. Antes de aplicar al gel las muestras se calentaron a 68° C por 15 minutos y se centrifugaron brevemente. Se cargaron las muestras en el gel y se dejaron correr hasta que entraron en el gel. Una vez que entraron las muestras al gel se llenan los pozos con el buffer de corrida (MOPS 1X), se cubre el gel con un parafilm y se corrió a 60 Volts por 5 horas.

IV. Transferencia del gel e hibridación.

Cuando terminó la electroforesis se agitó el gel en 20 X SSC por 30 minutos. Se transfirió el gel siguiendo el protocolo del apartado de Hibridación tipo Southern Blot de esta misma tesis. El marcado de la sonda e hibridación se hicieron siguiendo el protocolo descrito en la sección anterior.

ENSAYOS DE ACTIVIDAD PARA CATALASA

I. Preparación de las muestras.

Las muestras de 0, 6, 12 y 25 horas se obtuvieron de los cultivos conidiantes y las esporas de cajas de Petri (como se hizo para la extracción de RNA). En esta ocasión se resuspendieron las esporas en agua antes de molerlas con perlas de vidrio.

Se pesaron 30 mg en peso seco de las muestras de cultivos sincrónicos y las esporas se extrajeron de 2 cajas de Petri inoculadas a confluencia. Se resuspendieron en 300 µl de agua desionizada y se agitó la solución hasta que estuviera homogénea. Las muestras se centrifugaron 15 minutos a 4° C a 12 000 X g y el sobrenadante se traslado a un tubo nuevo. De este extracto crudo se cuantificó proteína con el estuche de ensayo para proteína, Bio-Rad Protein Assay (CA, U.S.A.) que se basa en el método de Bradford (1976). Este ensayo se hizo diluyendo el extracto crudo 50 veces; es decir, 10 µl de extracto en 490 µl de agua desionizada. De esta dilución se tomaron 100 µl y se les agregaron 700 µl de agua desionizada y 200 µl del reactivo del estuche concentrado. Se mezcló vigorosamente y se leyó la absorbancia a 595 nm. En todos los casos se realizó una curva de proteína de albúmina de bovino como referencia.

Para semipurificar la catalasa, las muestras se calentaron a 65° C por 5 minutos y se congelaron y descongelaron para posteriormente correrse en un gel de acrilamida agregándoles un décimo de volumen de colorante y glicerol.

II. Preparación del gel nativo y electroforesis.

El gel nativo para proteínas se preparó al 6.5% según el método de Laemmli (1970) sin β-Mercaptoetanol, sin SDS y sin hervir las muestras. Para la elaboración del gel se utilizaron las siguientes soluciones:

Solución A

30% Acrilamida

0.8% Bis-Acrilamida

Se almacenó a 4° C en frascos
color ambar.

Solución B

Trizma Base 1.5 M

Ajustar el pH a 8.9 con HCl

Buffer de Corrida

Tris 0.025 M

Glicina 0.192 M

pH 8.5

Para el gel inferior se utilizaron 6.5 ml de solución A, 6.5 ml de solución B y 17 ml de agua. Esta mezcla se agitó y se desgasificó por 5 minutos. Se agregaron 150 µl de Persulfato de Amonio al 10% y 50 µl de TEMED. Se vertió la solución del gel entre los vidrios y se estratificó la parte superior con 500 µl de isopropanol. Se dejó polimerizar

por dos horas. El gel superior se preparó agregando 1.7 ml de la solución A, 1.7 ml de la solución B y 6.6 ml de agua. Se desgasificó y se agregaron 100 µl de persulfato de amonio y 10 µl de TEMED. Se vertió la solución sobre el gel anterior y se puso el peine. Se dejó polimerizar por una hora.

El gel se corrió usando el buffer de corrida, a 60 Volts por 14 horas tiempo en el que el colorante azul salió del gel (13 cm de largo).

III. Tinción del gel.

Para la tinción del gel se utilizó el método descrito por Harris y Hopkinson (1976) modificado por Chary y Natving en 1989.

Cuando la corrida del gel terminó se separaron los vidrios y se cortó la esquina inferior del gel para conservar la orientación. El vidrio con el gel se sumergieron en metanol al 5% en donde muy cuidadosamente se separó el gel del vidrio y se agitó suavemente por 5 minutos. Se eliminó la solución de metanol y se enjuagó el gel con agua destilada 2 veces.

El gel se incubó en una solución de peróxido de hidrógeno (100 ml de agua desionizada y 100 µl de peróxido de hidrógeno al 30%) por 15 minutos. Al terminar la incubación se descartó la solución y se enjuagó con agua destilada. Para teñir el gel se preparó una solución de 1 g de ferricianuro de potasio en 50 ml de agua y una solución de 1 g de cloruro férrico en 50 ml de agua. Justo antes de teñir el gel se juntaron las soluciones anteriores y se decantaron en el recipiente que contenía el gel. El gel se dejó en contacto con la solución hasta que se observaron las bandas de actividad, en ese momento se retiró la solución y se agregó una solución de ácido acético/metanol (10%/30%). El gel puede conservarse en esta solución por varios días.

En presencia del cloruro férrico y el peróxido de hidrógeno, el ferricianuro de potasio se oxida formando un precipitado azul dentro del gel. En las regiones del gel en donde hay actividad de catalasa el peróxido se elimina, por lo que ahí no se precipita el ferricianuro.

BUSQUEDA DE *catD* EN UNA BIBLIOTECA GENOMICA DE *A. nidulans*

La biblioteca genómica de *A. nidulans* ordenada por cromosomas fue construida por Brody *et al.* en 1991. Esta biblioteca se obtuvo del Fungal Genetics Stock Center. Las bacterias que contienen los cósmidos de la biblioteca fueron crecidas sobre membranas de nitrocelulosa con soporte de nylon Hybond-N (Amersham, Inglaterra) y lisadas *in situ*

según la técnica descrita por Sambrook *et al.* (1989). Las membranas de la biblioteca que contienen clonas que incluyen el genoma completo de *A. nidulans* fueron hibridadas usando el fragmento PstI de CAN5 como sonda, como se describió anteriormente en el apartado de hibridación tipo Southern Blot.

PURIFICACION DE COSMIDOS QUE CONTENIAN A *catD*

Para purificar los cósmidos W7E08, W2CO9 y W22CO1 se usó el estuche para purificación de plásmidos de la compañía QIAGEN (Alemania). El método consiste en la purificación de plásmidos usando lisis alcalina y pasando el extracto celular por una columna de intercambio iónico. Las bacterias que contenían los cósmidos fueron crecidas en cajas Petri para colonia aislada. Una colonia fue inoculada en 3 ml de medio líquido de LB con ampicilina 75 µg/ml e incubadas a 37° C a 300 rpm todo el día. En la noche este cultivo se transfirió a 300 ml de medio fresco y se incubaron en las mismas condiciones durante toda la noche. Se procedió según el fabricante.

CONSTRUCCION DE PLASMIDOS

Los plásmidos fueron contruidos usando técnicas estandares, descritas en Sambrook *et al.* (1989). El vector que fue utilizado para la construcción de los plásmidos fue el fagémido Bluescript II KS - (STRATAGENE La Jolla, CA U.S.A.).

I. Construcción de pOS1A

El cósmido W22CO1 se digirió con las enzimas XbaI, ApaI, SpeI, BglI y SacI. Posteriormente, esta digestión se hibridó con *catD* (Figura 4). Se eligió la digestión con la enzima ApaI por dar una sola banda de un peso molecular de aproximadamente 5 kb. El vector Bluescript KS - y el cósmido W22CO1 se digirieron con ApaI en la misma mezcla y ligados nuevamente. Con la ligación resultante se transformó a *Escherichia coli* y se plaqueó en cajas de Petri con LB con ampicilina 75 µg/ml (Sambrook *et al.*, 1989). Se obtuvieron 45 transformantes de las cuales se tomaron 18 colonias y se hicieron minipreparaciones del plásmido. Las minipreparaciones se digirieron con ApaI para verificar la estructura del plásmido transformante. Se obtuvieron tres plásmidos que contenían el evento que esperábamos (la integración en Bluescript KS - de un fragmento de 5 Kb del cósmido W22CO1) y se aisló plásmido de las 3 clonas con el método descrito anteriormente.

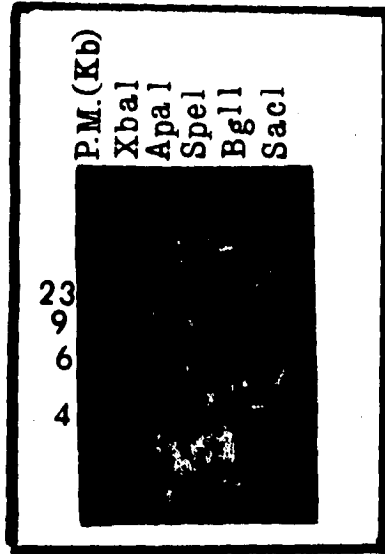


FIGURA 4.

Patrón de hibridación de *catD* con el cósmido W22C01 del cromosoma III de *A. nidulans*.

El cósmido W22C01 del cromosoma III de *A. nidulans* fue digerido con las enzimas que se indican. Las digestiones se corrieron por electroforesis en un gel de agarosa al 1% y este gel se transfirió a una membrana de Nylon. La membrana se hibridó con el fragmento PstI de CAN5 marcado radioactivamente. Los marcadores de peso molecular (P.M.) corresponden al fago λ digerido con Hind III.

II. Construcción de pREN1.

El cósmido W22C01 y Bluescript KS - fueron digeridos con la enzima SacI. Y se procedió de la forma descrita para la construcción de pOSIA.

SECUENCIA

La secuencia de la catalasa se realizó con el método de terminación de cadena de Sanger, *et al.* (1977). Las reacciones de secuencia se realizaron de acuerdo al protocolo del estuche de Sequenase Versión 2.0 de la compañía United States Biochemical (USB).

I. Preparación del templado

Se preparó el plásmido para cadena sencilla usando el método de desnaturalización alcalina modificado de Sambrook, 1989. Se preparó la siguiente solución desnaturalizante:

5.0 M NaOH
0.5 M EDTA
en TE 1X pH 8

Se agregaron 4 μ l de la solución desnaturalizante a una mezcla de TE 1X pH 8 y 5 μ g de DNA. Se mezcló y se incubó a temperatura ambiente por 5 min. Se neutralizó la solución con 2 μ l de acetato de sodio 2M pH 5.2 y se precipitó el DNA con 60 μ l de etanol absoluto (-20° C). Se incubó en hielo por 5 min y se centrifugó a 12000 rpm por 15 minutos a 4°. Se desecha el sobrenadante. Se lavó la pastillas con 500 μ l de etanol al 70% a temperatura ambiente, se centrifugó 5 minutos y se secó la pastilla 5 min en un liofilizador al vacío (Speed vac SAVANT). Finalmente se almacenó a -20° C hasta su uso (el DNA desnaturalizado debe usarse en un tiempo máximo de una semana).

II. Alineamiento del cebador.

El DNA desnaturalizado y precipitado se resuspendió en un volumen final de 10 μ l, usando amortiguador para la DNA polimerasa (Sequenase Versión 2.0) a una concentración final de 1X, 1.5 pmol de cebador y agua desionizada. Se incubó a 65°C por 2 min, se dejó enfriar lentamente hasta 30° C (aproximadamente 45 min) y se incubó en hielo. Esta mezcla es estable por aproximadamente 4 horas.

III. Reacción de marcado.

A la mezcla de templado-cebador que sumaban 10 μ l, se le agregaron 1 μ l de DTT 0.1M, 2 μ l de la mezcla de marcado (Labeling Mix) diluidos 1:5 en agua, 0.5 μ l [α - 35 S]-dATP (10 μ ci/ μ l) y 2 μ l de DNA polimerasa (Sequenase Version 2.0) diluida 1:8 en el buffer de dilución para la enzima (Diluir hasta el momento de su uso). Se mezcló y se incubó a temperatura ambiente por 10 min.

IV. Reacción de terminación.

Se marcaron 4 tubos como A (adenina), C (citosina) G (guanina) y T (timidina). Al tubo de adenina se le agregaron 2.5 μ l de mezcla de terminación de ddATP. A los tubos restantes se le agregó la misma cantidad de la mezcla de nucleótidos correspondiente. Estos tubos se precalentaron a 37° C. Cuando la reacción de marcado terminó se agregaron 3.5 μ l de esta mezcla a cada uno de los 4 tubos que contenían la mezcla de terminación. Se incubó a 37° C por 5 min. Para terminar la reacción se agregaron 4 μ l de solución de terminación (Stop Solution) a cada tubo y se agitó. En algunos casos las reacciones se almacenan a -20° C. Las reacciones son estables hasta una semana.

Cuando el gel estaba listo para que se cargaran las muestras, éstas se calentaron a 80° C por 2 min. Se dejaron enfriar en hielo y se cargaron 2.5 μ l en cada carril.

En ciertas ocasiones algunas reacciones eran difícil de leerlas debido a compresiones que se producen en la reacción. Cuando este problema se presentó, se usó el kit de TAQuence Versión 2.0 de la misma compañía (USB). El procedimiento es básicamente el mismo, varían las concentraciones de los reactivos, los tiempos de incubación y lo más importante; la temperatura. Debido a que la DNA polimerasa que se utiliza es de un organismo termófilo (*Thermus aquaticus*) la temperatura de polimerización del DNA puede llevarse a cabo desde 55 hasta 80° C lo que evita la formación de estructuras secundarias y las reacciones son mucho más claras.

V. Preparación del gel para secuencia.

La preparación de los vidrios se hizo de acuerdo a la técnica de Sambrook, *et al.* (1989) con algunas modificaciones para obtener mejores resultados.

Los vidrios se lavaron con suficiente agua y jabón. Se enjuagaron con abundante agua corriente y finalmente con agua destilada. Se dejaron secar y se limpiaron con

etanol comercial del lado que está en contacto con el gel. Es importante que los vidrios estén muy limpios para evitar que el gel se pegue y se rompa.

Para un mejor manejo del gel, éste se pegó a la superficie del vidrio pequeño. El tratamiento para el vidrio pequeño fue el siguiente:

1. Se preparó una mezcla de 3 ml de etanol, 50 μ l de ácido acético al 10% y 5 μ l de γ -metacriloxipropiltrimetoxisilano (Sigma).
2. Esta mezcla se vació en el centro del vidrio pequeño y se extendió por todo el vidrio con una toalla absorbente.
3. Se dejó secar por 5 min. Se aplican 5 ml de etanol por toda la placa para lograr que el pegamento se extienda por todo el vidrio.

Con este tratamiento se crea una superficie hidrofílica a la que se adhiere el gel.

El vidrio grande se trató con silicón para facilitar que éste se desprege del gel cuando termina la corrida. Este tratamiento se hizo de la siguiente manera:

1. En el centro del vidrio grande se colocaron 3 ml de silicón Sigmacote (Sigma), y se extendieron por toda la placa.
2. Se dejó secar por 5 min. Se extendieron 5 ml de etanol comercial por la placa y se dejó secar.

El silicón genera una superficie hidrofóbica facilitando que el gel se desprege del vidrio grande.

Una vez tratados los vidrios se colocan dos espaciadores a cada lado del vidrio grande y se colocó el vidrio pequeño encima de vidrio grande con la cara tratada hacia el interior. Se pone cinta adhesiva en los extremos largos del vidrio y el extremo inferior. Solo el extremo superior queda descubierto y es por donde se puso el gel y los peines.

Los geles tenían una concentración de 6% de acrilamida/bis-acrilamida. El gel llevaba los siguientes componentes:

- 5.7 g Acrilamida
- 0.3 g Bis-acrilamida
- 42 g Urea
- 40 ml Agua desionizada

Se disolvió, se aforó a 100 ml, se filtró por Millipore y se desgasificó al vacío por 5 min. Se agregó 400 μ l de Persulfato de amonio y 20 μ l de TEMED para catalizar la reacción. Se agitó y se vació el gel entre los vidrios. Finalmente se ponen los peines y se dejó polimerizar toda la noche.

VI. Electroforesis

Cuando el gel polimerizó se quitaron las pinzas y cintas a los vidrios y se lavaron con agua corriente y jabón para quitar restos de acrilamida con cuidado de que no entraran en el gel y finalmente se enjuagó con agua destilada y se secó. Se colocó el gel en la cámara de electroforesis. Se usó buffer TBE 1X para la electroforesis. El gel se precalentó por aproximadamente una hora, tiempo en el que llega a una temperatura de 50° C y las muestras se cargaron desnaturalizadas. El gel corrió manteniendo una temperatura constante de 50° C (aproximadamente 70 Watts) por 1 hora y media en el caso de la corrida corta y 3 horas y media en el caso de la corrida larga.

VII. Tratamiento del gel después de la electroforesis.

Cuando terminó la electroforesis se separaron los vidrios y el gel de se quedó adherido al vidrio pequeño. Se fijó en ácido acético al 10% por 30 min con agitación constante, se enjuaga con abundante agua destilada para eliminar el exceso de ácido acético y urea. Se secó en una estufa a 80° C por una hora aproximadamente. Se puso a exponer con una placa para autorradiografía toda la noche. Al otro día se reveló y se leyó la secuencia.

VIII. Análisis de la secuencia.

Cada secuencia generada con un cebador (diseñado a partir de la secuencia conocida) se archivó en la computadora creando un archivo de secuencia por cada cebador en el programa de computadora Macintosh, DNA INSPECTOR. La clona de cDNA CAN5 fue secuenciada en ambas direcciones y la clona genómica fue secuenciada en una dirección. Con la función M13 CONTIG ALIGNMENT se empalmaron todos los archivos que iban en una sola dirección generando un solo archivo que contenía toda la secuencia. Como se secuenciaron ambas cadenas del cDNA y una cadena del DNA genómico se creó un alineamiento para cada dirección y se salvaron en archivos independientes. Estos archivos que se encontraban en el programa DNA Inspector fueron salvados como archivos de texto. Con el programa MacLink los archivos del DNA Inspector fueron traducidos a un archivo de texto con formato PC. Estos archivos fueron introducidos al directorio de una computadora SUN remota en donde se encuentra el programa GCG (Genetics Computer Group Inc. Version 7, Abril de 1991. Wisconsin, USA) mediante un FTP (File Transfer Protocol). Posteriormente se entró al programa

GCG por medio del comando TELNET. Estos archivos fueron se reformatearon mediante el comando REFORMAT, poniéndole el nombre al archivo, un punto y seq (ejemplo: catalasa.seq). De esta manera el programa puede trabajar con este archivo. Con el comando LINE-UP se generó un archivo que contenía todas alineaciones que se tenían en cada dirección. Con este directorio de secuencias se usó el comando PILE-UP para generar un alineamiento entre las secuencias generadas. En este alineamiento de secuencias se localizaron las zonas conflictivas; es decir, en donde no coincidían las bases o sobraban o faltaban bases. Estas zonas fueron localizadas en las placas de autorradiografía y corregidas (en el caso en que se trataran de errores en la lectura ó manipulación de la secuencia). En los casos en que no se podía corregir se repitieron las reacciones. Finalmente se generó un archivo con la catalasa confirmada y está secuencia se tradujo a proteína con el comando TRANSLATE. Este péptido fue comparado con las bases de datos de bancos de genes con el comando FASTA.

Finalmente de las secuencias de catalasas que salieron en la búsqueda se eligieron algunas para hacer alineaciones más finas entre ellas. Estas secuencias se extrajeron de las bases de datos con el comando FETCH en donde se da el número o nombre de acceso para cada secuencia y el programa las trae al directorio. Usando el comando REFORMAT las secuencias se "reformatean" para ser usadas.

Para hacer alineaciones se creó un archivo como se describió anteriormente con LINE-UP y el comando PILE-UP. Con este procedimiento aparece la alineación de las secuencias. Para generar un consenso y resaltar los cambios conservados se usó el comando PRETTY. Para realizar la figura final de la comparación de secuencias este archivo se exporta a un procesador de palabras ("Microsoft Word for Windows. Versión 2.0") y ahí se hacen las correcciones y ajustes necesarios.

Para elaborar la figura de la secuencia se utilizó el comando PUBLISH del programa GCG. Las correcciones finales se realizaron en un procesador de palabras.

RESULTADOS Y DISCUSION

Estrategia de secuencia de *catD*.

La clona de cDNA CAN5 fue aislada debido a que se expresa preferencialmente durante la esporulación. La biblioteca de cDNA de *A. nidulans* de la que se aisló CAN5 fue construida por Mcknight *et al.* en 1986 usando RNA poly A⁺ de cultivos esporulantes crecidos por 25 horas. La biblioteca de cDNA se creció en filtros de nitrocelulosa, los cuales se hibridaron contra cDNA marcado radioactivamente con ³²P obtenido de RNA poly A⁺, aislado de hifas indiferenciadas y de cultivos esporulantes de *A. nidulans*. Se eligieron las clonas que hibridaron con el cDNA de cultivos esporulantes y que no hibridaron con el cDNA de cultivos de hifas indiferenciadas. De esta manera, se seleccionaron a los mensajes que se expresan preferencialmente durante la esporulación (Boylan *et al.*, 1987, Stringer *et al.*, 1991, Mcknight *et al.*, 1986).

Una de las clonas aisladas con este método (la clona CAN5, "Conidiation *Aspergillus nidulans*"), se secuenció parcialmente (250 pares de bases) y se hizo una comparación de secuencias con las bases de datos y se encontró que tenía una gran homología con secuencias de catalasas, en especial con la de la catalasa HPII de *E. coli* (Stringer v Timberlake, sin publicar). Se procedió a secuenciar totalmente esta clona de CAN5. Como esta clona se aisló como un transcrito de la conidiación y presenta una alta homología con los genes de catalasa se decidió nombrarlo *catD* (catalasa del desarrollo) y se decidió aislar el gen correspondiente a CAN5 en una biblioteca genómica, ordenada por cromosomas (Brody *et al.*, 1991).

La biblioteca genómica se analizó usando como sonda el fragmento de la digestión del cDNA CAN5 con la enzima PstI, en condiciones de alta severidad. Se encontraron tres cósmidos en el cromosoma III que dieron señal; el cósmido W7E08, W2C09 y W22C01. Se confirmó por el patrón de restricción que los tres cósmidos contenían fragmentos de DNA que hibridaban con el fragmento PstI de CAN5. El cósmido W22C01 se digirió con la enzima ApaI y se seleccionó una banda de aproximadamente 5.1 kb que hibridaba con el fragmento PstI de CAN5 (Figura 4) para clonarlo en Bluescript KS-. El plásmido obtenido se denominó pOSIA y se utilizó para secuenciar el gen *catD*. Por comparación de esta secuencia con la de otras catalasas se vió que el gen estaba incompleto en el extremo 5', por lo que fue necesario construir otro plásmido.

Se seleccionó una banda de aproximadamente 4 kb, resultante de la digestión del cósmido W22C01 con la enzima SacI, para clonarla en el plásmido Bluescript KS-. A

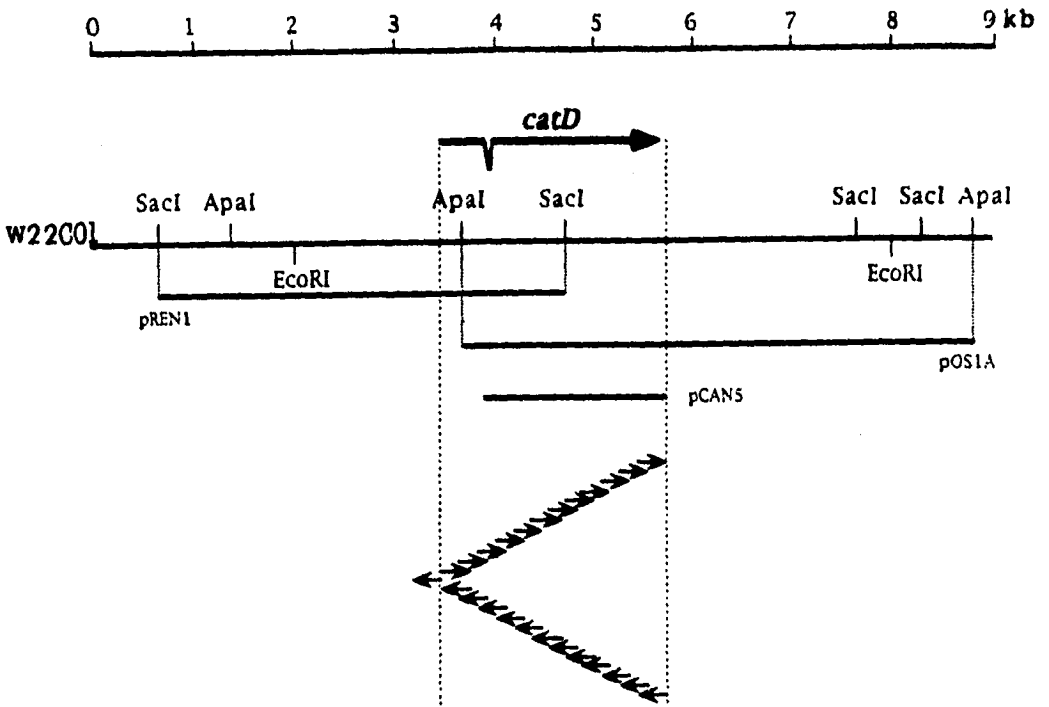


FIGURA 5.

Estructura de la unidad transcripcional de *catD* y estrategia de secuenciación.

Para secuenciar *catD* se utilizó el plásmido de cDNA CAN5 y el gen correspondiente, el cual se obtuvo a partir de una biblioteca genómica de *A. nidulans* separada por cromosomas. Tres cósmidos del cromosoma III hibridaron con CAN5 (W7E08, W2C09 y W22C01). Se seleccionó al cósmido W22C01 para su análisis posterior. El plásmido pOS1A se construyó a partir de la digestión de este cósmido con la enzima ApaI, tomando una banda de aproximadamente 5.1 kb que se ligó en Bluescript KS-. El plásmido pREN1 se construyó con una banda de 4 kb tomada de la digestión de W22C01 con la enzima SacI y ligada en Bluescript KS-. Las flechas inferiores indican los cebadores que se utilizaron para secuenciar el gen. La parte superior de la figura indica la escala. La flecha grande indica la dirección de la transcripción de *catD* y la longitud de DNA secuenciado (ver materiales y métodos).

este plásmido se le dió el nombre de pREN1. La estrategia que se usó para secuenciar el gen *catD* se resume en la figura 5.

Para iniciar la secuencia del plásmido CAN5 se utilizaron los cebadores cani5' y cani3' que hibridan con la secuencia del plásmido pBR329. Con la secuencia que se obtuvo de estos dos cebadores se mandaron a sintetizar dos cebadores nuevos que se utilizaron para secuenciar otra parte. La secuencia del gen *catD*, tanto de la clona de cDNA como de la clona genómica, se obtuvo sintetizando nuevos cebadores generados a partir de la secuencia anterior. Todo el gen se secuenció por lo menos dos veces.

En la figura 6 se observa la secuencia completa derivada del cDNA y las 2 clonas genómicas la secuencia contiene un solo marco de lectura capaz de codificar para un péptido mayor de 100 amino ácidos que inicia con ATG (metionina). El marco de lectura predice un péptido de 744 amino ácidos (Figura 6) con una masa molecular de 83 969 Da. En la figura 6 se incluyen 237 nucleótidos de la región no codificadora en el extremo 5' y 153 nucleótidos después del codón de terminación en el extremo 3'. La secuencia genómica contiene un intrón de 49 pb que comienza a partir del nucleótido 784 y termina en el nucleótido 833 (indicado con letras minúsculas). La secuencia del intrón contiene regiones que muestran homología con las secuencias consenso para el procesamiento de los intrones en hongos filamentosos (secuencias subrayadas) (Ballance, 1986). Dentro de la secuencia que pertenece a la región reguladora se encontró una posible caja TATA (se indica con un recuadro), la cual es importante para la interacción con la RNA polimerasa y el inicio de la transcripción (Lewin, 1990).

Es muy posible que el gen *catD* se encuentre en el cromosoma III, ya que los tres cósmidos, W7E08, W2C09 y W22C01, que se aislaron por hibridación con CAN5, pertenecen a este cromosoma. Por otra parte, en un gel en los que se separaron los cromosomas de *A. nidulans* por electroforesis de pulsos y después se hibridaron contra el fragmento PstI de CAN5, se observó una sola banda de hibridación con el cromosoma III (este dato no se muestra en este trabajo).

El gen *catD* presenta una alta similitud con las secuencias de catalasas.

Una búsqueda de la similitud entre la secuencia de *catD* y las secuencias en las bases de datos del GeneBank y SwissProt, tanto a nivel de nucleótidos como de proteína, usando los programas FASTA, LINE-UP, PILE-UP y PRETTY de Genetics Computer Group (GCG; versión 7, 1991), reveló que *catD* era similar a varias catalasas. A nivel del DNA todas las secuencias que salieron en la búsqueda de similitud fueron catalasas


```

1 ACTGACTGTCTTGAAATGUAAGCAAGGAAGCTGGTCCTGCCCCTGTTTTCATCACTCTGCAATCACTGCGCGTAAGCGGTGTAAATGTCAGCAGACAGCA
130 TCCGTAGATGCTGCAACAAAGCAGTATGAAAGTCCACCAACGCAATGAAATAAAGCTTAAATTTCTGCGAGCGACTTTCTTCTCTGATGATTTTATGAT
138 CTGGCTGTTTTAAGCCCAATAAAGTCGTACTGCACTGGTATG 3CT ACT AAT ATC ACC GCG CGC GTA CAA AAG CGC GAG CAA GCA
  139 CTG CAG CAG ACT ACC ACC AAG AAC AAG AAG AAT ATT GTC GAT ATT ACC CAG CAG ACA ATA AAT TTC CAG CAG CAG CAG
  140 V Q D T A T R N R R R I Y D I S R E D T V N V R T G G
358 GAG CAG CGA ACA GAT TTT GGT TTC CCG ATC ACC CAC CCT GAT CAG TGG CTA CUC CTC ACC AAC GAG CGC GAG CAG TCG
  141 R Q R T D F G V A I T D F D R M L R V T H R T H S
433 GGC GCC TCG CTG GTA GAA GAC CAC ATG CCN CGA GAG CGC ATC CAT COT TTC CAC CAG GAG CGC ATC COT GAG CGC
  142 G P S L L E D E I A R E R I R R F D S R I P S R R
501 GTT GTT CAA GGC GGT GGA CGC GGC GCC TAC CGC AAT TTC ACC CTC AAG GAG ACG ATG GAA GAG TTC ACC TAT CTT
  143 V V H A R J T Q A Y G N F T L K E S I S D G L T T A
583 GAA ATG TTA ACC GAT ACT TCG ACC AAC ACC CGC GTC TTC GTC GTC TTT GTC ACT C C C C C C C C C C C C C C C C C
  144 G Y L F D T S R H T P V P Y R F S T V Q G S R G A
639 GCT GAT ACC GTT GGC GAT GTT CCG GCG TTC GCT GTC AAG TTC TAC ACT GAC GAG GGA AAC TCG GAT ATT GTC GGC
  145 A D T R D V R G F A V E P T T D E S W Y D I V G
733 AAC AAC ATG CCC GTC TTC TTC ATT CAG GAG CGC ACG AAG TTC COT GAC TTT G gtagtggcccccaaaagaccggagatga
  146 N H I P Y P P I Q D A I R P P D F
814 TGGTgtagtggcccccaaaagaccggagatga TC CAG GGT GTC AAG CGC GAG CCT CAC AAC GAA GTG CCC CAG GCC CAG CAT AAC
  147 Y H A Y K P E P E H E V G A Q T A B B
893 AAT TTC TGG GAC TTT GTG TAC TTC CAC CCC GAA ACC CGC CAC ATG TTC ATG TGG CCG ATG TCT GAC CAC ACC ATC
  148 N P V D F V L E P E A T H H P H M D R A I Z 27
968 CCG CCG TCC TAC CGT ATG ATG CAG GGT TTC GCT GGT AAC CCG TTC TCG CTG GTC AAC AAG GAG GGT AAG CGC CAC
  149 P R S T R H N G G P J V N R T P S L V H R R E 252
1043 TTT GTC AAA TTC CAG TGG ATC CCT CAC TGC GGA GTG CAG TCG GTC GTC TGG CAG CAG CGC CTA AAG CTA CCG GGA
  150 F V H N F L P E L G V E S L W G S A L R L A S
1113 GAG GAT CCG GAC TTC CAG CCG AAG GAC TTC ATG GAG CGC ATC GAT AAC AAG CGC TCC AAG TCG GAG TTT GCG
  151 Q D P C F E R R D L M E A I D N R A V P R K W D P A
1133 ATC CAG ACC ATC CCC GAG GAG CAC CAG AAC AAG TTC GAG TTT CAC ATC TTC GAT ACC ACC AAG GTC TCG CCG GAA
  152 I Q A I S B S D G Q D R P S P D I F D A T R R V W P B 327
1268 GAG CAG GTG CCC CTG CTT GTC GTC CCG GAG CTC GAA CTG AAC CCG AAC ATG CAG GAG TTC TTC CCC GAG ACT GAA
  153 B C V P L R L V V O E H L E L M R N I D E S P F P E Y H 352
1343 CAG GTT CCC TTC TGC ACT AAG CAG ATC ATC GTG COT GGT ATC GAC TTC TCT CAG GAC CCG CTT GTC CAG CCG CAC AAC
  154 C V A P C T S B E I V P G I D P S D D P L L G G R N 377
1418 TTC TCA TAT CAG GAT ACA CAA ATT AGT COT CTA GGT GTC AAC TGG GAA GAA ATA CCC ATC AAC CGA CTT GTC TGC
  155 F S T Q D T G T S R L G V H W S S I P V H M P 402
1473 CCG TTC CTC AAC CAT AAC CCG GAC GGA CCT AAA CCG CAG CAC ATC ACC AAG CGC CGS GTG AAC FAT TGG CCC AAC
  156 P F L H E M R D G A R E E R I T K G T V H T W P H 427
1568 CCG TTC GAG CGC AAC COT CGA CCT ACG GAG AAG CGC TTC AAG TCG CAC CGA CCG CGS ATT ACA GCG CCG AAG CAG
  157 R P S A M P S A S D K G P R H N H P A Q T Q R H R 452
1513 CCG GAT CTC ACA CCG AAG TTC AAG GAA TAC CAC AAC CAG CCG CAG CTT TTC FAT AAC TCC CTC TCC GAA CTC GAG
  158 R D L T P R P R Y E H M Q A Q L P F R A P G S V S 477
1713 AAG GTG CAC GTC AAG AAG CCG TTT TCC TTC GAG CTT GAC CAC TGT GAC CAG CCG ATC GTT TAC GAG CCG CTC GCA
  159 K V S V R K R A S F S L D E C D P I V Y E R L A 502
1793 GCG CAG CGC CTC CGA GAG ATG GAT CTC CCG CTC GTC CAA CGC GTG CCG GAG ATG GTC CCG CCG CCC ATC CCC ACG
  160 Q R L A S I D L P L A Q A V A H W V G A S I P T 527
1868 AAG GCA GTG CTT GAT AAC CAG CCG AAG ACC TCC CTC CTT CTC TCC CAJ TTC GAC TTC ACT CTT AAG COT CTC CCG
  161 R A L R D N H E G R T S V R L S G R R A P G A P G 582
1943 APT ATC ACG CTT CCG ATT GCG ATC ATC ATC GGT GAC GCG TAC GAC AAG ATC GCG TTC AAT GCG ATG AAG CCG GCT
  162 I I S R R T A I I G D G E T D R I A P N G M R A 577
2018 APT CTC CCG GCT CGA ACG CCT CCG CTT COT CAT TGG CAC CAA CCG TCC CCG ATC TAC CGA CAG CCG GAG GAT AAG
  163 I L A A A S A P G L R H H H Q T S A I T A G G S D R 602
2093 AAT ACG TCT AAG GGT GTC ATT CCC GAC CAC ATG FAT GAC GCG ATG CCG TCC ACG ATG TTC GAG CCG ACC TTC ATC
  164 N S S K G V I P D E H M T D G H R S T H P D A T P I 627
2148 CCG GCG GCG TCG CAC ATG GAG CAT CTC CAA AAG AAC GCG CAG ATT CCG TAC TGG ATT CCG ACA TTC CCG CAG
  165 P G G S E I S T L Q K N G Q I R Y W I A E T P F G H 652
2243 CTT AAG CCG CTC GGT GCG ATG CCG GAA CCG CCG CAG CTG GTC AAG GAA GTT CTG GCG AAT TTC ATG CCG GTC CAA
  166 L R A L G A M G G A A Q L V K E V G H V M G G G 677
3318 APT GCG GGT GCG GAC TCT GCT GAG CCG GTC GAA TGG FAT GGT GTT GTT ACA GCT CTT GGA CGA GAG ACC GCG GAG
  167 I A G A D S A E F V E H T G V V T A R G F S S A S 702
2383 AAG CTC AAT GAG CCG TTC AAG GTG CTA AAG GAC GCG GGT GAT TTC ACA ACG AAG TTC TTT TAC CAG ATC GAT CAG
  168 S L S E G P R V L K R D A G D P T S R P F Y Q I S G 727
2488 CAC CCG AAC TGG CAJ CGT GAG TTC GAT GGA TGG GCT TCG ACG GTT CCG TAA TCT CACTCGCCCTCGGTACTOTATTTTC
  169 H R N M Q S E L D G L A S T V A F 741

```

255: TTTATATGATATACGTCGCCAAGCCTTTGCTCTGACGATATATATGATTAAGGAAATATGACTGAAATGAGTATATCAAAATTAATCACTGCA

2590 ATCTTCTTCTCAAGATAAAGTACCAAT

FIGURA 6
Secuencia de *catD*.
 La secuencia genómica de *catD* predice un polipeptido de 744 aa. Las letras minúsculas indican el único intrón que interrumpe la secuencia del gen (49 pb), las bases subrayadas dentro del intrón indican señales consenso de procesamiento de intrones en hongos filamentosos. Una posible caja TATA en la región no codificadora del extremo 5' se indica enmarcada.

mientras que de 40 secuencias de proteínas que salieron en la búsqueda 29 correspondieron a las secuencias de catalasas de diversos animales, plantas, hongos y bacterias.

Se eligieron algunas secuencias de acuerdo a los siguientes criterios: a) un representante de cada grupo de organismos a nivel de reino y b) las secuencias que fueran más parecidas a la catalasa de *A. nidulans*. Las secuencias elegidas se utilizaron para hacer una comparación entre las secuencias de las catalasas utilizando las opciones LINE-UP, PILE-UP y PRETTY del programa GCG.

En la figura 7 se observa la comparación entre las secuencias de las catalasas de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (Cohen *et al.*, 1988), de bovino *Bos taurus* (Schroeder *et al.*, 1981), de las bacterias *Bacillus firmus* (Número de acceso p30266) y *Escherichia coli* (von Ossowski *et al.*, 1991), del maíz (*Zea mays*; Redinbaugh *et al.*, 1988) y los hongos filamentosos *A. niger* (Fowler *et al.*, 1993) y *A. nidulans* (este trabajo). Con el programa PRETTY se buscó la secuencia consenso pidiendo que los amino ácidos de al menos 3 proteínas fueran idénticos o conservados. En la figura 7 se ilustran en mayúscula los amino ácidos idénticos o conservados y en minúsculas los amino ácidos no conservados.

De acuerdo con los datos de cristalografía de la catalasa de bovino (Murthy *et al.*, 1981), se determinó que los amino ácidos histidina 132, serina 179 y asparagina 206, marcados con un asterisco en la figura 7, conforman el grupo activo y los amino ácidos valina 131, treonina 172, fenilalanina 211 y 218, prolina 398, arginina 417 y tirosina 421, marcados con una flecha, participan en la unión del grupo hemo (La numeración corresponde a la figura 7). Estos residuos se encuentran conservados en todas las secuencias, excepto en los casos de la valina 131 del sitio de unión al hemo de la catalasa CTAI de *S. cerevisiae*, la cual presenta un cambio no conservado de este residuo por una prolina y en la catalasa de *A. nidulans* la prolina 398 del sitio de unión al hemo presenta un cambio de este amino ácido a treonina. El sitio de la secuencia que corresponde a este residuo en *A. nidulans* lo hemos confirmado cuidadosamente y no se ha encontrado ningún error experimental por lo que este cambio es real.

Los porcentajes de similitud de la proteína *catD* y las catalasas seleccionadas se presentan en la siguiente tabla:

ORGANISMO	% DE SIMILITUD	No. de aa COMPARADOS
<i>E. coli</i> (<i>katE</i>)	45.2	695
<i>B. firmus</i> (<i>katA</i>)	60.8	406
<i>Zea mays</i> (<i>cat1</i>)	46.3	406
<i>S. cerevisiae</i> (CTA1)	44.7	351
<i>S. cerevisiae</i> (CTT1)	38.8	423
<i>B. taurus</i> (<i>katA</i>)	38.6	469

Las secuencias de catalasas más grandes son la catalasa HP11 de *E. coli* con 753 aa, la catalasa de *A. nidulans* con 745 aa y la catalasa de *A. niger* con 728 aa. Las otras secuencias miden en promedio 500 aa. Las secuencias más parecidas a la catalasa de *A. nidulans* son la catalasa de HP11 de *E. coli*, con un porcentaje de similitud de 45.2% en 695 aa comparados y la de *B. firmus*, con un porcentaje de 60.8% en 406 aa comparados que equivalen a casi toda la proteína de esta bacteria.

Aunque no hemos estudiado la localización subcelular de la catalasa CatD, es de llamar la atención el hecho de que en la misma biblioteca genómica en el que se encontró *catD*, se han detectado genes que codifican para enzimas relacionadas con peroxisomas o glioxisomas, tales como la isocitrato liasa asociada a la degradación de lípidos. Por esta razón, pensamos que *catD* podría ser una enzima peroxisomal. Sin embargo, la secuencia de amino ácidos de CatD no presenta la señal de importación de proteínas a peroxisomas. Esta señal corresponde a un tripeptido en el carboxilo terminal que presenta la secuencia SKL, es decir serina, lisina y leucina (Gould *et al.*, 1990). Sería interesante crecer a la cepa silvestre de *A. nidulans* en lípidos y observar si se induce la catalasa ya que este dato sugeriría que esta enzima es peroxisomal.

Existen por lo menos dos catalasas en el hongo *A. nidulans*.

Para determinar el número de catalasas que existían en el hongo *A. nidulans* se realizó el experimento que se describe a continuación. El hongo se hizo crecer en un medio líquido por 18 horas con agitación constante. Después de este tiempo, se filtró el micelio y se expuso al aire para inducir la esporulación. Se tomaron muestras a las 0, 6, 12 y 25 horas de esporulación, las cuáles se congelaron y liofilizaron. La muestra de 0 horas corresponde a hifas no diferenciadas (18 horas de crecimiento), la de 6 horas a hifas aéreas, la de 12 horas a hifas aéreas con conidióforos y algunas esporas y la de 25

1

110

S. cerevisiae (CTA1) m sklgqeknev nYedvEdrv vTnatGpIn EpfvtqRIQe ... hgpILLq
B. taurus (BLC) khwREQr... aagkpdv LTTggGpVg DainSLtVUp ... RQPIlVg
B. firmus (katA) manexEh qRkDQql e sFrvedGhK LTTgGpVg EdofSLkaDe ... RQPIlVg
E. coli (HP11) aeghnekmpH qhgspIhdas cakpgndsla jodqshrpaa eptjyagat apyalkagDt rNklnal e dvrkgsEnya LTTgGpVrIa DdgpSLkaDe ... RQPIlVg
A. nidulans (catD) m atastagIqk agqawqdt at kVkvvdish dtvuvhtdqe qRTdGvMt DdgpSLvRtn ethaGpALLE
Z. mays (cat1) mdpkhh rpaqanast WTINaGpVv nhsaLTVGq ... RQPIlVg
A. niger (catR) mxfwll pavagIaag epylygmasf fqqnIagUt ievLEQpida tlyvndtgyy HTTdGpIa D.qtSLkaq... RQPIlVg

ConsensoD- H-EEQ-----E- LTTN-G-VI- D----SLKVG- ---RQPIlVg

111

*

220

S. cerevisiae (CTA1) DYNLIdSLAH FndEaIqGn pMAGGAGFG YFEVDDID icgsaWfSk GRtKclLRF STVgGpGSA DTVRDpRGA KFYTREGM DLVgMTPVF FIdQaIKFFD
B. taurus (BLC) DvVFDaMAH FDRERIPERV VHARGAGAFG YFEVLDIDt YsKArVehi GRtPIaVRF STVagEaGSA DTVRDpRGA VKFYTREGM DLVgMTPVF FIdQaIKFFD
B. firmus (katA) DfAFREKtH FDRERIPERI VHARGaahG nFqVYdmeE FTKAFLQp svkTPVVFVF STVagEaGSA DTVRDpRGA VKFYTREGY DLVgMTPVF FIdQaIKFFD
E. coli (HP11) DFLIREKtH FDRERIPERI VHARGaahG YFqyktalSD lTADFLSDP nKtTPVVFVF STVgGpGSA DTVRDpRGA KFYTREGIY DLVgMTPVF FIdQaIKFFD
A. nidulans (catD) DhlAREKtH FDRERIPERV VHARGIGAY nFLkIaEdt lTAgvltIdt srtTPVVFVF STVgGpGSA DTVRDpRGA VKFYTREGM DLVgMTPVF FIdQaIKFFD
Z. mays (cat1) DYLLIEKLaq FDRERIPERV VHARGAaKQ FFEVtDhVSH LTCaFLaP GvqTPVVFVF STVvBRGSP ETIRpRGA VKFYTREGY DLVgMTPVF FIdQaIKFFD
A. niger (catR) DFIFNqLq FDR VPERV VHARGAGAYG tFkyaadWse vTAApFLSan dRoTPVVFVF STVvGERGsv DTARvDhGA cRFYTREGY DLVgMTPVF FIdQaIKFFD

Consenso DFI-RRLAH FDRERIPERV VHARGAG-G YFEV-DDSD lTADFLSDP GR-TPVVFVF STV-GERGSA DTVRD-RGA -KPYTREGM- DLVgMTPVF FIdQaIKFFD

36

221

330

S. cerevisiae (CTA1) FINTqKrnPj InIrdA... DmWdfltp enqvaIkqVn lISDpGtPa NYRmGpYag HTRVnknG dWYVqVnK IdQGiknIt EAaKLaGn PdyqGdLFE
B. taurus (BLC) FInaKrnPq thlkdp... DmWdWslr pe...slmqY FLISUBGIPD ghWdGpYg HTRFLVnAG caVYcRFRYK IdQGiknIev EAaKLaGn PdyqGdLFE
B. firmus (katA) LVHAIKPpH nEIPQAQAN DfM Dfia enqkaRnVn WmSURAIPR SFRmGpYv HYFRVnAG KAHFVKFHK PvlGdSLV DEaKLaGn PdyqGdLFE
E. coli (HP11) FVNAVKPpH wLIPQAQAN DfM Dfvs lqPKLmVn WmSURAIPR SYRmGpYv HTRFLVnAG KAFVcRFRYK FladSLV DEaKLaGn PdyqGdLFE
A. nidulans (catD) FVNAVKPpH nKVPQAQAN nqW DpVY lhpKaRnVn WmSURAIPR SYRmGpYv nTFLVnAG KHFVKFHK FlhGvSLV DEaKLaGn PdyqGdLFE
Z. mays (cat1) NVHAIKPpH InI...G EnmRlVDFE hhpKALmE FLIdvGpI NYRmGpYv nTFLVnAG KpLVKFKHK PtdGvKLI dEAvtVgC hshatKdLYD
A. niger (catR) LVHAIKPpH nKIPQAQAN taW DfEFS qgstaLhaal WLSqnGIPR SFRmGpYv HAFRVAaG tskvVcRFRYK aqGvASLV DEaKLaGn nqWmRdLYD

Consenso FVNAVKP-PH -EIPQAQ-AN D-FW--DF-S --PE-LmVn WLSURGIPR SYRmGpYv HTRFLVnAG KAHFVKFHK P-QG-KSLV DEaKLaGn AG-D PD-NARDL-E

331

440

S. cerevisiae (CTA1) AIGmNYpW tvYIqtatER DnkLpFvF DITKVMpGgq fPLIrVOKLV lNmPmFFA qvEQaFpS tVpYqEaSa DPVLQaSLF YaDahRYLG PNFqIPVn
B. taurus (BLC) AItaMNYpW tLYIqvtEa EaeIppFpF DITKVMpGd vPLIrVOKLV lNRmNYFA EVEQIAFGP nqPGIEpSp DMLQaSLF YpDahRRLG PNYIqIPVn
B. firmus (katA) sIRMGYpEY ElgVqIIEE DEInpFDVL DPTKVMpEE VPKIImR lNRmVnVFA ElEQvAFpY HVVPGIDFtn DPLLQaSLF YdDahRYLG GmFpIPVn
E. coli (HP11) AIRaGpYpW ElgVqIIEE DRKFDL DPTKVMpEE VpVqVnVn lNRmNYFA EHQaAFpS HVPGLDftn DPLLQaSLF YdDahRYLG GmFpIPVn
A. nidulans (catD) AIDnkaYpW DfAIqaiPEE DqSKFSLIF DnKVMpEEq vPLIrVqGL lNRmDpFF ElEQvAFpS HVPGIDFSD DPLLQaSLF YdDahRYLG v...PmFIPVn
Z. mays (cat1) slaaMNYpW kLYIqIdid hdkKFDpL DvTKMPEE lPLIrVqGpV lNRmNYFA KneQIAFpS :aVpIhYSD DMLQaSLF YAdDahRYLG PNYIqIPVn
A. niger (catR) AqgMNYpW ELqaiDEE DmlFgEtIL DPTKVMpEE VpYpIImR lNRmNYFA EVEQaFpG HVVPGIDFtn DPLLQaSLF YIdDahRYLG GmFpIPVn

Consenso AIGmNYpW kLYIQ I-EE DE-RFDVVL DPTKVMPEE vPLIrVqGpV lNRmNYFA EHQv AF P H-VGIDFSD DPLLQaSLF Y-DQR-RLG GmFpIPVn

441

550

S. cerevisiae (CTA1) cPyankfFap aIRhHpmvvn gnfqsepVYL nMkSytYiq pIrPdqgH qvvnAgpai pynMatsPgi vDFvqainLY kvLgkqgQ gnlAVnigi hvegacpqi
B. taurus (BLC) cPyarvan. yQNDQmmn dnqgGpMYV FN. SfaaPn hqPaateH. rthFagdvq Rfn. Sand dnvitvTFY kvLhew. Q rKriceniag hkdqqlfiq
B. firmus (katA) RPlCP. FHM NQRDG. ygRq tInkGpVnH ENSLaMTPq. VaseewGQ YAhVqRlVeG KEVkrSeSf kDP.
E. coli (HPII) RPlCP. YHN EQRDG. mHm qIdtupaNYE PMSandMPR etEPgkrGQ FvaykrVeG nKVKerSPaf gEYshpLp WLSqtPEQR hIVdGpFEL skvzPyIre
A. nidulans (catD) RPlCP. FHM hNRDG. akRn rItkGpVnH FwFoam. PpaakG FkshpLpG RRkdlTpkF KEYhDqLp YnSLsevEw hVhAFpFEL dhdspVye
Z. mays (catI) aPKCa. hHN hNRDG. fmaf nhrdeevNYF ParEPaRha ekvPippe. v LtrCRkca qK. onnFKqager YrSvDpARd rfiqrwDal thprvthhr
A. niger (catR) RPlCP. VHN hNRDG. fqqi qIptnawYt PMSHGpM qanqtqkH FlapYryasG hIVRqtSPtF nhhWpQpMF WnSLpARQ mVvAdvPE skvnsPvK

Consenso RP-CP-FHM NQRDG---R- -I -G-VNY- MHSFS-MYP- -PE- HRS F- Y R-V-U REVR--SP-F -DY--Q-LP --SL-P-EGQ -VV-AP-FEL ----P-V--

551

640

S. cerevisiae (CTA1) qVvdmFAtV DkGLoaAkk vaaKhasEI sanstf
B. taurus (BLC) kkaaknfedv hpeygariga iId.KyneEK pkn
B. firmus (katA)
E. coli (HPII) rVVQ. LAH DILAQAVAR nLGIeltDq Initppgdn gkkkdpisi YaipdgVtk rvVailnde vras. dila ikalkkgyv hakliyrmg evtadd
A. nidulans (catD) rIagqRLaI DILAQAVhe mvGapiPka lrdnqktav zI. sqfd FpkagGis rFIaillgdy ydki. fmg maaailAas apirhwqte aiyagqdn
Z. mays (catI) tiwisyhspc DaalgQklps rInkPam.
A. niger (catR) nVVQ. LnmV hnaLAvrVAR gLGIdp. spnptyy Gnktsnvgf Fqkpliseg iqVgfians hpasikqqa maaqfaAgv dinvteaya qvntityals

Consenso -VV-Q-LA-V D--LAQAVA- -LQ-R---E- -----F-----I- -VV-----A-----

661

770

S. cerevisiae (CTA1)
B. taurus (BLC)
B. firmus (katA)
E. coli (HPII) gtvpiant fctpSLtd avivpno ni adadagdan yY imkAYk hIKpailvki arkikatis adygeagive adadagdmid elltimaahr vwarpkik
A. nidulans (catD) sskgvapdum ydmrStanf atfipgshi etiqkqziz yW. saStfG hIKalqamG aaglvhev. l qnvsvqtag adadagvmy qvntarqos adlaeqkv
Z. mays (catI)
A. niger (catR) daidfdalil advqSifas palangmet atstlyppar pEqalvdsFr ygkpuavde qvvalknagi dsaragpyty ssettekiak evleglyft fvdrfolda.

Consenso -----G-Q-S-----E-F--R-----G-----

771

805

S. cerevisiae (CTA1)
B. taurus (BLC)
B. firmus (katA)
E. coli (HPII) spa
A. nidulans (catD) lkdagdfak ffyqlaghrn wqreidglas twaf
Z. mays (catI)
A. niger (catR)

Consenso -----

FIGURA 7.

Comparación de CatD con las secuencias de seis catalasas .

Se seleccionaron 7 secuencias polipeptídicas de catalasas que se compararon con ayuda del programa GCG (Genetics Computer Group; versión 7, 1991). Las catalasas comparadas fueron *Saccharomyces cerevisiae* (Cohen *et al.*, 1988), *Bos taurus* (Schroeder *et al.*, 1981), *Bacillus firmus* (Número de acceso p30266), *Escherichia coli* (von Ossowski *et al.*, 1991), *Zea mays* (Redinbaugh *et al.*, 1988) *A. niger* (Fowler *et al.*, 1993) y *A. nidulans* (este trabajo). Las letras grandes indican amino ácidos conservados, las letras pequeñas no conservados. El consenso se elaboró estableciendo que al menos que 3 amino ácidos fueran conservados o idénticos. Los amino ácidos marcados con un asterisco se han implicado en la formación del sitio activo de la catalasa de bovino mientras que los indicados con una flecha se han implicado en la unión del grupo hemo en la misma enzima.

horas a hifas aéreas, la de 12 horas a hifas aéreas con conidióforos y algunas esporas y la de 25 horas a hifas aéreas con conidióforos y esporas maduras. Por otra parte, se aislaron esporas de cajas de Petri inoculadas a confluencia e incubadas a 37° C por 5 días. Se procesaron las muestras para obtener extractos crudos de proteínas, las cuales se ajustaron por proteína y se corrieron en un gel nativo de poliacrilamida, el cual fue teñido para detectar actividad de catalasa según la técnica de Harris y Hopkinson (1976) modificada por Chary y Natving (1989).

En la figura 8 se observan dos bandas de actividad predominantes, una banda de peso molecular más bajo, la cual esta presente a partir de las 0 horas. Esta catalasa muestra un incremento en su actividad durante todo el proceso de esporulación, llegando a su máxima acumulación a las 25 horas, tiempo al cual se observa una nueva banda de actividad con alto peso molecular. En esporas aisladas se observó una alta actividad de la catalasa de mayor peso molecular. A la catalasa de menor peso molecular le hemos denominado CatC (catalasa del crecimiento) y a la catalasa de mayor peso molecular le hemos denominado CatD (catalasa de la diferenciación). Por otra parte, se observa que existen otras bandas de menor actividad en los carriles de 0, 6 y 12 horas que podrían corresponder a la catalasa CatD. Las catalasas no se afectaron por el proceso de semipurificación por calentamiento, ya que en las muestras control se observa el mismo patrón de bandas.

Estos resultados sugieren que en *A. nidulans* existen por lo menos dos catalasas. La catalasa CatC de menor peso molecular, está presente en condiciones de crecimiento del hongo y se induce durante la esporulación y la catalasa CatD, de mayor peso molecular la cual aparece a las 25 h de esporulación y se encuentra acumulada principalmente en esporas. Con estos datos no se podría excluir la posibilidad de que estas dos catalasas estén codificadas por el mismo gen y las distintas bandas de actividad correspondan a modificaciones postraduccionales.

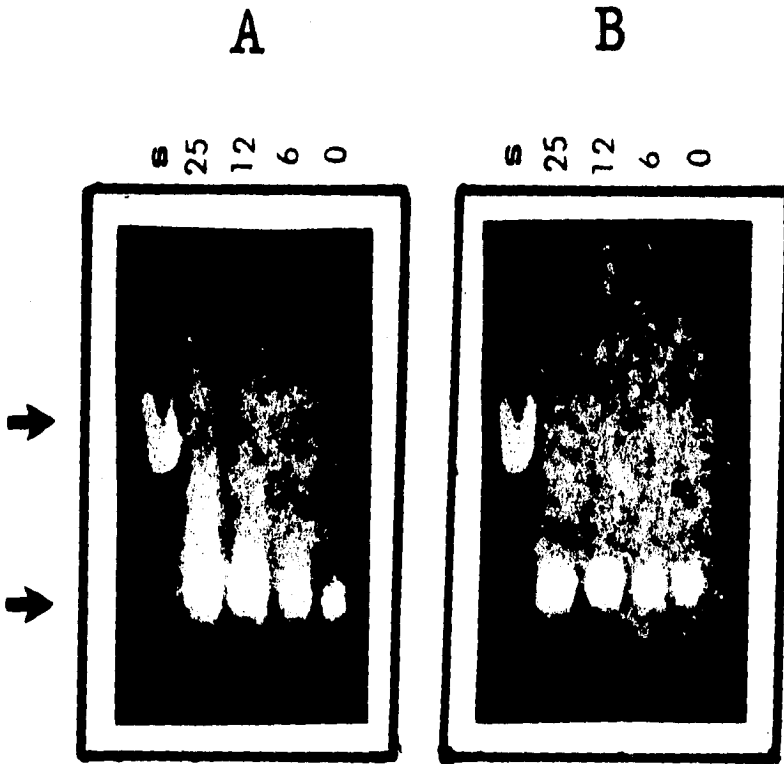


FIGURA 8.

Aspergillus nidulans muestra al menos dos bandas de actividad de catalasa que son reguladas inversamente durante el crecimiento y el desarrollo asexual.

Se prepararon extractos de proteína total a partir de cultivos inducidos a esporular. Panel A), extractos crudos sin calentar y sin congelar (Control). B) Extractos crudos semipurificados por calor. Los extractos control y semipurificados fueron separados por electroforesis en un gel nativo de poliacrilamida, el cual fue procesado para detectar actividad de catalasa según el método de Harris y Hopkinson (1976), modificado por Chary y Natving (1989). Las flechas indican bandas de actividad de catalasa. Los distintos carriles corresponden a muestras de proteína extraídas de los siguientes estados de desarrollo del hongo: 0 h de desarrollo (18 h de crecimiento), hifas indiferenciadas, 6 h, hifas aereas, 12 h, conidióforos, 25 h, conidióforos maduros con esporas asexuales; S, esporas asexuales purificadas

Dentro de un mismo organismo se han descrito la existencia de varias catalasas. En algunos casos se ha encontrado que una de ellas se expresan diferencialmente durante el desarrollo de estos organismos. En el caso de *E. coli* se han clonado y secuenciado dos genes de catalasa. La catalasa HPI codificada por el gen *katG* (Triggs-Raine et al., 1988), es una enzima bifuncional que tiene actividad de catalasa y peroxidasa. Esta catalasa se induce durante la fase de crecimiento logaritmico. La catalasa HP11, codificada por el gen *katE* (von Ossowski et al., 1991), es una enzima monofuncional que se induce durante la fase de crecimiento estacionario (Loewen et al., 1985). En *Bacillus subtilis* se han encontrado dos catalasas, codificadas por diferentes genes. La catalasa 1 se expresa durante el crecimiento logaritmico, mientras las catalasa 2 se induce cuando se inicia el proceso de esporulación y se encuentra en las esporas aisladas (Loewen et al., 1987). El gen *katA*, que codifica para la catalasa vegetativa de *B. subtilis*, ha sido clonado y secuenciado (Bol et al., 1991) y se piensa que codifica para la catalasa 1.

En la levadura *S. cerevisiae*, existe evidencia genética de dos catalasas, la catalasa peroxisomal A (CTAI) y la catalasa citosólica T (CTTI) (Zitomer y Lowry, 1992). No se ha estudiado si alguna de éstas se induce durante el desarrollo sexual de este hongo. En el hongo filamentoso *N. crassa* se han reportado tres catalasas; Cat-1 es la catalasa predominante durante el crecimiento vegetativo, Cat-2 se encuentra en bajos niveles en las esporas y en micelio en fase estacionaria y la catalasa Cat-3 es la catalasa predominante en las esporas (Chary y Natvig, 1989). La evidencia genética de la existencia de estas catalasas no es definitiva y recientemente se ha observado que solo existen 2 catalasas y una de ellas esta asociada a las conidias (Lledias y Hansberg, en preparación).

Se ha sugerido que en *A. niger* existen dos catalasas. El gen *catR* ha sido clonado y secuenciado. De acuerdo a las condiciones en las que fue aislado, podría codificar para la catalasa de las esporas. El otro gen de catalasa de este hongo, *catA* se aisló por homología con el gen CTAI de *S. cerevisiae*. Se ha sugerido que esta catalasa se induce durante el crecimiento del hongo en ácidos grasos y podría ser peroxisomal (Fowler et al., 1993).

Para el maíz, *Zea mays*, se han descrito 3 genes de catalasa Cat1, Cat2 y Cat3, los cuales se encuentran expresados diferencialmente en zonas específicas de la semilla y el embrión (Redinbaugh et al., 1988).

En la hipótesis para la diferenciación celular en microorganismos propuesta por Hansberg y Aguirre (1990), se sugiere que los microorganismos se diferencian aislándose del oxígeno. De acuerdo con los datos obtenidos en este trabajo y los datos reportados en la literatura se observa que las catalasas se inducen durante la esporulación. Dado que la

inducción de actividad de catalasas corresponde con el incremento en la concentración de peróxido de hidrógeno (Demple y Amáñile-Cuevas, 1991), estos datos son consistentes con dicha hipótesis ya que el incremento en la actividad de una catalasa ya existentes, así como la aparición de una nueva catalasa durante la diferenciación asexual, sería consistente con la aparición y desarrollo de distintos tipos de tensión oxidativa.

Regulación de *catD* durante el desarrollo.

Con el objetivo de conocer cómo se expresaba el gen de *catD* a nivel del RNA mensajero durante el desarrollo en *A. nidulans*, se realizó una hibridación tipo Northern Blot, como se describe a continuación. Se purificó RNA total de cultivos conidiantes a distintos tiempos de desarrollo. El RNA fue separado en un gel desnaturizante de agarosa-formaldehído y se transfirió a una membrana de Nylon, la cual fue hibridada usando el fragmento PstI de CAN5 como sonda.

En esta hibridación tipo Northern Blot (figura 9) se observa la aparición del mensajero de *catD* a partir de las 12 horas (carril 3), tiempo en el cual ya se han formado los conidióforos y una pequeña cantidad de esporas. A las 25 horas (carril 4) vemos un incremento en la acumulación de este mensajero cuando el hongo ya ha esporulado. En las esporas aisladas (carril 5) se observa que existe una gran acumulación del mensaje de *catD*. En los carriles 1 (0 horas de diferenciación) y 2 (6 horas de diferenciación) no se observa esta señal.

De estos datos podemos concluir que la expresión de *catD* se regula diferencialmente durante el desarrollo del hongo y que está preferencialmente acumulado en las esporas. Este resultado sugiere que las dos bandas de actividad de catalasa detectadas en geles nativos corresponden a dos genes distintos siendo *catD* el que podría codificar la catalasa de mayor peso molecular que aparece a las 25 h de esporulación y cuya actividad se encuentra acumulada en esporas. Es interesante hacer notar que aunque el mensajero para *catD* es detectable a las 12 h y claramente acumulado a las 25 h, la actividad de CatD es apenas detectable a las 25 h, lo cual sugiere un desfase temporal entre la transcripción de *catD* y la traducción del mensajero y por lo tanto, una posible regulación a nivel traduccional. Es interesante destacar que se ha propuesto que la catalasa de pulmón se regula a nivel traduccional (Clerch y Massaro, 1992).

Recientemente se interrumpió el gen de *catD* y se confirmó que efectivamente codifica para la catalasa de las esporas (Navarro *et al.*, en preparación). De acuerdo a estos datos, observamos que la catalasa CatD se encuentra acumulada en las esporas tanto a nivel de RNA mensajero (figura 9) como a nivel de proteína (figura 8). No

conocemos cuales son los genes que regulan la transcripción de *catD*), sin embargo, sería interesante averiguar si alguno de los genes reguladores de la esporulación descritos en *A. nidulans* regula a *catD*.

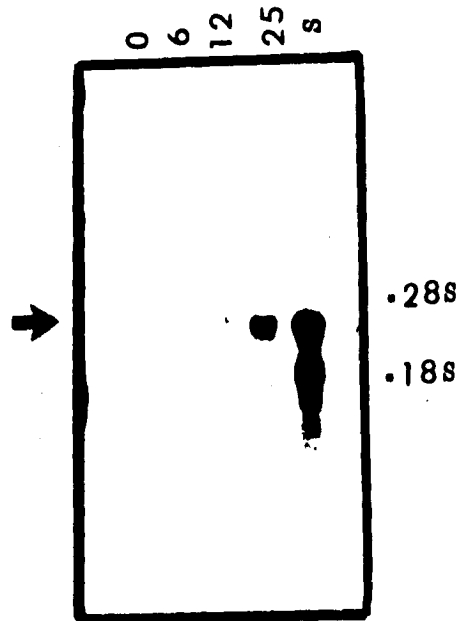


FIGURA 9.

Patrón de regulación de *catD* a nivel de RNA mensajero durante la esporulación.

Se aisló RNA total de cultivos conidantes de la cepa silvestre FGSC-26 a las horas indicadas (Ver figura 8). El RNA se separó en un gel de agarosa-formaldehído, se transfirió a una membrana de Nylon y se hibridó usando el fragmento PstI de CAN5. Las flechas indican bandas de hibridación. Los puntos indican la posición de los RNA ribosomales 28S y 18S.

Existe un homólogo de *catD* en *Neurospora crassa*.

Con el propósito de averiguar si existía algún gen homólogo de *catD* en *N. crassa* se realizó una hibridación tipo Southern Blot con el DNA genómico de *A. nidulans* y *N. crassa* usando como sonda el fragmento PstI de CAN5.

Se aisló DNA total de *A. nidulans* y *N. crassa*. El DNA fue digerido con las enzimas PstI y BamHI, separado en un gel de agarosa, transferido a una membrana de

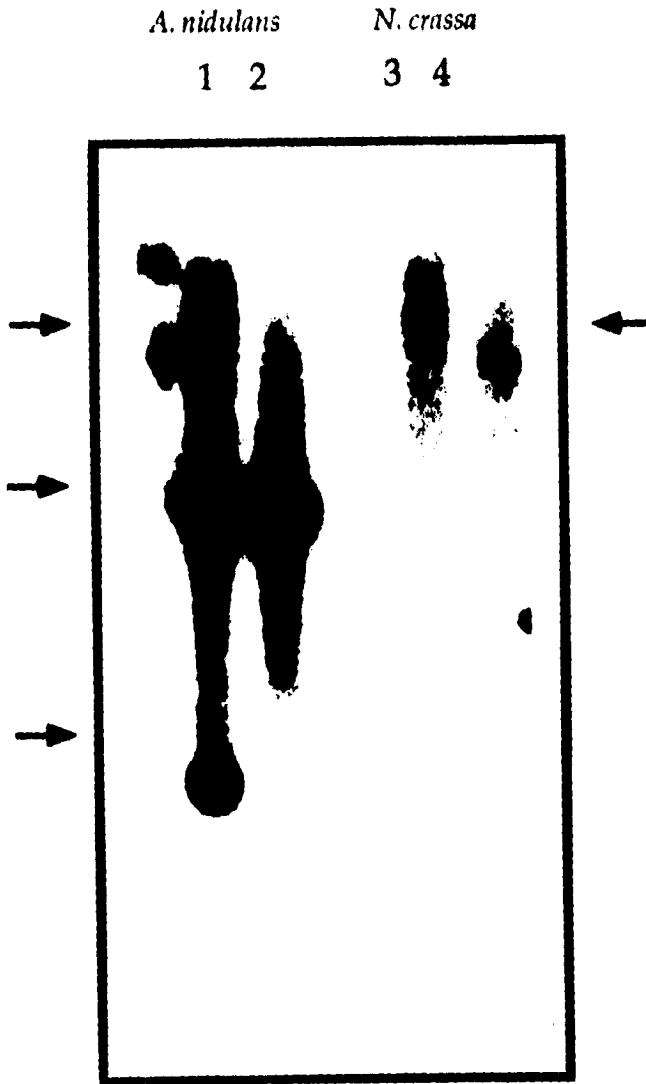


FIGURA 10.

En *Neurospora crassa* existe un posible homólogo de *catD*.

Se aisló DNA total de *A. nidulans* y *N. crassa* y se digirió con las enzimas PstI y BamHI. El DNA se separó en un gel de agarosa y se hibridó usando la sonda CAN5 PstI en condiciones de baja severidad (0.5X SSC, temperatura ambiente). Las flechas indican señales de hibridación. Los carriles 1 y 3 corresponden a las digestiones con BamHI y los carriles 2 y 4 a las digestiones con PstI.

Nylon e hibridado contra *catD* en condiciones de baja severidad. Los carriles 1 y 3 de la figura 10 son digestiones con la enzima BamHI y los carriles 2 y 4 son digestiones con la

En el carril 1 de la figura 10 se observan dos bandas de hibridación que corresponden a la digestión del gen *catD* con la enzima BamHI. En esta digestión se producen una banda de 3500 pares de bases (pb) y una banda menor de aproximadamente 1000 pb. En el carril 2 se observa la digestión del DNA de *A. nidulans* con la enzima PstI en donde sólo se observa una banda de hibridación de aproximadamente 3500 pb. En el carril 3 se observa una banda de hibridación de aproximadamente 9000 pb del gen *catD* con el DNA de *N. crassa*. Finalmente en el carril 4 se observa una sola banda de hibridación del DNA de *N. crassa* con el gen de catalasa de *A. nidulans* que mide aproximadamente 6000 pb.

Estos datos concuerdan con el mapa de restricción de la secuencia del gen *catD*. Para la enzima BamHI se observan dos sitios de corte dentro de la secuencia de esta catalasa. Estos sitios de corte generan un fragmento de 80 pb, uno de 300 pb y un fragmento de mayor peso molecular de aproximadamente 1800 pb. En la figura 10 sólo se observan dos bandas de hibridación que corresponden a las bandas del fragmento de 300 pb (hasta el siguiente sitio de corte de la enzima dentro del genoma que parece estar aproximadamente a 700 pb del extremo 5') y la otra banda corresponde a la banda de 1800 que abarca hasta el siguiente sitio de corte el cual esta aproximadamente a 1700 pares de bases en el extremo 3'. La banda de menor peso molecular (80 pb) no se observa en esta hibridación debido a que tiene un tamaño muy pequeño. En el caso de la enzima PstI, no existen sitios de corte dentro de la región codificadora y por esta razón sólo se observa una sola banda que corresponde al peso molecular de *catD*. Como los datos del mapa de restricción de la catalasa y los datos de hibridación concuerdan concluimos que existe una sola copia de este gen. En la figura 10 se observan dos bandas de hibridación muy débiles las cuales podrían corresponder al segundo gen de catalasa propuesto en este trabajo.

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Las conclusiones de este trabajo son las siguientes:

1. El gen *catD* define un nuevo locus en el cromosoma III de *Aspergillus nidulans* capaz de codificar una catalasa de 744 amino ácidos, con un masa molecular de 83 969 Daltones.
2. Existen por lo menos dos genes de catalasa en *A. nidulans* cuya expresión se regula diferencialmente durante el desarrollo.
3. El gen *catD* se induce durante la conidiación y tanto el RNA mensajero y la proteína se encuentran acumulados en las esporas.

Las perspectivas del trabajo son las siguientes:

1. La demostración formal de que *catD* codifica para la catalasa de las esporas requiere de la interrupción del gen *catD* y la observación del patrón de actividad de catalasa de la mutante. En la mutante debe desaparecer la actividad de catalasa de las esporas y si la actividad de la catalasa del crecimiento debe permanecer intacta.
2. Estudiar el fenotipo de la mutante con el gen interrumpido con relación a los factores medio ambientales durante la germinación y latencia de las esporas.
3. Buscar si alguno de los tres genes reguladores principales de la esporulación en *A. nidulans* (*brlA*, *abaA*, *wetA*) regula la expresión de *catD*. Establecer de esta manera si *catD* es un gen específico de la esporulación.
4. Secuenciar la región promotora de la catalasa y establecer por medio de remociones específicas cuáles son las secuencias mínimas, necesarias para la regulación del gen durante la esporulación.
5. Establecer en qué compartimentos celulares se localiza esta catalasa.
6. Clonar y secuenciar el otro gen de catalasa.

BIBLIOGRAFIA

- Adams, T.H., Boylan, M.T. y Timberlake, W.E. 1988. *brl1* is necessary and sufficient to direct conidiophore development in *Aspergillus nidulans*. *Cell*. **54**:353-362.
- Aguirre, J., Adams, T.H. y Timberlake, W.E. 1990. Spatial control of developmental regulatory genes in *Aspergillus nidulans*. *Exp. Mycol.* **14**:290-293.
- Aguirre, J., Rodriguez, R. y Hansberg, W. 1989. Oxidation of *Neurospora crassa* NADP-specific glutamate dehydrogenase by activated oxygen species. *J. Bacteriol.* **171**:201-221.
- Aguirre, J. y Hansberg. 1986. Oxidation of *Neurospora crassa* glutamine synthetase. *J. Bacteriol.* **166**:1040-1045.
- Aguirre, J. 1992. *Aspergillus nidulans* como sistema experimental, y la esporulación como modelo de diferenciación celular y regulación genética. *Ciencia* **43**:445-450.
- Ballance, D.J. 1986. Sequences import for gene expression in filamentous fungi. *Yeast* **2**:229-236.
- Belazzi, T., Wagner, A., Wieser, R., Schanz, M., Adam, G., Hartig, A. y Ruis, H. 1991. Negative regulation of transcription of the *Saccharomyces cerevisiae* catalase T (CTT1) gene by cAMP is mediated by a positive control element. *EMBO J.* **10**:585-592.
- Bol, D.K. y Yasbin, R.E. 1990. Characterization of an inducible oxidative stress system in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **172**:3503-3506.
- Bol, D.K. y Yasbin, R.E. 1991. The isolation, cloning and identification of a vegetative catalase gene from *Bacillus subtilis*. *Gene*. **109**:31-37.
- Boylan, M.T., Mirabito, P.M., Willett, C.E., Zimmerman, C. R. y Timberlake, W. 1987. Isolation and physical characterization of three essential conidiation genes from *Aspergillus nidulans*. *Mol. and Cell. Biol.* **7**:3113-3118.

Bradford, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, **72**:248-254.

Brody, H., Griffith, J., Cuticchia, A.J., Arnold, J. y Timbrlake, W.E. 1991. Chromosome-specific recombinant DNA libraries from the fungus *Aspergillus nidulans*. *Nucleic Acids Res.* **19**:3105.

Cárdenas, M.E. y Hansberg, W. 1984. Glutamine metabolism during aerial mycelium growth of *Neurospora crassa*. *J. Gen. Microbiol.* **130**:1733-1741.

Chater, K.F. 1989. Multilevel regulation of *Streptomyces* differentiation. *TIG* **5**:372-377.

Chary, P. y Natvig, D.O. 1989. Evidence for three differentially regulated catalase genes in *Neurospora crassa*: effects of oxidative stress, heat shock and development. *J. Bacteriol.* **171**:2646-2652.

Clerch, L.B. y Massaro, D. 1992. Oxidation-reduction-sensitive binding of lung protein to rat catalase mRNA. *J. Biol. Chem.* **267**:2853-2855.

Clutterbuck, J.A. 1974. *Aspergillus nidulans*. En King RC (ed): "Handbook of Genetics". New York: Plenum Press: pp 447-510

Cohen, G., Rapatz, W. y Ruis, H. 1988. Sequence of *Saccharomyces cerevisiae* CTA1 gene and amino acid sequence of catalase A derived from it. *Eur. J. Biochem.* **176**:159-163.

Demple, B. y Amabile-Cuevas, C.F. 1991. Redox redux: The control of oxidative stress responses. *Cell.* **67**:837-839.

Fantes, P. 1989. Yeast cell cycle. *Curr. Opin. Cell. Biol.* **1**:250-255.

Fowler, T., Rey, M.W., Vähä-Vahe, P., Power, S.D. y Berka, R.M. 1993. The *catR* gene encoding a catalase from *Aspergillus niger*: primary structure and elevated expression

through increased gene copy number and use of a strong promoter. *Mol. Microbiol.* **9**:989-998.

Gould, S.J., Keller, G.A., Schneider, M., Howell, S.H. y Garrard, L.J. 1990. Peroxisomal protein import is conserved between yeast, plants, insects and mammals. *EMBO J.* **9**:85-90.

Gross, J.D. 1994. Developmental decisions in *Dictyostelium discoideum*. *Microbiol. Rev.* **58**:330-351.

Halliwell, B. y Gutteridge J.M.C. 1984. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem. J.* **219**:1-14.

Halliwell, B. y Gutteridge J.M.C. 1989. Free radicals biology and medicine. Clarendon Press, Oxford. 543 p.

Hansberg, W. y Aguirre, J. 1990. Hyperoxidant states cause microbial cell differentiation by cell isolation from dioxygen. *J. Theor. Biol.* **142**:201-221.

Harris, H. y Hopkinson, D.A. 1976. Handbook of enzyme electrophoresis in human genetics. North-Holland Publishing Co., Amsterdam. pp1-2.

Hengge-Aronis, R. 1993. Survival of hunger and stress: The role of *rpoS* in early stationary phase gene regulation in *E. coli*. *Cell.* **72**:165-168.

Ivanova, A., Miller, C., Glinsky, G. y Eisenstark, A. 1994. Role of *rpoS* (*katG*) in oxyR-independent regulation of hidropoxidase I in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **12**:571-578.

Jacob, F. y Monod, J. 1961. Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. *J. Mol. Biol.* **3**:318-356.

Jonhstone, I.L., Hughes, S.G. y Clutterbuck, A.J. 1985. Cloning an *Aspergillus nidulans* developmental gene by transformation. *EMBO J.* **4**:1307-1311.

Jungmann, J., Reins, H.A., Lee, J., Romeo, A., Hassett, R., Kosman, D. y Jentsch, S. 1993. MAC1, a nuclear regulatory protein related to Cu-dependent transcription factors is involved in Cu/Fe utilization and stress resistance in yeast. *EMBO J.* **12**:5051-5056.

Käfer, E. 1977. Meiotic and mitotic recombination in *Aspergillus nidulans* and its chromosomal aberrations. *Adv. Genet.* **19**:33-131.

Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**:680.

Law, D.J. y Timberlake, W.E. 1980. Developmental regulation of laccase levels in *Aspergillus nidulans*. *J. Bacteriol.* **144**: 509-517.

Lewin, B. 1990. Genes IV. Oxford University Press, Cambridge, Mass. E.U. p. 545.

Losick, R., Youngman, P. y Piggot, P.J. 1986. Genetics of endospore formation in *Bacillus subtilis*. *Annu. Rev. Genet.* **20**:625-659.

Loewen, P.C., Switala, J. y Triggs-Raine, B. 1985. Catalases HPI and HPII in *Escherichia coli* are induced independently. *Arch. Biochem. Biophys.* **243**:144-149.

Loewen, P.C. y Switala, J. 1987. Multiple catalases in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **169**:3601-3607.

Martinelli, S.D. 1994. *Aspergillus nidulans* as an experimental organism, en *Aspergillus: 50 years*. Ed. Martinelli, S.D. y Kinghotn, J.R. Elsevier. Nueva York. E.U. pp:33-58.

Marshall, M.A. y Timberlake, W.E. 1991. *Aspergillus nidulans wetA* regulates spore-specific gene expression. *Mol. Cell. Biol.* **11**:55-62.

McKnight, G.L., O'Hara, P.J. y Parker, M.L. 1986. Nucleotide sequence of triosephosphate isomerase gene from *Aspergillus nidulans*: Implications for a differential loss of introns. *Cell* **46**:143-147.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

- Mirabito, P.M., Adams, T.H. y Timberlake, W.E. 1989. Interactions of three sequentially expressed genes control temporal and spatial specificity in *Aspergillus* development. *Cell*. **57**:859-868.
- Mims, C.W., Richardson, E.A., Timberlake, W.E. 1988. Ultrastructural analysis of conidiophore development in the fungus *Aspergillus nidulans* using freeze-substitution. *Protoplasma* **44**:132-141.
- Miller, K.Y., Toennis, T.M., Adams, T.H. y Miller, B.L. 1991. Isolation and transcriptional characterization of a morphological modifier: the *Aspergillus nidulans* stunted (*stuA*) gene. *Mol. Gen. Evol.* **227**:285-292.
- Murthy, M.R.N., Reid III, T.J., Sicignano, A., Tanaka, N. y Rossmann, M.G. 1981. Structure of beef liver catalase. *J. Mol. Biol.* **152**:465-499.
- Mukhopadhyay, S.M. y Schellhorn, H.E. 1994. Induction of *Escherichia coli* hydroperoxidase I by acetate and other weak acids. *J. Bact.* **176**:2300-2307.
- Penefsky, H.S. 1977. Reversible Binding of P_i by Beef Heart Mitochondria Adenosine Triphosphatase. *J. Biol. Chem.* **252**:2891-2899.
- Pontecorvo, G., Roper, J.A., Hemmons, L.M., MacDonald, K.D. y Bufton, A.W.J. 1953. The genetics of *Aspergillus nidulans*. *Adv. in Gen.* **5**:141-239.
- Roberts, V.A., Fisher, C.L., Redford, S.M., Mcrec, D.E., Parge, H.E., Getzoff, E.D. y Tainer, J.A. 1991. Mechanism y atomic structure of superoxide dismutase. *Free Rad. Res. Comms.* **12-13**:269-278.
- Redinbaugh, M.G., Wadsworth, G.J. y Scandalios, J.G. 1988. Characterization of catalase transcripts and their differential expression in maize. *Biochim. Biophys. Acta.* **1049**:219-222.
- Redinbaugh, M.G., Sabre, M. y Scandalios, J.G. 1990. Expression of the maize Cat3 catalase gene is under the influence of a circadian rhythm. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**:6853-6857.

Sambrook, J., Fritsch, E.F. y Maniatis, T. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor, N.Y.

Sanger, F., Niklen, S. y Coulson, A.R. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **74**:5463-5467.

Schroeder, W.A., Shelton, J.R., Shelton, J.B., Robberson, B., Apell, G., Fang, R.S. y Bonaventura, J. 1981. *Arch. Biochem. Biophys.* **214**:397-421

Shimkets, L.J. 1990. Social and developmental biology of the myxobacteria. *Microbiol. Rev.* **54**:473-501.

Schüller, C., Brewster, J.L. Alexander, M.R., Gustin, M.C. y Ruis, H. 1990. The HOG pathway controls osmotic regulation of transcription via the stress response element (STRE) of *Saccharomyces cerevisiae* CTT1 gene. *EMBO J.* **13**:4382-4389.

Scott, M.P. y Carroll, S.B. 1987. The segmentation and homeotic gene network in early *Drosophila* development. *Cell* **51**:689-698.

Stringer, M.A., Dean, R.A., Sewall, T.C. y Timberlake, W.E. 1991. Rodletless, a new *Aspergillus* developmental mutant induced by directed gene inactivation. *Genes & Dev.* **5**:1161-1171.

Stringer, M.A. y Timberlake, W.E. Sin publicar.

Subramani, S. 1993. Protein import into peroxisomes and biogenesis of the organelle. *Annu. Rev. Cell. Biol.* **9**:445-478.

Timberlake, W.E. 1980. Developmental gene regulation in *Aspergillus nidulans*. *Dev. Biol.* **78**:497-510.

Triggs-Raine, B.L., Doble, B.W., Mulvey, M.R., Sorby, P.A. y Loewen, P.C. 1988. Nucleotide sequence of *katG*, encoding catalase HPI of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **170**:4415-4419.

von Ossowski, I., Mulvey, M.R., Leco, P.A., Borys, A. y Loewen, P.C. 1991. Nucleotide sequence of *Escherichia coli katE*, which encodes catalase HP11. *J. Bacteriol.* **173**:514-520.

Ward, M. 1991. *Aspergillus nidulans* and other filamentous fungi as genetic systems en *Modern Microbial Genetics*. Wiley-Liss, Inc. pp 455-496.

Yager, L.N. 1992. Early developmental events during asexual and sexual sporulation in *Aspergillus nidulans*, en *Aspergillus*, biology and industrial applications. Ed. Bennett, J.W. y Klich, M.A. Butterworth-Heinemann Publications. Londres, Inglaterra. pp:19-42.

Zitomer, R.S. y Lowry, C.V. 1992. Regulation of gene expression by oxygen in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Rev.* **56**:1-11.