

00581

2
2 ef



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**



FACULTAD DE QUIMICA

LAS CATALASAS Y LA RESPUESTA
ANTIOXIDANTE DURANTE EL CRECIMIENTO Y LA
DIFERENCIACION EN *Aspergillus nidulans*.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTORA EN CIENCIAS BIOQUIMICAS
P R E S E N T A :
M. EN B. LAURA KAWASAKI WATANABE

ASESOR: DR. JESUS AGUIRRE LINARES.

MEXICO, D. F.

1998.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

26 12 84



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.

Agradezco a mi comité tutorial integrado por:

Dr. Jesús Aguirre Linares

Dr. Luis Covarrubias Robles

Dr. Fernando Montiel Aguirre

por su apoyo, crítica y valiosos comentarios durante el desarrollo de este trabajo.

Agradezco al jurado integrado por los doctores:

Dr. Jorge Vázquez Ramos

Dra. Alicia González Manjarrez

Dr. Roberto Coria Ortega

Dr. Mario Rocha Sosa

Dr. Wilhelm Hansberg Torres

Dra. Amelia Farrés González-Saravia

Dr. Miguel Angel Cevallos Gaos

por sus comentarios y aportaciones a la presente tesis.

El presente trabajo se realizó en el Instituto de Fisiología Celular bajo la asesoría del Dr. Jesús Aguirre Linares y con el apoyo de los donativos IN208994 e IN206097 de la DGAPA-UNAM y 400346-5-2246PN de CONACyT. También se contó con el apoyo de una beca de DGAPA-UNAM.

Gracias al Dr. Jesús Aguirre Linares por depositar su confianza en mí y por darme la oportunidad de trabajar en un proyecto tan interesante.

Agradezco al Dr. Whilhelm Hansberg Torres su apoyo, crítica y participación tan activa durante el desarrollo de este trabajo.

Gracias a la Dra. Amelia Farrés por su amistad y apoyo durante tantos años.

Gracias a Rosa Navarro y Fernando Lledias por su paciencia y por enseñarme tantas técnicas indispensables para llevar a cabo este trabajo. Agradezco también sus valiosos comentarios y amistad.

Agradezco muy especialmente a Rosalinda Tapia por su amistad que para mí tiene un valor enorme. Gracias por todos tus comentarios y apoyo durante los momentos difíciles.

Agradezco a Lety García por hacer que los trámites administrativos fueran tan ágiles y eficientes. Gracias especialmente por tu amistad.

Gracias a Ana Luz López, Susi Rodríguez y Fernando Zamora por brindarme su amistad durante tantos años.

Agradezco a mis compañeros de laboratorio: Rosa, Olivia, Rosalinda, Fernando, Shaday, Adelaida, Gabriela y Yésika por hacer el trabajo mas divertido.

Dedico este trabajo a mis padres, Amalia y Alfredo y a mis hermanas, Silvia y Lety por su cariño y apoyo. Mil gracias por todo.

A Juan Carlos por tantos años de apoyo, amistad y cariño. Gracias por impulsarme a seguir siempre adelante.

INDICE

Resumen.....	1
Introducción..	3
I. Las especies de oxígeno reactivas..	3
II. Mecanismos de defensa contra las especies de oxígeno reactivas.....	5
1. Mecanismos enzimáticos.....	5
2. Mecanismos no enzimáticos.....	8
III. Factores transcripcionales que participan en la respuesta antioxidante en microorganismos.....	11
1. Bacterias.	12
2. Hongos.....	17
IV. Regulación de las catalasas.....	22
V <i>Aspergillus nidulans</i> como modelo experimental...	29
Objetivos.....	31
Materiales y métodos.....	33
I. Cepas de <i>Aspergillus nidulans</i> empleadas en este trabajo ..	33
II. Medios de cultivo y condiciones de crecimiento de <i>Aspergillus nidulans</i> y <i>Escherichia coli</i>	34
III. Obtención de extractos totales de proteínas ..	35
IV. Medición de actividades de catalasa y de β -galactosidasa.....	36
V. Inmunoelectrotransferencia e inmunolocalización de la catalasa B.....	36
VI. Genética.....	40
VII. Mutagénesis ..	40
VIII. Técnicas de biología molecular ..	41

Resultados y Discusión.....	46
Capítulo I. Clonación del gen <i>catB</i> , estudio sobre la regulación de la catalasa B y caracterización de dobles mutantes <i>catA</i> ⁻ / <i>catB</i> ⁻	47
Capítulo II. Regulación transcripcional del gen <i>catB</i>	57
Capítulo III. Inmunolocalización de la catalasa B y detección de una tercera catalasa en <i>A. nidulans</i> , la cual se expresa en la fase exponencial tardía de crecimiento.....	72
Capítulo IV. Estrategias para el aislamiento de mutantes incapaces de expresar el gen <i>catB</i>	78
Discusión general.....	82
Conclusiones.....	91
Perspectivas.....	92
Referencias.....	93
Apéndices.....	103

RESUMEN

Hansberg y Aguirre (1990) han propuesto que los microorganismos se diferencian al pasar de un estado estable a otro, al enfrentarse a un estado hiperoxidante. Este ocurre cuando la producción de especies de oxígeno reactivas supera la capacidad celular antioxidante. Partiendo de esta hipótesis, se decidió estudiar la regulación de las catalasas durante el desarrollo del hongo *Aspergillus nidulans*. Las catalasas juegan un papel fundamental durante la respuesta antioxidante, al descomponer el H_2O_2 intracelular que se genera por diversas vías durante el metabolismo aerobio. En *A. nidulans* se reportó la existencia de una catalasa A que es muy abundante en las esporas asexuales (conidios) y que está codificada por el gen *catA* y otra catalasa B presente durante la diferenciación asexual (Navarro *et al.*, 1996).

Se decidió estudiar y caracterizar a la catalasa B así como aislar el gen correspondiente. Para clonar el gen *catB*, se hibridó una biblioteca genómica de *A. nidulans* con un fragmento interno de 800 pb del gen *catA*. La secuencia del gen clonado reveló un marco de lectura abierto que predice un polipéptido de 721 aminoácidos que mostró 78% de identidad con una catalasa de *A. fumigatus* y 61% con la catalasa R de *A. niger*. La interrupción de este gen anuló la actividad de la catalasa B, por lo cual lo nombramos *catB*. En un estado particular del ciclo de vida (colonias jóvenes), la cepa con el gen *catB* interrumpido, resultó mucho más sensible al H_2O_2 que una cepa silvestre isogénica, lo que indica la importancia de esta enzima durante el crecimiento en condiciones de tensión oxidativa (Kawasaki *et al.*, 1997).

Las hibridaciones tipo Northern de *catB*, revelaron que el mensajero correspondiente se encuentra ausente en los conidios, comienza a detectarse después de 10 h de crecimiento y continúa acumulándose durante la fase estacionaria y en la esporulación. El patrón de inducción de la catalasa B durante la germinación y el crecimiento fue similar al observado para su rNm, lo cual sugirió que la regulación de *catB* ocurre a nivel transcripcional. La catalasa B no solo se regula durante el crecimiento y la esporulación del hongo, sino que también responde al estrés oxidativo generado por H_2O_2 o por paraquat. Otras condiciones que también indujeron a esta catalasa, fueron el choque de calor a 42°C y el crecimiento en ácido úrico como única fuente de nitrógeno.

Se investigó si una mutante *catA⁻/catB⁻* presentaba un fenotipo durante el crecimiento en compuestos cuyo metabolismo genera H_2O_2 . Se probaron ácidos grasos como única fuente de carbono y el ácido úrico como única fuente de nitrógeno. Los resultados indicaron que una doble mutante crece tan bien como una cepa silvestre isogénica en ácido oleico ó en úrico. Esto indica que *A. nidulans* posee mecanismos alternativos para deshacerse del H_2O_2 (Kawasaki *et al.*, 1997), función que podría realizar una peroxidasa, o como se postula más adelante, otra catalasa. Para conocer la localización celular de CatB, se inmunolocalizó utilizando anticuerpos contra la catalasa 1 de *A. fumigatus* y muestras de micelio de *A. nidulans* de 48 h de crecimiento. Los datos indicaron que una parte considerable de la catalasa B de *A. nidulans* se encuentra asociada a la pared celular de las hifas, mientras que parte de la catalasa A está asociada a la pared celular de los conidios (Navarro y Aguirre, comunicación personal).

La regulación transcripcional de la catalasa B se estudió mediante la construcción de una fusión *catB::lacZ*. Esta fusión contenía 3.5 kb de DNA río arriba del codón de inicio de CatB y mostró una clara inducción durante la fase estacionaria de crecimiento, con un aumento de 4 veces a las 18h, 14 veces a las 28h y 22.5 veces a las 48h con respecto a la actividad detectada a las 10h, tiempo en el que la actividad del reportero es de aproximadamente 90U. Los niveles máximos de actividad a las 48 h alcanzaron más de 2000U de β -galactosidasa. El reportero también respondió la tensión oxidativa detectándose una inducción de 17 veces durante el tratamiento con paraquat por 2h. Estos datos demuestran que el gen *catB* se regula a nivel transcripcional. Una segunda fusión con 993 pb río arriba del codón de inicio de CatB presentó una regulación muy semejante a la observada con la fusión de 3.5 kb. Se secuenció la región de 993 pb y se buscaron secuencias consenso a las que se unen factores transcripcionales involucrados en respuestas a distintos tipos de tensión.

Se detectaron posibles sitios de unión para UaY (activador transcripcional que se induce por ácido úrico), HapC (homólogo de Hap3 de *S. cerevisiae*; participa en la activación de genes por hemo) y Yap1 (homólogo de AP-1; participa en la respuesta a la tensión oxidativa en levadura), así como también sitios parecidos a STRE (involucrados en la respuesta a diferentes tipos de tensión en *S. cerevisiae*). Todas estas secuencias se encuentran en la región comprendida entre los sitios -413 y -993 con respecto al codón de inicio. La eliminación de esta región afectó notablemente la regulación del reportero *catB::lacZ*: la inducción en respuesta a la tensión oxidativa disminuyó aproximadamente 4 veces con respecto al control, mientras que la inducción durante el crecimiento se redujo aproximadamente 3.5 veces. Los resultados muestran que los 580pb de la región regulatoria del gen *catB* incluyen elementos que median la mayor parte de la inducción de *catB* durante la fase estacionaria y en respuesta a la tensión oxidativa. Un análisis más fino de esta región permitirá definir si ambos tipos de inducción operan o no a través de un mismo factor transcripcional.

Durante el desarrollo de este trabajo, se detectó la actividad de una tercera catalasa que se induce durante la fase estacionaria tardía (48-72 h). Esta catalasa es fácilmente reconocida en extractos de mutantes *catA⁻/catB⁻*. Sin embargo, en una cepa silvestre la presencia de la catalasa B, hace difícil el distinguirlas. Esta nueva enzima se denominó catalasa C y probablemente participe en la desintoxicación del H₂O₂ generado al crecer una mutante *catA⁻/catB* en ácidos grasos.

Se propone que el estudio de la regulación del gen *catB* es un enfoque adecuado para comprender la respuesta antioxidante en eucariotes y su relación con la diferenciación.

INTRODUCCION

En 1990, Hansberg y Aguirre propusieron que la diferenciación celular en los microorganismos ocurre como una respuesta ante un estado hiperoxidante inestable. Dicho estado se define como una condición en la que la producción de especies de oxígeno reactivas supera la capacidad antioxidante de la célula. Ante esta situación, el camino que siga la célula dependerá de la disponibilidad de poder reductor, pudiendo regresar a un estado estable anterior o bien, puede aislarse y limitar la entrada de oxígeno, alcanzando un nuevo estado estable. La célula muere cuando no puede compensar el estado hiperoxidante. Considerando esta hipótesis, resulta importante conocer cuáles son las especies de oxígeno reactivas (EOR), de dónde provienen, cuáles son sus efectos y los mecanismos con que cuentan los organismos para defenderse de ellas.

I. Las especies de oxígeno reactivas.

El dioxígeno en su estado basal tiene dos electrones sin aparear que tienen el mismo sentido de giro, lo cual limita su reactividad con otros compuestos. Existen varias formas en que se puede aumentar la reactividad del dioxígeno y en cada caso se genera una especie diferente. Estas especies pueden formarse *in vivo* durante la respiración aeróbica, por drogas redox-activas o por la reacción de Fenton (Kullik y Storz, 1994). Las EOR son capaces de generar formas más reactivas de oxígeno, o de reaccionar directamente con diversos compuestos celulares tales como proteínas, ácidos nucleicos, lípidos y azúcares, causando modificaciones nocivas para las células.

I. Singulete ($^1\text{O}_2$).

El dioxígeno en singulete se forma cuando uno de los electrones sin aparear del dioxígeno absorbe energía y cambia el sentido de su giro. Esto libera la restricción impuesta para captar electrones con giro opuesto al de los electrones desapareados del dioxígeno. El dioxígeno en singulete se puede generar *in vivo* cuando se iluminan las células en presencia de oxígeno. Esto es debido a la captación de la energía luminosa por los pigmentos celulares tales como la clorofila y las flavinas (Halliwell y Gutteridge, 1984).

2. Superóxido (O_2^-).

Se forma cuando el oxígeno en estado basal se reduce al aceptar un electrón. El superóxido es poco reactivo, aunque su forma protonada es más activa (HO_2^-), y puede iniciar, por ejemplo, la peroxidación de lípidos. De hecho, el mayor peligro del superóxido radica en que se pueden formar especies más reactivas a partir de él. El superóxido se genera *in vivo* durante la respuesta de los fagocitos (neutrófilos, monocitos, macrófagos y eosinófilos) al contacto con partículas extrañas (Halliwell y Gutteridge, 1984). En presencia del oxígeno, algunos compuestos como el gliceraldehído se oxidan generando superóxido.

La cadena de transporte de electrones en la mitocondria es la principal fuente biológica generadora de superóxido. Los sitios principales en los que puede haber un escape de electrones son el complejo NADH-coenzima Q reductasa y en las formas reducidas de la propia coenzima Q. Estos electrones son capturados por el oxígeno formando superóxido. En el retículo endoplásmico de muchos tejidos animales y de plantas se encuentran varios citocromos denominados colectivamente sistema P-450 que se encargan de oxidar una gran cantidad de compuestos tóxicos o xenobióticos utilizando para ello al oxígeno. Entre los compuestos que se oxidan por este sistema se encuentran algunos insecticidas y drogas fenólicas. Durante la acción del sistema P-450, también se pierden electrones que reducen al oxígeno formando superóxido.

3. Peróxido de hidrógeno (H_2O_2).

Cuando el superóxido acepta un electrón, se forma el radical peróxido $O_2^{\cdot-}$ que en condiciones fisiológicas forma inmediatamente peróxido de hidrógeno (H_2O_2). En solución acuosa, el superóxido puede dismutar y generar H_2O_2 y O_2 (Halliwell y Gutteridge, 1989). El peróxido de hidrógeno se forma como producto de la reacción de varias oxidasas (urato oxidasa, glicolato oxidasa) y también se genera por acción de la superóxido dismutasa. El H_2O_2 puede difundir fácilmente y su toxicidad se debe a la formación del radical hidroxilo.

4. Radical hidroxilo (OH^\cdot).

El H_2O_2 puede tener una reacción de fisión homolítica y formar dos radicales hidroxilo. La homólisis puede darse por calor o por la radiación ionizante. Este radical también se produce

por medio de la reacción de Fenton cuando el H_2O_2 se reduce al aceptar un electrón de un metal de transición (cobre, hierro). El radical hidroxilo es el más reactivo y reacciona rápidamente con azúcares, aminoácidos, fosfolípidos, bases del DNA y ácidos orgánicos (Halliwell y Gutteridge, 1989).

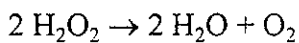
II. Mecanismos de defensa contra las especies de oxígeno reactivas.

1. Mecanismos Enzimáticos.

1.1. Catalasas.

Las catalasas y las peroxidasas tienen como principal función desechar el H_2O_2 .

La reacción que lleva a cabo la catalasa es la siguiente:



La mayoría de los organismos aerobios contienen catalasas, aunque hay algunas excepciones, como es el caso de *Euglena* y *Mycoplasma pneumoniae*, entre otros (Halliwell y Gutteridge, 1989). Generalmente, estas enzimas son homotetrámeros. Cada una de las subunidades contiene un grupo hemo que forma parte del sitio activo. Algunas contienen además un sitio para NADPH (Halliwell y Gutteridge, 1989).

1.2. Peroxidasas.

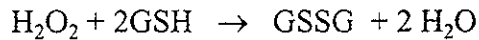
La reacción que catalizan las peroxidasas es:



donde SH_2 representa a un sustrato reducido.

Las peroxidasas se encuentran distribuidas ampliamente, algunas de ellas son específicas en cuanto al sustrato que utilizan, pero también existen peroxidasas no específicas que aceptan una gran variedad de moléculas como sustratos. En esta última clase se encuentran la lactoperoxidasa (en leche y saliva), mieloperoxidasa (células fagocíticas) y peroxidasa de la tiroides. La más conocida y estudiada de este grupo es, sin embargo, la peroxidasa de raíz fuerte. Esta enzima puede oxidar sustratos como guaiacol, pirogallol, el ion CN^- , NADH, compuestos tiol, fenoles y ácido indolacético (Halliwell y Gutteridge, 1989). Dentro de las peroxidasas específicas, la más conocida es la glutatión peroxidasa, que se encuentra en

animales, en algunas algas y hongos, pero está ausente en plantas. Esta enzima es un tetrámero que contiene un átomo de selenio en cada monómero y la reacción que lleva a cabo es:



donde el glutati6n (GSH) es oxidado a GSSG. Normalmente, en la c6lula la proporci6n de GSH/GSSG se mantiene alta gracias a la presencia de la glutati6n reductasa, que es la encargada de reducir el GSSG a GSH:



El NADPH de la c6lula se obtiene principalmente del ciclo de las pentosas. Otras peroxidasas espec6ficas conocidas son la citocromo *c* peroxidasa, la NADH peroxidasa y la ascorbato peroxidasa. La primera se encuentra en la membrana mitocondrial de levaduras y en algunas bacterias. Esta enzima reacciona r6pidamente con el per6xido de hidr6geno formando un complejo que posteriormente reacciona con el citocromo *c*, reduci6ndolo. La NADH peroxidasa se encuentra en algunas bacterias (*Lactobacillus casei*, *Streptococcus faecalis*) y utiliza el NADH para reducir el H₂O₂. El NADH que requiere se obtiene de rutas metab6licas como la gluc6lisis. La ascorbato peroxidasa se encuentra en los cloroplastos de plantas superiores y en el alga verde *Euglena*. La ascorbato peroxidasa es sumamente importante dado que los sistemas mencionados carecen de catalasa, glutati6n peroxidasa y peroxidasas no espec6ficas (Halliwell y Gutteridge, 1989).

1.3. Catalasas-peroxidasas.

Son hidropoxidasas que se caracterizan, como su nombre lo indica, por presentar actividad tanto de catalasa como de peroxidasa. La mayor6a de estas enzimas se han encontrado en bacterias y est6n formadas por tetr6meros (Claiborne y Fridovich, 1979; Hochman y Goldberg, 1991; Morris, *et al.*, 1992; Brown-Peterson y Salin, 1993) aunque tambi6n se han visto algunas dim6ricas (Loprasert *et al.*, 1988) e inclusive monom6ricas en arqueobacterias. (Cendrin *et al.*, 1994). En la Tabla 1 pueden verse algunas caracter6sticas y diferencias entre las catalasas y las catalasas-peroxidasas. Hasta ahora, solamente se han encontrado dos catalasas-peroxidasas en eucari6tos, ambas en hongos. Una de ellas es de *Septoria tritici* (Levy *et al.*, 1992) y la otra de *Penicillium simplicissimum* (Fraaije *et al.*, 1996). La de este 6ltimo es un

homodímero cuya actividad enzimática se inhibe por cianuro y azida pero no por 3-amino-triazol.

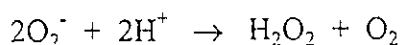
Tabla 1. Diferencias entre catalasas y catalasas-peroxidasas (Goldberg y Hochman, 1989; Fraaije, *et al.*, 1996).

CATALASA	CATALASA-PEROXIDASA
Actividad máxima en un rango de pH amplio (5-10.5)	Actividad de catalasa y peroxidasa Actividad a un pH óptimo (6-6.5)
Resistentes al tratamiento con etanol/cloroformo	Se inactiva por tratamiento con etanol/cloroformo
Inhibición por 3-amino-triazol	No se inhiben por 3-amino-triazol
	Más termosensibles que las catalasas
	Más sensibles al H ₂ O ₂

1.4. Superóxido dismutasas.

Las superóxido dismutasas generalmente contienen cobre-zinc (Cu-ZnSOD) o manganeso (MnSOD), aunque hay algunas que tienen hierro. La CuZnSOD se encuentra prácticamente en todos los organismos eucariotas. La MnSOD se encuentra tanto en eucariotas como en procariotas y la FeSOD en algunas bacterias, algas y algunas plantas superiores pero no se ha encontrado en animales (Halliwell y Gutteridge, 1989). *E. coli* tiene tanto FeSOD como MnSOD, pero hay otras bacterias que tienen solamente una de las dos superóxido dismutasas. *Propionibacterium shermanii* normalmente contiene FeSOD pero es capaz de producir MnSOD si se crece en un medio deficiente en hierro. *Streptococcus mutans* parece utilizar la misma apoenzima para producir FeSOD o MnSOD dependiendo del metal disponible en el medio de cultivo (Halliwell y Guttridge, 1989).

La reacción que catalizan es:



En la Tabla 2 se pueden observar algunas características de las diferentes superóxido dismutasas.

Tabla 2. Características de las Superóxido Dismutasas (Halliwell y Gutteridge, 1989).

CuZnSOD	MnSOD	FeSOD
Homodímero	Tetrámero, aunque las de bacterias son dímeros.	Generalmente, dímeros.
Tiene un ion de cobre y uno de zinc en el sitio activo de cada monómero.	Tienen un ion manganeso en el sitio activo.	Contienen uno o dos iones de fierro por molécula de enzima.
Es citosólica; se inhibe por cianuro	Se localiza en la matriz mitocondrial; se inhibe por cianuro	

2. Mecanismos no enzimáticos de defensa contra las EOR.

En la Tabla 3 se muestran los mecanismos no enzimáticos que participan en la protección contra las especies de oxígeno reactivas.

2.1. Compuestos liposolubles.

La vitamina E (tocoferol) es el antioxidante distribuido más ampliamente en la naturaleza y se encuentra tanto en plantas como en animales. Su papel fundamental es la protección contra la peroxidación de lípidos de las membranas a través de su reacción con radicales peroxilo ($\text{ROO}\cdot$) y alcoxilo ($\text{RO}\cdot$) (Yu, 1994). La vitamina E reacciona y desactiva el oxígeno en singulete.

Los carotenos (vitamina A) tienen en su estructura dobles enlaces conjugados que les permiten atrapar y desactivar al oxígeno en singulete, protegiendo a los lípidos de la peroxidación (Yu, 1994).

La bilirrubina desactiva el oxígeno en singulete y reacciona con el radical peroxilo ($\text{ROO}\cdot$) y es un antioxidante que rompe reacciones en cadena (Yu, 1994).

2.2. Compuestos hidrosolubles.

2.2.1 Acido ascórbico (Vitamina C)

Además de funcionar como cofactor para varias enzimas, el ácido ascórbico (vitamina C) sirve como antioxidante. Reacciona directamente con el superóxido y con el radical hidroxilo, así como también con varios hidroperóxidos lipídicos (Yu, 1994). Cuando el ascorbato se oxida, forma semideshidroascorbato, el cual es poco reactivo y generalmente forma ascorbato y deshidroascorbato mediante una reacción de dismutación. El ascorbato parece inhibir algunos

Tabla 3. Mecanismos no enzimáticos de protección contra EOR (Yu, 1994).

Categoría	Funciones
I. Compuestos liposolubles	
1. Vitamina E	Desactiva el 1O_2 . Interrumpe las reacciones en cadena de la peroxidación de lípidos.
2. β -carotenos	Desactiva el 1O_2 .
3. Bilirubina	Desactiva el 1O_2 y reacciona poco con O_2^- .
II. Compuestos hidrosolubles	
1. Vitamina C	Reacciona OH^\cdot y poco con O_2^-
2. Acido úrico	Reacciona principalmente OH^\cdot . Previene la oxidación de la vitamina C. Une metales de transición.
3. Glutación	Sustrato de GSH-peroxidasa; reacciona con OH^\cdot y radicales orgánicos libres.
III. Proteínas que unen metales de transición	
1. Transferrina y ferritina	Unen fierro.
2. Ceruloplasmina	Une cobre; oxida Fe^{2+} a Fe^{3+} .
3. Metalotioneínas	Unen Zn^{+2} , Cu^+ , Cd^{2+} y Hg^{2+} .

agentes carcinogénicos probablemente mediante su reducción a formas inactivas (Halliwell y Gutteridge, 1989). El ascorbato puede reaccionar con el superóxido o con su forma protonada (HO_2^-) pero reacciona más rápidamente con el radical hidroxilo. Como las formas oxidadas del ascorbato no son totalmente inocuas, algunos organismos (plantas y animales) cuentan con la enzima deshidroascorbato reductasa, que se encarga de regenerar la forma reducida del ascorbato mediante la reacción:



El ascorbato puede funcionar también como prooxidante al reducir el Fe(III) a Fe(II) y, si hay H_2O_2 presente, se puede formar el radical hidroxilo mediante la reacción de Fenton (Halliwell y Gutteridge, 1989; Yu, 1994). El efecto de estas reacciones dependerá de la concentración de ascorbato, ya que como se mencionó anteriormente, reacciona con el radical hidroxilo.

2.2.2. Glutación.

Además de ser sustrato de la glutación peroxidasa, este compuesto reacciona con el hidroxilo y con el oxígeno en singulete y participa como cofactor de diferentes enzimas. Su versatilidad se debe a que puede funcionar como nucleófilo y como agente reductor. Cuando algunas proteínas se exponen a una alta concentración de oxígeno o agentes oxidantes, se oxidan los grupos $-\text{SH}$. El glutación es capaz de regenerar los sulfhidrilos. Otro papel importante del glutación consiste en unirse, por medio de la acción de la glutación-S-transferasa, a compuestos xenobióticos tales como los herbicidas. El producto así obtenido forma finalmente ácidos mercaptúricos que se eliminan del organismo (Halliwell y Gutteridge, 1989).

2.2.3. Acido úrico.

Funciona como un agente antioxidante y es un poderoso atrapador de radicales hidroxilo. De hecho, en condiciones de tensión oxidativa se acumula la alantoína, que es el producto oxidado del ácido úrico (Halliwell y Gutteridge, 1989). También parece evitar la oxidación de la vitamina C, probablemente debido a que es capaz de formar complejos con metales de transición como el fierro y el cobre (Davies *et al.*, 1986).

2.3. Proteínas que regulan la disponibilidad de metales de transición: transferrina, ceruloplasmina y metalotioneínas.

Como ya se mencionó, la presencia de metales de transición libres es peligrosa porque pueden reaccionar con el H_2O_2 o con el O_2^- , formando compuestos más reactivos y por lo tanto nocivos. La transferrina es una glicoproteína que se encuentra en el plasma siendo su función unir fierro y transportarlo. A pH ácido se favorece la liberación del fierro de la transferrina y puede entonces unirse a otras proteínas como la ferritina. Esta última es capaz de unir hasta 4,500 átomos de fierro (Fe^{+3}) por molécula (Yu, 1994). Como los iones de fierro están atrapados por estas proteínas, la concentración libre de dicho metal es muy baja. Sin embargo, siempre es posible la presencia de algún ion de fierro libre y por lo tanto, la eliminación del H_2O_2 y el O_2^- a través de las catalasas y las superóxido dismutasas es muy importante (Halliwell y Gutteridge, 1989).

La ceruloplasmina es otra proteína a la que se unen entre 6 y 7 iones de cobre por molécula evitando, por lo tanto, que este metal se encuentre libre. Esta proteína tiene propiedades antioxidantes, ya que funciona como atrapadora de O_2^- , aunque también es capaz de oxidar el Fe (II) a Fe(III), disminuyendo la probabilidad de formar radicales hidroxilo a partir del Fe(II) y del H_2O_2 (Halliwell y Gutteridge, 1989; Yu, 1994).

Las metalotioneínas son proteínas pequeñas que se localizan en el citosol de las células eucariotas. Son ricas en grupos tioles y pueden a través de éstos unir iones de metales como Zn^{2+} , Cu^+ , Cd^{2+} y Hg^{2+} . Los mismos grupos tioles permiten funcionar como atrapadores de singulete y de hidroxilo. Al secuestrar cobre evitan que esté disponible para la formación de radicales (Halliwell y Gutteridge, 1989).

III. Factores transcripcionales que participan en la respuesta antioxidante en microorganismos.

Uno de los pasos más importantes en la respuesta antioxidante es que las células puedan detectar cambios en los niveles de especies de oxígeno reactivas y sean capaces de transducir la señal a los genes correspondientes. Se conocen varios factores transcripcionales regulados por tensión oxidativa, en algunos casos se sugiere la señal específica que los activa. También se han detectado algunos genes que se inducen en respuesta a dichas señales (revisiones de Kullik y

Storz, 1994; Jamieson y Storz, 1997). Hasta el momento se han descrito dos casos en donde el H_2O_2 funciona como segundo mensajero. Uno de ellos es en la respuesta hipersensible en plantas y el otro en la transducción de señales en células del músculo liso de ratas (Levine *et al.*, 1994; Sundaresan *et al.*, 1995). Algunos de los factores de transcripción regulados por la tensión oxidativa se mencionan a continuación.

1. Bacterias.

1.1. OxyR.

El factor transcripcional OxyR se ha descrito en *E. coli* y en *Salmonella typhimurium* y es responsable de la expresión de algunas enzimas antioxidantes durante el crecimiento pero no durante la fase estacionaria. OxyR pesa 34 kDa, pertenece a la familia LysR de factores transcripcionales y se autorregula negativamente (Tartaglia *et al.*, 1989; Christman *et al.*, 1989). Este factor se une al DNA como un tetrámero por medio de una estructura de hélice vuelta hélice presente en su región N-terminal (Toledano *et al.*, 1994). Cuando está en su forma reducida, un dímero se une a dos secuencias de reconocimiento y el otro dímero se une a otras secuencias de reconocimiento separadas por una vuelta de hélice. En presencia del H_2O_2 , OxyR se oxida y cada una de las cuatro subunidades se une a una secuencia de reconocimiento del DNA presente en los promotores de los genes que regula positivamente (Christman *et al.*, 1985; Storz *et al.*, 1990; Toledano *et al.*, 1994). Este factor transcripcional es, por lo tanto, el sensor y el encargado de transducir la señal. Se ha propuesto que el sitio sensible a la oxidación de OxyR es un residuo de cisteína localizado en la posición 199 (Kullik *et al.*, 1995) y más recientemente se comprobó que en presencia del H_2O_2 OxyR se activa debido a la formación de un puente disulfuro intramolecular entre sus cisteínas 199 y 208 (Zheng *et al.*, 1998). OxyR regula por lo menos nueve genes diferentes en respuesta al peróxido. Entre ellos se encuentra la catalasa-peroxidasa HPI (*katG*), la glutatión reductasa (*gorA*), la glutaredoxina (*grxA*) que participa en la reducción y por lo tanto inactivación de OxyR, una proteína de unión al DNA que probablemente protege a éste del daño oxidativo (*dps*) y finalmente OxyS, genera un RNA pequeño que no se traduce (Christman *et al.*, 1989; Zheng *et al.*, 1998). Recientemente se determinó que el RNA de *oxyS* funciona como un regulador que integra la adaptación al

tratamiento con peróxido de hidrógeno con otras respuestas celulares ante la tensión y además ayuda a proteger a las células contra el daño oxidativo. *oxyS* activa y reprime la expresión de varios genes de *E. coli* y protege contra las mutaciones espontáneas o inducidas (Altuvia *et al.*, 1997).

1.2 RpoS.

En *E. coli*, el gen *rpoS* (*katF*) codifica para la subunidad σ^S (también llamada σ^{38}) que da especificidad a la RNA polimerasa. Es importante para la regulación de la expresión de por lo menos 30 genes, algunos de los cuales participan en la osmoprotección (*osmB*, *osmE*, *otsAB*, *treA*), en la morfología celular (*bolA*) y en la respuesta general a la tensión metabólica (*katE*, *xth*, *dps*, *appA*, *mccC*) (Siegele y Kolter, 1992; Hengge-Aronis, 1993). σ^S responde a la limitación de nutrientes a través de la guanosina tetrafosfato (ppGpp; Loewen y Hengge-Aronis, 1994) y de la acil homoserina lactona (Huisman y Kolter, 1994), así como también responde a otras señales como el AMPc (Loewen y Hengge-Aronis, 1994) y la UDP-glucosa (Böhringer *et al.* 1995). RpoS y OxyR regulan varios genes en común, entre ellos, *katG*, *dps* y *gorA*. Sin embargo, RpoS también regula a *katE* (HPII). Se ha propuesto que la diferencia entre estos reguladores es que OxyR regula la respuesta antioxidante durante la fase exponencial y RpoS lo hace durante la fase estacionaria (Jamieson y Storz, 1997).

1.3. SoxRS.

Mientras que OxyR se activa en respuesta al H_2O_2 , el regulón *soxRS* es el responsable de la respuesta al superóxido, aunque también se ha visto que responde al ácido nítrico (Nunoshiba *et al.*, 1993). Los factores transcripcionales SoxR y SoxS se transcriben en sentido divergente y el promotor de *soxR* se encuentra dentro del gen *soxS* (Amábile-Cuevas y Demple, 1991; Wu y Weiss, 1991). SoxR es una proteína constitutiva de 17 kDa que es homóloga a la familia MerR de activadores transcripcionales (Amábile-Cuevas y Demple, 1991). MerR une Hg^{2+} e induce la expresión del operón *mer*, involucrado en el metabolismo de este metal tóxico. SoxR funciona como un homodímero y la forma activa es la oxidada, aunque no se ha podido demostrar que la forma inactiva de SoxR sea la reducida (Hidalgo y Demple, 1994; Wu *et al.*, 1995). Cada monómero posee un centro [2Fe-2S] que es esencial para que SoxR detecte la tensión por O_2^- y

funcione como un activador transcripcional, pero no lo es para mantener la estructura del dímero (Hidalgo y Demple, 1994). La hipótesis es que SoxR *in vivo* normalmente está reducido $[2\text{Fe}-2\text{S}]^+$ y en presencia del O_2^- se oxida a $[2\text{Fe}-2\text{S}]^{2+}$, activándose (Wu *et al.*, 1995). SoxR contiene un motivo de unión al DNA en cada uno de sus monómeros del tipo hélice vuelta hélice, que se une a un palíndromo de 18 nucleótidos en el promotor de *soxS* induciendo su expresión (Wu *et al.* 1995; Hidalgo y Demple, 1994). SoxS es una proteína de 13 kDa homóloga a la familia de activadores AraC de procariotes y es el activador de los genes pertenecientes al regulón *soxRS*. Entre los genes regulados por SoxS se encuentran: *sodA* (Mn-SOD), *nfo* (que es la endonucleasa IV, la cual interviene en la reparación del DNA), *zwf* (glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa), *fumC* y *acnA* (los cuales codifican, respectivamente, para una fumarasa y una aconitasa resistentes al superóxido y al calor) y *fpr* (NADPH:ferredoxina:óxido reductasa) (Greenberg *et al.*, 1990; Tsaneva y Weiss, 1990; Liochev y Fridovich, 1992; Gruer y Guest, 1994; Liochev *et al.*, 1994).

1.4. MarA y Rob.

También en *E. coli* se ha estudiado el factor MarA, el cual se induce en presencia de los compuestos fenólicos como el salicilato y la tetraciclina y, en general, por compuestos que generan superóxido. El operón donde se encuentra se denominó *marRAB* y fue inicialmente reconocido porque diferentes mutantes en estos genes resultaron resistentes a algunos antibióticos y/o a compuestos generadores de superóxido, como la menadiona. MarR es el represor del operón y se ha visto que *in vitro*, el salicilato se le une, reduciendo su afinidad de unión al DNA y, por lo tanto, desreprimiendo la expresión de MarA, que es el activador del operón (Cohen *et al.*, 1993; Martin y Rosner, 1995). MarA es una proteína de 127 residuos que es homóloga a la familia XylS-AraC de reguladores transcripcionales, a la cual pertenece también SoxS. Los genes relacionados con la tensión oxidativa, que se activan tanto por el sistema *marRAB* como por *soxRS*, incluyen a *sodA*, *zwf* y *fumC* (Greenberg *et al.*, 1991; Liochev y Fridovich, 1992; Ariza *et al.*, 1994; Li y Demple, 1994).

Rob es una proteína relacionada con SoxS y con MarA. Entre ellas existe un porcentaje de identidad de alrededor del 50%. Estos tres factores transcripcionales contienen motivos de hélice vuelta hélice en posiciones similares que parecen participar en la unión al DNA. La homología de RobA con SoxS y MarA está restringida al extremo N-terminal. El C-terminal no

está relacionado con la familia XylS-AraC (Ariza *et al.*, 1995). Para activar el gen *zwf*, estos factores se unen a una secuencia de 21 pb denominada soxbox-marbox-robbox. Rob funciona como monómero, al menos para regular a los genes *zwf* y *fumC* (Jair *et al.*, 1996). Al sobreproducir Rob se presenta una mayor resistencia a varios antibióticos (ácido nalidíxico, cloramfenicol, tetraciclina y puromicina) y también a la droga metasulfato de fenazina (Ariza *et al.*, 1995) aunque las mutantes sin Rob no tienen un fenotipo evidente (Jair *et al.*, 1996). A pesar de que SoxS, MarA y Rob regulan varios genes en común, presentan un control diferencial. Los efectos de Rob son más débiles que los de SoxS, tanto a nivel de la resistencia a antibióticos como en la activación de genes. En contraste con SoxS y MarA, que se inducen específicamente en respuesta a algunos estímulos ambientales y que ejercen una clara respuesta de defensa, Rob es constitutiva. Se encuentra presente en aproximadamente 5000 moléculas por célula durante el crecimiento y, por lo tanto, su actividad tal vez se regule a nivel post-traducciona l o por la unión de algún cofactor. No se sabe cuál es la señal ni cómo se activa Rob, pero se han hecho experimentos de retardamiento en geles que demuestran que se une al promotor de algunos genes inducibles por tensión oxidativa (Ariza *et al.*, 1995) activando la transcripción *in vitro* de *zwf*, *fpr*, *fumC*, *micF*, *nfo* y *sodA* (Jair *et al.*, 1996).

1.5. Otros reguladores.

El gen *sodA* (Mn-SOD) de *Escherichia coli* está regulado negativamente por IHF, ArcA, Fnr y Fur (Compan y Touati, 1993). IHF es una proteína básica, pequeña, que funciona como un heterodímero de las proteínas codificadas por los genes *himA* y *himD*. En un principio se detectó como un factor necesario para la integración del fago lambda en *E. coli*, aunque actualmente se sabe que también participa en el control de la expresión genética. IHF no afecta directamente la transcripción pero es capaz de unirse al DNA formando un dobl e z en éste lo cual afecta la función de algunos reguladores. IHF está presente durante el crecimiento exponencial, pero aumenta considerablemente al entrar en la fase estacionaria (Aviv *et al.*, 1994). En el promotor de *sodA*, se han encontrado varios sitios potenciales de unión de IHF y aunque no se ha demostrado su funcionalidad, se sabe que IHF fortalece la represión por Fur en condiciones aeróbicas y, en ausencia de Fur, fortalece la represión anaeróbica por ArcA (Compan y Touati, 1993).

ArcB/ArcA definen un sistema que controla la respuesta aeróbica y está formado por dos componentes, donde ArcA es una proteína regulatoria citoplásmica y ArcB es una cinasa transmembranal. No se conoce una secuencia consenso a la que se una ArcA, ni tampoco la naturaleza de la señal que activa este sistema. La señal no es la ausencia de oxígeno *per se*; podría ser algún metabolito que se acumule durante la deficiencia de éste y, de hecho, se ha visto que el piruvato, D-lactato, acetato y NADH activan a ArcB *in vitro* (Iuchi 1993). ArcB es una proteína grande, de 778 residuos, encargada de percibir las condiciones anaerobias. Se sintetiza también bajo condiciones aeróbicas, lo cual permite a la célula responder inmediatamente al estímulo respiratorio bajo cualquier condición de crecimiento. ArcB responde a las condiciones anóxicas autofosforilándose en una histidina esencial (His292). El dominio transmisor se fosforila en el aspártico 576 y luego transfiere el fosfato al residuo de histidina 717. Posteriormente, fosforila a ArcA, activándola. Este modelo se propuso basándose en resultados obtenidos *in vitro* (Iuchi y Lin, 1992; Georgellis *et al.*, 1997).

Fnr es un factor transcripcional que tiene fierro como cofactor y funciona en condiciones anaeróbicas regulando la transcripción de al menos 31 genes. Estructuralmente, Fnr se parece a CAP (receptor de AMPc). Ambos tienen motivos de hélice vuelta hélice en su dominio de unión al DNA. Fnr se diferencia de CAP en que tiene tres residuos de cisteína cerca de su extremo N-terminal. Estos, junto con la cisteína 122 parecen conformar un centro [4Fe-4S] (Lazazzera *et al.*, 1996). Fnr responde a la ausencia de oxígeno, activando la expresión de varios genes, incluyendo algunos que codifican para las deshidrogenasas y reductasas que participan en la respiración anaeróbica, como por ejemplo, la fumarato reductasa y la nitrato reductasa (Spiro y Guest, 1991; Gunsalus, 1992). También reprime varios genes del metabolismo aerobio, como por ejemplo, la NADH deshidrogenasa II, la citocromo oxidasa y al propio Fnr (autoregulación). Fnr se une a una secuencia de 20 pares de bases (pb) con una secuencia invertida repetida de 5 pb. Lazazzera *et al.* (1996) proponen que la formación del centro [4Fe-4S] en presencia de baja tensión de oxígeno promueve la dimerización y la unión al DNA. La exposición al oxígeno destruye este centro y, por lo tanto, Fnr se despega del DNA. Melville y Gunsalus (1996) proponen, que en condiciones de bajo oxígeno, Fnr se une al DNA como monómero y, al unirse la segunda molécula de Fnr en un sitio vecino del DNA, se forma el dímero estable. En

presencia de oxígeno, la unión al DNA se reduce debido a un estado conformacional inestable de la proteína.

Fur es una proteína rica en histidinas, de 148 residuos, con un peso de 17 kDa (Stojilkovic y Hantke, 1995). Fur es el regulador de los niveles de hierro intracelular y actúa como un regulador negativo de las proteínas que participan en el transporte de este metal en *E. coli*. También funciona como activador de varios genes, entre ellos *acnA* (aconitasa A) y *fumA*, que es una fumarasa que se expresa sólo en aerobiosis (Hantke, 1982; Gruer y Guest, 1994). Fur se une a una secuencia de 19 pb y, en su forma activa, es un dímero o un multímero. Su extremo N-terminal es el que participa en la unión al DNA y el C-terminal en la unión al hierro (Stojilkovic y Hantke, 1995).

2. Hongos.

En *Saccharomces cerevisiae* y *Schizosaccharomyces pombe* hay dos reacciones adaptativas a la tensión oxidativa, donde una responde al H₂O₂ y otra a compuestos como la menadiona (generador de superóxido). Estas respuestas están moduladas por diferentes reguladores, aunque no se han encontrado homólogos de SoxR, SoxS ni OxyR. Es importante destacar, además, que esta respuesta se traslapa con el efecto producido por otros tipos de tensión como son la limitación de nutrimentos, el choque de calor, el choque osmótico y la resistencia a metales pesados como el cadmio (Jamieson y Storz, 1997).

2.1. yAP-1 y yAP-2.

El factor transcripcional yAP-1 es importante en la respuesta a la tensión oxidativa en *Saccharomyces cerevisiae*. yAP-1 pertenece a la familia de proteínas tipo bZIP. El factor yAP-1 se identificó y clonó debido a su unión específica a los sitios AP-1, particularmente a un promotor que contiene un sitio AP-1 del virus SV40 (Harshman *et al.*, 1988; Moye-Rowley *et al.*, 1989). Independientemente, el gen yAP-1 se aisló porque, cuando está en un alto número de copias, confiere resistencia a varias drogas (Schnell *et al.*, 1992; Grey y Brendel, 1994). Recientemente, Fernandes *et al.* (1997) utilizaron una secuencia de aminoácidos conservados en la región básica de varias proteínas tipo bZIP de diferentes organismos para identificar a las proteínas de esta clase en *S. cerevisiae*. Para ello, compararon esta secuencia con la del genoma de dicha levadura. Encontraron 14 proteínas, de las cuales seis son muy parecidas a yAP-1 y

yAP-2 y por lo tanto, se denominaron yAP-3, 4, 5, 6, 7 y 8. Las proteínas yAP forman una familia de tipo bZIP exclusivas de hongos. Se caracterizan porque contienen cuatro residuos en su región básica que raramente o nunca se observan en otras proteínas bZIP. Dentro de esta familia también se encuentran: *meuB*, que codifica para una proteína involucrada en la represión por nitrógeno de *A. nidulans*; *Pap1*, que participa en la resistencia a drogas en *Schizosaccharomyces pombe* y *Cap1*, que participa en la resistencia a fluconazol en *Candida albicans*. Fernandes *et al.* (1997) también definieron que el sitio óptimo de unión de yAP es TTACTAA, el cual difiere en las posiciones +2 y -2 del sitio AP-1 (TGACTCA).

Las mutantes deficientes en yAP-1 son sensibles al H₂O₂ y a compuestos que generan superóxido. En estas mutantes, además, se detectaron niveles más bajos de algunas enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa, la glutatión reductasa y la glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa (Schnell *et al.*, 1992). Hasta ahora, se ha demostrado que yAP-1 afecta directamente la transcripción de por lo menos seis genes: *GSH1*, que codifica para la γ -glutamilcisteína sintetasa (Wu y Moye-Rowley, 1994); *TRX2*, que codifica para la tiorredoxina (Kuge y Jones, 1994); *YCF1*, que codifica para un transportador que une ATP y que es esencial en la resistencia al cadmio (Wemmie *et al.*, 1994); *GLR1*, que codifica para la glutatión reductasa (Grant *et al.*, 1996) y *ATR1*, que codifica para una proteína integral de membrana (Coleman *et al.*, 1997). En el caso de *GLR1*, yAP-1 participa en la inducción tanto en la respuesta a la tensión oxidativa como durante la fase estacionaria (Grant *et al.* 1996).

La proteína yAP-1 tiene cuatro dominios: la región bZIP (cerca del N-terminal), dos dominios que participan en la activación transcripcional y un dominio rico en cisteínas llamado CRD localizado cerca del extremo C-terminal (Toda *et al.*, 1991; Wemmie *et al.*, 1994). Recientemente, se determinó que el dominio CRD contiene tres cisteínas esenciales y participa como un regulador negativo de yAP-1, ya que al remover dicho dominio, yAP-1 se vuelve constitutiva y se localiza siempre en el núcleo (Kuge *et al.*, 1997). Este dominio es importante porque permite que, bajo condiciones de tensión oxidativa, la proteína yAP-1, normalmente localizada en el citoplasma, se transporte hacia el núcleo. Kuge *et al.* (1997) proponen que probablemente la oxidación de los grupos -SH de los residuos de cisteína alteren el comportamiento de la proteína yAP-1, ya sea induciendo un cambio conformacional o

disminuyendo la hidrofobicidad de la region CRD. Bajo estas condiciones, yAP-1 podría transportarse al núcleo.

A pesar de que se ha encontrado una clara relación entre yAP-1 y la sensibilidad a algunos oxidantes, resulta también evidente que, las mutantes afectadas en dicho gen, siguen presentando una respuesta adaptativa a la presencia del peróxido de hidrógeno. Por lo tanto, deben existir otros factores responsables de esta respuesta (Stephen *et al.*, 1995; Jamieson y Storz, 1997).

El gen *YAP2/CAD1* también pertenece a la misma familia de factores transcripcionales y se aisló porque su sobreexpresión confiere resistencia al cadmio. Por otro lado, las mutantes en este gen son hipersensibles a oxidantes (Bossier *et al.*, 1993; Wu *et al.*, 1993; Hirata *et al.*, 1994). Hasta la fecha, no se ha encontrado qué genes regula Yap2.

2.2. GCN4.

GCN4 es un factor transcripcional de *S. cerevisiae* y, al igual que Jun y Fos de mamíferos, pertenece a la familia de proteínas tipo bZip. Estos tres factores se unen a la misma secuencia del DNA conocida como sitios AP-1 (TGACTCA) y son funcionalmente intercambiables (Struhl, 1988; Oliveiro *et al.*, 1992). GCN4 funciona como activador transcripcional de por lo menos 40 genes de enzimas involucradas en la biosíntesis de aminoácidos (Hinnebusch, 1994). Por otra parte, GCN4 también participa en la respuesta protectora contra la luz ultravioleta la cual es muy similar en mamíferos y en *S. cerevisiae* (Engelberg *et al.*, 1994). El significado funcional de esta respuesta aún no está claro, dado que no involucra la inducción de genes que participan en la reparación del DNA. Tanto en mamíferos como en levadura, la irradiación con luz UV estimula la transducción de señales dada por Ras. En las células de mamíferos se requiere de los factores transcripcionales AP-1 y NFκB mientras que en levadura se requiere de GCN4. Otra función interesante de GCN4 es que, al igual que yAP-1, participa en la resistencia a compuestos como el 3-amino triazol (3-ATZ) y el 4-NQO (Coleman *et al.*, 1997). El 3-ATZ es un análogo de histidina y uno de sus efectos es producir una limitación de dicho aminoácido; el 4-NQO es un agente que daña al DNA. Para poder proteger a la célula contra estos compuestos, se requiere de un gen *ATR1* intacto el cual codifica para una proteína integral de la membrana que aparentemente participa en la

eliminación de los compuestos tóxicos mencionados anteriormente. ATR1 está regulado por yAP-1 y por GCN4 (Coleman *et al.*, 1997). De acuerdo con estos datos, GCN4 puede tener un papel protector contra la tensión (luz UV, compuestos tóxicos) que es independiente de su función como regulador de la biosíntesis de aminoácidos (Engelberg *et al.*, 1994; Coleman *et al.*, 1997).

2.3. Ace1 y Mac1.

Estos factores transcripcionales tienen similitud considerable en el sitio de unión al DNA (extremo N-terminal) y en un sitio rico en cisteínas que une cobre. Ace1 se encarga de la homeostasis del cobre y entre los genes que regula se encuentra *CUPI*, el cual codifica para una metalotioneína. *CUPI* también se induce en respuesta a compuestos que generan superóxido, pero esta respuesta depende del HSF (factor de choque de calor), que es otro factor transcripcional que se fosforila diferencialmente en respuesta al calor y a la tensión oxidativa. La fosforilación en respuesta al calor es transitoria, mientras que, en respuesta a la tensión oxidativa se sostiene aproximadamente 2 h (Liu y Thiele, 1996). El gen *SOD1* (CuZnSOD) se induce por cobre y tiene en su promotor un sitio de unión de Ace1. Se ha demostrado, por medio de experimentos de huella genética, que Ace1 se une a dicho sitio (Gralla *et al.*, 1991).

Mac1 es otro factor transcripcional esencial tanto para la activación como para la inactivación de genes requeridos para el transporte de cobre. El extremo C-terminal tiene cisteínas e histidinas que probablemente interactúan reversiblemente con el cobre, mientras que el N-terminal participa en la unión a DNA. En ausencia de cobre, Mac1 se une al DNA activando la transcripción de los genes *FRE1* y *CTR1* que codifican, respectivamente, para una reductasa férrica y para una proteína de membrana que participa en la entrada de cobre (Marchler *et al.*, 1993; Yamaguchi *et al.*, 1997). En bajas concentraciones de cobre, Mac1 no activa la transcripción de genes involucrados en el transporte de cobre, mientras que en altas concentraciones de este ion, Mac1 se degrada de manera rápida y específica, evitando la expresión sostenida de los genes del transporte de cobre, y por lo tanto, evitando la toxicidad que produce este ion cuando se encuentra en exceso (Zhu *et al.*, 1998). Un aspecto interesante sobre este factor es que también participa en la inducción del gen *CTTI* (catalasa citosólica) por el H_2O_2 (Jungmann *et al.*, 1993). De acuerdo con los datos reportados, no existe evidencia de que

Mac1 se une al promotor de *CTT1*, pero las mutantes nulas *mac1* son hipersensibles al H₂O₂. Otra característica de estas mutantes es que son hipersensibles al calor y a varios metales como cadmio, zinc y plomo.

2.4. Hap1 y Hap2/3/4/5.

Los factores transcripcionales Hap1 y Hap2/3/4/5 regulan los genes activados por hemo. Hap1 es una proteína de 1483 residuos que tiene cerca del extremo N-terminal un motivo de dedos de zinc, el cual participa en la unión al DNA. El extremo C-terminal contiene un dominio con residuos ácidos que se requiere para la activación transcripcional y que es muy parecido a los dominios de otros factores transcripcionales, como GAL4 y GCN4 (Pfeifer *et al.*, 1989). Entre los genes que regula se encuentran *CTT1*, la catalasa citosólica, (Winkler *et al.*, 1988), *CYC1*, *CYC7*, *CYT1*, *CYB2* que codifican para las diferentes subunidades de los citocromos (Zitomer y Lowry, 1992). Hap2/3/4/5 es un complejo que funciona como activador transcripcional y está formado por cuatro subunidades diferentes. El complejo se une a la secuencia consenso CCAAT y responde tanto al hemo como a las fuentes de carbono no fermentables. Hap4 contiene el dominio que participa en la activación transcripcional (Forsburg y Guarente, 1989); Hap2 y Hap3 se unen al DNA (Xing *et al.*, 1993) y Hap5 se requiere para la unión al DNA pero no se sabe si participa solamente en el ensamblaje del complejo o si está involucrado directamente en la unión al DNA (McNabb *et al.*, 1995). Hap2/3/4/5 regulan principalmente a los genes que codifican para varias subunidades de algunos citocromos: *CYB2*, *COR2*, *COX4*, *COX5A*, *CYC1* (Zitomer y Lowry, 1992).

En *A. nidulans* se ha clonado el gen *hapC*, que es homólogo de *HAP3* de levadura. Las mutantes que tienen *hapC* cancelado son viables pero crecen pobremente y tienen una conidiación reducida (Papagiannopoulos *et al.*, 1996).

2.5. Msn2 y Msn4.

Las proteínas Msn2 y Msn4 son funcionalmente redundantes. Tienen dos dedos de zinc Cys₂His₂. Estos factores de transcripción se requieren para inducir los genes que tienen la secuencia denominada STRE en el promotor. Estos genes participan en la respuesta a diversos tipos de tensión (osmótica, oxidativa, choque de calor). Se ha demostrado por medio de gels de retardo que Msn2 y Msn4 se unen específicamente a los oligonucleótidos que contienen

secuencias STRE (Martínez-Pastor *et al.*, 1996; Schmitt y McEntee, 1996). La sobreexpresión de Msn2 mejora la resistencia a la privación de glucosa y la termotolerancia, además de permitir la expresión de *CTT1* y de *HSP26*, aún en ausencia de tensión. En contraste, se ha observado que en una doble mutante sin Msn2 y Msn4 el nivel de expresión de los mensajes de *HSP12*, *CTT1* y *DDR2*, que tienen sitios STRE en su promotor son nulos en presencia de choque de calor, tensión osmótica o etanol (Martínez-Pastor *et al.*, 1996; Schmitt y McEntee, 1996).

IV. Regulación de las catalasas.

Las catalasas son enzimas antioxidantes que se encargan de desechar el H_2O_2 . En algunos casos se ha observado que se regulan durante la diferenciación celular. Dentro de los microorganismos, las catalasas más estudiadas son las de *E. coli*, *S. cerevisiae*, *Neurospora crassa* y *Aspergillus*.

Escherichia coli tiene dos genes de catalasas, *katG* (Triggs-Raine, *et al.*, 1988) y *katE* (von Ossowski, *et al.*, 1991), los cuales codifican para las catalasas HPI y HPII, respectivamente. La HPI es una catalasa-peroxidasa constituida por cuatro subunidades, mientras que la HPII solamente tiene actividad de catalasa. La fase estacionaria de crecimiento en *E. coli* puede considerarse como un estado diferenciado, ya que se presentan cambios morfológicos (células más pequeñas y esféricas) y fisiológicos característicos. Entre estos últimos se encuentra por ejemplo, la inducción de la catalasa HPII. En la fase estacionaria, las células son más resistentes al choque de calor y al H_2O_2 . La HPI se induce en presencia del H_2O_2 por medio de OxyR y la HPII se induce mediante RpoS.

Saccharomyces cerevisiae tiene dos genes de catalasa, *CTT1* y *CTA1*, los cuales codifican para la catalasa citosólica y la peroxisomal, respectivamente (Hartig y Ruis, 1986; Cohen *et al.*, 1985). El mensaje de la catalasa A se acumula en presencia de los ácidos grasos, lo cual también induce la proliferación de peroxisomas. En estos microcuerpos se lleva a cabo la β -oxidación de ácidos grasos, generando H_2O_2 como subproducto. La función de la catalasa A es dismutar el peróxido en los peroxisomas. Los niveles del mRNA aumentan hasta 100 veces en las células que crecen en fuentes de carbono no fermentables y 10 veces más en condiciones de inducción por ácido oleico (Skoneczny *et al.*, 1988).

El gen *CTA1* se clonó por complementación de una mutante *ctal* (Cohen *et al.*, 1985) y su regulación se estudió mediante una fusión con el gen reportero *lacZ* (Filipits *et al.*, 1993; Simon *et al.*, 1995). En la Figura 1 se presenta un esquema de la regulación de la catalasa A. Al analizar el promotor, se reconocieron dos elementos de regulación positiva en las posiciones -170 y -190 del inicio de la traducción. En el de -170 se une el activador transcripcional Adr1p, el cual regula positivamente a la alcohol deshidrogenasa reprimible por glucosa, *ADH2*. Adr1p participa en la regulación de *CTA1* y en el control de la transcripción de otros genes peroxisomales y de hecho se requiere para la proliferación de peroxisomas en presencia de ácido oleico (Simon *et al.*, 1992).

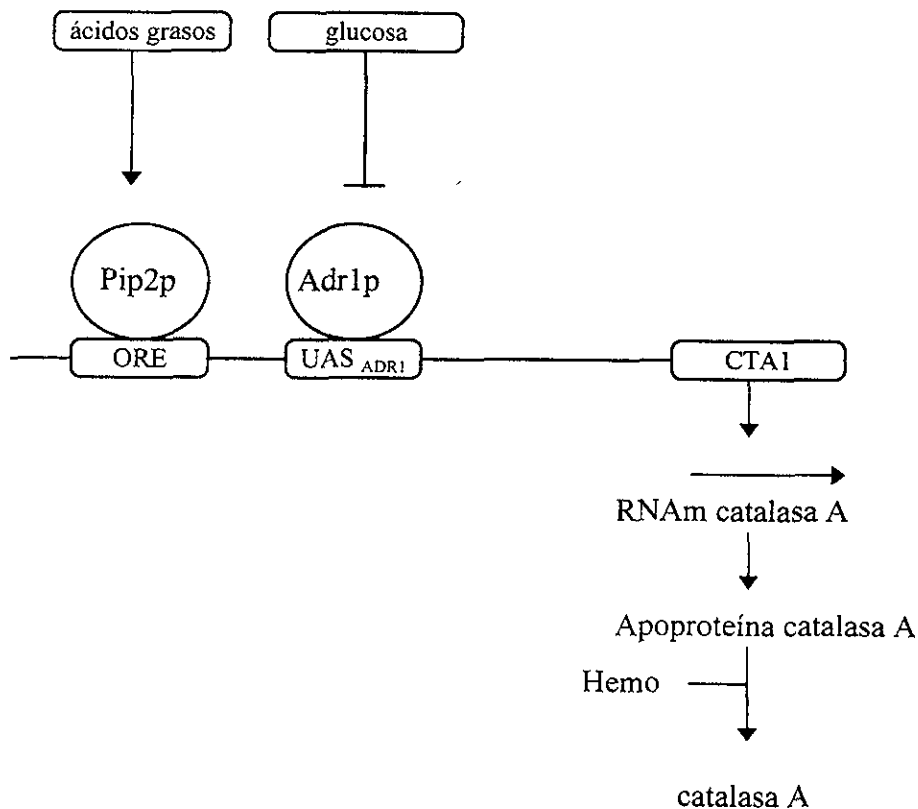


Figura 1. Regulación de *CTA1* (catalasa peroxisomal) de *Saccharomyces cerevisiae*. Se indican los elementos que participan en la regulación de la catalasa A en respuesta al ácido oleico (ORE) y a la presencia de glucosa (UAS_{ADR1}). La secuencia consenso para el sitio ORE es CGGNNNTNA (tomado de Ruis y Koller, 1997).

El elemento de la posición -190 interviene en la activación del promotor por ácidos grasos. Un elemento parecido se encontró en el gen *FOX3*, el cual codifica para la β -cetiolasas del sistema peroxisomal de β -oxidación. Este sitio se encuentra en varios genes peroxisomales y en el caso del gen *CTAI* se le denominó “caja del peroxisoma” (Filipits *et al.*, 1993) y elemento de respuesta a ácido oleico (ORE) en el caso del gen *FOX3* (Einerhand *et al.*, 1993).

Para estudiar la regulación del elemento ORE, se hizo una fusión de esta secuencia con el reportero *lacZ*. En presencia de ácido oleico, la cepa con la fusión se tiñe de azul en presencia del sustrato cromogénico X-Gal. Esta cepa se mutagenizó y se seleccionaron colonias blancas. El análisis genético definió cinco grupos de complementación. Uno de ellos se estudió más profundamente y se vio que la proteína para la cual codifica tiene un sitio de unión al DNA del tipo dedos de zinc. El gen se denominó *PIP2* y la proteína se une específicamente al sitio ORE, funcionando como un activador transcripcional. Las mutantes con el gen *PIP2* cancelado son incapaces de crecer en oleato y no inducen a la catalasa A ni a otros componentes del peroxisoma. De hecho, el propio gen *PIP2* contiene un sitio ORE y se induce por ácido oleico, por lo que esta proteína es autoregulatoria (Rottensteiner *et al.*, 1996)

La regulación de la catalasa citosólica (*CTT1*) se ha estudiado ampliamente y en la Figura 2 se muestra un esquema que representa el control de la expresión de dicho gen.

El gen *CTT1* se induce por diferentes condiciones de tensión que incluyen la privación de nutrientes, el choque de calor, alta osmolaridad y la tensión oxidativa generado por H_2O_2 (Wieser *et al.*, 1991; Belazzi, *et al.*, 1991; Marchler *et al.*, 1993; Schüller *et al.*, 1994).

El promotor de la catalasa T tiene dos sitios STRE (elemento de respuesta a la tensión) cuya actividad se estudió mediante una fusión *STRE::lacZ*. Como la fusión se induce por diferentes tipos de tensión (privación de nitrógeno, de carbono, tensión osmótica y oxidativa, pH ácido y etanol) queda claro que esos sitios son funcionales y que participan en la respuesta a diferentes condiciones de tensión (Bissinger *et al.*, 1989; Schüller *et al.*, 1994; Martínez-Pastor *et al.*, 1996).

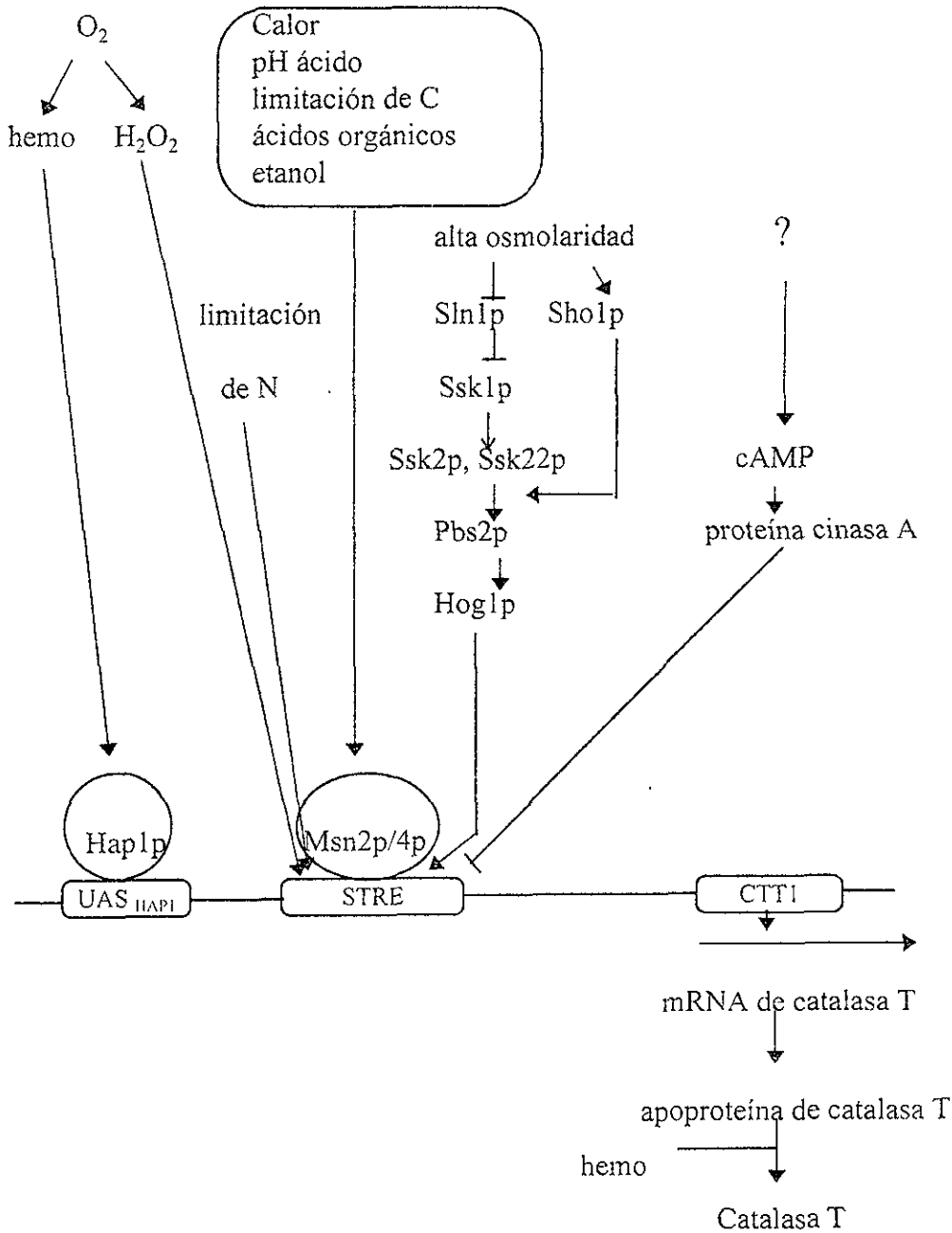


Figura 2. Regulación del gen *CTT1* (catalasa citosólica) de *Saccharomyces cerevisiae*. En el esquema se muestran las condiciones fisiológicas a las que responde la catalasa T y los mecanismos que se conoce que participan en dichas respuestas (Tomado de Ruis y Koller, 1997).

La inducción de la catalasa T vía elementos STRE en respuesta a la tensión osmótica se lleva a cabo por la denominada ruta HOG (Schüller *et al.*, 1994). En la transducción de esta

señal participan las proteínas Hog1p y Pbs2p, que corresponden a una MAP cinasa y a una MAP cinasa cinasa, respectivamente. Si alguna de ellas se mutageniza, no se detecta respuesta a la tensión osmótica pero sí a otros tipos de tensión que también se inducen por elementos STRE (choque de calor, etanol, privación de nitrógeno). Por lo tanto, la ruta HOG parece participar únicamente en la respuesta a alta osmolaridad (ver Figura 2). Recientemente se aisló y caracterizó un factor transcripcional que se une al sitio STRE (Martínez-Pastor *et al.*, 1996; ver Figura 2). Este factor está codificado por dos genes diferentes pero redundantes denominados *MSN2* y *MSN4*. Las proteínas codificadas por ambos genes tienen dedos de zinc, se unen *in vitro* a sitios STRE y se requieren para la activación vía este elemento de varios genes, incluyendo *CTT1*, *DDR2* (gen que responde al daño en DNA) y *HSP12* (proteína inducida por choque de calor).

En una doble mutante *msn2 msn4* no se detectó respuesta dependiente de STRE en presencia de choque de calor, pH bajo ni etanol al 7.5% mientras que la respuesta a la tensión osmótica y oxidativa así como el crecimiento en medio con etanol al 3% se redujo dramáticamente pero sin llegar a ser nula. Estos datos muestran que los factores Msn2p y Msn4p están directamente involucrados en la respuesta a solo unos tipos de tensión y que debe haber otros factores que también se unan a los sitios STRE (Martínez-Pastor *et al.*, 1996).

Por otra parte, la proteína cinasa A parece actuar como un regulador negativo de la transcripción mediada por STRE (Figura 2). Esto se dedujo porque las cepas afectadas en la activación de la proteína cinasa A tienen mayor actividad basal de catalasa T y además, la adición exógena de cAMP evita la inducción de *CTT1* (Bissinger *et al.*, 1989; Belazzi *et al.*, 1991). Aparentemente, la proteína cinasa A no transmite ninguna señal de tensión pero participa en la decisión de las células entre crecer o activar la transcripción de genes en respuesta a la tensión (Ruis y Koller, 1997).

Hap1p es un factor transcripcional que se encarga de la regulación de la síntesis de hemoproteínas, requiere hemo para activarse y éste solamente se sintetiza en condiciones aeróbicas. Hap1p también participa en la regulación de la catalasa citosólica (Figura 2) y se demostró que se une al promotor del gen *CTT1* por medio de geles de retardamiento y experimentos de huella genética (Winkler *et al.*, 1988). La unión del factor se estimula en

presencia de hemina. La hemina se produce en mitocondrias y requiere oxígeno para sintetizarse. La hemina activa la proteína HAP1 que a su vez induce varios genes en el núcleo.

En hongos filamentosos las catalasas que más se han estudiado son las de *Neurospora crassa* y las de *Aspergillus*. Anteriormente se había reportado que *N. crassa* tenía tres genes estructurales de catalasas que se regulaban diferencialmente (Chary y Natvig, 1989). Sin embargo, datos recientes demuestran que la Cat I se modifica en presencia de singulete dando como resultado una movilidad electroforética diferente para cada una de las modificaciones. La Cat-1a es el homotetrámero no modificado y las Cat-1b, Cat-1c, Cat-1d y Cat-1e son las modificaciones en uno, dos, tres y cuatro monómeros respectivamente (Lledías *et al.*, 1998). El gen *cat-1* se clonó, se secuenció parcialmente y mapea en el grupo de complementación IIIR (Baldwin y Natvig, 1995). La proteína codificada por este gen se expresa durante el ciclo de vida vegetativo del hongo y su actividad aumenta en presencia de paraquat y de choque de calor. El gen *cat-2* no se ha clonado pero mapea en el grupo de complementación VIIR. Esta proteína se expresa bajo condiciones de tensión y transitoriamente en conidios (Chary y Natvig, 1989; Baldwin y Natvig, 1995). Lledías y Hansberg (1998) observaron que las catalasas de *N. crassa* se regulan durante el crecimiento y la diferenciación. En extractos de hifas en crecimiento, Cat-1a y Cat-1c están presentes mientras que en micelio adherido, además de estas formas, está también presente la Cat-1e. En el micelio aéreo al momento de la formación de conidios, aumentan Cat-1a, 1b y 1c. Cat-1e también se aprecia y aparece Cat-2. En las conidias, la actividad predominante fue la de Cat-1a. La Cat-1a se induce en cultivos con aereación en presencia de H₂O₂ o paraquat, así como también por luz intensa. En choque de calor, la Cat-1a aumentó tanto en aerobiosis como en anaerobiosis. En paraquat y en choque de calor en presencia de oxígeno, se detectaron modificaciones de la catalasa (Lledías y Hansberg, 1998).

En *Aspergillus* se han estudiado principalmente las catalasas de tres especies: *A. niger*, *A. nidulans* y *A. fumigatus*. De acuerdo con lo reportado por Witteveen *et al.* (1992), *A. niger* tiene cuatro catalasas diferentes. La I es intracelular, ya que es más abundante en protoplastos, la II se localiza en la pared celular, la III (intracelular) y la IV (extracelular) solamente se detectan en condiciones de inducción de la glucosa oxidasa (genera como productos gluconato y H₂O₂). La I y la II son enzimas prácticamente constitutivas. La glucosa oxidasa se localiza en

la pared celular por lo que es necesario contar con una catalasa en este sitio para que desintoxique a la célula del H_2O_2 por la actividad de dicha oxidasa.

A. niger tiene por lo menos dos catalasas genéticamente distintas. *catA* se clonó usando como sonda *CTAI* de levadura, se induce por crecimiento en ácidos grasos y probablemente sea peroxisomal. *catR* se clonó utilizando oligonucleótidos sintéticos, tiene cinco exones y cuatro intrones pequeños. La región amino-terminal del polipéptido deducido a partir de la secuencia parece ser un péptido señal, por lo que podría tratarse de una catalasa de la pared celular (Fowler *et al.*, 1993).

En *A. fumigatus* se detectaron en un gel nativo tres bandas diferentes de actividad de catalasa que se denominaron F (rápida), S1 (lenta 1) y S2 (lenta 2). La F tiene actividad de peroxidasa mientras que las otras dos solamente tienen actividad de catalasa (Hearn *et al.*, 1992).

En *A. nidulans* se aislaron unas clonas de cDNA que se expresan significativamente más en cultivos conidiantes que en micelio vegetativo (Zimmermann *et al.*, 1980). Estas clonas se secuenciaron parcialmente y una de ellas, denominada CAN5, resultó ser muy parecida a una catalasa, lo cual es muy interesante porque representa una enzima antioxidante que se expresa durante la conidiación. El gen correspondiente se clonó y se designó *catA* (Navarro *et al.*, 1996). CatA es más parecida a la catalasa HPII de *E. coli* que a las catalasas de otros hongos. *catA* se regula durante el desarrollo y la acumulación de su mensaje es virtualmente nula en el micelio vegetativo pero se induce notablemente durante la esporulación y se acumula considerablemente en las esporas. La regulación de este gen es independiente de los genes regulatorios del desarrollo *brlA*, *abaA* y *wetA* (Navarro *et al.*, 1996). Además de la CatA, se detectó la actividad de otra catalasa, denominada CatB, que se induce durante el crecimiento (Navarro, *et al.*, 1996).

Los conidios de las mutantes con el gen *catA* interrumpido son muy sensibles al tratamiento con H_2O_2 , lo cual indica la importancia de esta enzima durante la latencia de las esporas y/o la germinación. En estas mismas mutantes la actividad de la catalasa B no se afectó, indicando que estas enzimas están codificadas por genes diferentes (Navarro *et al.*, 1996).

V. *Aspergillus nidulans* como modelo experimental.

A. nidulans es un hongo ascomiceto, homotálico, manipulable a nivel de genética tanto clásica como molecular (Aguirre, 1992). Este microorganismo tiene un tiempo de duplicación de aproximadamente 2.5 h y su ciclo de vida incluye las fases asexual y sexual (Fig 3). La primera también se conoce como conidiación y se caracteriza porque se forman estructuras especializadas llamadas conidióforos en los cuales se forman los conidios (esporas asexuales). Los conidios son uninucleados. Brevemente, el ciclo asexual de *A. nidulans* (Fig 3) consiste en la germinación de las conidias, proceso que se inicia con el hinchamiento de las mismas (2 h). Posteriormente, se forma un tubo germinativo (6 h) y luego continúa el crecimiento formando el micelio vegetativo (18 h). El desarrollo asexual se induce al exponer al aire el micelio de 18 h de crecimiento. Se inicia con la diferenciación de algunas células de las hifas en células pie (6h después de exponer al aire). Las células pie producen hifas aéreas cuyo extremo apical se hincha formando la vesícula multinucleada (12h después de exponer al aire). De la vesícula se forman las métulas por gemación múltiple y posteriormente las fiálides. Ambos tipos celulares son uninucleados. Finalmente, se forman los conidios uninucleados mediante mitosis sucesivas (12-25h de exposición al aire).

En *A. nidulans* se han mapeado más de 700 genes en sus ocho cromosomas y actualmente existe una base de datos que incluye secuencias de cDNA (Roe *et al.*, 1997).

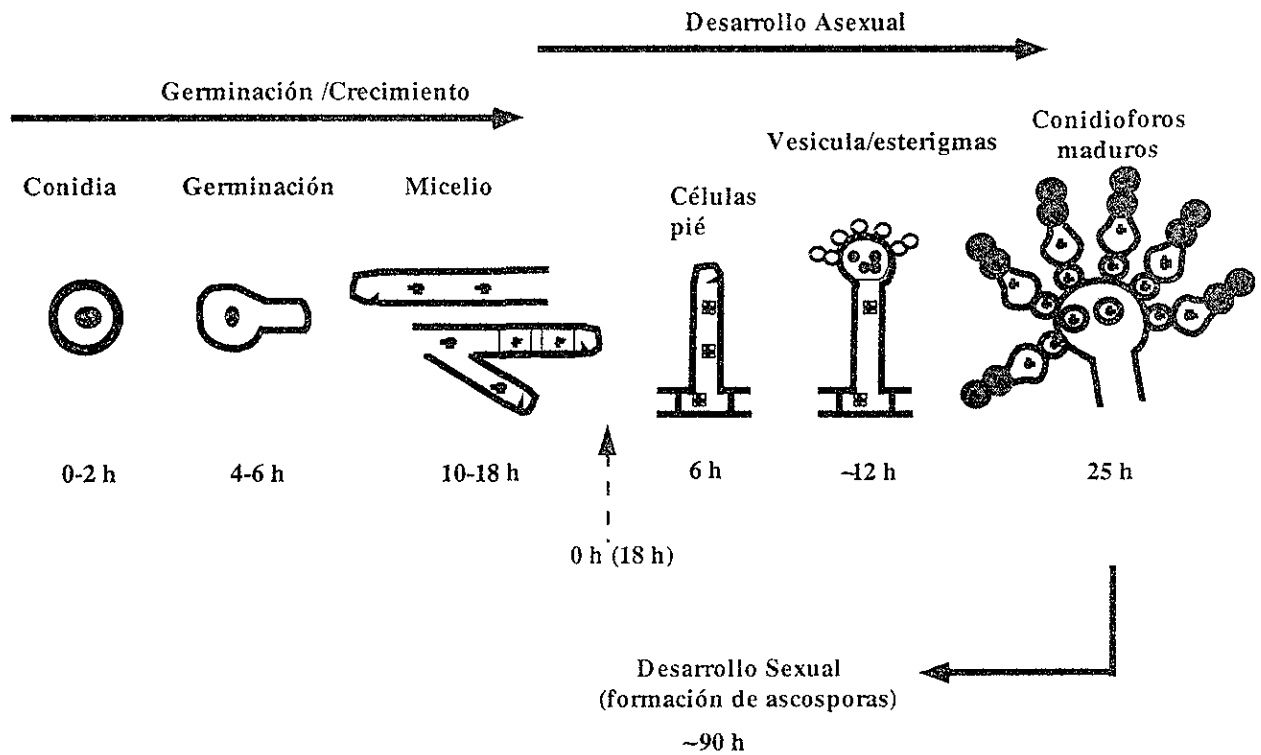


Figura 3. Ciclo de vida asexual de *Aspergillus nidulans*. En el esquema se muestran los diferentes estados de desarrollo a lo largo del tiempo. Después de crecer el micelio durante 18 h en medio líquido, se induce la diferenciación por medio de la exposición al aire, lo cual corresponde a las 0 h de la diferenciación (flecha discontinua). Posteriormente, se inicia la formación del conidióforo y en tiempos más prolongados de cultivo comienza el desarrollo sexual, el cual culmina con la formación de ascosporas. Los puntos negros dentro de las distintas estructuras indican núcleos.

OBJETIVOS

Considerando la propuesta de Hansberg y Aguirre (1990) de que un estado hiperoxidante conduce a la diferenciación celular, se abordó el estudio de la regulación de las catalasas, como enzimas fundamentales en la respuesta antioxidante y utilizar al hongo *Aspergillus nidulans* como sistema experimental.

Los primeros estudios relacionados con las catalasas en *A. nidulans* (Navarro *et al.*, 1996) reportaron la existencia de por lo menos dos genes de catalasas diferentes y la clonación de uno de ellos (*catA*) el cual codifica para la catalasa A, específica de las esporas. Durante el crecimiento se detectó la actividad de una catalasa B que se relacionó con la fase vegetativa del hongo.

La presente tesis es una contribución al estudio de la catalasa B, y tiene como objetivo general definir el papel de dicha catalasa en la respuesta a la tensión oxidativa y su posible relación con los procesos de diferenciación. Para llevar a cabo este estudio, se plantearon los siguientes objetivos particulares:

1. La clonación y secuenciación del gen *catB* (en colaboración con R. Diamond y D. Wysong de Boston University Medical Center) y el análisis de su expresión durante el ciclo de vida de *A. nidulans*.
2. La interrupción del gen *catB* y la caracterización de las mutantes resultantes en distintas condiciones de tensión oxidativa.
3. Determinar la localización celular de la catalasa B.

4. El estudio de la regulación del gen *catB* durante el crecimiento y en diferentes condiciones de tensión. La construcción de una fusión *catB::lacZ* que permita estudiar la regulación transcripcional de *catB*. Esta fusión puede servir para tratar de aislar mutantes afectadas en la regulación del gen *catB*. A largo plazo, esto podría conducir a la identificación de factores transcripcionales que participen en la respuesta antioxidante en *A. nidulans*.

5. Definir las regiones necesarias para la regulación transcripcional del gen *catB*. Se construirán diferentes fusiones para tratar de delimitar secuencias importantes para la regulación de *catB* en distintas condiciones fisiológicas.

MATERIALES Y METODOS

I. Cepas de *Aspergillus nidulans* empleadas para este trabajo.

CEPA	GENOTIPO	ORIGEN
FGSC26	<i>biA1; veA1</i>	FGSC
FGSC411	<i>proA1, pabaA1, yA2</i>	FGSC
PW1	<i>biA1; argB2; metG1; veA1</i>	P. Weglenski
RMS011	<i>pabaA2, yA2; ΔargB::trpCΔB, veA1, trpC801</i>	Stringer <i>et al.</i> , 1991
RYC16	<i>ΔargB::trpCΔB, ΔcatA::argB; ΔcatB::argB, veA1</i>	Y. Chang
RYC17	<i>ΔargB::trpCΔB, ΔcatA::argB; veA1</i>	Y. Chang
TJA22	<i>biA1, brlA (-2900 p/l)::lacZ (argB⁺/argB::CAT); metG1; veA1</i>	Aguirre, J. 1993
TOS1	<i>pabaA1, yA2; ΔargB::trpCΔB, catA::argB; veA1, trpC801</i>	Navarro <i>et al.</i> , 1996
TRN1	<i>pabaA1, yA2; ΔargB::trpCΔB, ΔcatA::argBΔA; trpC801, veA1</i>	R. Navarro
CLK12	<i>biA1; ΔcatA::argBΔA; metG1; veA1</i>	TOS1 X PW1 (este trabajo)
CLK14	<i>biA1; ΔcatA::argBΔA; metG1; ΔcatB::argBΔB, veA1</i>	CLK12 X TLK12 (este trabajo)
CLK15	<i>biA1; metG1; ΔcatB::argBΔB, veA1</i>	CLK12 X TLK12 (este trabajo)
CLK16	<i>proA1, pabaA1, yA2; catB::lacZ; veA1</i>	TLK42 X FGSC411 (este trabajo)
CLK19	<i>pabaA1, yA2, biA1; ΔcatA::argBΔA; metG1; ΔcatB::argBΔB, veA1</i>	TRN1 X CLK15 (este trabajo)
CLK20	<i>biA1; ΔcatA::argBΔA; metG1; ΔcatB::argBΔB, veA1</i>	TRN1 X CLK15 (este trabajo)

CEPA	GENOTIPO	ORIGEN
TLK12	<i>pabaA1, yA2;</i> <i>ΔargB::trpCΔB;</i> <i>ΔcatB::argBΔB, trpC801,</i> <i>veA1</i>	RMS011 transformada con pLK2 (Kawasaki <i>et al.</i> , 1997)
TLK25	<i>biA1; catB::lacZ; metG1;</i> <i>veA1</i>	PW1 transformada con pLK3 (este trabajo). Contiene una copia de la fusión
TLK26	<i>biA1; catB::lacZ; metG1;</i> <i>veA1</i>	PW1 transformada con pLK3 (este trabajo). Contiene una copia de la fusión.
TLK42	<i>biA1; catB(-3500)::lacZ;</i> <i>metG1; veA1</i>	PW1 transformada con pLK8 (este trabajo). Contiene 1 copia de la fusión
TLK50	<i>biA1; catB(-993)::lacZ;</i> <i>metG1; veA1</i>	PW1 transformada con pLK9 (este trabajo). Contiene una copia de la fusión
TLK56	<i>biA1; catB(-413)::lacZ;</i> <i>metG1; veA1</i>	PW1 transformada con pLK10 (este trabajo). Contiene 1 copia de la fusión

II. Medios de cultivo y condiciones de crecimiento de *Aspergillus nidulans* y *Escherichia coli*.

1. *Aspergillus nidulans*.

El medio de cultivo utilizado para el crecimiento de *A. nidulans* fue el medio mínimo sugerido por Käfer (1977) con glucosa al 1% y suplementado con los requerimientos necesarios para cada cepa. Para los medios sólidos se adicionó agar al 1.25% y la temperatura de incubación para los cultivos fue de 37°C. Los cultivos líquidos se crecieron a la misma temperatura y a 300 rpm. En este último caso, se emplearon matraces de 250 ml con 50 ml de medio. Todos los medios de cultivo y el material necesario se esterilizaron a 121°C durante 20 minutos.

Para inocular los medios de cultivo líquidos se hizo una cosecha de esporas a partir de cajas de Petri sembradas a confluencia e incubadas durante 5 días a la temperatura ya indicada. La cosecha se hizo raspando las esporas con un asa bacteriológica y agregando Tween 80 al 0.01%. La suspensión se centrifugó 5 min en una centrifuga clínica y el botón se resuspendió en

agua estéril. Se agitó vigorosamente en un vórtex y posteriormente se repitió la centrifugación. El lavado anterior se hizo una vez más y finalmente, el botón se resuspendió en un volumen conocido de agua. La cuantificación de esporas se hizo en una cámara de Newbauer utilizando para ello una dilución 1:100. El inóculo empleado fue de 5×10^5 esporas/ml.

Para tratar de encontrar condiciones que indujeran a la CatC, se prepararon medios de cultivo líquidos con medio mínimo y se crecieron durante 24 h. Transcurrido este tiempo, se transfirió el micelio a medio nuevo con diferentes fuentes de carbono, que incluyeron: glucosa 1%; glucosa 1% + Tween 80 al 0.5%; glucosa 0.1% + acetato de sodio 50 mM; ácido oleico 6mM + Tergitol NP10 1% (como emulsificante). Estos cultivos se incubaron durante 24 h más para un total de 48 h de crecimiento. También se incubaron matraces con medio mínimo con glucosa al 1%; ácido oleico 6 mM + tergitol NP10 1%; glucosa 0.1% + acetato de sodio 50 mM y se crecieron durante 48 h.

2. *Escherichia coli*

Para propagar plásmidos que confieren resistencia a ampicilina en *E. coli*, se empleó el medio Luria Bertani con 75 µg/ml de ampicilina (Sambrook *et al.*, 1989).

III. Obtención de extractos totales de proteínas.

Las muestras de micelio se lavaron con agua destilada estéril, se secaron en un Savant y se molieron con una espátula. Se agregó suficiente amortiguador (HEPES 20 mM, DTT 1mM, pH 7.2) para humedecer bien toda la muestra y se añadió el mismo volumen de perlas de vidrio estériles (Sigma, diámetro 710-1,180 µm). Para romper el tejido se hicieron 5 ciclos de un minuto en el vórtex a máxima velocidad y un minuto en hielo. En el caso de la extracción de proteína de los conidios, primero se colectaron éstos a partir de 3 cajas de Petri inoculadas a confluencia. La suspensión de esporas se filtró a través de Miracloth, se centrifugó y se resuspendió en aproximadamente 300 µl de amortiguador. Se agregaron las perlas de vidrio y se siguió el mismo procedimiento, pero haciendo un total de ocho ciclos. Una vez terminado este proceso, las muestras se centrifugaron 15 min a 11,500 rpm a 4°C en una microfuga. El sobrenadante se recuperó en un tubo eppendorf limpio.

La proteína se diluyó 1:50 y se cuantificó con el método de Bradford (1976) utilizando el reactivo BioRad Protein Assay. Para determinar la cantidad de proteína, se hizo una curva patrón de albúmina sérica de bovino (Sigma).

IV. Medición de actividades de catalasa y de β -galactosidasa.

1. Catalasa.

La actividad de catalasa se midió utilizando un electrodo de Clark y siguiendo el protocolo de del Río *et al.* (1977). Las unidades específicas de actividad reportadas corresponden a las nanomoles de H_2O_2 descompuestas por minuto por mg de proteína.

2. Actividad de β -galactosidasa.

Se siguió el procedimiento de Miller (1972), el cual se basa en la hidrólisis de ortonitrofenil- β -D-galactopiranososa (ONPG) por acción de la β -galactosidasa, lo cual genera un compuesto cromogénico (ortonitrofenol) que se cuantifica leyendo en el espectrofotómetro a 420 nm.

V. Inmunoelectrotransferencias e inmunolocalización de la catalasa B.

1. Anticuerpos probados contra la catalasa B de *Aspergillus nidulans*.

Se probaron los siguientes anticuerpos:

- a) anti-catalasa I de *Neurospora crassa* (Montes de Oca, Lledías y Hansberg, Instituto de Fisiología Celular, UNAM)
- b) anti-cat55 y anti-cat6, ambos contra las catalasas de girasol. Se obtuvieron a partir de la subunidad desnaturalizada de 55 kDa y de la isoforma nativa CAT6, respectivamente (Tenberge y Eising, 1995; Tenberge *et al.*, 1997). Estos anticuerpos fueron donados por el Dr. R. Eising (Institut für Botanik, Westfälische Wilhelms-Universität Münster, Alemania).
- c) anti-p90, es el anticuerpo generado contra la catalasa I de *A. fumigatus* y fue donado por el Dr. Fernando Leal de la Universidad de Salamanca, España (López-Medrano *et al.*, 1995). El anticuerpo liofilizado se reconstituyó en agua desionizada estéril y se guardó en alícuotas de 100 μ l a -70°C .

Para probar si estos anticuerpos eran capaces de cruzar con la catalasa B de *A. nidulans*, se titularon utilizando diluciones de 1:10, 1:20, 1:40, 1:80, 1:160, 1:320, 1:640 y 1:1280. Las muestras de proteína empleadas para estas titulaciones fueron de condiciones y de cepas en las que se sabía que había una cantidad abundante de catalasa B, de catalasa A o de ninguna de las dos. Para el primer caso, se extrajo proteína de un cultivo de 48 h de la cepa PW1, para el segundo, de conidias de la cepa RMSO11 y para el tercero, de la cepa CLK14, la cual tiene interrumpidos los genes *catA* y *catB*.

2. Inmunoelctrotransferencias.

Las proteínas se corrieron en un gel desnaturalizante, es decir, en presencia de SDS y β -mercaptoetanol (Laemmli, 1970). El gel separador se preparó al 10% y el concentrador al 4%. Para el primero se utilizó un amortiguador de Tris-HCl 1.5M, pH 8.8 y para el segundo, se empleó el mismo amortiguador, pero a un pH de 6.8. Los marcadores de peso molecular preteñidos empleados fueron de BioRad. El gel se corrió durante aproximadamente 45 min a 200 volts en un amortiguador de corrida de Tris 0.025M, Glicina 0.192 M, pH 8.0 con SDS (1g/litro).

Se cargaron aproximadamente 55 μ g de proteína por carril. En el caso de la titulación del anticuerpo, se hizo un gel con dos pozos de distintas capacidades. El pozo con mayor capacidad se cargó con 800 μ g de proteína y el otro se cargó con los marcadores de peso molecular. Una vez transferido el gel a una membrana, ésta se humedeció en PBS 1X (ver más adelante) y se cortó en tiritas finas para probar diferentes diluciones del anticuerpo. La parte de la membrana correspondiente a los marcadores y a un fragmento de la muestra, se tiñó con amido negro para saber posteriormente de qué peso aproximado y cuál banda fue la que cruzó con el anticuerpo. La tinción se hizo durante 20 minutos en la siguiente solución:

Amido negro	0.05 g
Metanol	22.5 ml
Acido acético	5 ml
Agua destilada	aforar a 50 ml

Esta solución se guardó a temperatura ambiente.

Posteriormente, la membrana se destiñó con la siguiente solución que se preparó al momento:

Metanol	22.5 ml
Acido acético	5 ml
Agua destilada	aforar a 50 ml

2.1. Electrotransferencia del gel y lavados de la membrana.

El gel se transfirió a una membrana de nitrocelulosa de 0.45 μm (BioRad Trans-Blot Transfer Medium) siguiendo el sistema sugerido por Towbin *et al.* (1979). La transferencia se hizo durante 2 horas a 15 volts y a temperatura ambiente. El gel se tiñó con azul de Coomassie para corroborar la transferencia. Una vez hecha la transferencia, se hicieron los siguientes lavados e incubaciones de la membrana:

- Se incubó 5 minutos en Rojo Ponceau (Sigma), el cual tiñó las bandas de proteínas sirviendo como indicador de que la transferencia fue exitosa.
- Se lavó la membrana con agua hasta que se destiñó el colorante.
- Se fijó durante 15 min en glutaraldehído al 0.5% preparado en PBS 1X. Esta solución se prepara al momento de utilizarla. Se mantuvo en agitación constante, de tal manera que la solución cubrió la membrana todo el tiempo. El PBS 1X se preparó a partir de la siguiente solución concentrada 10X:

NaCl	80 g
KCl	2 g
Na ₂ HPO ₄	11.49 g
KH ₂ PO ₄	2 g
Agua destilada	Aforar a un litro

La solución 10X se almacenó a temperatura ambiente y la 1X a 4°C.

- Se enjuagó la membrana con PBS 1X, Tween 20 al 0.3% durante 5 min con agitación constante. El proceso se repitió con PBS 1X.
- Se bloqueó la membrana toda la noche en una solución de leche descremada (Svelty) al 5% disuelta en PBS 1X, Tween 20 al 0.3%, también en agitación.
- Se enjuagó la membrana en PBS-Tween 20 durante 10 minutos tres veces.

2.2. Incubación con el anticuerpo.

Todas las incubaciones se hicieron en agitación constante y a 37°C.

- a) Se preparó una solución de leche al 0.2% en PBS-Tween 20. El volumen debe ser el mínimo necesario para que quede completamente cubierta la membrana. Se agregó el anticuerpo de tal forma que quedó a la dilución deseada en el volumen preparado de leche. Se incubó durante una hora.
- b) Se enjuagó con PBS-Tween 20 durante un minuto y posteriormente, se lavó tres veces durante 5 minutos cada vez en la misma solución.
- c) Se incubó la membrana en el mínimo volumen posible de leche al 0.2% disuelta en PBS-Tween 20 y adicionada con el segundo anticuerpo acoplado a una peroxidasa (Sigma Immuno Chemicals Anti-Rabbit IgG ,whole molecule, peroxidase conjugate) de tal modo que éste quedó a una dilución de 1:500. Esta incubación se hizo durante una hora.
- d) Se lavó la membrana un minuto en PBS-Tween 20 y luego 5 min en la misma solución.
- e) Se lavó tres veces durante 5 min en PBS.

2.3. Revelado

- a) La solución de revelado se preparó al momento:

PBS 1X	10 ml
orto-cloro-naftol	2 ml
H ₂ O ₂	10 µl

La solución de orto-cloro-naftol (Sigma) se preparó a una concentración de 3 mg/ml en metanol y se guardó en un frasco ámbar a -20°C.

- b) Se adicionó la solución y se agitó manualmente hasta ver la reacción.
- c) Se enjuagó con agua destilada. La membrana se secó, se fotografió y se guardó entre papel filtro Whatman No. 1.

3. Inmunolocalización de la catalasa B.

Para inmunolocalizar a la catalasa B, se utilizó el anticuerpo de *A. fumigatus* a una dilución de 1:10, 1:50 y 1:100. Las muestras empleadas fueron de las cepas FGSC26 y CLK15 cultivadas durante 48 h en medio líquido y bajo las condiciones ya indicadas en **II**. Las muestras se fijaron 90 min con glutaraldehído al 3% disuelto en amortiguador 0.1M de cacodilato de sodio pH 7.2, se deshidrataron en series de etanol y se embebieron en resina L-white. Los cortes se

trataron con el anticuerpo de acuerdo con lo sugerido por Roth (1985) para inmunolocalizar proteínas utilizando la técnica de Proteína A-Oro (pAg).

VI. Genética.

La obtención de cruzas y el análisis de la progenie se hizo por medio de la genética clásica y siguiendo los procedimientos sugeridos por Pontecorvo *et al.* (1953) y Clutterbuck (1974).

VII. Mutagénesis.

1. Mutagénesis con luz ultravioleta.

La mutagénesis se hizo con luz ultravioleta, colocando la lámpara a una distancia aproximada de 7.5 cms de la caja de Petri con 25 ml de una suspensión de esporas, a una concentración de 1×10^6 esporas/ml.

Para cada cepa empleada, se hizo una curva de sobrevivencia, irradiando a diferentes tiempos. Las esporas mutagenizadas se plaquearon en un medio mínimo sólido con los requerimientos necesarios y con desoxicolato de sodio (Sigma) al 0.04% como inhibidor de crecimiento.

Las cajas de Petri se incubaron a 37°C durante 2 días y se cuantificaron las colonias sobrevivientes para cada tiempo. A partir de la curva, se seleccionó el tiempo de irradiación que diera alrededor del 10-20% de sobrevivencia. La mutagénesis se llevó a cabo por dicho tiempo.

2. Métodos de selección de mutantes.

El primer método empleado consistió en cubrir con una solución de H₂O₂ 10 mM durante 5 minutos colonias jóvenes (24 h de incubación a 37°C) crecidas en medio completo. Después de 5 minutos, la solución se decantó y las mutantes se incubaron durante otras 24 h. Se seleccionaron aquellas colonias que esporularon pero que se veían más pequeñas que las demás. El plaqueo se hizo en medio completo para excluir la posibilidad de que alguna auxotrofia afectara el crecimiento de las mutantes y por lo tanto, que el análisis no se hiciera en una población representativa. Otra forma de seleccionar las mutantes consistió en que después de

añadir el peróxido, se observaron las colonias bajo el microscopio estereoscópico y se escogieron aquéllas que no burbujearon.

Con las cepas así elegidas se hicieron placas maestras en medio completo para hacerles una segunda selección que consistió en cubrirlas nuevamente con peróxido y escoger las que no burbujearan. Para esta mutagénesis se empleó la cepa TOS1 (mutante nula en *catA*).

Como se deseaba obtener mutantes regulatorias del gen *catB*, también se mutagenizó la cepa TLK42 la cual contiene una fusión *catB::lacZ*. En este caso, se prepararon tubos estériles con 4 ml de agar suave con medio mínimo, los requerimientos correspondientes y desoxicolato de sodio al 0.04%. Se probaron diferentes cantidades de X-Gal resultando una mejor tinción con 80 µl, por lo que a los tubos se les añadió dicho volumen y una dilución de las esporas mutagenizadas, de tal forma que crecieran aproximadamente 500 colonias por caja. El tubo se agitó en un vórtex e inmediatamente se vació sobre una caja petri con el mismo medio ya sólido. Las cajas petri se incubaron durante dos días y se seleccionaron las colonias blancas. Se guardaron a 4°C durante un día mas y se hicieron placas maestras con las que seguían siendo blancas. Estas placas se permeabilizaron con cloroformo y se volvieron a teñir con X-Gal para hacer una segunda selección. Las colonias blancas se consideraron como mutantes.

VIII. Técnicas de Biología Molecular.

1. Secuencia.

Todas las secuencias se hicieron de acuerdo al método de terminación de cadena de Sanger, *et al.* (1977). Las reacciones de secuencia se hicieron con el estuche de Sequenase Versión 2.0 (USB), siguiendo los procedimientos sugeridos por el fabricante.

Los oligonucleótidos empleados en este trabajo para secuenciar la región 5' del gen *catB* fueron:

- a) Oligo *catB2*: 5'AGTTCAGCAGCGAGGTCTGG3'
- b) Oligo *catB3*: 5' GATGTTGTATAGGTCTCGAS3'
- c) Oligo *catB5*: 5'CAATAGCCATCATTTGATCT3'

El plásmido secuenciado fue el pDW1.

Para corroborar que las fusiones *catB::lacZ* estuvieran en el marco de lectura correcto, se secuenció la zona donde se unió la región regulatoria 5' de *catB* con *lacZ*. El oligonucleótido empleado fue el catB4: 5'CATTCCCTATCCCTCTTTCCT3'

2. Purificación de vectores y transformación de *E. coli*.

Los vectores empleados en este trabajo se obtuvieron utilizando el procedimiento de purificación por columnas de Qiagen y de acuerdo a las especificaciones del proveedor.

La preparación de células competentes de la cepa *E. coli* XLI-Blue se hizo de acuerdo con lo sugerido por Inoue *et al.* (1990). La transformación de *E. coli* y las minipreparaciones de plásmidos se llevaron a cabo según Sambrook *et al.* (1989). Las cepas de bacterias que contienen los vectores construídos en este trabajo se almacenaron a -70°C en glicerol al 15%.

3. Construcción de las fusiones *catB::lacZ*.

La construcción de las fusiones se hizo siguiendo las técnicas estándares sugeridas por Sambrook *et al.* (1989) y todas las enzimas de restricción se obtuvieron de Gibco-BRL o de Boehringer Mannheim, y se ensayaron a la temperatura y con los amortiguadores sugeridos por el proveedor. Los análisis y mapas de restricción se obtuvieron con los programas Gene Construction Kit o DNA Inspector (Textco) y se pueden consultar en el Apéndice I de este trabajo.

Los fragmentos de DNA que se clonaron en los diferentes vectores, se purificaron utilizando el GeneClean II (Bio 101, La Jolla, Ca.) de acuerdo a las especificaciones del proveedor, o bien corriendo geles de agarosa de bajo punto de fusión (Gibco-BRL) al 0.6%. Estos últimos se corrieron a 45 volts, dado que este tipo de agarosa tiene una malla más amplia y el bajo voltaje permite una mejor definición de las bandas. Las reacciones de ligación se hicieron con el estuche Rapid DNA Ligation Kit de Boehringer Mannheim de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

El vector que se empleó para obtener las construcciones *catB::lacZ* fue el pRA42 (Aramayo y Timberlake, 1993), el cual a su vez proviene del pIC19R.

La primera fusión que se construyó contenía 3.5 kb río arriba del codón de inicio de *catB*, incluyendo además la información que codifica para los primeros 25 aminoácidos de la proteína. El plásmido así obtenido se designó pLK3 y se construyó de la siguiente manera:

Se sustituyó el promotor y las regiones reguladoras del gen *γA2* por el de *catB* en el pRA42. Este vector se digirió primero con *KpnI* durante 2 h. Transcurrido este tiempo, se agregó NaCl 500 mM para que quedara a una concentración final de 50 mM, que es la concentración adecuada para que la enzima *NruI* digiera bien. Se agregó dicha enzima y se dejó la reacción 2 horas. El vector se trató con fenol/cloroformo y se precipitó con etanol y acetato. Se centrifugó, se lavó con etanol al 70%, se secó en el Savant y se resuspendió en un volumen adecuado de agua.

El pDW1 se digirió con *KpnI* y *NruI*, se corrió en un gel de agarosa de bajo punto de fusión y la banda de aproximadamente 3.5 kb se purificó. Este inserto y el pRA42 digerido con anterioridad se ligaron y se transformó *E. coli*. Se corrió una reacción de secuencia con el pLK3 para corroborar que la fusión estaba en el marco de lectura correcto.

La siguiente fusión que se construyó ya no contenía los 27 aminoácidos. Primero se removió el cassette *argB::CAT* del pRA42 digiriéndolo con *XbaI* y religándolo, lo cual originó el pLK6. Para deshacerse de los 27 aminoácidos de la fusión anterior se hizo un PCR utilizando como templado el pDW1 y los oligos T7 y L4363. Este último se diseñó específicamente para introducir un sitio único *NcoI* justo en la ATG del gen *catB*. El oligo se mandó a sintetizar en la compañía BRL y su secuencia es 5'-AGCCATGGTGAGGTAAAGTC-3'.

El PCR se llevó a cabo con la mezcla de enzimas elongasa (BRL) en un termociclador Perkin Elmer 2400. El programa consistió en un "hot start" de 94°C durante 1 min agregando la enzima elongasa cuando tanto ésta como las reacciones ya estaban calientes. La enzima se calentó por separado y se añadió al final. La temperatura de alineamiento fue de 45°C durante 45 seg y se hicieron un total de 25 ciclos de 4 min cada uno a 72°C. La elongasa sintetiza aproximadamente 1kb por minuto y como el templado fue de 3.5 kb, se calcularon 4 min. Se hizo una curva de magnesio y la concentración seleccionada fue de 2 mM.

El fragmento así amplificado se digirió con las enzimas *KpnI* y *NcoI*, se purificó por agarosa de bajo punto de fusión y se clonó en el pLK6 digerido con las mismas enzimas. El

nuevo vector se llamó pLK7 y con el se hizo una reacción de secuenciación para corroborar que la fusión *catB::lacZ* estuviera en el marco de lectura correcto.

El plásmido pLK7 se digirió con *XbaI* y se le regresó el cassette *argB::CAT* obtenido del pRA42 digerido con la misma enzima. Se hizo la ligación y la transformación de *E. coli*, seguidas de minipreparaciones de plásmidos que se digirieron para seleccionar la orientación adecuada de *argB::CAT*, que es con el sentido de la transcripción de *argB* contrario al de la fusión. Este plásmido se denominó pLK8.

Como la región 5' de *catB* incluida en el pLK8 contenía el gen *treA* que codifica para la trehalasa (d'Enfert y Fontaine, 1997), se construyó el plásmido pLK9 digiriendo el pLK8 con *SphI* y religándolo. De esta forma se eliminó el gen *treA*. Para continuar el estudio de la regulación de la catalasa B, se diseñó el vector pLK10 digiriendo el pLK9 con *SphI* y *XhoI* que son enzimas de restricción que generan extremos cohesivos no compatibles por lo que éstos se hicieron romos (Sambrook *et al.*, 1989) y se religaron con el estuche de ligación de Bøehringer y de acuerdo a las especificaciones del fabricante. La nueva fusión carece de los posibles elementos de regulación detectados en la secuencia 5' de *catB* (ver figura 8 de los Resultados).

4. Transformación de *A. nidulans*.

Este procedimiento se llevó a cabo de acuerdo con Yelton *et al.* (1984). Las transformantes con las diferentes fusiones *catB::lacZ* se obtuvieron al transformar la cepa PW1 con los plásmidos pLK3, pLK9 y pLK10. En este caso, se emplearon 5 µg de DNA por transformación. Todas las transformantes se analizaron por hibridaciones tipo Southern usando el gen *argB* como sonda para seleccionar el evento deseado. En el caso de las fusiones *lacZ*, se escogieron transformantes con una sola integración en el locus *argB*. En algunos casos, las transformantes se permeabilizaron con cloroformo antes de teñirlas con X-Gal. Para ello, se puso un papel filtro humedecido con cloroformo en una caja de petri de vidrio y encima de ella se colocó la caja de petri con las transformantes que se querían permeabilizar. La incubación con cloroformo se hizo a temperatura ambiente durante aproximadamente 20 min. Transcurrido este tiempo, las transformantes se cubrieron con 10 ml de amortiguador de fosfatos 0.1M pH 7.0 que contenían 50 µl de X-Gal y se incubaron a 37°C hasta observar la tinción azul.

5. Extracción de RNA y DNA. Hibridaciones tipo Southern y Northern.

La extracción de DNA genómico de *A. nidulans* se hizo de acuerdo con Timberlake (1980). El RNA se obtuvo con el estuche RNaid Plus (Bio-101, La Jolla, Ca.). Las hibridaciones tipo Southern y Northern se hicieron de acuerdo a Sambrook *et al.* (1989).

;

RESULTADOS Y DISCUSION

Los resultados se presentan en tres capítulos que contienen:

Capítulo I. Clonación del gen *catB*, estudio sobre la regulación de la catalasa B y caracterización de mutantes dobles *catA⁻/catB⁻*.

Estos datos están reportados en el artículo:

Kawasaki, L., Wyson, D., Diamond, R. y Aguirre, J. 1997. Two Divergent Catalase Genes Are Differentially Regulated during *Aspergillus nidulans* Development and Oxidative Stress. *J. Bacteriol* 179(10): 3284-3292.

Capítulo II. Regulación transcripcional del gen *catB*.

Contiene datos aún sin publicar sobre el análisis de la región regulatoria 5' y del presunto promotor del gen *catB* derivado del estudio de fusiones entre *catB* y el reportero *lacZ*.

Capítulo III. Inmunolocalización de la catalasa B y detección de una tercera catalasa en *A. nidulans*, la cual se expresa en la fase estacionaria tardía de crecimiento.

Se presenta la evidencia experimental de que existe una tercera catalasa en *A. nidulans*, denominada catalasa C, así como también algunos aspectos sobre su regulación durante la fase estacionaria. También se incluyen los datos de inmunolocalización de la catalasa B donde se demuestra que una parte importante está asociada a la pared celular de hifas vegetativas.

Capítulo IV. Estrategias para el aislamiento de mutantes incapaces de expresar el gen *catB*.

Contiene los resultados obtenidos al mutagenizar con luz ultravioleta una cepa con la fusión *catB::lacZ*. Se presentan además algunas sugerencias para aumentar las posibilidades de aislar las mutantes desecadas y se proponen otras metodologías de selección.

Capítulo I. Resumen del artículo: “Two divergent catalase genes are differentially regulated during *Aspergillus nidulans* development and oxidative stress” (anexo).

Las catalasas son enzimas ubicuas encargadas de la desintoxicación del H_2O_2 y su papel es fundamental en la respuesta antioxidante de las células. En *Aspergillus nidulans* se han detectado dos actividades de catalasas, una de las cuales (CatA) es específica de las esporas y está codificada por el gen *catA*. En el presente trabajo, se caracterizó un segundo gen de catalasa, el cual fue identificado al hibridar una biblioteca genómica utilizando *catA* como sonda. También se demuestra que el gen clonado codifica para la catalasa B. Este gen se designó *catB* y el polipéptido deducido (CatB) a partir de la secuencia tiene 721 aminoácidos. Dicha proteína presenta un porcentaje de identidad del 78% con una catalasa de *Aspergillus fumigatus* y un 61% con CatR de *Aspergillus niger*. Cabe destacar que se encontraron niveles de identidad semejantes al comparar CatB con las catalasas HPII de *Escherichia coli* (43%), CatA de *A. nidulans* (40%) y con el polipéptido esperado a partir de la secuencia de un supuesto homólogo de *catA* de *A. fumigatus* (38%). Estas dos últimas catalasas muestran entre sí un porcentaje de identidad del 79%. La actividad de la catalasa B es apenas detectable en las esporas asexuales (conidios), desaparece después de la germinación, comienza a aumentar a las 10 h y continúa aumentando durante el crecimiento y la conidiación. El mensaje de *catB* está ausente en los conidios y su acumulación durante la germinación y el desarrollo asexual corresponde con la actividad de catalasa sugiriendo que la expresión de *catB* está regulada a nivel transcripcional. La actividad de CatA es muy abundante en los conidios y disminuye gradualmente durante la germinación y el crecimiento. Además de la regulación durante el desarrollo asexual, CatB se indujo por H_2O_2 , choque de calor, paraquat o por el catabolismo del ácido úrico, mientras que no se observó inducción por choque osmótico. El patrón de regulación y el papel protector contra el H_2O_2 que tienen CatA y CatB en diferentes etapas del ciclo de vida de *A. nidulans* sugiere que la redundancia en los genes de catalasas cumple la función de satisfacer la demanda de estas enzimas en dos estados diferentes de regulación metabólica y genética, representado por hifas en crecimiento versus esporas. El hecho de que mutantes dobles *catA*⁻/*catB*⁻ fueron capaces de crecer en sustratos cuyo catabolismo genera H_2O_2 indica la existencia de rutas alternativas de desintoxicación de dicho compuesto.

Two Divergent Catalase Genes Are Differentially Regulated during *Aspergillus nidulans* Development and Oxidative Stress

LAURA KAWASAKI,¹ DEBORAH WYSONG,² RICHARD DIAMOND,² AND JESÚS AGUIRRE^{1*}

Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510 México, D. F., Mexico,¹ and Section of Infectious Diseases, Boston University Medical Center, Boston, Massachusetts 02118-2393²

Received 9 January 1997/Accepted 10 March 1997

Catalases are ubiquitous hydrogen peroxide-detoxifying enzymes that are central to the cellular antioxidant response. Of two catalase activities detected in the fungus *Aspergillus nidulans*, the *catA* gene encodes the spore-specific catalase A (CatA). Here we characterize a second catalase gene, identified after probing a genomic library with *catA*, and demonstrate that it encodes catalase B. This gene, designated *catB*, predicts a 721-amino-acid polypeptide (CatB) showing 78% identity to an *Aspergillus fumigatus* catalase and 61% identity to *Aspergillus niger* CatR. Notably, similar levels of identity are found when comparing CatB to *Escherichia coli* catalase HPII (43%), *A. nidulans* CatA (40%), and the predicted peptide of a presumed *catA* homolog from *A. fumigatus* (38%). In contrast, the last two peptides share a 79% identity. The catalase B activity was barely detectable in asexual spores (conidia), disappeared after germination, and started to accumulate 10 h after spore inoculation, throughout growth and conidiation. The *catB* mRNA was absent from conidia, and its accumulation correlated with catalase activity, suggesting that *catB* expression is regulated at the transcription level. In contrast, the high CatA activity found in spores was lost gradually during germination and growth. In addition to its developmental regulation, CatB was induced by H₂O₂, heat shock, paraquat, or uric acid catabolism but not by osmotic stress. This pattern of regulation and the protective role against H₂O₂ offered by CatA and CatB, at different stages of the *A. nidulans* life cycle, suggest that catalase gene redundancy performs the function of satisfying catalase demand at the two different stages of metabolic and genetic regulation represented by growing hyphae versus spores. Alternative H₂O₂ detoxification pathways in *A. nidulans* were indicated by the fact that *catA/catB* double mutants were able to grow in substrates whose catabolism generates H₂O₂.

Toxic reactive oxygen species such as superoxide, hydrogen peroxide, and the hydroxyl radical are produced during normal aerobic metabolism. Virtually all aerobic organisms contain enzymatic and nonenzymatic defense systems against such forms of activated oxygen (18). Catalases (H₂O₂:H₂O₂ oxidoreductase, EC 1.11.1.6) are central components of the enzymatic detoxification pathways that prevent the formation of the highly reactive hydroxyl radical by decomposing H₂O₂. On the other hand, it has recently been shown that H₂O₂ can also perform regulatory functions in plants (23) and animals (38). Previous work has implicated reactive oxygen species in induction and control of asexual sporulation in *Neurospora crassa* (20, 41-43) and in general microbial differentiation (19). The ascomycete fungus *Aspergillus nidulans* provides an excellent tractable genetic system, with an elaborate asexual reproductive pathway (conidiation), which can be used to approach the study of general antioxidant responses and their possible roles in cell differentiation. Conidiation in *A. nidulans* can be initiated by exposing nondifferentiated mycelia to air or by nutrient starvation (36, 40). This process involves formation of spore-producing specialized structures called conidiophores, which are composed of several different cell types. Genes that play fundamental roles in this process have been identified and characterized (1, 6, 7, 9, 50; for a review, see reference 40). We have initiated the study of catalase regulation in this fungus during its asexual reproduction with the long-term goal of evaluating the role of reactive oxygen species in gene regula-

tion and sporulation. Our previous work identified two catalase activities in *A. nidulans*. Catalase B activity is present before induction of conidiation, increases its activity during conidiation, and is barely detectable in isolated spores, whereas catalase A appears at later stages of conidiation and is highly accumulated in spores. Catalase A is encoded by the *catA* gene, whose expression is induced during conidiation independently from major conidiation regulatory genes and whose mutation renders spores H₂O₂ sensitive (30). Here we characterize the catalase B encoding gene *catB* and show that it is developmentally regulated in opposite fashion to *catA*. Consistent with this, catalase B is able to provide protection against H₂O₂ to growing hyphae, independently from the presence of catalase A. In addition to its developmental regulation, catalase B is induced by H₂O₂ or H₂O₂-generating conditions. We also show that *catA/catB* double mutants can still grow in some lipids as the sole carbon source or in uric acid as the sole nitrogen source, implying the existence of alternative pathways for H₂O₂ detoxification.

MATERIALS AND METHODS

Strains, media, and transformation and growth conditions. The *A. nidulans* strains used were FGSC26 (*biA1 veA1* [Fungal Genetics Stock Center]), RMS011 (*pabaA1 va2 ΔargB upCΔB veA1 upC801* [37]), TOS1 (*pabaA1 va2 ΔargB upCΔB catA:argB veA1 upC801* [30]), TLK12 (*pabaA1 va2 ΔcatB veA1* [this work]), TLK24 (*pabaA1 va2 veA1* [this work]), CLK12 (*biA1 metG1 catA argB veA1* [this work]), CLK14 (*bi11 metG1 catA:argB ΔcatB veA1* [this work]), CLK15 (*bi11 metG1 ΔcatB veA1* [this work]), and VLA22 [*biA1 bi11c 2900 pil' lacZ (argB argB::CAT) metG1 veA1* (2)]. All strains were grown in supplemented minimal-nitrate medium (21). When fatty acids were used as sole carbon sources, they were added to nitrate medium with agar previously dissolved by heating, emulsified with a blender and autoclaved. Developmental cultures were induced as described

* Corresponding author. Phone: (525) 622-5651. Fax: (525) 622-5630. E-mail: jaguirre@ifesun1.fisiol.unam.mx.

1	GATTCGATTCGGTCCGGCCCTCCAGACCTCGCTGCTGAAGTAACTAGTGGCTCCGGCTCCGAGCTCCCGTCCCTGCCAGGTGGGCGGGCCAGGGCTC	
100	ATCAATGTGATGAAAGATGGAGGCCGTATGTGTCTCTCCAGAGACCGTCTGCTGCTCCGTTGGTATAAATACACCCCGTGGCCCTGTCTCTA	
199	CGCTAGGAATGCACGGCCGCTTTACCCGACCTCAAGCCCGACCTCCTCTGCACTTCT	
298	CATTACCTCACCATG CGA GCT CTC GGC CTG GTC GGC CTT GTT GGC GTC GCC AAT GCC GTC TGT CCG TAT ATG ACA GGC	22
	M R A L G L V G L V G V A N A V C P Y M T G	
376	GAG CTC GGC CGT CGC GAT ACC AAC CCC GAT GGT ACC GAG GCC ACT GAG GAA TTT CTG TCC GAG TAC TAC CTT GAC	47
	E L G R R D T N P D A T E A T E E F L S E Y Y L D	
451	GAC ACG GAC TCG TAC CTG ACG ACT GAC GTC GGC CCA ATT GAG GAC CAG CAG AGT CTC AAG GCC GGT CGC CGC	72
	D T D S Y L T D V G G P I E D Q Q S L K A G A R	
526	GGG TCT ACC CTG CTG GAA GAC TTT ATC TTC CGT CAG AAG ATC CAG CGA TTC GAC CAC GAG CGG <u>gtsagtactgagga</u>	93
	G S T L L E D F I F R Q K I Q R F D H E R	
604	ctcttcaattgtcgattgaaacgcttggatgctgactgagcag GTC CCC GAG CGT GCC GTC CAT GCT CGG GGT GCA GGT GCC CAC	107
	V P E R A V H A R G A G A G A H	
688	GGT GTC TTC ACC TCG TAC GGC GAC TTC TCC AAC ATC ACC GCC GCC TCC TTC CTC TCT GCT GAG GGT AAG GAG ACC	132
	G V F T S Y G D F S N I T A A S F L S A E G K E T	
763	CCC GTC TTC CTC CGG TTC TCG ACC GTC GCC GGC AGT GGC AGT TCT GAC CTC GCC CGC GAT GTC CAC GGT TTC	157
	P V F V R F S T V A G S R G S S D L A R D V H G F	
838	GCC ACC CGC TTT TAC ACT GAC GAG GGC AAC TTT GAT ATC GTC GGT AAC AAC ATT CCC GTC TTT TTC ATC CAC GAT	182
	A T R F Y T D E G N F D I V G N N I F V F F I Q D	
913	GCC ATC CAG TTC CCC GAC CTG ATC CAC GCC GTC AAG CCC AAG GGC GAT CGT GAA ATC CCC GAC GCT GCC ACC GCC	207
	A I Q P P D L I H A V K P K G D R E I P Q A A T A	
988	CAT GAC GCC CGC TGG GAT TTC TTC AGC CAG CAG CCC TCG ACT CTT CAC ACC CTG CTC TGG GCC ATG GCC GGT CAC	232
	H D A A W D F F S Q Q P S T L H T L L W A M A G H	
1063	GGT ATC CCG GAT TCG TTC CGC CAC GTC GAT GGG TTC GGT GTG CAC ACT TTC CGG CTC GTC ACG GAG GAT GGC TCC	257
	G I P R S F R H V D G P G V H T F R L V T E D G S	
1138	ACC AAG CTC GTC AAG TTC CAC TGG AAG ACC CTG CAA GGT TTG GCA AGT ATG GTC TGG GAG GAA GCT CAG CAA ATT	282
	T K L V K F H W K T L Q G L A S M V W E E A Q Q I	
1213	TCT GGC AAG AAC CCC GAC TAC ATG CGC CAG GAT CTG TTC GAG TCG ATT GAG GCT GGC CGG TAC CCT GAG TGG GAG	307
	S G K N P D Y M R Q D L P E S I E A G R Y P E W E	
1288	<u>gtatggtaccacctatttctactacatagcgaagatggttactgaccggcag</u> CTT AAC GTG CAA ATC ATG CAC GAG GAG CAC	318
	L N V Q I M D E E D Q	
1374	TTG CGC TTT GGC TTC GAC CTT TTC GAC CCT ACC AAG ATT GTC CCT GAG GAA TAC GTC CCA TTG ACC CCG CTG GGC	343
	L R F G F D L F D P T K I V P E E Y V P L T P L G	
1449	AAG ATG ACC CTC AAC CGC AAC CCC CGC AAC TAC TTT GCG GAG ACT GAG CAG GTC ATG <u>gtaggttctctctctctctctctct</u>	362
	K M T L N R N P R N Y F A E T E Q V M	
1528	tgtatccctctcttttgcggtttcttaacagtaacag TTC CAA CCC GGC CAC GTC GTG CGT GGT GTT GAC TTC ACC GAG GAT CCC	378
	F Q P G H V V R G V D F T E D P C	
1611	CTT CTT CAG <u>gtaggcggcgagcgacaaactttttgtcttttttactaagctgactcgaagcag</u> GGA CGT CTT TTC AGC TAC CTT	388
	L L Q G R L F S Y L	
1697	GAC ACC CAG CTC AAC CGC AAT GGT GGC CCG AAC TTT GAG CAG TLG CCC ATC AAC CAG CCG CCG GTT GCT ATT CAC	413
	D T Q L N R N G G G P N F E C Q L P I N A Q P R V A I H	
1772	AAC AAC AAC CGT GAC GGT GCT GGC CAC ATG TTC ATT CCG CTG AAC CCC GAT GCG TAC AGC CCC AAC ACG CTG AAG	438
	N N N R N D G A G Q M F I P L N P D A Y S P N T L K	
1847	GGA TCA ACC CTC AAA CAG GCC AAC CAG ACT GCG GGT CCG GGA TTC TTT ACT GCT CCT GAC CGT ACT GCC AAC GGC	463
	G S T L K Q A N Q T A G R G F P T A P D R T A N G	
1922	AAT CTT GTG CGT GCC AAG AGC TCC ACC TTC GAT GAT GCT TGG TCG CAG CCC CGG CTT TTC TGG AAC TCT CTT	488
	N L V R A K S S T P D D A W S Q P R L F W N S L L	
1997	CCC GCC GAG AAG CAG TTC GTG GTC AAC GCC ATT CGC TTC GAA AAC GCC AAT GTG AAG AGC GAT GTC GTG AAG AAC	513
	P A E K Q F V V N A I R F E N A N V K S D V V K N	
2072	AAC GTC ATC GTT CAG CTT AAT CGA ATC TCG AAC GAC CTT GCC ACC CGC GTT GCC AAG GCC ATC GGT GIT GAT GCT	538
	N V I V Q L N R I S N D L A T R V A K A I G V D A	
2147	CCC GAG CCC GAC AAC ACT TAC TAC CAC GAC AAC ACG ACC TCC AAC ATC GGT GCG TTT GGC CAC CGA CTG CAG AGC	563
	P E F D N T Y H D N T T S N I G A F G H R L Q S	
2222	TTG GCT GGC CTG AAG ATT GGC GTA CTT GCT TCT GTT GAC GCA GAG GAA TCC TTC AGC GCG GCT ACT GCT CTG AAG	588
	L A G L K I A V L A S V D A E E S F S A A T A L K	
2297	GCC GAG CTC TCC AAC GAC AAC CTG GAC GTC ATT GTC GTC GGT GAA CGC TTC TCC AAC GGC GTG AAC CAG ACC TAC	613
	A E L S N D N L D V I V V A E R P S N G V N G T Y	
2372	TCT GCC TCT GAC GCC ATT CAG TTT GAC GCC CTC GTT GTC GCT GGT GGC CCG GAG AAG CTC TTC GGT GAC TCC	638
	S A S D A I Q F D A V V A P G A E K L F G A K S	
2447	GCG GCC AAC TCC AGC TCA ACC CTC TAC CCT GCC GGC CGT CCC CTC GAA ATC CTC GTT GAT GCT TTC GCG TTC GGT	663
	A A N S S S T L Y P A G R P L E I L V D A P R F G	
2522	AAG CCA GTC GCT GCT CTT GGC AGC GGC TCC ACT GCT TTC GAC AAC OCT GGT ATC AAC ACC GCC GTC GAG GGC GTG	688
	K P V A A L G S G S T A F D N A G I N T A V E G V	
2597	TAC GTT GCC GAT GCC GTG GAC GAG ACT TTT GCC AAC AAC CTC GAG GAG GGT CTG ACC GTG TTC AAG TTC TTT GAT	713
	Y V A D A V D E S F A N N L B E G L T V P K F L D	
2672	CGC TTT GCC CTG GAC TCG GAA TAG ATGTAGAAAGAGACTAGCCGAGAGCTTATCTGTATAGATAATATATTTATTTATTTGCA	721
	R F A L D S D E *	
2762	TTTTCAAATTTGACAAACTGTCTATAATCGTCACTGGTGGCATTTTATCGGATTTTATAGTGTAGATTTTCATGCTGAGGGCCGCTATATTTCTGAC	
2861	GTTTGTCTCACTGCATGATTTCTAATCATCACACCACATAAGCCTAGATGAGTCCAAAACACATTATCACACATTATCAATTTGAACCGTAAAGCGGT	
2960	AGTTGARC	

FIG. 1. *catB* nucleotide and predicted polypeptide sequences. A potential TATA box and consensus splice signals are underlined.

before (2) Strain RMS011 was transformed with plasmid pLK2 linearized with *Pst*I by using standard techniques (49).
Catalase induction by different types of stress and H₂O₂ sensitivity assays. The *catA* minus strain TOS1 was used to study catalase B induction by different types of stress. Liquid cultures inoculated at a density of 9 × 10⁷ spores/ml were grown for 8 h at 37°C and 300 rpm before the different treatments. Paraquat and H₂O₂ were added as concentrated solutions to final concentrations of 5 and 0.5 mM, respectively, the second being added after the first 8 h of growth and then 30, 60, and 90 min later. For growth in ureic acid, mycelia were filtered through a nitrocellulose membrane and then transferred to media containing ureic acid (0.8 mg/ml) as a sole nitrogen source. Heat shock was performed by shifting an 8-h culture to 42 or 50°C. Cultures were incubated for 2 h and in some cases for 3, 4, and 5 h under indicated conditions. Mycelia were harvested and frozen with liquid nitrogen. Ground lyophilized mycelia were used to prepare protein ex-

tracts and to determine catalase activity in native gels (30) or by using a Clark oxygen electrode as reported previously (reference 11 and see below).
 A reproducible assay was developed for testing of H₂O₂ sensitivity in solid media. Such testing in liquid cultures was precluded by the early aggregation of spores during germination and by the formation of mycelial pellets of heterogeneous size at later stages of growth. Preliminary experiments following O₂ evolution (bubbling) by individual colonies of a *catA* mutant, overlaid with 20 mM H₂O₂ solutions, determined that 30 h was the appropriate time to carry out the H₂O₂ sensitivity assay. At that time, catalase B activity was readily detectable, colonies were not yet hydrophobic and could be easily covered by the H₂O₂ solutions, and conidiation had not started, thus preventing catalase A interference when using *catA*⁻ strains.
 Conidia from strains TJA22, CLK12, CLK14, and CLK15 were inoculated onto petri dishes to a final density of 200 to 400 colonies per dish. After incu-

CatAm	atsiTaqlQk	AQgavqdtat	knkkivldish	dtvvhvTbqe	qrTdfGvaIt	Dpdhwlrvtn	100
AFU87630m	atkiagGhLr	AQEvlqntes	kkkkivldLer	dtadahTgqp	LTfDdGvrVs	ntdgwlrvtn	
CatBmraIgl	vgIvGVaAV	CPYMTGELg	rRD...tnpDa	teatEeflSe	.yIldnDTSy	LTfDdGvPIE	DQqSL....k
AFCATGENEmrltFi	PelIiGVANAV	CPYMTGELn	rrDeisddDa	aaatEeflSq	.yIldnDTSy	MtSdvGgPIE	DQnSL....x
CatRmrhfwLi	PavaGIAGaQ	CFYLsGEmef	tQEeqdnagDT	ievTEqpIdn	tIvvdTgSy	MTfDfGtPIs	DQtSL....x
HPII	msqhnekph	qhqsplhdas	eakpgmdsLa	PedgshrpAa	sPtpPgagqt	ApgsIkepDT	rnakInSLed	vrkgsEnyal
Consensus	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
CatAm	ethsGPeLLE	DhIaerIthR	FDHERIPERV	VHARGtGAYg	nFTIkesied	lTyAgvLtDt	srtNPVfVRF
AFU87630m	drtrGPeLLE	DqIaerKIhR	FDHERIPERV	VHARGtGAYg	nFkIkesied	lTyAgvLTDt	srtNPVfVRF
CatBmraIgl	AGaRgTLLLE	DFIFRqKIQR	FDHERVPERA	VHARGAGAhg	VFTSYgdFSn	ITAAsFLSae	gKeTPVfVRF
AFCATGENEmraIgl	AGeRgPTLLE	DFIFRqKIQR	FDHERVPERA	VHARGAGAhg	VFTSYgdFSn	ITAAsFLake	gKqTPVfVRF
CatRmraIgl	AGPRGPTLLE	DFIFRqKIQR	FDHERVPERV	VHARGAGAYg	tFkSYadWSn	VTAAdFLSan	dKeTPmPcRF
HPII	msqhnekph	qhqsplhdas	eakpgmdsLa	PedgshrpAa	sPtpPgagqt	ApgsIkepDT	rnakInSLed	vrkgsEnyal
Consensus	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
CatAm	DIVGNnIPVF	FIQDAIKFPD	FVHAVKPEPH	NEVPOAQTAH	nnfWDFvylh	PEatHmFMWA	MSdRaIPRSY
AFU87630m	DIVGNnIPVF	FIQDAIKFPD	FVHAVKPEPH	NEVPOAQTAH	nnfWDFvylh	PEatHmFMWA	MSdRaIPRSY
CatBmraIgl	DIVGNnIPVF	FIQDAIKFPD	FVHAVKPEPH	NEVPOAQTAH	nnfWDFvylh	PEatHmFMWA	MSdRaIPRSY
AFCATGENEmraIgl	DIVGNnIPVF	FIQDAIKFPD	FVHAVKPEPH	NEVPOAQTAH	nnfWDFvylh	PEatHmFMWA	MSdRaIPRSY
CatRmraIgl	DIVGNnIPVF	FIQDAIKFPD	FVHAVKPEPH	NEVPOAQTAH	nnfWDFvylh	PEatHmFMWA	MSdRaIPRSY
HPII	msqhnekph	qhqsplhdas	eakpgmdsLa	PedgshrpAa	sPtpPgagqt	ApgsIkepDT	rnakInSLed	vrkgsEnyal
Consensus	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
CatAm	lGvHsLVWDE	AlKLgGqDP	FHRkDLmEAI	DnkayPKWDF	AIQaipEEDQ	dkFeFDlFDa	TKVvPEEgVP
AFU87630m	lGvHsLVWDE	AlKLgGqDP	FHRkDLmEAI	DnkayPKWDF	AIQaipEEDQ	dkFeFDlFDa	TKVvPEEgVP
CatBmraIgl	QGLASMVWEE	AQqIsGKnPd	YmRQDLFEai	EaGrYPkWel	nVQImDEEDQ	LRfGFDLFD	TKIVPEEYVP
AFCATGENEmraIgl	QGLASMVWEE	AQqIsGKnPd	YmRQDLFEai	EaGrYPkWel	nVQImDEEDQ	LRfGFDLFD	TKIVPEEYVP
CatRmraIgl	QGVASLVWDE	AQaaAGKnPd	YHRQDLYnAm	pnGhYPkWel	qAQImDEEdm	LRfGFDLFD	TKIVPEEYVP
HPII	msqhnekph	qhqsplhdas	eakpgmdsLa	PedgshrpAa	sPtpPgagqt	ApgsIkepDT	rnakInSLed	vrkgsEnyal
Consensus	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
CatAm	VPGIDfSDDP	LLQGRnFSYQ	DTQISRL.Gv	NWEiPIINRP	vCPfInhNRD	GakhrIItkg	tvnyWPNrFe
AFU87630m	VPGIDfSDDP	LLQGRnFSYQ	DTQISRL.Gi	NWEiPIINRP	vCPfInhNRD	GakhrIItkg	tvnyWPNrFe
CatBmraIgl	VrGvDfTDDP	LLQGRnFSYQ	DTQInRhGGP	NFEqIPIInG	RvAIhNNNRD	GAGqMfIPIIn	PdaYsPntLk
AFCATGENEmraIgl	VrGvDfTDDP	LLQGRnFSYQ	DTQInRhGGP	NFEqIPIInG	RvPVhNNNRD	GAGqMfIPIIn	PhaYsPntLk
CatRmraIgl	VPGIDfSDDP	LLQGRnFSYQ	DTQInRhGGP	NFEqIPIInG	RkPVhNNNRD	GfGqqqIPcN	nwaYtPNSMa
HPII	msqhnekph	qhqsplhdas	eakpgmdsLa	PedgshrpAa	sPtpPgagqt	ApgsIkepDT	rnakInSLed	vrkgsEnyal
Consensus	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
CatAm	ltpkFkEYhn	QaGLFYNSLs	evEXvHVkka	sFSEldhced	PIVvYerlaq	rLaeIDlPLA	QvAemVGAP
AFU87630m	lndkFrEhnn	QaGLFYNSMs	ehERLhmKka	sFSEldhced	PtVvYerlaq	rLaeIDLELA	QvAemVGAP
CatBmraIgl	ksatFndDWS	QPRLFNSVl	PAERQIVVna	irFEnanVks	dVvKnnVlQq	.LnrIsnDLA	tRVAKaIGVD
AFCATGENEmraIgl	vsasFndDWS	QPRLFNSVl	PAERQIVVna	irFEnanVks	PVvKnnVlQq	.LnrIDnDLA	tRVARaIGVa
CatRmraIgl	tSPtFndDWS	QPaMFWNSL	PAEQmVVna	lvFEnskVns	PhvkrnVnVnQ	.LnmVnnnLA	vRVArgIGLD
HPII	msqhnekph	qhqsplhdas	eakpgmdsLa	PedgshrpAa	sPtpPgagqt	ApgsIkepDT	rnakInSLed	vrkgsEnyal
Consensus	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
CatAm	pgIasrRIAI	IlgDgyDkIA	IngmkaAIIA	aaSaplrhwh	qtsaIYAqGe	dknasqgVip	DhmyDgmret
AFU87630m	ptIasrRIAI	IlgDgyDpva	StgkItAIKA	aaIpfIigt	krasIYA.te	dktsakgIip	DhhYDgqrst
CatBmraIgl	qslGLkIAV	L...sVSDaeE	SfsaatALKA	eLSDnldlvi	vVaeRfSngv	ngTYaasDAI
AFCATGENEmraIgl	kkldGkIVgV	L...sVqghpG	SfegastLrd	rIkdgdvDlv	lvAeRlADGv	DqTYastDAI
CatRmraIgl	lsteGkIVgV	L...sVshpE	SikggqAMAA	qFSaagVdn	lvEsaYADGv	ntTYalSdaI
HPII	msqhnekph	qhqsplhdas	eakpgmdsLa	PedgshrpAa	sPtpPgagqt	ApgsIkepDT	rnakInSLed	vrkgsEnyal
Consensus	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
CatAm	ghIkaLgagM	eaavIvKEtL	sgtIhVqVas	ads.....Ae	pVewygvVta	rgpesaESLs	EgFkvIkdAg
AFU87630m	ghIkaLgagM	eaavIvKEtL	sgtIhVqVas	ads.....pe	pVewygvVta	gqkqkPEsPk	EsvqIkgAt
CatBmraIgl	neaStLYpTg	RPLeIIVDaf	RFGKPVAAIG	SGStAFnDAG	IntavEGVYV	ada.vdESFA	nnLeEgltvF
AFCATGENEmraIgl	sgasStLYpTg	RPLQILIdgF	RFGKtVgAlG	SGtaALrNAG	IatSrDGVYV	ads.vdDdFA	nDLkEgltvF
CatRmraIgl	tsStLYpPa	RPQIIVDaf	RyGKPVAAvG	SGSvALKnAG	IdasrGvYt	gssetEklIA	kEvIEgltvF
HPII	msqhnekph	qhqsplhdas	eakpgmdsLa	PedgshrpAa	sPtpPgagqt	ApgsIkepDT	rnakInSLed	vrkgsEnyal
Consensus	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

FIG 2. Comparison of *A. nidulans* CatB with highly similar catalases. CatB was aligned with *A. niger* CatR (16), *E. coli* HPII (46), *A. nidulans* CatA (30), and the *A. fumigatus* catalases deduced from sequences AFU87630 (Wysong et al., GenBank accession number US7630) and AFCATGENE (Takahashi et al., GenBank accession number Y07763); the nearly identical catalase sequence AFU87850 has been reported by Wysong et al., GenBank accession number US7850, using the GCG programs PILEUP and PRETTY (13). Capital letters represent identical or conserved amino acids in at least three of the sequences. Consensus sequence shows identical amino acids in all catalases.

bation at 37°C for 30 h, colonies were overlaid with a solution of H₂O₂ at concentrations ranging from 10 to 20 mM, for 10 min. After such treatment, the solution was carefully decanted and colonies were incubated further for 26 h at 37°C. Colonies able to resume growth and to sporulate after H₂O₂ treatment were counted as survivors.

catB cloning, cosmid identity, plasmid construction, sequencing, and sequence comparisons. A *Pst*I *catA* fragment was removed from pCAN5 (30) and further digested with *Nhe*I to obtain an internal *catB* 800-bp fragment, which was used to probe an *A. nidulans* chromosomal-specific cosmid library (5) under low stringency conditions. Cosmids W7C08, W15C07, and W19D03, previously assigned to chromosome VIII, were identified. A *catA*-hybridizing *Eco*RI-*Hind*III 7.5-kb fragment from cosmid W7C08 was cloned into pBluescript SK+ (Stratagene) to generate pDW1. Finally, a 2.6-kb *Pvu*II-*Sal*I fragment from pDW1 was subcloned into pBluescript SK+ to generate pDW2. DNA sequencing was carried out by the dideoxy chain termination method of Sanger et al. (32). Both strands were sequenced by using pDW2 as a template and with specific oligonucleotide primers. Sequence similarity, identity, and catalase alignments were done with the Genetics Computer Group (GCG) programs FASTA, GAP, PILEUP, and PRETTY (version 8.0) by using default parameters (13).

A. nidulans physical maps were consulted at Internet http://fungus.genetics.uga.edu:5080/physical_maps.html

The plasmid pLK2, used to disrupt *catB* was constructed in two steps. First the *Bam*HI site present at the polylinker of pDW2 was removed by digestion with

*Sma*I-*Not*I, filling in, and blunt-end ligation (31) to generate pLK1. Second, the *catB* *Bam*HI-*Eco*RV fragment present in pLK1 was substituted with a *Bam*HI-*Nru*I fragment from pDC1 (3), containing the *A. nidulans* *argB* gene as a selective marker, to generate pLK2.

Hybridization analyses and nucleic acid isolation. Genomic DNA was isolated as described by Timberlake (39). Total RNA was obtained with the RNaid Plus kit (Bio-101, La Jolla, Calif.). RNA was fractionated in formaldehyde-agarose gels, transferred to Hybond-N nylon membranes, and hybridized as described by the manufacturer (Amersham). The *Pvu*II-*Sal*I fragment from pDW2 was used as the *catB*-specific probe, and the *Bam*HI-*Nru*I fragment from pDC1 was used as the *argB*-specific probe. Both were labeled with ³²P by using the BRL random priming labeling system.

Catalase activity determination. Native polyacrylamide gels were prepared with an 8% resolution gel and a 5% stacking gel, and 25 to 40 µg of total protein was loaded. The gels were run at 100 V for 3.5 h in a Miniprotein II cell (Bio-Rad), and catalase activity was detected as described before (8, 30). Direct catalase activity was determined by measuring initial rates of O₂ production with a microClark electrode. The reaction was started by injecting protein extracts into a sealed chamber filled with 2 ml of 50 mM phosphate buffer, pH 7.2, and 10 mM H₂O₂ (11).

Nucleotide sequence accession number. The GenBank accession number for the sequence shown in Fig. 1 is U80672.

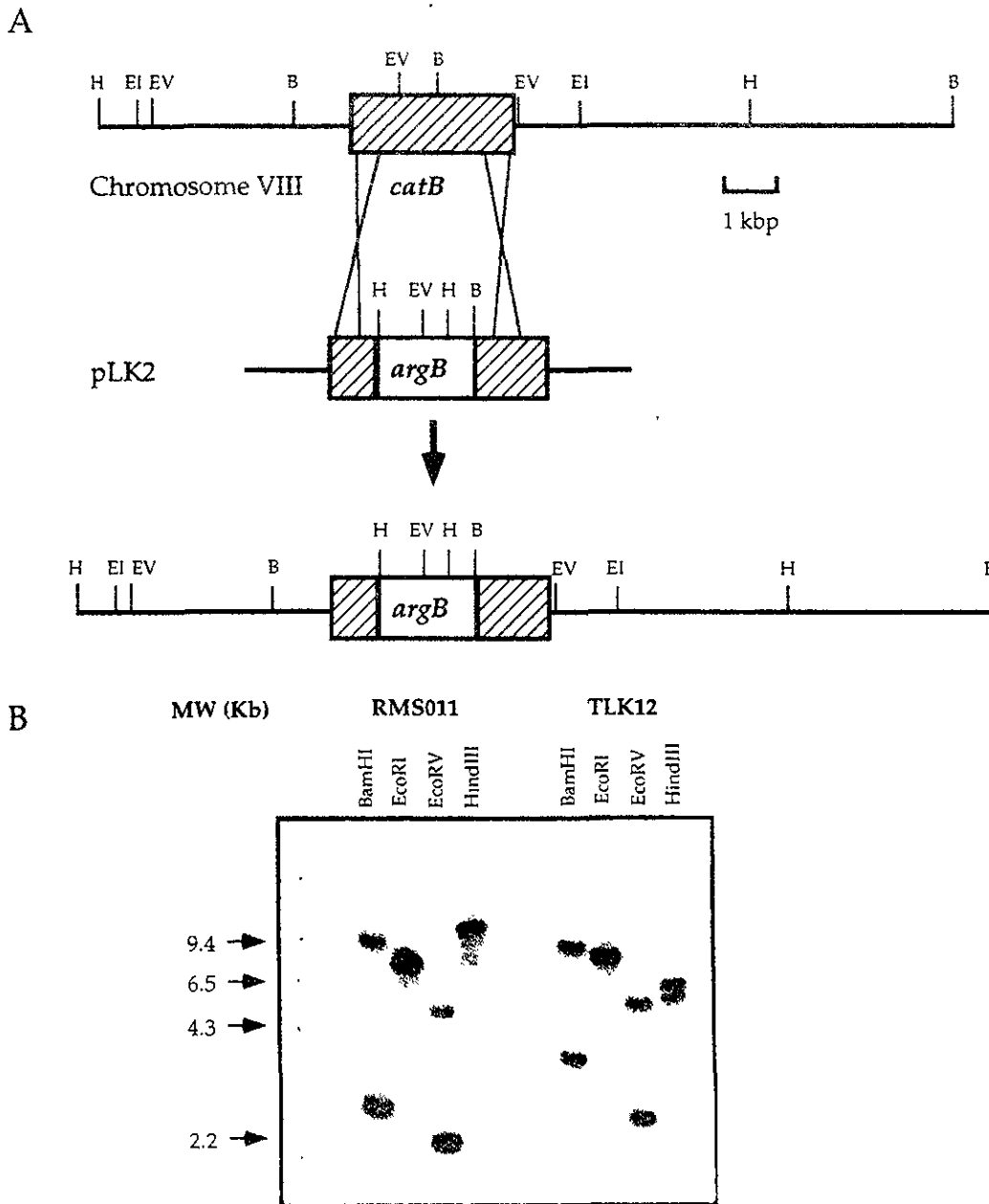


FIG. 3 Disruption of the *catB* gene (A) Plasmid pLK2 was constructed by removing a central region from *catB* (amino acids 170-376 from putative polypeptide) and replacing it with the *argB* gene as a selectable marker. Linear pLK2 was used to transform the *argB*-deleted strain RMS011 to arginine independence. Restriction sites: B, *Bam*HI; EI, *Eco*RI; EV, *Eco*RV; H, *Hind*III. (B) Total DNA from strains RMS011 and TLK12 was digested with the indicated restriction enzymes and used for Southern blot analysis using the *Pst*I-*Sal*I *catB* fragment from pDW2 as a probe. Probing with the *argB* gene (not shown) gave results also consistent with the integration event shown in panel A.

RESULTS

Cloning, nucleotide sequence, and comparison of a second *A. nidulans* catalase gene. We have previously shown that the *A. nidulans catA* gene encodes a spore-associated catalase. Disruption of *catA* did not affect the activity of a second catalase, designated catalase B, whose activity was detected at 18 h of growth and increased during asexual sporulation (30). To isolate the catalase B corresponding gene, we used a *catA* radiolabeled probe to hybridize against an *A. nidulans* chromosome-specific cosmid library (5). Cosmids W7C08, W19D03, and W15C01 were identified. These cosmids were previously as-

signed to chromosome VIII, cosmid W15C01 being part of a contig that includes the genes *facB* and *palB* (47) (see Materials and Methods). Restriction analysis of the three cosmids indicated that they represented the same genomic region. A 2.6-kb *Pst*I-*Sal*I *catA*-hybridizing fragment from cosmid W7C08 was subcloned and fully sequenced.

Sequence analysis revealed an ATG-initiated open reading frame interrupted by four putative introns, predicting a 721-amino-acid polypeptide ($M_r = 79,143$) with significant similarity to catalases from many different organisms, including *A. nidulans* CatA. We therefore provisionally named this gene

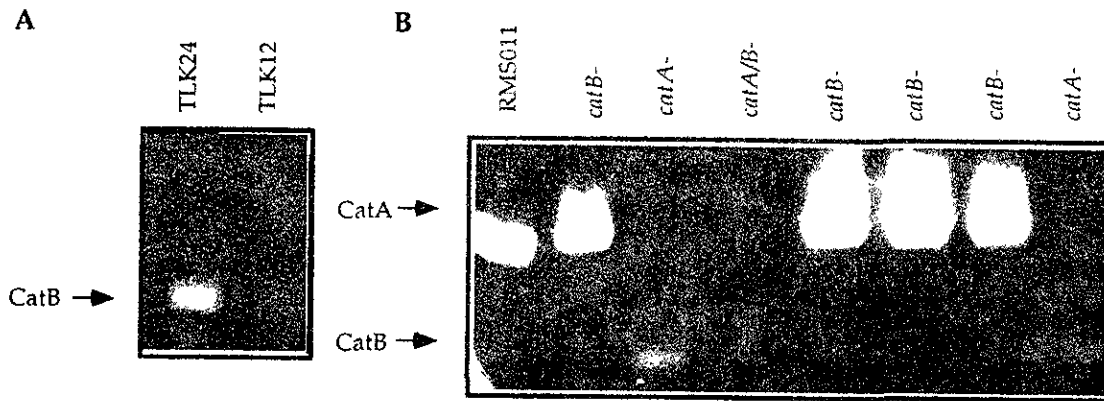


FIG. 4. *catB* disruption eliminates catalase B activity. (A) Protein extracts from 18-h-grown mycelia were prepared from the wild-type strain TLK24 and from *catB*-disrupted strain TLK12. Proteins were fractionated in native polyacrylamide gels and used to determine catalase activity. (B) Conidial protein extracts were prepared from randomly selected progeny from a sexual cross between TLK12 and the *catA* mutant strain CLK12 and processed for catalase activity determination as before. Conidia from strain RMS011 were included as a reference.

catB, and the corresponding predicted polypeptide was named CatB (Fig. 1). Alignment of CatB to several catalases (Fig. 2) indicated that CatB shows ~78% overall identity to the catalase deduced from the two nearly identical *A. fumigatus* sequences AFCATGENE (Takasuka et al., GenBank accession number Y07763) and AFU87850 (Wysong et al., GenBank accession number U87850) and a 61% identity to the *Aspergillus niger* CatR (16). Whereas in most reported catalases, the highly conserved regions lay in the central portion of the proteins, CatB, the predicted peptide from AFCATGENE/AFU87850, and CatR also share amino acid sequences at their amino- and carboxyl-terminal ends (Fig. 2), such as the sequences GxAXxCPYxxGE and FxTxDRFxxD, respectively (x representing nonidentical amino acids). Comparisons of CatB to CatA (30) and *Escherichia coli* HPII (46) catalases indicates that CatB is as similar to the other *A. nidulans* catalase (40% identity) as it is to the prokaryotic catalase HPII (43% identity). In contrast, CatA shares a 79% identity with a second *A. fumigatus* catalase (Fig. 2) deduced from sequence AFU87630 (Wysong et al., GenBank accession number U87630). Moreover, the position conservation of the only *catA* intron (30) and the first putative AFU87630 intron strongly suggests that these genes are homologs.

Assuming that the *catB* intron positions are confirmed experimentally, the precise conservation of intron I position between *catB*, AFCATGENE, and *catR* also favors the idea that these three genes are homologs. The six catalases compared here constitute the largest reported known sequences and the ones sharing the highest similarity.

The *catB* gene encodes catalase B. To find out if the cloned *catB* gene (Fig. 1) encoded the previously detected catalase B (30), we designed plasmid pLK2 by replacing the most conserved region of the putative *catB* open reading frame (amino acids 170 to 376 deleted) by the *argB* gene, and we used this plasmid to transform an *A. nidulans argB*-deleted strain to arginine independence. Figure 3A shows the event expected upon integration of pLK2 at *catB*. Figure 3B shows a Southern blot analysis of transformant TLK12, containing a single copy of plasmid pLK2 integrated at *catB*. The band pattern was fully consistent with the predicted integration event. Protein extracts from 18-h-grown mycelia from this and other transformants were analyzed for catalase activity in native gels. Figure 4A shows that the band of activity corresponding to catalase B was missing in transformant TLK12, demonstrating that *catB* encodes catalase B. When *catB* mutant strain TLK12 was

crossed to a *catA* mutant strain, recombination of both mutations was observed (Fig. 4B), in agreement with the different chromosomal locations of the genes.

Catalase B activity is regulated during the *A. nidulans* life cycle. We reported that catalase B activity was present in cultures approaching the stationary phase of growth (18 h), increased gradually during sporulation, and was barely detectable in asexual spores (30). We investigated if there was correspondence between enzyme activity and the *catB* mRNA levels during sporulation. A Northern blot analysis using RNA from developmental cultures and isolated spores, and using *catB* as a probe, is shown in Fig. 5A. *argB* probing of the same membrane was used as a reference for RNA loading. Normalized *catB/argB* pixel ratios of digitized images gave values of 1, 1.3, 1.8, 0.7, and 0.08 for 0, 6, 12, and 25 h of conidiation and for purified conidia, respectively. This indicates that, except for the 25-h point, where a slight decrease is detected, the *catB* mRNA levels correspond with the catalase activity found previously at the same times of development; i.e., *catB* mRNA is accumulated in 18-h growth samples and during conidiation and is virtually absent from purified spores. This pattern of accumulation implied that *catB* mRNA had to accumulate sometime between spore germination and 18 h of growth. When catalase activity was monitored during spore germination and growth, the catalase A activity which had accumulated in spores was gradually lost and barely detectable by 10 h. At that time, catalase B activity started to increase, after being virtually lost by 4 h of germination (Fig. 5B). Under these conditions, catalase B activity was also correlated with the *catB* mRNA levels (Fig. 5C).

These results indicate that catalase B is developmentally regulated during the *A. nidulans* asexual cycle, in opposite fashion to catalase A during the growth phase. They also indicate that catalase B activity is regulated at the transcript accumulation level.

Nondevelopmental regulation of catalase B and function. To explore if catalase B was also regulated in response to different types of stress, we determined catalase B activity in a *catA* mutant subjected to different types of stress. Since a slight induction of catalase B was detected between 6 and 10 h of growth (Fig. 5B), an intermediate time of 8 h was selected to evaluate the effects of the different stimuli, so that even low levels of induction would be easily detectable. Heat shock (42 and 50°C), osmotic stress (1 M sorbitol, 100 mM LiCl), H₂O₂,

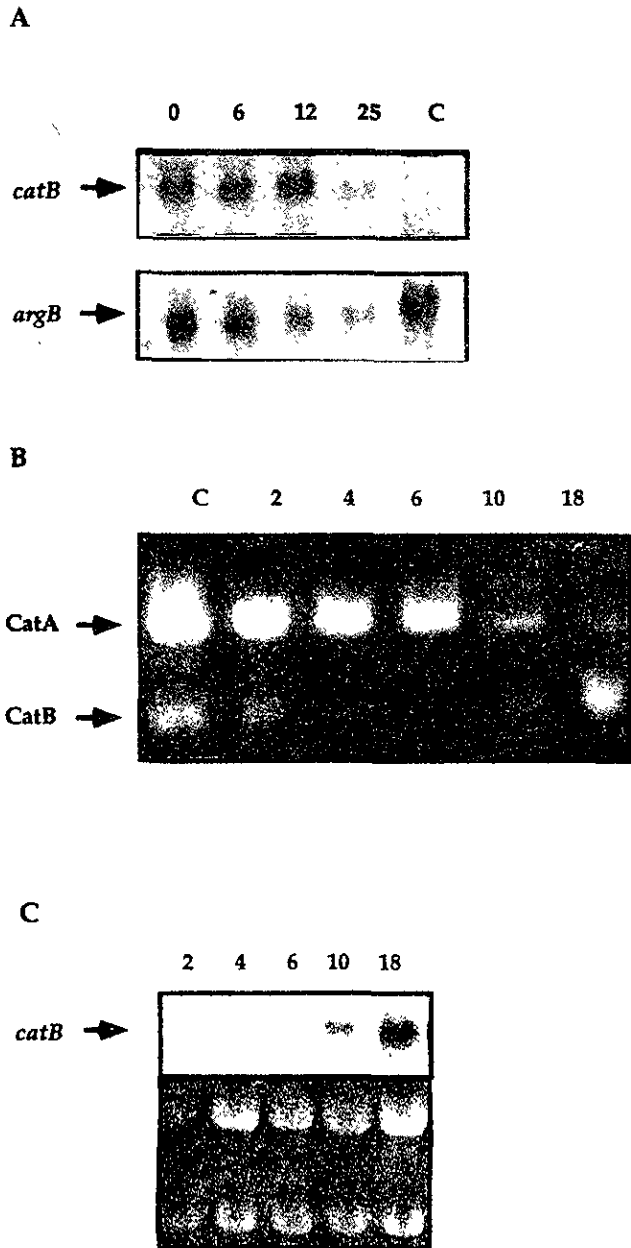


FIG. 5. Developmental regulation of *catB*. (A) Total RNA extracted from 18-h-grown mycelia (0), from mycelia induced to conidiate for the indicated times (hours), or from isolated conidia (C) was fractionated in formaldehyde-agarose gels, transferred to a nylon membrane, and hybridized with the *Pst*I-*Sal*I *catB* fragment from pDW2. The same membrane was hybridized with an *argB*-specific probe as a loading control. The different times of development correspond to the following morphologies: 0 h of development (18 h of growth), growing hyphae; 6 h, conidiophore stalks; 12 h, conidiophores and immature conidia; 25 h, mature conidiophores and conidia. (B) Purified conidia (C) were used to inoculate a liquid culture and harvested at the indicated times (hours). Resulting samples were processed for catalase activity determination as indicated before. The different times of development correspond to the following morphologies: conidia (C), latent ungerminated spores; 2 h, swollen conidia; 4 h, swollen conidia with short germ tubes; 6 h and 10 h, actively growing hyphae; 18 h, prestationary phase of growth. (C) Part of the samples obtained in panel B were used for total RNA extraction and Northern blot analysis as indicated before. The bottom part of the figure shows rRNA bands in the ethidium bromide-stained gel used to prepare the blot.

(0.5 mM), the superoxide-generating compound paraquat (5 mM), and growth in uric acid as the sole nitrogen source were tested. The last treatment was included because uric acid catabolism produces H_2O_2 (33).

Figure 6 shows that uric acid, paraquat, and H_2O_2 were able to induce catalase B 2.1-, 13.2-, and 8.4-fold, respectively, compared with nontreated cultures. In contrast, catalase A was not induced by these treatments (30a). Heat shocks (2 h) of 50 or 42°C (not shown) and osmotic shock treatments failed to induce catalase B. However, when these treatments (42°C, 1 M sorbitol or 100 mM LiCl) were monitored for 3, 4, and 5 h, only the heat shock was able to induce catalase B 3.2-, 2.3-, and 1.8-fold, respectively.

An assay was developed (see Materials and Methods) to test if catalase B was able to provide protection against H_2O_2 . We grew otherwise isogenic *catA*, *catB*, and *catA/catB* double mutants in petri dishes for 30 h and then covered the resulting colonies with H_2O_2 solutions at different concentrations for 10 min. After the H_2O_2 solutions were removed, incubation was continued and the surviving colonies were counted after 26 h.

Results in Fig. 7 show that virtually all *catB* mutant colonies were killed by 15 to 20 mM H_2O_2 , while the *catA* mutant and wild-type strains were practically unaffected by the same H_2O_2 concentrations. In contrast, spores from *catA* mutants were dramatically sensitive to H_2O_2 (30). Other than this sensitivity to H_2O_2 , no obvious sporulation phenotype was detected for the *catB* or *catA/catB* mutants. These results show that both catalase B and catalase A provide protection against H_2O_2 treatment at different phases of the *A. nidulans* asexual cycle.

Alternative H_2O_2 detoxification pathways in *A. nidulans*. To explore the role of *CatA* and *CatB* in conditions where H_2O_2 is physiologically generated, we decided to test the growth response of *catA*, *catB*, and *catA/B* mutants in substrates that generate H_2O_2 . Uric acid utilization as the sole nitrogen source (33) induced *CatB* (Fig. 6). Fatty acid catabolism is another condition that generates H_2O_2 through peroxisomal β -oxidation. In fact, the catalase inhibitor 3-aminotriazole has been used to isolate mutants defective in peroxisome assembly in yeast (45) and *A. nidulans* (12). Table 1 shows that all mutants grew as the wild type in every condition tested, except in lauric acid and starch plus lauric acid, where the *catA/catB* double mutant was unable to grow, just as wild-type yeast and *A. nidulans* strains are unable to grow in lauric acid only when the catalase inhibitor 3-aminotriazole is present (12, 45). In addition to catalases, most aerobic organisms contain peroxidases, and although no *A. nidulans* peroxidases have been reported, results in Table 1 indicate that unidentified peroxidases can perform part of the catalase function in vivo.

DISCUSSION

Here we have characterized the *catB* gene and shown that it encodes a second catalase from *A. nidulans*. Based on sequence similarity and intron position conservation, it is likely that *catB*, *A. fumigatus* AFCATGENE/AFU87850 (accession numbers Y07763 and U87850, respectively), and *A. niger catR* (16) are homologs. By the same criteria, the *A. nidulans catA* and *A. fumigatus* AFU87630 (accession number U87630) can be considered homologs. Five of the catalases shown in Fig. 2 are the only catalases from filamentous fungi for which putative primary sequences are reported. Together with *Neurospora crassa* (8), *Penicillium vitale* (44), and, notably, *E. coli* HPII (46) catalases, these constitute a group of enzymes that are much larger than reported catalases from any other sources. The relatively high similarity of the corresponding fungal genes to *E. coli katE* would be consistent with the proposed migration of

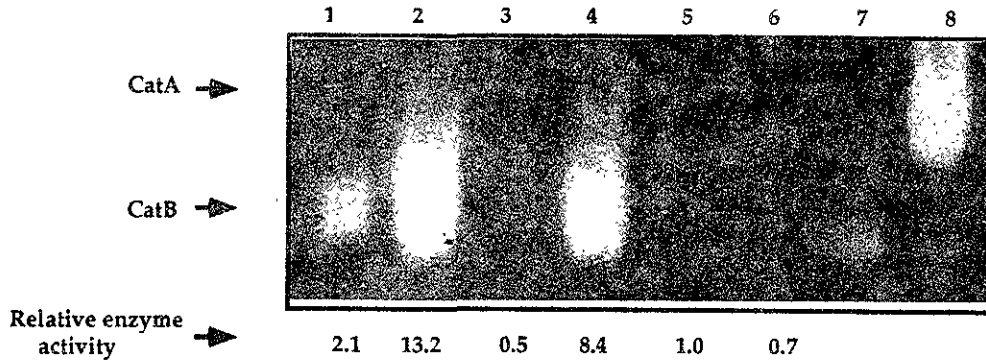


FIG. 6. Nondevelopmental regulation of catalase B. Mycelia from *catA* mutant strain TOS1 grown for 8 h were subject to different types of stress for 2 h (see Materials and Methods). After the different treatments, protein extracts were prepared for catalase activity determination as before. Lane 1, mycelia shifted to medium containing uric acid (0.8 mg/ml) as the sole nitrogen source; lane 2, paraquat (5 mM) added to the medium; lane 3, culture shifted to 50°C; lane 4, H₂O₂ (0.5 mM) added to the culture; lanes 5 and 6, strain TOS1 grown continuously for 10 and 8 h, respectively, as controls; lanes 7 and 8, 18-h-grown mycelia from strain FGSC26 and spores from strain RMS011 as catalase B and A references, respectively. Direct catalase activity, determined by O₂ evolution, is indicated at the bottom of the figure as relative enzyme activity. A specific activity of 1.0 (lane 5, 10 h of growth) corresponded to 482.6 μmol of H₂O₂ decomposed/min/mg of protein.

catalase gene sequences from eukaryotes to prokaryotes during evolution (28, 30).

The catalase B activity was shown to be regulated in a developmental fashion along the *A. nidulans* life cycle: it was barely detectable in spores, disappeared after 4 h during germination, and started to accumulate at about 10 h of mycelial growth. During conidiation, it gradually increased but was practically excluded from conidia. Activity was correlated with the *catB* mRNA abundance, indicating that *catB* is regulated, at least in part, at the transcript accumulation level. This pattern of regulation contrasted with the one observed for catalase A: its activity and corresponding mRNA were highly accumulated in spores, but while the mRNA disappeared after 2 h of germination (30a), the enzyme activity remained detectable up to 10 h of growth; it then disappeared until the later

stages of conidiation, when conidia were formed. Except at about 10 h of growth, when both enzyme activities were barely detectable, the patterns of activity observed for both catalases during development virtually show that the activity of one enzyme is present while the other is low or absent. This pattern of regulation and the fact that catalase B provided protection against H₂O₂ to growing colonies independently from catalase A, whereas catalase A supplied protection to isolated conidia against H₂O₂ (30), suggests that catalase redundancy serves the purpose of protecting the fungus against oxidative stress at different stages of its cell cycle. A potentially similar situation has been reported for the two *A. nidulans* alpha-tubulin genes *tubA* and *tubB*, which, being highly divergent and differentially required at discrete stages of the life cycle, are nevertheless functionally exchangeable, supporting the interpretation that

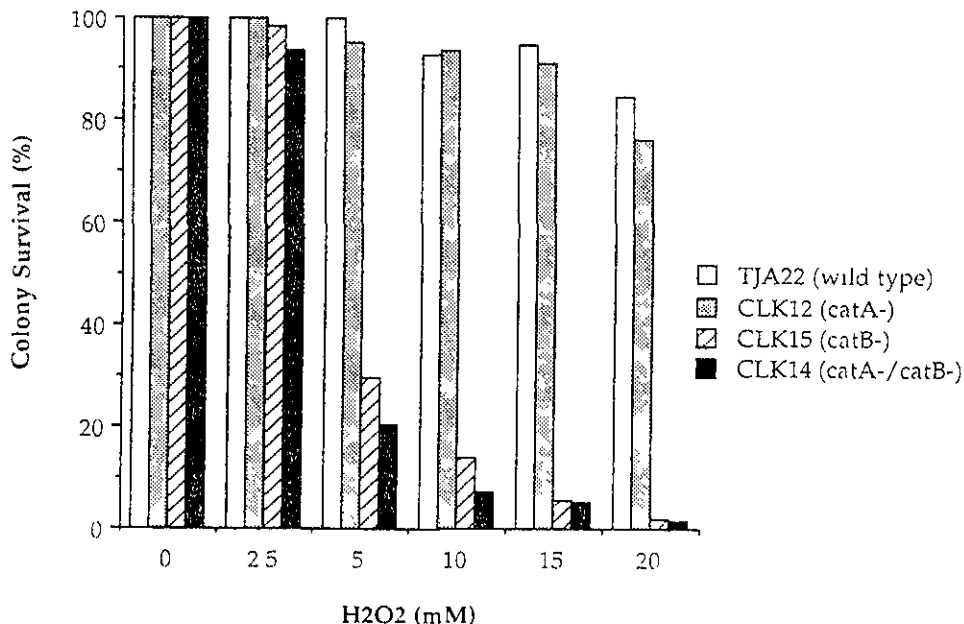


FIG. 7. Growing colonies from *catB* but not *catA* mutants are sensitive to hydrogen peroxide. Spores from strains TJA22, CLK12, CLK14, and CLK15 were inoculated onto petri dishes and grown for 30 h. After this time, colonies were flooded with aqueous solutions of H₂O₂ at the indicated concentrations for 10 min; the solutions were removed, and plates were incubated for 76 more hours. The colonies that were able to resume growth were counted as survivors. Shown are the percentages of treated colonies (200 to 400) that were able to survive the different H₂O₂ concentrations. A representative experiment is shown.

TABLE 1. Growth response of wild-type strain and catalase mutants in H₂O₂-generating substrates

Substrate	Growth response ^a			
	TJA22 (wild type)	CLK12 (<i>catA</i> mutant)	CLK15 (<i>catB</i> mutant)	CLK14 (<i>catA/catB</i> mutant)
Glucose	+++++	+++++	+++++	+++++
Oleic acid	++++	++++	++++	++++
Starch	++++	++++	++++	++++
Lauric acid	+	+	+	-
Lauric acid plus starch	++	++	++	-
Tributyrin	+++	+++	+++	+++
Uric acid	++++	++++	++++	++++

^a Spores from the indicated strains were used to point inoculate solid glucose-nitrate minimal medium or media in which glucose was replaced by oleic acid (6 mM), lauric acid (0.03%), starch (0.5%), starch plus lauric acid (0.5% and 0.03%, respectively) or tributyrin (1%) as the sole carbon sources. Uric acid (0.8 mg/ml) was used instead of nitrate as the sole nitrogen source. Growth was evaluated after 48 h at 37°C. Relative growth: +++++, very good; ++++, good; ++, low; +, scarce; -, very scarce; --, none.

two functionally redundant polypeptides exist to facilitate altered patterns of expression during development (22).

Although two or more differentially regulated catalase genes within the same organism have been reported (8, 15, 17, 24, 51), their functions are not well understood. In plants, most catalases are organelle associated (17, 51), whereas in yeast, a peroxisomal catalase A, repressed by glucose and induced by fatty acids, and a cytoplasmic catalase T have been characterized (10, 35). Like catalase T (27, 34), CatB was induced by oxidative and heat shock stress and during later stages of growth, but in contrast to catalase T, it was not induced by osmotic stress (34, 48). In *Bacillus subtilis*, a vegetative catalase I (encoded by the *katA* gene [4, 24]) and a spore-associated catalase 2 (encoded by the *katB/katE* gene [15]) have been characterized, showing that *katA* expression is induced by H₂O₂ but not by heat shock or salt stress and that *katE* is induced by heat shock, salt, and glucose starvation but not by H₂O₂ (15).

Whereas the cellular localization of CatA and CatB remains to be determined, the hydrophobic region formed by the first 21 or 22 amino acids from CatB, and the deduced catalases from *A. fumigatus* AFCATGENE/AFU87850 and *A. niger* CatR, show a high degree of similarity between them (Fig. 2) and signal peptides present in secretory proteins (16). An *A. fumigatus* catalase with a 90-kDa molecular mass has been identified as an antigen present in 90% of serum samples from patients with aspergilloma (25). If this catalase corresponds to the AFCATGENE/AFU87850 gene, which, in turn, would be a *catB* homolog, it will be interesting to determine a possible developmental regulation for the *A. fumigatus* catalase and its possible roles in dealing with oxidative products derived from neutrophil attack in vitro (14) or during human pathogenesis.

While catalases A and B are necessary for protection against exogenous H₂O₂, alternative pathways for the in vivo detoxification of this compound are indicated by the fact that *catA/catB* double mutants were able to grow as the wild type in media that contained uric acid as the sole nitrogen source or fatty acids as the sole carbon source. The presence of peroxidases could explain these results, as well as the lack of any obvious sporulation phenotype in *catA/catB* double mutants. Several peroxidases have been reported in fungi (26, 29), but little is known about their role in general antioxidant response or development. We have not detected catalase activity in *catA/catB* mutants subjected to many different physiological

conditions. However, the existence of more catalases in *A. nidulans* cannot be formally excluded.

The developmental regulation of CatB and its specific induction by H₂O₂ or by conditions that favored intracellular H₂O₂ formation, such as the paraquat and uric acid treatments, suggest that intracellular H₂O₂ concentration could rise during stationary and conidiation phases of the *A. nidulans* life cycle. Our current research is aimed at understanding how the developmental regulation of *catA* and *catB* is achieved and whether the same mechanisms operate during oxidative stress

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants IN208994 from DGAPA-UNAM and 400346-5-2246PN from CONACyT, México and AI 15338/DK 51478 from NIH.

We are grateful to Wilhelm Hansberg for helpful discussions and critical reading of the manuscript.

REFERENCES

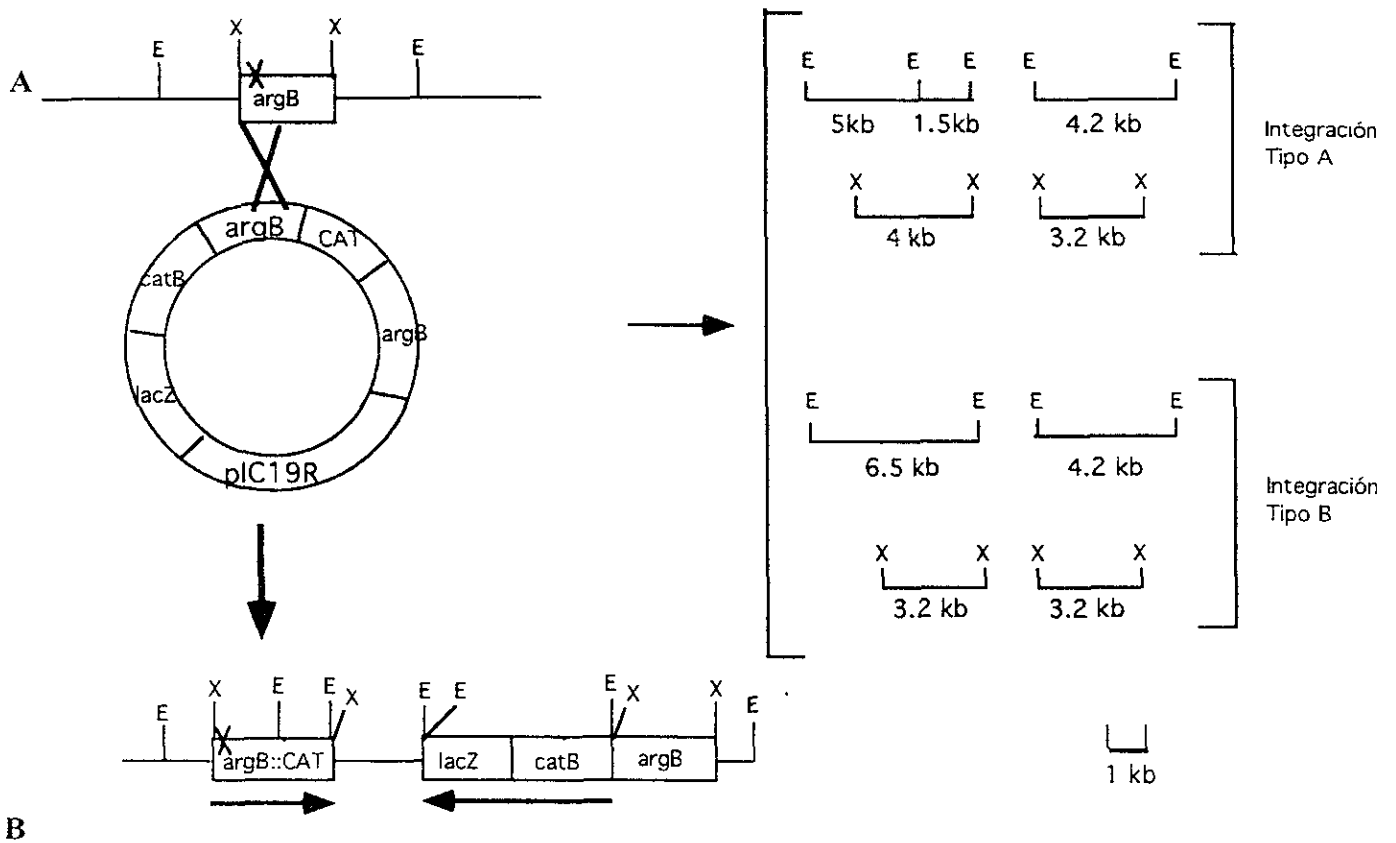
- Adams, F. H., M. T. Boylan, and W. E. Timberlake. 1988. *brlA* is necessary and sufficient to direct conidiophore development in *Aspergillus nidulans*. *Cell* 54:353-362.
- Aguirre, J. 1993. Spatial and temporal controls of the *Aspergillus* *brlA* developmental regulatory gene. *Mol. Microbiol.* 8:211-218.
- Aramayo, R., T. H. Adams, and W. E. Timberlake. 1989. A large cluster of highly expressed genes is dispensable for growth and development in *Aspergillus nidulans*. *Genetics* 122:65-71.
- Boi, D. K., and R. E. Yasbin. 1991. The isolation, cloning and identification of a vegetative catalase gene from *Bacillus subtilis*. *Gene* 109:31-37.
- Brody, H., J. Griffith, A. J. Cuticchia, J. Arnold, and W. E. Timberlake. 1991. Chromosome-specific recombinant DNA libraries from the fungus *Aspergillus nidulans*. *Nucleic Acids Res.* 19:3105-3109.
- Bushy, T. M., K. Y. Miller, and B. L. Miller. 1996. Suppression and enhancement of the *Aspergillus nidulans* *medusa* mutation by altered dosage of the *brlA* and *stunted* genes. *Genetics* 143:155-163.
- Champe, S. P., D. L. Nagle, and L. N. Yager. 1994. Sexual sporulation, p. 429-454. In S. D. Martinell, and J. R. Kinghorn (ed.), *Aspergillus*: 50 years on. Progress in industrial microbiology, vol. 29. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands.
- Chary, P., and D. O. Natvig. 1989. Evidence for three differentially regulated catalase genes in *Neurospora crassa*: effects of oxidative stress, heat shock, and development. *J. Bacteriol.* 171:2646-2652.
- Clutterbuck, A. J. 1969. A mutational analysis of conidial development in *Aspergillus nidulans*. *Genetics* 63:317-327.
- Cohen, G., W. Rapatz, and H. Ruis. 1988. Sequence of the *Saccharomyces cerevisiae* CTA1 gene and amino-acid sequence of catalase A derived from it. *Eur. J. Biochem.* 176:159-163.
- del Río, L. A., M. Gómez Ortega, A. Leal López, and J. López Gorgé. 1977. A more sensitive modification of the catalase assay with the Clark oxygen electrode. *Anal. Biochem.* 80:409-415.
- De Lucas, J. R., S. Valenciano, C. Amor, and F. Laborda. 1996. Use of 3-aminotriazole to isolate oleate/acetate non-utilizing mutants of *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genet. Newsl.* 43:20-22.
- Devereux, J., P. Haerberli, and O. Smithies. 1984. A comprehensive set of sequence analysis programs for the VAX. *Nucleic Acids Res.* 12:387-395.
- Diamond, R. D., and R. A. Clark. 1982. Damage to *Aspergillus fumigatus* and *Rhizopus oryzae* hyphae by oxidative and nonoxidative microbicidal products of human neutrophils in vitro. *Infect. Immun.* 38:487-495.
- Engelmann, S., C. Lindner, and M. Hecker. 1995. Cloning, nucleotide sequence, and regulation of *katK* encoding a O₂-dependent catalase in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 177:5598-5605.
- Fowler, T., M. W. Rey, P. Vuha-Vahe, S. D. Power, and R. M. Berka. 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.
- Guan, L., and J. G. Scandalios. 1995. Developmentally related responses of maize catalase genes to salicylic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:5930-5934.
- Hallwell, B., and J. M. C. Gutteridge. 1990. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods Enzymol.* 186:1-85.
- Hansberg, W., and J. Aguirre. 1990. Hyperoxidant states cause microbial cell differentiation by cell isolation from dioxygen. *J. Theor. Biol.* 142:201-221.
- Hansberg, W., H. de Groot, and H. Sies. 1993. Reactive oxygen species associated with cell differentiation in *Neurospora crassa*. *Free Radical Biol. Med.* 14:287-293.
- Kafer, E. 1977. Meiotic and mitotic recombination in *Aspergillus* and its

- chromosomal aberrations. *Adv Genet* **19**:33-131
22. Kirk, K. E., and N. R. Morris. 1993. Either α -tubulin isogene product is sufficient for microtubule function during all stages of growth and differentiation in *Aspergillus nidulans*. *Mol. Cell. Biol.* **13**:4465-4476
 23. Levine, A., R. Tenhaken, R. Dixon, and C. Lamb. 1994. H₂O₂ from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. *Cell* **79**:583-593
 24. Loewen, P. C., and J. Switala. 1987. Multiple catalases in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **169**:3601-3607.
 25. López-Medrano, R., M. C. Ovejero, J. A. Calera, P. Puente, and F. Leal. 1995. An immunodominant 90-kilodalton *Aspergillus fumigatus* antigen is the subunit of a catalase. *Infect Immun.* **63**:4774-4780
 26. Machwe, A., and M. Kapoor. 1993. Identification of the heat shock protein of *Neurospora crassa* corresponding to the stress-inducible peroxidase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **196**:692-698.
 27. Marchler, G., C. Schüller, G. Adam, and H. Ruis. 1993. A *Saccharomyces cerevisiae* UAS element controlled by protein kinase A activates transcription in response to a variety of stress conditions. *EMBO J.* **12**:1997-2003
 28. Mayfield, J. E., and M. R. Duvall. 1996. Anomalous phylogenies based on bacterial catalase gene sequences. *J. Mol. Evol.* **42**:469-471
 29. Mayfield, M. B., K. Kishi, M. Alic, and M. H. Gold. 1994. Homologous expression of recombinant manganese peroxidase in *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**:4303-4309
 30. Navarro, R. E., M. A. Stringer, W. Hansberg, W. E. Timberlake, and J. Aguirre. 1996. *catA*, a new *Aspergillus nidulans* gene encoding a developmentally regulated catalase. *Curr. Genet.* **29**:352-359
 - 30a. Navarro, R. E., and J. Aguirre. Unpublished results.
 31. Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*, second ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY
 32. Sanger, F., S. Nicklen, and A. R. Coulson. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**:5463-5467
 33. Scazzocchio, C. 1994. The purine degradation pathway, genetics, biochemistry and regulation, p. 221-257. *In* S. D. Martineili and J. R. Kinghorn (ed.), *Aspergillus*, 50 years on. Progress in industrial microbiology, vol. 29. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands.
 34. Schüller, C., J. L. Brewster, M. R. Alexander, M. C. Gustin, and H. Ruis. 1994. The HOG pathway controls osmotic regulation of transcription via the stress response element (STRE) of the *Saccharomyces cerevisiae* CTT1 gene. *EMBO J.* **13**:4382-4389
 35. Simon, M., G. Adam, W. Rapatz, W. Spevak, and H. Ruis. 1991. The *Saccharomyces cerevisiae* *ADR1* gene is a positive regulator of transcription of genes encoding peroxisomal proteins. *Mol. Cell. Biol.* **11**:699-704.
 36. Skromme, L., O. Sanchez, and J. Aguirre. 1995. Starvation stress modulates the expression of the *Aspergillus nidulans* *hlaA* regulatory gene. *Microbiology* **141**:21-28
 37. Stringer, M. A., R. A. Dean, T. C. Sewall, and W. E. Timberlake. 1991. Rodletless, a new *Aspergillus* development mutant induced by direct gene inactivation. *Genes Dev.* **5**:1161-1171.
 38. Sundaresan, M., Z. X. Yu, V. J. Ferrans, K. Irani, and T. Finkel. 1995. Requirement for generation of H₂O₂ for platelet-derived growth factor signal transduction. *Science* **270**:296-299.
 39. Timberlake, W. E. 1980. Developmental gene regulation in *Aspergillus nidulans*. *Dev. Biol.* **78**:497-510.
 40. Timberlake, W. E., and A. J. Clutterbuck. 1994. Genetic regulation of conidiation, p. 383-427. *In* S. D. Martineili and J. R. Kinghorn (ed.), *Aspergillus*: 50 years on. Progress in industrial microbiology, vol. 29. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands.
 41. Toledo, I., and W. Hansberg. 1990. Protein oxidation related to morphogenesis in *Neurospora crassa*. *Exp. Mycol.* **14**:184-189.
 42. Toledo, I., A. A. Noronha-Dutra, and W. Hansberg. 1991. Loss of NAD(P)-reducing power and glutathione disulfide excretion at the start of induction of asexual growth in *Neurospora crassa*. *J. Bacteriol.* **173**:3243-3249
 43. Toledo, I., J. Aguirre, and W. Hansberg. 1994. Enzyme inactivation related to a hyperoxidant state during conidiation of *Neurospora crassa*. *Microbiology* **140**:2391-2397.
 44. Vainshtein, B. K., W. R. Melik-Adamyan, V. V. Barynin, A. A. Vagin, A. I. Grebenko, V. V. Borisov, K. S. Bartels, I. Pita, and M. G. Rossmann. 1986. Three-dimensional structure of catalase from *Penicillium vitale* at 2.0 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **188**:49-61.
 45. Van der Leij, L., M. Van den Berg, R. Boot, M. Franse, B. Distel, and H. F. Tabak. 1992. Isolation of peroxisome assembly mutants from *Saccharomyces cerevisiae* with different morphologies using a novel positive selection procedure. *J. Cell Biol.* **119**:153-162.
 46. von Ossowski, I., M. R. Mulvey, P. A. Leco, A. Borys, and P. C. Loewen. 1991. Nucleotide sequence of *Aspergillus nidulans* *catB*, which encodes catalase HPII. *J. Bacteriol.* **173**:514-520
 47. Wang, Y., R. A. Prade, J. Griffith, W. E. Timberlake, and J. Arnold. 1994. A fast random cost algorithm for physical mapping. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**:11094-11098
 48. Wieser, R., G. Adam, A. Wagner, C. Schuller, G. Marchler, H. Ruis, Z. Krawiec, and T. Bilinski. 1991. Heat shock factor-independent heat control of transcription of the CTT1 gene encoding the cytosolic catalase T of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **266**:12406-12411
 49. Yelton, M. M., J. E. Hamer, and W. E. Timberlake. 1984. Transformation of *Aspergillus nidulans* by using a *trpC* plasmid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**:1470-1474.
 50. Yu, J.-H., J. Wieser, and T. H. Adams. 1996. The *Aspergillus* FibA RGS domain protein antagonizes G protein signaling to block proliferation and allow development. *EMBO J.* **15**:5184-5190.
 51. Zhong, H. H., and C. R. McClung. 1996. The circadian clock gates expression of two *Arabidopsis* catalase genes to distinct and opposite circadian phases. *Mol. Gen. Genet.* **251**:196-203

de los bordes. Estas cinco cepas se analizaron mediante una hibridación tipo Southern con el gen *argB* como sonda.

Como se puede observar en la Figura 2, las transformantes TLK25 y TLK26 tuvieron el patrón de digestión esperado para integraciones del tipo B y A (Hamer y Timberlake, 1987), respectivamente. Dicho patrón de digestión fue consistente tanto al digerir con *EcoRI* como con *XbaI* (Fig. 2B). Ambas transformantes contienen una sola copia del plásmido pLK3 integrada en *argB*.

La catalasa B se induce en presencia de H₂O₂, paraquat y ácido úrico como única fuente de nitrógeno (Kawasaki *et al.*, 1997). Para probar la fusión *catB::lacZ*, se prepararon cultivos líquidos de 13 h de crecimiento de las cepas transformantes TLK25 y TLK26 y de la cepa PW1 como control. Transcurrido este tiempo de incubación, se adicionó H₂O₂ (0.5 mM) o paraquat (5 mM), continuando los cultivos durante una o tres horas más. Los resultados graficados en la Figura 3 muestran que la actividad de β-galactosidasa detectada para la cepa control fue de aproximadamente 0.5 U mientras que para las cepas con la fusión, la actividad observada antes de inducir fue de aproximadamente 1.5 U. En general, los niveles de actividad de β-galactosidasa resultaron ser muy inferiores a los esperados en relación con la expresión del gen *catB* a nivel de acumulación de mensaje y a la actividad de catalasa observada en condiciones semejantes, lo cual parecía indicar que la fusión no estaba comportándose como un buen reportero del gen *catB*. Sin embargo, a pesar de que los niveles más elevados de actividad alcanzaron apenas 21 U, al adicionar H₂O₂ o paraquat se logró detectar una inducción. Las dos transformantes mostraron algunas diferencias entre sí. Excepto en H₂O₂, la cepa TLK25 alcanzó en promedio, niveles aproximadamente del 40% más que los detectados para la cepa TLK26. Con H₂O₂ las dos cepas tuvieron actividades similares. En promedio, la inducción por H₂O₂ fue de 14 veces a una hora y 11.5 veces a 3 h; con paraquat los tratamientos durante 1 y 3 h produjeron actividades similares para cada cepa, aunque entre ellas, como ya se mencionó, la diferencia fue de alrededor del 40%. La TLK25 se indujo 10 veces y la TLK26, 5 veces, tanto a la hora como a las 3 h de tratamiento.



B

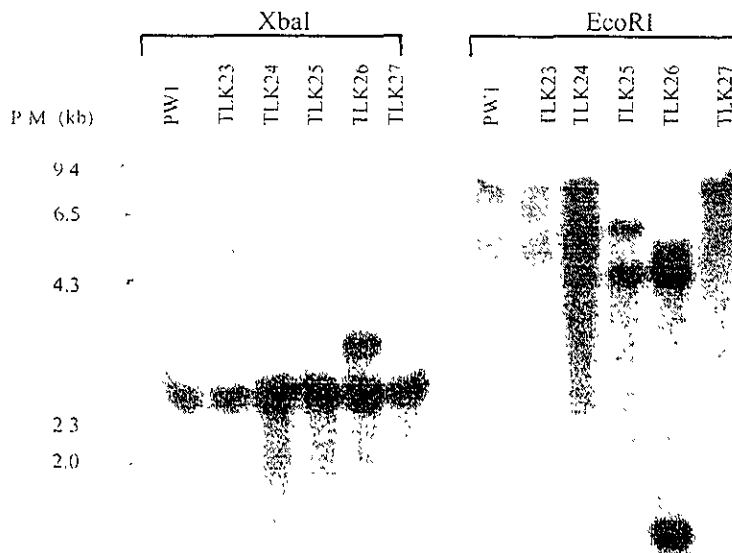


Figura 2 Obtención de las fusiones *catB*:*lacZ* en *A. nidulans*. **A.** Esquema del evento esperado para la integración de una sola copia del plásmido con la fusión *catB*:*lacZ* en el gen *argB* de la cepa receptora. Se indican los pesos moleculares esperados al digerir el DNA genómico de las transformantes con *EcoRI* (E) o *XbaI* (X) e hibridar con *argB*. La cruz en el gen *argB* de la cepa receptora indica una mutación puntual y las flechas debajo del plásmido integrado indican la dirección de la transcripción. También se indican los dos posibles tipos de integraciones, en las cuales la diferencia es la conservación o la pérdida del gen CAT. **B.** Hibridación tipo Southern de las transformantes obtenidas con el plásmido pL.K3. El DNA genómico de las transformantes se digirió con *XbaI* y *EcoRI*. La transformante TL.K25 tiene el patrón esperado para una sola integración de la fusión del tipo B y la TLK26 el esperado para una integración tipo A

Como se indica en la Figura 1, la fusión *catB::lacZ* utilizada contenía la secuencia que codifica para los primeros 27 aminoácidos de la catalasa B. Al examinar esta zona con cuidado, resultó tener características de un péptido señal parecido a los encontrados en proteínas que se secretan (Voet y Voet, 1990). No existe una secuencia consenso para los péptidos señal, pero se caracterizan por tener un residuo básico, generalmente arginina, enseguida de la metionina inicial y por ser hidrofóbicos (Fig. 4). Es posible que la β -galactosidasa generada estuviese

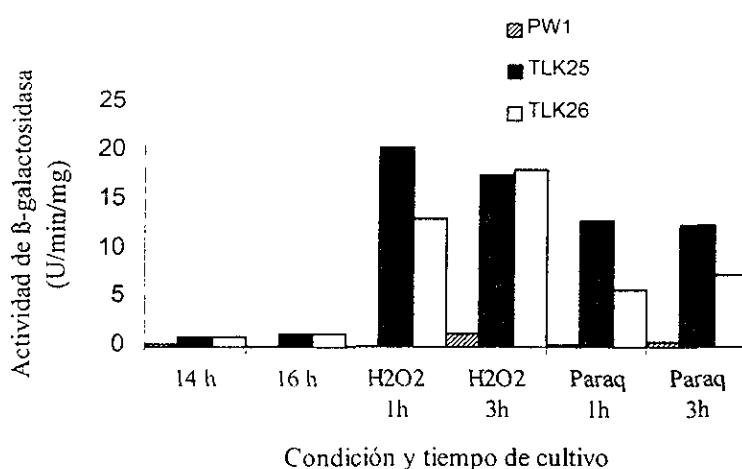


Figura 3 Actividad de β -galactosidasa en las cepas PW1 (control sin la fusión), TLK25 y TLK26 (fusión *catB::lacZ*). La actividad se midió de acuerdo con Miller (1972). Las muestras se obtuvieron de cultivos de 14 y 16 h (controles en ausencia de tensión) y de cultivos de 13 h más una o tres horas de incubación en presencia de H_2O_2 (0.5 mM) o paraquat (5 mM). El experimento se hizo considerando como duplicados las muestras con las cepas TLK25 y TLK26. Los datos de PW1 son por duplicado.

siendo secretada al medio o bien que estuviese localizada en el retículo endoplásmico donde podría ser degradada o de difícil extracción. El hecho de que ninguna de las dos transformantes probadas produjera un color azul en medios sólidos con el sustrato cromogénico X-Gal, sugirió que la β -galactosidasa no se secreta.

Los resultados anteriores sugerían que el posible péptido señal presente en la fusión *CatB::lacZ* afectaba la expresión del reportero; por lo tanto, se hizo una nueva construcción sin dicho péptido. De hecho, la catalasa R de *A. niger* (Fowler *et al.*, 1993) y la catalasa I de *A.*

fumigatus también presentan un péptido de este tipo. En el caso de la CatI de *A. fumigatus*, se demostró que además del péptido señal de 15 aminoácidos existe un propéptido de 12 aminoácidos que se requiere para la maduración apropiada de la proteína. Al clonar en *Pichia pastoris* un cDNA que contiene la secuencia del propéptido, la proteína se secretó al medio y se comprobó que la secuencia N-terminal de la CatI recombinante es idéntica a la de la CatI silvestre (extraída de *A. fumigatus*). Se definió que la señal de corte del propéptido es un par de argininas localizadas en las posiciones 26 y 27 con respecto a la metionina de inicio (Calera *et al.*, 1997). La CatB de *A. nidulans* no solamente tiene conservado el péptido señal sino también el propéptido de CatI de *A. fumigatus*, incluyendo las dos argininas en las mismas posiciones (ver Fig.2 de Kawasaki *et al.*, 1997).

Catalasa B de <i>A. nidulans</i>	MR <u>R</u> ALGLVGLVGVANA
Hormona del crecimiento (bovina)	MMAAGP <u>R</u> T <u>S</u> LLLAFALLCLPWTQVVG
Proinsulina humana	MALWM <u>R</u> LLPLLALLALWGPDPAAA
γ -interferón humano	M <u>K</u> YTSYILAFQLCIYLGSLG
Amilasa de rata	M <u>K</u> FVLLLSLIGFCWA
Lisozima de pollo	M <u>R</u> SLILVLCFLPLAALG

Figura 4. Comparación de la secuencia N-terminal de CatB con la de algunas proteínas que se secretan en eucariotos. La zona hidrofóbica está indicada en itálicas y el aminoácido básico que la precede (R o K) está subrayado (Tomado de Voet y Voet, 1990; Kawasaki *et al.*, 1997).

Para la nueva fusión CatB::lacZ, la estrategia a seguir consistió en hacer un PCR de la región 5' de *catB* utilizando los oligos T7 y PCATBL4363, este último diseñado específicamente para generar un sitio *NcoI* único que permitiera clonar este producto en el vector pRA42. En la reacción de PCR se obtuvo el producto deseado, de aproximadamente 3.5 kb el cual se clonó en el plásmido mencionado para generar el plásmido pLK8 (ver apéndice I). Se secuenció la zona cercana al codón de inicio de CatB para asegurarse de que la fusión estuviera en el marco de lectura correcto. También se hizo un análisis con enzimas de restricción de sitios que deberían estar presentes en la zona amplificada. Este análisis coincidió con lo esperado. Una vez que se

verificó el vector, se volvió a transformar. De un total de tres transformaciones, se obtuvieron 10 transformantes que se crecieron en presencia de X-Gal. Ocho de ellas se tiñeron de azul con diferentes intensidades. Las otras dos sólo se tiñeron un poco en el centro de la colonia.

El análisis por Southern (Fig. 5) reveló que tres de ellas (TLK28, TLK42, TLK44) contienen una sola integración de tipo B (ver Fig. 2A) en *argB* y una sola con dos integraciones en tándem del plásmido (TLK40). Las transformantes TLK39 y TLK49 parecen ser producto de conversión génica.

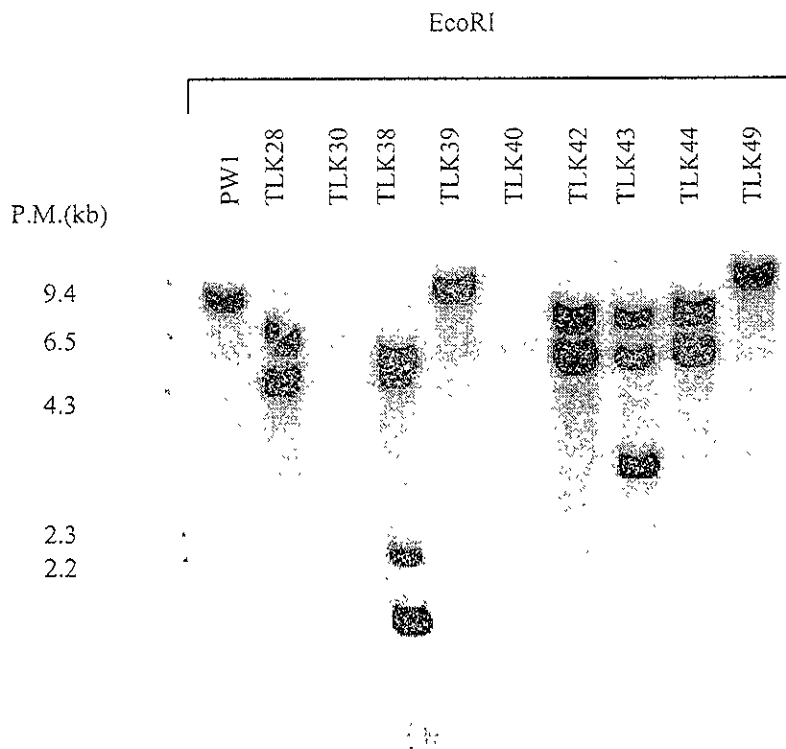


Figura 5. Hibridación tipo Southern de DNA genómico de las transformantes obtenidas con el plásmido pLK8. Las digestiones del DNA se hicieron con la enzima *EcoRI* y se utilizó *argB* como sonda. Las transformantes TLK28, TLK42 y TLK44 tuvieron el patrón esperado para una sola integración del tipo B en *argB* (ver figura 2A). El patrón de la TLK40 corresponde con una doble integración del plásmido.

Se estudió la regulación de la fusión durante el crecimiento y la fase estacionaria, tomando muestras a las 18, 28 y 48h de cultivo. También se estudió la respuesta a la tensión oxidativa, causada por el tratamiento con paraquat. Los cultivos se crecieron durante 8 h y en

ese momento se les adicionó el paraquat, continuando la incubación durante 2 h más para dar un total de 10 h de cultivo. La cepa elegida para estos estudios fue la TLK42. Los niveles de actividad de β -galactosidasa detectados con esta cepa fueron notablemente mayores que con la anterior.

Mientras que con la fusión anterior se detectaron aproximadamente 1.5 U a las 16h, con la nueva fusión se detectaron 92.3 U a las 10h y 387.4 U a las 18h. La actividad de β -galactosidasa continuó en aumento en tiempos más prolongados de cultivo; llegó a 1300 U a las 28h y a 2080 U a las 48h (Fig. 6). Como ya se había mencionado anteriormente, la catalasa B se induce durante el crecimiento y continúa su inducción durante el desarrollo asexual (Kawasaki *et al.*, 1997) y este comportamiento resulta ser muy semejante al descrito con la fusión de la cepa TLK42. En la misma Figura 6 se puede observar que la inducción por tensión oxidativa generada por paraquat resultó en la detección de 1533 U de β -galactosidasa mientras que en el

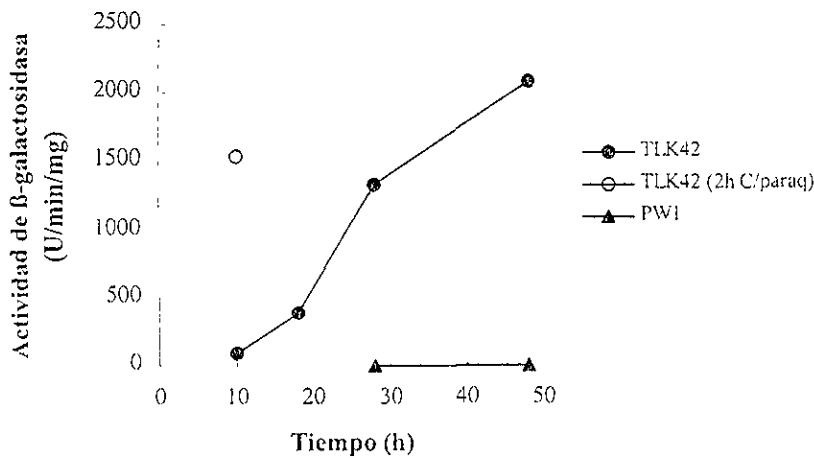


Figura 6. Actividad de β -galactosidasa derivada de la fusión CatB::lacZ contenida en la transformante TLK42, durante el crecimiento y en presencia de paraquat. La actividad se midió igual que en la Figura 3, y las muestras se extrajeron en los tiempos de cultivo señalados. Con paraquat (5 mM) se tomó una muestra de 10 h totales de cultivo, donde el hongo se incubó durante 8 h en medio mínimo y posteriormente se añadió dicho compuesto durante 2 h más. Los datos de la cepa control sin la fusión (PW1) son muy bajos en comparación con la TLK42, por lo que resulta difícil distinguirlos. El experimento se hizo por duplicado y los resultados mostrados son el promedio de los datos obtenidos.

control sin tratamiento se obtuvieron 92.3 U (10h), lo cual corresponde a un incremento de 16.6 veces. Con la fusión anterior los niveles máximos de inducción alcanzaron apenas 21 U (ver Fig. 3).

En la Figura 7 se puede observar que la cinética de las actividades de catalasa y de β -galactosidasa fue muy similar y por lo tanto, esta fusión puede emplearse como reportero confiable de la expresión del gen *catB*, además de que confirman los resultados anteriores que sugerían que este gen podría estar regulado a nivel transcripcional (Kawasaki *et al.*, 1997). La actividad de la catalasa A se encuentra ausente en los tiempos analizados (Navarro *et al.*, 1996) y por lo tanto, no interfiere con la cinética mostrada en la Figura 7. Por otro lado, la actividad de la catalasa C (ver Capítulo III) comienza a detectarse hasta las 48 h y probablemente interfiera en ese tiempo; sin embargo, en geles nativos se observó que a las 48 h la actividad predominante es la de CatB (ver Fig. 13, Capítulo III).

En la figura 8 se muestra la región 5' de *catB* secuenciada en este trabajo. En esta secuencia se buscaron sitios consenso de unión de factores de transcripción que podrían regularse por diferentes tipos de tensión. Utilizando distintos algoritmos se encontraron tres posibles sitios de unión de HapC y uno de yAP-1; también se detectaron cinco sitios semejantes a STRE. HapC de *A. nidulans* es el homólogo de HAP3 de *Saccharomyces cerevisiae*. Hap3 forma parte del complejo Hap2/3/4/5 el cual participa en la activación transcripcional de varios genes regulados por hemo, tales como los que codifican para algunas subunidades de citocromos (Zitomer y Lowry, 1992). Hap2 y Hap3 participan en la unión al DNA (Xing *et al.*, 1993) y reconocen al consenso CCAAT. HapC de *A. nidulans* se une al mismo consenso (Papagiannopoulos *et al.*, 1996). yAP-1 es un factor transcripcional de *S. cerevisiae* que participa en la respuesta a la tensión oxidativa. Las mutantes sin yAP-1 son sensibles al H₂O₂ y a compuestos que generan superóxido (Schnell *et al.*, 1992). Los sitios STRE están bien caracterizados en levadura y se sabe que median la respuesta a diferentes tipos de tensión tales como el osmótica, el oxidativa, la respuesta a la privación de nutrientes y al choque de calor (Marchler *et al.*, 1993). Recientemente se identificaron los factores transcripcionales Msn2p y Msn4p, los cuales tienen dedos de zinc y se ha demostrado que se unen a oligonucleótidos

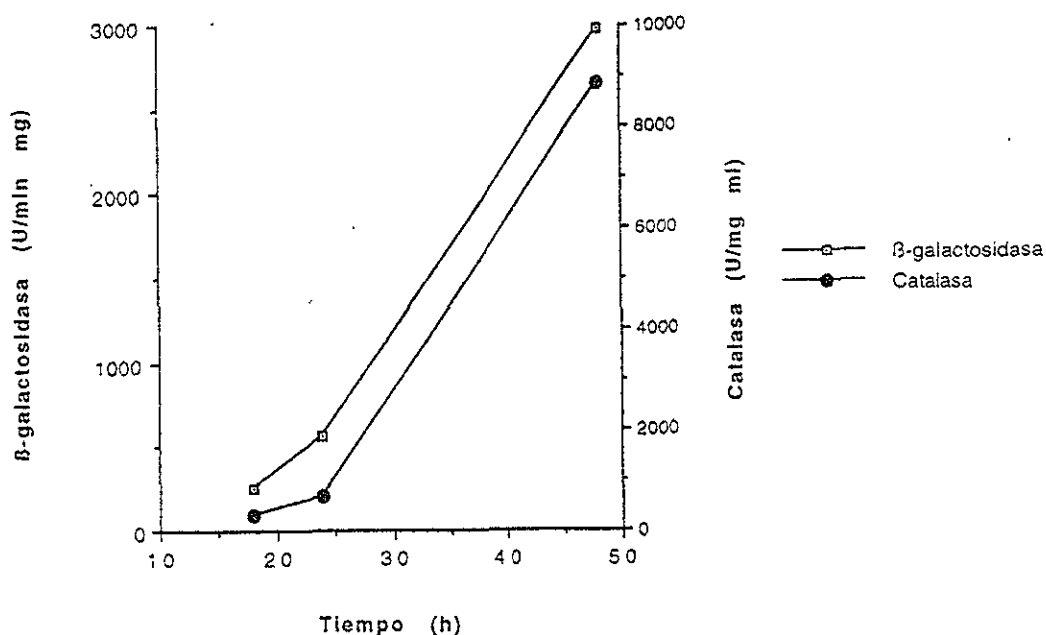


Figura 7. Actividad de β -galactosidasa y de catalasa en extractos totales de proteínas de la cepa TLK42, crecida por distintos tiempos. La actividad de catalasa se determinó utilizando el método sugerido por del Río *et al.* (1977) y la β -galactosidasa por el método de Miller (1972).

que contienen sitios STRE (Martínez-Pastor *et al.*, 1996; Schmitt y McEntee, 1996). En la región 5' de *catB* también se detectó un posible sitio de unión para UaY, el cual es un activador transcripcional que participa en la inducción, por ácido úrico, de varios genes que codifican para enzimas y permeasas que intervienen en la ruta de utilización de las purinas (Suárez *et al.*, 1991a; Suárez *et al.*, 1991b). Estos sitios tienen un interés particular porque, de ser funcionales, pueden revelar aspectos muy relevantes sobre la regulación del gen *catB* tanto por tensión oxidativa (sitios STRE y yAP-1) como por hemo (HapC) o por ácido úrico (UaY). Con respecto a éste último, debe recordarse que este compuesto fue capaz de inducir la actividad de la catalasa B (Kawasaki *et al.*, 1997), lo cual podría deberse al H_2O_2 producido durante el catabolismo del ácido úrico por la urato oxidasa y la xantina oxidasa, o bien, el ácido úrico podría actuar como inductor directo del gen *catB* a través de UaY (Suárez *et al.*, 1991b). La mayoría de estas secuencias consenso se encontraron en la zona comprendida entre los sitios de digestión de las enzimas *SphI* y *XhoI* (ver Fig. 8).

TreA

1 CTACTGTAATGTAGAATATCATGTAGAGTAGTATGAGCGAGTTTAGCATA 50

51 GAATCTGAGGTATACCCFAGATCACTTTCTTCTACGGATTTTCTAACCTT 100

101 ATCGTGGATAGAGTTGTGGCGTACTCCGTACTTTGCGTGCTGATACTCGT 150

151 TTGAGTCATGTGACTTTACCCGGCCGACTGGGGTGAGTCTACGTTATTCA 200

201 TCCTGCGGTCCACTGCGGGCTAACAAATCCGAATTTTCAATACAGAATACG 250

251 TCGAGATACGCTGATCTCAAACAGACCCGAAGCAAGGGTAATTATCAAGC 300

301 ATTTCTGGACTTCTCGACGAAGCTGATTGAGCGTTCGGCCACTGTAATTT 350

351 CAGGGCGGGCCTAGCTTCCCAGTTGTATCGATCAGATTAATCCTAATTCC 400

401 GAGCCTGGGCATGCCTGTAATTTGAGGGCGGGCCTAGCTTCCCAGTTGTA 450

SphI

451 TCGATCAGATTAATCCTAATTCGAGCCTGGGCATGCTCGATGTGATCA 500

HAPC

501 GTGTCAGAGCCTGCTCAGGTACTCGTCGAGACTGGTTGTATATCCTCCAA 550

551 TAAGCCTACATTGTCTGAGCACAGCAGTCGGCAGTAAACAAAGAGAACTG 600

STRE

601 CCGATCTCTCCTGTTATTTGCTGAGGCGGTCAAACCGGGCAGGCTGGGG 650

UAY

651 GCTCTAGTATGTTGCTATTTCTGGGATGTAAAGTCGGACAGCGGCCGCAA 700

HAPC (r)

701 TTATTGTACGATGGACAGATCAAATGATGGCTATTTGGCTGATGTTCTGTT 750

HAPC

751 TGCAGCAGGCTTTCTGTGCGGTACACAATCACACTGCTGTGGCCCAAT 800

STRE (r)

801 AATAGTGCATAGCCCCGTACGAGTTGGCTGATGCCAAGCCTTGCAAGGCC 850

STRE

851 CAGCTTCCAGTTTCTGTGGGACTCCAAGAGTTTCCTTCCAGCTCGCTGC 900

YAP

901 TATTACCAAGCACTCTGGTCGAGACCTATAACAATCGCACGGTCAACCT 950

STRE (r) GCN4 (r)

951 CAATTCAGGTCCCCAACCACTCATCAGACCATAATTACTGATAGCCAAG 1000

STRE (r)

1001 CAGATCGCCTGCTCGGCACCACCTGCTTAACCCCGAATAAGACATCGCTC 1050

XhoI

1051 CGAGCGTTGCTCGAGCGTTGCTCTGGCCGTTTCTGCTGAACGATGGTGAC 1100

1101 GTACGTAGGTACTTGCTTTGCGGTGGGAGGTCTTGGATTCTGTTGGAGAAGC 1150

1151 TCAGCAACGGCGTCGATTGATTCGTTTCGCGCCTTCCAGACCTCGCTGCT 1200

1201 GAACTAAGCTAAGTGGCTCCGGCTCGCAGCTCCCGTGCCTGCCAGGTGGG 1250

```

1251  CCGGGCAGGGCTCATCAATGTGATGGAAAGATGGGAGGCCGTATTGTGTT 1300
1301  CCTGCAGAGACGATCGTCCTGTTGCCTCGCTTGG TATAATACACCCGTG 1350
1351  TGGCCTGTCCTACGCTAGGAATGCAGCGCCCTTTACCCGACCTCAAGCCC 1400
                               STRE(r)
1401  GACCTCCTCTGCATTTCCTATCCCTCTTTCCCTAAAAACCACCAACTTTTAT 1450
                               GCN4
1451  CTTTATCTTGACTTTACCTCACC

```

STRE(Msn2,Msn4)	<u>AGGGG</u> (Wieser <i>et al.</i> , 1991)
HapC	<u>CCAAT</u> (Papagiannopoulos <i>et al.</i> , 1996)
UaY	<u>TCGGA-4X-GCCGA</u> (Suárez <i>et al.</i> , 1995)
Yap1	<u>TTACTAA</u> (Fernandes <i>et al.</i> , 1997)
GCN4	<u>TGACTCA</u> (Hinnebusch 1988; Ellenberger <i>et al.</i> , 1992)

Figura 8. Secuencia de la región 5' del gen *catB*. Los sitios parecidos a las regiones consenso están subrayados. La probable caja TATA está en *italicas* y subrayada. (r) significa que el elemento indicado está en la cadena complementaria. Los sitios se determinaron con los programas FindPatterns o Bestfit del GCG (Devereaux *et al.*, 1984). TreA indica el codón de término del gen *treA*. Los nucleótidos encerradas en cuadros están conservadas en la región 5' de *catB* de *A. fumigatus*.

También se hizo un análisis con dos programas que buscan regiones de unión parecidos a los consensos de factores transcripcionales de eucariotos (Prestridge, 1991; Akiyama, 1995). Dentro de los sitios potencialmente interesantes, se incluyen varios elementos de choque de calor (HSE) y sitios de unión de los factores ADR1 y GCN4 de levadura. ADR1 es un regulador positivo del gen *ADH2* (alcohol deshidrogenasa reprimida por glucosa) que también participa en la regulación por fuente de carbono de la catalasa A (peroxisomal) de *S. cerevisiae* (Ruis y Koller, 1997; ver Fig. 1 de la Introducción). También se encontraron dos sitios de unión de GCN4 (consenso TGACTCA), que funcionalmente es muy parecido a los factores transcripcionales AP-1 de mamíferos (Jun y Fos) y de hecho, se une al mismo consenso. GCN4 participa en la respuesta a la privación de aminoácidos (Hinnebusch, 1988) y también participa, al igual que Jun y Fos, en la respuesta de protección contra la luz ultravioleta, la cual está mediada por Ras (Engelberg *et al.*, 1994).

En 1997, d'Enfert y Fontaine reportaron la clonación y la secuenciación del gen *treA*, que codifica para la trehalasa ácida de *A. nidulans*. Este gen se asignó al cromosoma VIII y resultó estar justo hacia el extremo 5' de *catB*, por lo cual se decidió secuenciar *catB* hasta el sitio *SphI* que corresponde al punto en el que coincidirían las secuencias de *treA* y de *catB* (Fig. 8). Este

gen, al igual que *catB*, se induce durante la fase estacionaria y el desarrollo asexual (d'Enfert y Fontaine, 1997). En este caso, los experimentos se hicieron en medio YG (extracto de levadura al 0.5% y glucosa al 2%) a diferencia de los datos obtenidos en el presente trabajo, los cuales se obtuvieron con cultivos en medio mínimo. La trehalasa se induce ligeramente a las 75 h de cultivo pero la máxima inducción es alrededor de las 150 h. En cultivos conidiantes, la inducción se observó a las 24 h (d'Enfert y Fontaine, 1997). Probablemente estos genes tengan secuencias regulatorias comunes, por lo que se hizo una comparación entre sus regiones 5', la cual se puede consultar en el apéndice II. Las regiones que más se parecen están encerradas en un rectángulo y como se puede observar, la más destacada tiene ocho pares de bases idénticos (Apéndice II).

Para continuar con el análisis de la regulación del gen *catB* mediante el reportero *lacZ*, se construyó un nuevo plásmido (pLK9) en el que se eliminó la secuencia del gen *treA*, de tal modo que la posible región regulatoria 5' de *catB* se redujo de 3.5 kb a 993 pb. Para ello, se digirió el pLK8 con *SphI* y se religó para obtener el plásmido pLK9.

Como se puede observar en la Figura 8, la mayoría de los sitios posibles de unión de diferentes factores transcripcionales relevantes para la respuesta a la tensión, se encontraron en la región comprendida entre los sitios *SphI* y *XhoI*, lo cual resultó muy conveniente porque fue posible remover esta región al digerir el plásmido pLK9 con estas enzimas y religarlo para obtener el plásmido pLK10.

Con los plásmidos pLK9 y pLK10 se transformó la cepa PW1 de *A. nidulans*. Se obtuvieron seis transformantes con el primer vector y cinco con el segundo. Las transformantes se analizaron por una hibridación tipo Southern, obteniéndose dos transformantes con una sola copia del pLK9 y cuatro con una sola copia del pLK10 integradas en *argB*. Con este último, se obtuvieron dos transformantes con una integración del tipo B y dos con integración tipo A (Fig 9; ver Fig.2A para los tipos de integración). Las transformantes TLK50 (pLK9) y TLK56 (pLK10) se utilizaron para analizar el papel de las distintas regiones removidas en la regulación transcripcional del gen *catB*.

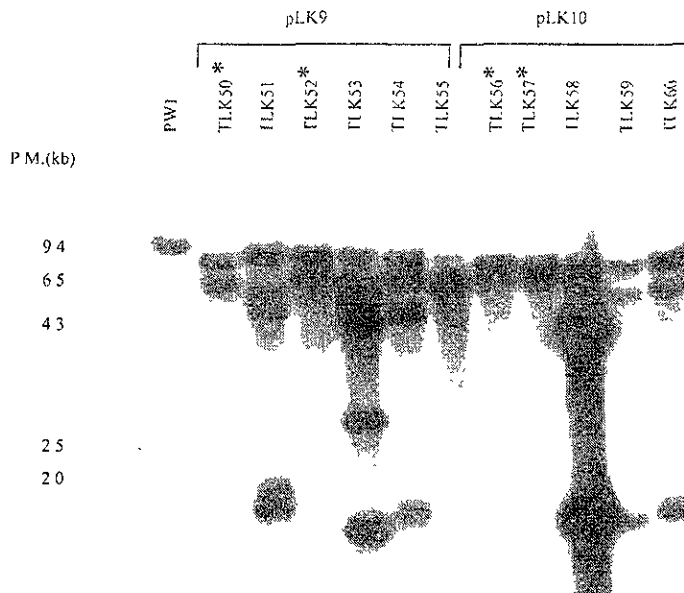


Figura 9. Hibridación tipo Southern de DNA digerido con *EcoRI* de las transformantes obtenidas con los plásmidos pLK9 y pLK10. La hibridación se hizo utilizando como sonda *argB*. Se indican con un asterisco las transformantes con una sola integración de la fusión en *argB*.

Hasta este momento se cuenta con tres fusiones que contienen diferentes regiones del extremo 5' de *catB*: TLK42(-3500), que contiene 3.5 kb; TLK50(-993), que contiene 993 pb y TLK56(-413) que contiene 413 pb, todas ellas con respecto al codón de inicio de la traducción de CatB. Se hicieron cultivos líquidos con estas cepas en presencia de paraquat y también durante el crecimiento, tomando muestras de 18, 28 y 48 h (Fig. 10). Durante el crecimiento (Fig.10A), las cinéticas obtenidas con las cepas TLK42(-3500) y TLK50(-993) resultaron ser muy semejantes, aunque los valores de esta última fueron aproximadamente 20% más elevados. Estos datos demuestran que la secuencia contenida en 993 pb es suficiente para conservar la regulación apropiada durante la fase estacionaria. En contraste, en la cepa TLK56(-413) prácticamente se perdió la respuesta a la inducción durante esta fase. A las 18 h no hay diferencias entre la TLK42(-3500) y la TLK56(-413), lo que indica que hasta este momento, la región removida no parece tener una función fundamental en la regulación. Sin embargo, en tiempos posteriores las diferencias entre estas dos cepas fueron notables. A las 28 h la actividad del reportero en la TLK56(-413) fue 3.4 veces menor que la actividad detectada en la TLK42(-3500); a las 48 h la TLK56(-413) tuvo una actividad 7.7 veces menor que el control. La cinética

con la TLK56(-413) demuestra que la respuesta a la inducción durante la fase estacionaria prácticamente se anula si se reduce la secuencia 5' de *catB* de 993 a 413 pb, lo que permite concluir que la mayor parte de la regulación durante esta fase está contenida en la región entre los sitios *SphI* y *XhoI*. Al observar los datos en la Figura 10A podría pensarse que al reducir la región 5' de 3.5 kb a 993 pb se pudo haber eliminado una secuencia importante que estuviera participando en una regulación negativa del gen, dado que la actividad del reportero resultó ser mayor en todos los tiempos probados para la TLK50(-993) que para la TLK42(-3500). Sin embargo, en la Figura 10B se puede apreciar que a las 8 y 10 h no hay diferencias entre las actividades de las dos cepas; por lo tanto, la posibilidad de la existencia de una secuencia represora en esta zona resulta poco probable mientras que la participación de un regulador positivo se fortalece.

En presencia de paraquat la actividad de β -galactosidasa se indujo 26 veces en la TLK42(-3500) y 16 veces en la TLK50(-993) mientras que en la TLK56(-413), aunque hubo inducción, ésta fue tan solo de 4 veces (Fig. 10B). De estos resultados se puede concluir que las secuencias contenidas río arriba de -993 participan en parte de la respuesta al paraquat ya que la

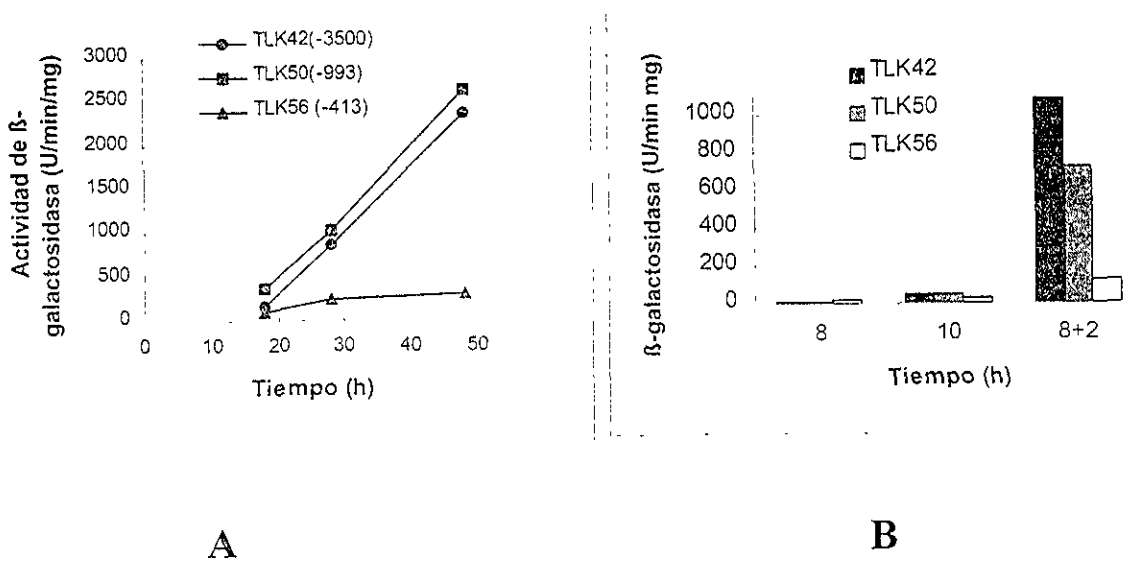


Figura 10. Actividad específica de β -galactosidasa en las cepas TLK42(-3500), TLK50(-993) y TLK56(-413). **A.** Actividad obtenida a las 18, 28 y 48 horas de crecimiento de las cepas indicadas en medio mínimo. **B** Actividad detectada en muestras de 8h, 10h y 8h (sin tensión) + 2h (paraquat 5 mM) de cultivo en medio mínimo. El experimento se hizo por duplicado y los datos graficados representan el promedio de los valores obtenidos.

delección -993 se induce un 38.3% menos que la de -3500. Sin embargo, una parte importante de la regulación en respuesta al paraquat también se encuentra en la región incluida entre los sitios *SphI* y *XhoI* ya que la cepa TLK56(-413) se indujo un 82.5% menos que la TLK50(-993).

En conclusión, las cepas TLK42(-3500) y TLK50(-993) se comportaron de manera muy similar durante el crecimiento y por lo tanto, la remoción de la secuencia del gen *treA* no parece afectar significativamente la regulación de la catalasa B en estas condiciones. Con base en los resultados obtenidos entre las cepas TLK50(-993) y TLK56(-413) también se puede concluir que las regiones contenidas entre los sitios -993 y -413 tienen un papel fundamental en la regulación de la inducción de *catB* tanto durante la fase estacionaria como en respuesta a la tensión oxidativa generado por la presencia de paraquat.

Capítulo III. Inmunolocalización de la catalasa B y detección de una tercera catalasa en *A. nidulans*, la cual se expresa en la fase estacionaria tardía de crecimiento.

1. Inmunolocalización de la catalasa B.

1.1. Anticuerpos contra la catalasa I de *Neurospora crassa*.

La catalasa I de *N. crassa* y la B de *A. nidulans* tienen un porcentaje de identidad del 59% a nivel de secuencia por lo que se decidió probar los anticuerpos generados contra la primera para determinar si cruza con la CatB. El anticuerpo empleado reconoce tanto al monómero como al tetrámero de Cat I de *N. crassa* (Montes de Oca, Lledías y Hansberg, comunicación personal).

Se hizo una inmunoelectrotransferencia con extractos de proteínas de *A. nidulans* que contuvieran catalasa A (extracto de conidios de una cepa silvestre), catalasa B (extracto de micelio de 20h de una cepa *catA⁻*) o que no tuvieran actividad de catalasa A ni B (extracto de micelio de 20h de una cepa *catA⁻/catB⁻*). El anticuerpo se empleó con dos diluciones diferentes, 1:60 y 1:300. Se esperaba que el anticuerpo reconociera solo a CatB y por lo tanto, que solo se detectara una banda en las condiciones en que dicha enzima estuviera presente y que no hubiera reacción en donde no lo estuviera (muestra de conidios, extracto de la cepa *catA⁻/catB⁻*). Sin embargo, con ambas diluciones solamente se distinguió una banda inespecífica presente en todas las muestras. Se repitió la inmunoelectrotransferencia cargando el doble de proteína (55 µg) y agregando una muestra de *N. crassa* como control positivo. No se vio ninguna reacción, excepto en el control positivo y volvió a apreciarse una banda tenue en los carriles, lo que sugiere que esta reacción no fue específica y que este anticuerpo no cruza con la CatB.

1.2. Anticuerpos contra una catalasa de girasol.

Se ha reportado que el hongo patógeno *Claviceps purpurea* secreta una catalasa dentro de la planta huésped. Esta catalasa se identificó por tinción *in situ*, marcaje por anticuerpos y por análisis bioquímico. Los anticuerpos empleados fueron de una catalasa de girasol (Gaffe *et al.*, 1997). La catalasa de *C. purpurea* comparte varios epítopes con las de plantas superiores. Los anticuerpos contra la catalasa de girasol que se probaron para ver si reconocían a la CatB de *A. nidulans* fueron el anti-cat55 (hecho contra la subunidad de 55 kDa de la catalasa

desnaturalizada) y el anti-cat6 (diseñado contra la isoforma nativa de la catalasa 6) (Tenberge *et al.*, 1997; Tenberge y Eising, 1995). Se titularon los dos anticuerpos con extractos de 48 h de la cepa silvestre PW1 y de semillas de girasol como control positivo. Se usaron diluciones de 1:10 hasta 1:1280.

Con anti-cat55 se detectaron muchas bandas en todas las diluciones, aunque hubo una que se veía más intensa. Con anti-cat6 se vieron dos bandas fuertes en las diluciones 1:40, 1:80 y 1:160. Se decidió probar el anti-cat6 con muestras de las mutantes de catalasas *catA*⁻, *catB*⁻ y la doble (*catA*⁻/*catB*⁻). El resultado fue negativo dado que no se vio ninguna reacción, ni siquiera con la cepa silvestre. Por lo tanto, estos anticuerpos tampoco cruzan con CatB de *A. nidulans*.

1.3. Anticuerpos contra la catalasa 1 de *A. fumigatus*.

El anticuerpo contra la catalasa 1 de *A. fumigatus* (López-Medrano *et al.*, 1995) se tituló utilizando muestras de 48 h de crecimiento de la cepa silvestre (actividad de CatB muy abundante), de la doble mutante (no hay actividad de catalasas A ni B) y de conidios (actividad de CatA muy abundante). Ni en extractos de conidios ni en extractos de 48 h de la doble mutante se detectó señal. En cambio, en la silvestre se detectó una sola banda en las diluciones de 1:40 y 1:80. En otra inmunoelectrotransferencia con 55 µg de proteína de cada muestra de 48 h, se vió claramente una sola banda en la cepa silvestre y en la mutante sin catalasa A, mientras que en las muestras de los conidios y de la doble mutante *catA*⁻/*catB*⁻ no se detectó nada (Fig. 11). El peso molecular de CatB es de 79.143 kDa (Kawasaki *et al.*, 1997) y el de la banda detectada es un poco más elevado, lo que probablemente se deba a que la proteína esté glicosilada como es el caso de las homólogas de CatB en *A. niger* (CatR) y *A. fumigatus* (Cat1) (Fowler *et al.*, 1993; Calera *et al.*, 1997).

También se hizo una inmunoelectrotransferencia con un gel nativo y se alcanzó a distinguir una señal muy tenue solo en los carriles que contenían a la catalasa B (datos no mostrados). Al parecer en este caso la transferencia no fue muy eficiente y sin embargo, se puede concluir que el anticuerpo de la Cat1 de *A. fumigatus* también reconoce a la proteína nativa de CatB. Por lo tanto, fue empleado para inmunolocalizar dicha proteína.

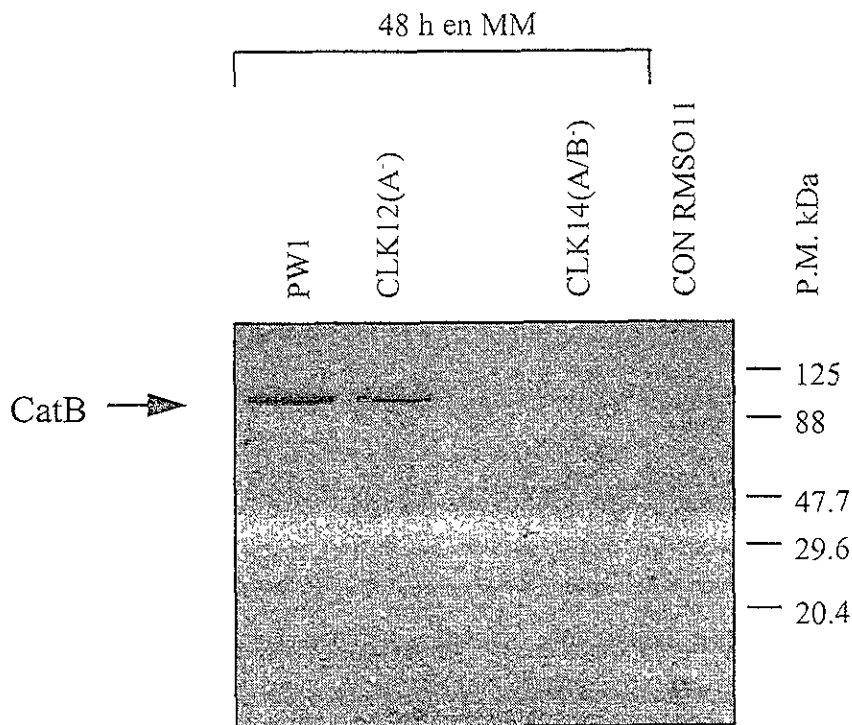


Figura 11 El anticuerpo de la catalasa I de *A. fumigatus* cruza con la catalasa B de *A. nidulans*. En la figura se muestra una inmunoelectrotransferencia hecha con extractos de proteína totales (55 µg/carril) de micelio de 48 h de crecimiento en medio mínimo de las cepas silvestre (PW1), CLK12 (*catA*⁻) y CLK14 (*catA*⁻/*catB*⁻) y de conidios de la cepa RMS011. A la derecha se indican los marcadores de peso molecular en kDa.

1.4. Inmunolocalización de la catalasa B.

Para inmunolocalizar a la catalasa B, se obtuvieron muestras de micelio de 48 h de crecimiento de una cepa silvestre (FGSC26) y de una doble mutante *catA*⁻/*catB*⁻ (CLK15). Las muestras se fijaron con glutaraldehído al 3% y los cortes se probaron con el anticuerpo ya descrito de la catalasa I de *A. fumigatus*. La Figura 12 presenta unas micrografías electrónicas donde puede apreciarse que una parte considerable de la catalasa B se encuentra en la pared celular de las hifas. La catalasa A ha sido inmunolocalizada en la pared celular de los conidios (Navarro y Aguirre, comunicación personal).

Al parecer, la catalasa B se exporta a la pared y tiene como función la protección de la célula contra el H₂O₂ generado en el exterior. Este resultado es consistente con la presencia de

un péptido señal aparentemente funcional (Figuras 1 y 3). La catalasa 1 de *A. fumigatus*, que tiene un porcentaje de identidad del 78% con CatB de *A. nidulans* (Kawasaki *et al.*, 1997), tiene un péptido señal y un propéptido de 15 y 22 aminoácidos respectivamente, y se ha detectado en la pared celular, en la fracción membranal y en el medio de cultivo (Calera *et al.*, 1997). Una parte considerable de la catalasa B de *A. nidulans* se encuentra asociada a la pared celular; sin embargo, parte de ella también se localiza en extractos de proteína soluble dado que se ha detectado en estas muestras mediante geles nativos teñidos para actividad de catalasas

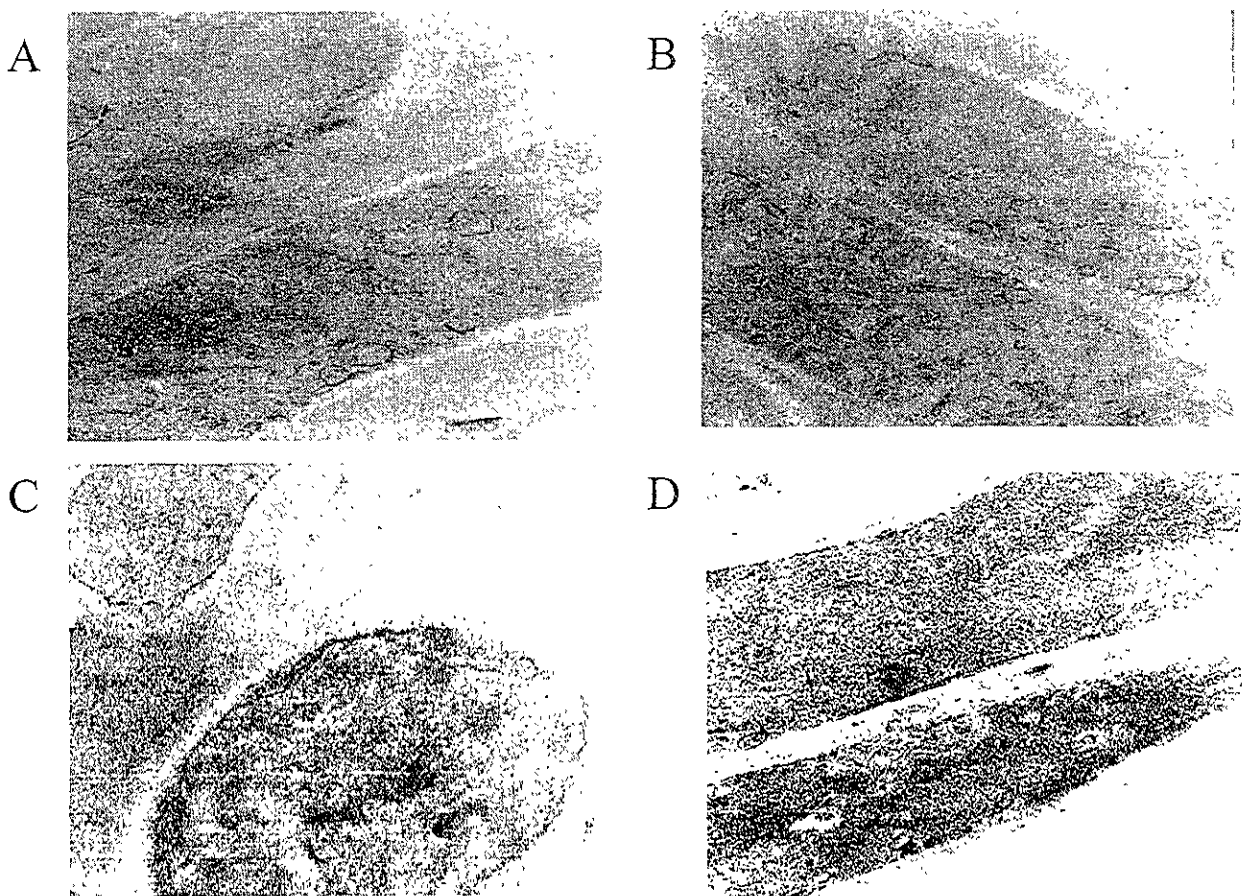


Figura 12. Una parte considerable de la catalasa B de *A. nidulans* está asociada a la pared celular. Los paneles A-C muestran cortes de micelio de 48 h de la cepa silvestre FGSC26. En A no hay anticuerpo, en B se utilizó una dilución 1:10 y en C una 1:100. El panel D muestra un corte de micelio de 48 h de la cepa *catB* (CLK15) en presencia de una dilución 1:50 del anticuerpo. El aumento es de 25,000 X en todos los casos.

(Kawasaki *et al.*, 1997). En el caso de *A. niger*, también se detectó una catalasa que está en la pared donde además se encuentra la glucosa oxidasa. En este caso, la catalasa tendría como función principal deshacerse del peróxido generado por dicha oxidasa (Witteven *et al.*, 1992).

2. *A. nidulans* tiene por lo menos tres catalasas distintas.

En *A. nidulans* se habían observado solamente dos bandas de actividad de catalasas denominadas A y B. Sin embargo, durante el curso de este trabajo, se obtuvo evidencia preliminar de la existencia de una tercera actividad, presente únicamente durante la fase estacionaria tardía. Para confirmar este resultado, se determinó la actividad de catalasa en un gel nativo utilizando muestras de mutantes dobles *catA⁻/catB⁻* obtenidas independientemente y crecidas durante 48 h en medio mínimo. En la Figura 13 puede observarse claramente la presencia de una catalasa con una movilidad electroforética mayor que la de la catalasa B.

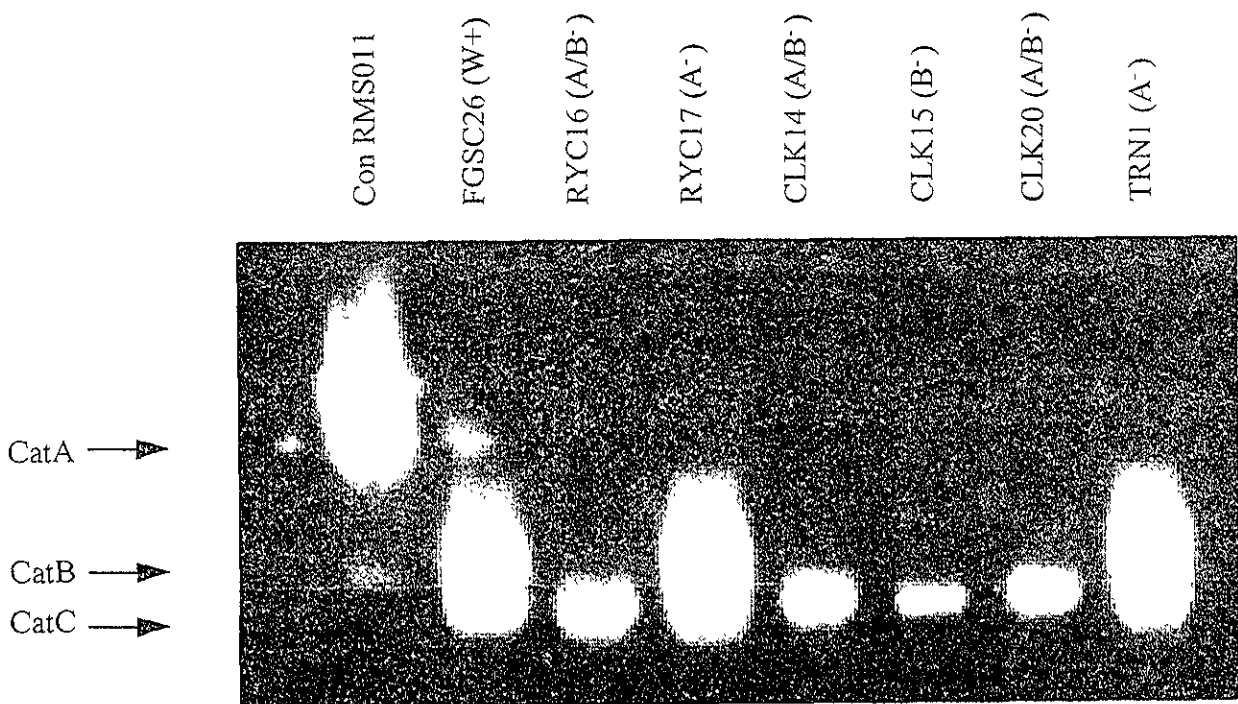


Figura 13. *A. nidulans* tiene por lo menos tres actividades de catalasas. En la figura se muestra un gel nativo teñido para actividad de catalasa con muestras de extractos totales de proteínas de micelio de 48 h obtenidos de diferentes cepas afectadas en las catalasas A y/o B. También se muestran un extracto de micelio también de 48 h de una cepa silvestre (FGSC26) y uno de conidios de la cepa RMS011 como controles de la posición de CatB y CatA, respectivamente.

Esta tercera actividad se designó catalasa C y está codificada por un gen diferente de los ya clonados y estudiados. Esta enzima comienza a detectarse a partir de las 48 h de crecimiento en medio mínimo y continúa presente a las 72 h (datos no mostrados). Una parte considerable de las catalasas A y B de *A. nidulans* están asociadas a la pared celular, por lo que es posible que la CatC sea peroxisomal. En *A. fumigatus* hay tres catalasas designadas, de acuerdo con su movilidad electroforética, S1 (slow 1), S2 (slow 2) y F1 (fast 1) (Hearn *et al.*, 1992). Las primeras dos tienen únicamente actividad de catalasa mientras que la F1 parece ser una catalasa/peroxidasa. Es probable que las catalasas S1 y S2 correspondan con CatB y CatA de *A. nidulans* y tal vez la F1 corresponda con la CatC. La F1 no siempre se detecta, es decir, hay diferencias entre experimentos (Hearn *et al.*, 1992) y solo se aprecia en medio con extracto de levadura pero no en medio mínimo (Calera *et al.*, 1997).

Se hicieron experimentos para intentar encontrar condiciones en las que se pudiera inducir la CatC, basándose principalmente en el supuesto de que se trate de una catalasa/peroxidasa peroxisomal, y por lo tanto, que pudiera inducirse en presencia de compuestos que favorecen la proliferación de peroxisomas, tales como ácidos grasos o acetato de sodio (Valenciano *et al.* 1996). Para este estudio se empleó la cepa CLK20(*catA*⁻/*catB*⁻). Como CatC se detectó hasta las 48 h, la cepa CLK20 se cultivó durante este tiempo en medio mínimo, en ácido oleico con tergitol NP10 como emulsificante o en baja glucosa (0.1%) más acetato de sodio. También se creció durante 24 h en medio mínimo y luego se transfirió el micelio a los medios ya indicados durante 24 horas más, para un total de 48 h de cultivo. La transferencia del micelio también se hizo a medios sin carbono o con Tween 80 como fuente de carbono. Los resultados (no mostrados) indicaron que la CatC parece inducirse cuando el cultivo se transfiere a baja glucosa más acetato, a medio sin carbono y muy poco en Tween 80. En los cultivos de 48 h sin transferencia, solo se apreció mayor actividad en baja glucosa más acetato (datos no mostrados). En este caso, el control de 48 h en medio mínimo prácticamente no se detectó actividad. Por lo tanto, al igual que Hearn *et al.* (1992) y Calera *et al.* (1997), se observaron diferencias entre experimentos en cuanto a la detección de actividad de CatC, los cuales podrían explicarse por variaciones en la extracción.

Capítulo IV. Estrategias para el aislamiento de mutantes incapaces de expresar el gen *catB*.

Para tratar de aislar mutantes regulatorias que no expresaran el gen *catB*, se mutagenizó la cepa TOS1 con luz ultravioleta. Esta cepa tiene cancelado el gen *catA* y en los tiempos de crecimiento empleados aún no aparece CatC, por lo que la mayor parte de la actividad detectada de catalasa debería provenir de CatB. De acuerdo con una curva de sobrevivencia, a los 90 seg de irradiación se obtuvo alrededor del 90% de muerte y por lo tanto, se empleó este tiempo para la mutagénesis. Las posibles mutantes se seleccionaron utilizando un método basado en los datos anteriores sobre la sensibilidad al H₂O₂ de las mutantes sin catalasa B (Kawasaki *et al.*, 1997). El método consistió en cubrir a las posibles mutantes con H₂O₂ (10 mM) durante 5 min y se seleccionaron las que mostraron poco o nada de burbujeo; también se seleccionaron aquéllas que después de ser tratadas con H₂O₂ y reincubadas por 24h más mostraran un menor crecimiento. Los resultados se resumen en la Tabla 1.

Tabla 1. Mutagénesis con luz ultravioleta de la cepa TOS1.

Total de mutantes analizadas	1373	1226
Primera selección	Por liberación de O ₂ al cubrirlas con H ₂ O ₂	Por su tamaño pequeño
No. de mutantes seleccionadas	86	96
Segunda selección	Por liberación de O ₂ al cubrirlas con H ₂ O ₂	Por liberación de O ₂ al cubrirlas con H ₂ O ₂
No. de mutantes seleccionadas	10	6

Se hizo una sola mutagénesis por lo que el total de colonias analizadas fue de 2599, de las cuales se analizaron más detalladamente 16. De estas últimas se hicieron cultivos líquidos de 20 h de crecimiento y se extrajo proteína para separarla en un gel nativo teñido para actividad de catalasas. El resultado de esta mutagénesis fue negativo, ya que todas las cepas presentaron actividad de catalasa B.

El aislamiento exitoso de mutantes regulatorias de *Aspergillus nidulans* utilizando como herramienta una fusión con el gen reportero *lacZ* ya se ha mostrado (Pérez-Esteban, *et al.*, 1995;

Brakhage y van den Brulle, 1995). El modelo esquemático de cómo funcionaría una fusión *catB::lacZ* para aislar mutantes regulatorias se presenta en la Figura 14.

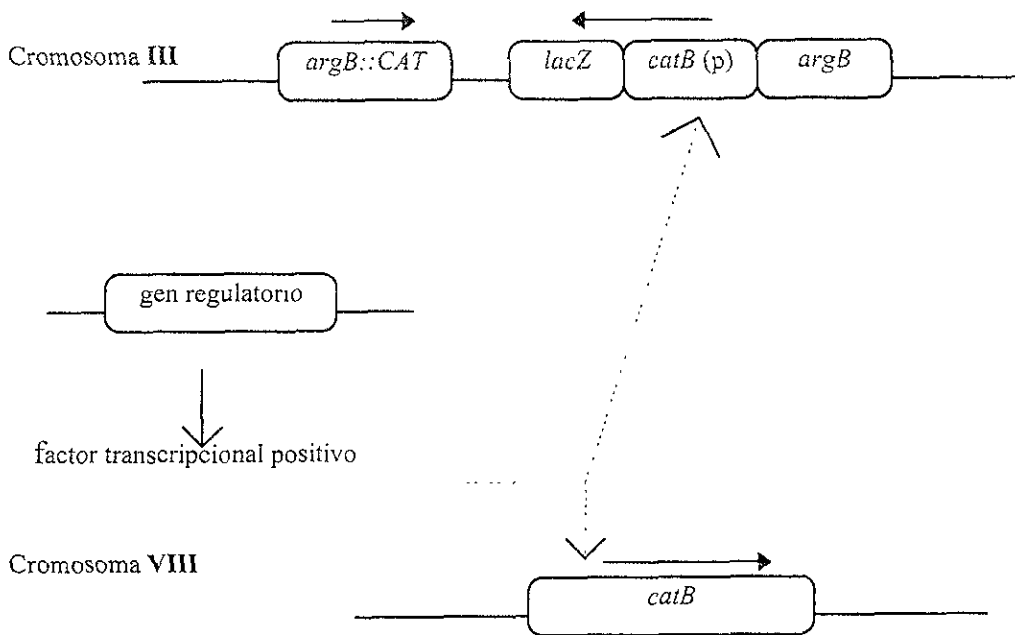


Figura 14. Uso de una fusión *catB::lacZ* como herramienta para la selección de mutantes regulatorias del gen *catB*. (Basado en Pérez-Esteban *et al.*, 1995). Al mutagenizar un gen que codifique para un factor transcripcional que actúe en *trans*, se esperaría que no se expresaran el gen reportero *lacZ* ni el gen estructural *catB*. Las flechas negras indicadas sobre los genes señalan la dirección de la transcripción.

De acuerdo con los datos obtenidos sobre la regulación del gen *catB* mediante el uso de las fusiones *catB::lacZ*, se esperaría que una parte considerable de dicha regulación se lleve a cabo mediante algún activador transcripcional, ya que no parece que intervenga un represor.

La cepa mutagenizada fue la TLK42 y nuevamente se empleó luz ultravioleta. El método de selección consistió en aislar aquellas mutantes que no se tiñeran de azul en presencia del sustrato cromogénico X-Gal. De un total de 7111 mutantes, se eligieron 50 que estaban poco o nada teñidas. Se hizo una segunda selección permeabilizando las colonias con cloroformo y exponiéndolas nuevamente a X-Gal. Esto último se hizo para evitar elegir colonias que estuvieran afectadas en algún mecanismo de transporte que impidiera la entrada del X-Gal, que además es poco permeable. Después de la segunda selección, solamente hubo 6 que no se tiñeron.

Se prepararon cultivos líquidos de 24 h de crecimiento de las seis mutantes, se les extrajo proteína y se corrió un gel nativo que se tiñó para actividad de catalasa. Nuevamente, el resultado fue negativo, es decir, todas las colonias presentaron actividad de catalasa B.

Al utilizar la cepa con la fusión *catB::lacZ* se esperaba obtener algunas mutantes regulatorias aunque también se esperaba aislar algunas que no se tiñeran debido a una mutación en el gen *lacZ*. En 1995, Pérez-Esteban *et al.*, reportaron el aislamiento de mutantes regulatorias afectadas en la expresión de genes del metabolismo secundario usando como herramienta una cepa con dos integraciones en tandem de la fusión *ipnA::lacZ*. De un total de 9000 colonias, aislaron siete que no se tiñeron o bien, lo hicieron con una intensidad considerablemente baja. Hicieron un análisis por hibridación tipo Southern y descubrieron que de las siete, cuatro habían perdido la fusión. Dados estos antecedentes, resulta probable que las seis mutantes que se aislaron con la fusión *catB::lacZ* la hayan perdido o bien, hayan sido dañadas en el gen *lacZ*.

En este trabajo se han montado las condiciones experimentales reproducibles para analizar mediante la tinción con X-Gal alrededor de 500 colonias por caja de petri. Además, ahora se sabe que aún removiendo la mayor parte de las regiones regulatorias de CatB (ver la Fig. 10) es posible obtener una expresión baja del reportero *catB::lacZ*. Por lo tanto, para intentar aislar las mutantes regulatorias se propone que se seleccionen colonias pálidas en vez de las totalmente blancas, probablemente con una tinción parecida a la obtenida con la cepa TLK56(-413) y que se utilice una cepa con una doble integración del plásmido con la fusión. En este momento, está disponible la cepa TLK40 que contiene precisamente una doble integración del plásmido y se observó que en presencia de X-Gal, su tinción es considerablemente mayor que una cepa isogénica con una sola integración (TLK42). Al utilizar una cepa con una doble integración disminuyen considerablemente las posibilidades de mutagenizar las dos fusiones.

Otro método de selección sugerido se basa en la tinción de geles nativos para ver actividad de catalasas y consistiría en el tratamiento de las posibles mutantes con H_2O_2 y su posterior tinción con ferricianuro de potasio y cloruro férrico. Bajo este criterio, las mutantes con catalasa formarían un halo claro mientras que aquellas sin la expresión de la enzima se verían más oscuras. En un primer ensayo, se sembraron cepas isogénicas que incluyeron a una silvestre y a mutantes con los genes *catA* y/o *catB* interrumpidos. El ensayo preliminar mostró

que mientras las cepas silvestre y *catA*⁻ formaron un halo, las mutantes *catB*⁻ no lo hicieron. Como es indispensable recuperar las mutantes después del tratamiento con ferricianuro de potasio y cloruro férrico, las cepas se volvieron a incubar a 37°C para corroborar si dicho tratamiento no afectaba la viabilidad o la esporulación de las colonias. Para poder utilizar este método, faltaría probarlo bajo las condiciones en las que se pensaría emplear, es decir, en cajas de petri con 500 colonias y en presencia de desoxicolato de sodio como inhibidor de crecimiento.

DISCUSION GENERAL

Aspergillus nidulans posee al menos tres distintas catalasas.

Aspergillus nidulans tiene tres catalasas que se regulan diferencialmente durante el crecimiento y el desarrollo (Navarro *et al.*, 1996; Kawasaki *et al.*, 1997; este trabajo). ¿Por qué requiere este microorganismo de tres enzimas distintas para deshacerse del H_2O_2 ? ¿Qué ventajas puede ofrecerle el poseer tres proteínas reguladas diferencialmente, en vez de una sola constitutiva?

La catalasa A (codificada por el gen *catA*) se encuentra en gran cantidad tanto en las esporas asexuales o conidios (Navarro *et al.*, 1996) como en las esporas sexuales o ascosporas y una parte importante de la enzima se ha inmunolocalizado en la pared celular de los conidios (Navarro y Aguirre, comunicación personal). La catalasa B, codificada por el gen *catB*, se induce durante el crecimiento y continúa en aumento durante la fase estacionaria y el desarrollo asexual. CatB se inmunolocalizó en la pared celular de hifas de 48 h de crecimiento pero también se encuentra presente en la fracción soluble de proteínas (Kawasaki *et al.*, 1997; Fig. 12, Capítulo III). El patrón de actividad de catalasa detectado en un gel nativo indica que cuando CatA es muy abundante, CatB está prácticamente ausente (conidios) y viceversa (micelio de 18 h de crecimiento). Esto sugiere que las dos enzimas se requieren en diferentes tiempos y estados del desarrollo (Kawasaki *et al.*, 1997). Una tercera, la catalasa C, comienza a inducirse en la fase estacionaria tardía (48 h), tiempo en el que también se encuentra presente CatB, aunque esta última es más abundante (Fig. 13, Capítulo III). En esta etapa del crecimiento, parece requerirse de ambas enzimas. En la fase estacionaria ocurren múltiples cambios metabólicos, como consecuencia del consumo de los nutrientes del medio. El hongo debe recurrir a la movilización de sus reservas, las cuales podrían incluir ácidos grasos, que se degradan a través de la β -oxidación en los peroxisomas y por lo tanto, habría una proliferación de éstos y de las enzimas propias de este organelo. La β -oxidación de ácidos grasos genera H_2O_2 y se requiere contar con un mecanismo de desintoxicación dentro del peroxisoma. En algunos microorganismos como en la levadura *S. cerevisiae* se detectó una catalasa peroxisomal (*CTA1*) que es inducible por ácidos grasos (Simon *et al.*, 1992; Filipits *et al.*, 1993; Fig. 1 de la Introducción). *A. niger* tiene por lo

menos dos genes de catalasas, que son *catR* (homólogo de *catB*; Kawasaki *et al.*, 1997) y otro que se clonó por hibridación cruzada utilizando como sonda el gen *CTA1* de levadura. El producto de este segundo gen se induce durante el crecimiento en ácidos grasos y probablemente sea peroxisomal (Fowler *et al.*, 1993). En *A. fumigatus* se detectaron tres actividades de catalasas que se denominaron S1 (slow 1), S2 (slow 2) y F(fast) debido a su movilidad electroforética (Hearn *et al.*, 1992). La catalasa F de *A. fumigatus* tiene actividad de peroxidasa (Hearn *et al.*, 1992). De las tres catalasas de *A. nidulans*, CatC es la que tiene una mayor movilidad electroforética (Fig. 13, Capítulo III) y como parece ser que las catalasas S1 y S2 de *A. fumigatus* son las homólogas de CatA y CatB, es probable que la catalasa F sea homóloga a CatC. Considerando esta posibilidad, resultaría muy interesante determinar si esta última también posee actividad de peroxidasa. En eucariotes, hasta la fecha solamente se han descrito dos catalasas/peroxidasas, ambas en hongos (Levy *et al.*, 1992; Fraaije *et al.*, 1996). Sería igualmente interesante determinar si la CatC de *A. nidulans* es peroxisomal porque de ser así, podría ser que se indujera durante la fase estacionaria como consecuencia de la utilización de ácidos grasos de reserva, sin interferir con las funciones de la CatB, ya que cada una cumpliría un papel diferente en función de su localización celular. Cuando se creció una cepa *catA⁻/catB⁻* en presencia de ácidos grasos como única fuente de carbono, al contrario de lo que se esperaba, no se detectaron diferencias en el crecimiento al compararla con una cepa silvestre (Kawasaki *et al.*, 1997). Este resultado se explicaría si la CatC fuera peroxisomal.

La catalasa B de *A. nidulans* es muy parecida a otras catalasas.

El polipéptido predicho para la catalasa B es muy semejante al de otras catalasas, particularmente a la Cat1 de *A. fumigatus* y a la CatR de *A. niger*, con las cuales tiene un 78 y 61% de identidad, respectivamente. La posición del primer intrón está conservada entre los genes que codifican para estas enzimas, lo cual aunado al alto porcentaje de identidad que comparten, indica que los genes correspondientes son homólogos. En contraposición, el porcentaje de identidad entre la catalasa B y la catalasa A del propio *A. nidulans* es de tan solo el 40% (Kawasaki *et al.*, 1997). Las catalasas de *Aspergillus* parecen estar relacionadas filogenéticamente con las catalasas de algunas bacterias, como la HP11 de *E. coli* (Klotz *et al.*,

1997) y constituyen un grupo de catalasas caracterizado por tener subunidades muy grandes, de aproximadamente 80 kDa mientras que otras catalasas tienen subunidades más pequeñas, de entre 50 y 65 kDa.

En *A. fumigatus*, como se mencionó anteriormente, se han detectado tres actividades de catalasas y se han clonado dos genes que son los homólogos de *catA* y *catB* de *A. nidulans* (Takasuka *et al.*, No. de acceso del GenBank Y07763; Wysong *et al.*, No. de acceso del GenBank U87630; Calera *et al.*, 1997). La catalasa I de *A. fumigatus* es homóloga de CatB y constituye un antígeno diagnóstico en pacientes con aspergilloma. El gen *catI* que codifica para esta enzima está clonado y secuenciado; tiene cinco intrones y el polipéptido deducido tiene cuatro sitios potenciales de N-glicosilación (Calera *et al.*, 1997). La catalasa correspondiente es un tetrámero con subunidades de 90 kDa definidas a partir de un gel con SDS, mientras que las subunidades de CatB tienen un peso de 79.1 kDa, determinado de acuerdo con el polipéptido predicho a partir de la secuencia (Kawasaki *et al.*, 1997). El peso de CatB en un gel con SDS es mayor, probablemente debido a la presencia de glicosilación. La proteína CatI tiene un péptido señal y un propéptido de 15 y 22 aminoácidos respectivamente, lo cual coincide con que la enzima se haya detectado en la pared celular, en la fracción membranal y en el medio de cultivo (Calera *et al.*, 1997). La CatB de *A. nidulans* también muestra un posible péptido señal, cuya funcionalidad se infiere de experimentos con distintas fusiones *catB::lacZ*. Una de estas fusiones, integrada en las cepas TLK25 y TLK26, incluía la secuencia del supuesto péptido señal y la actividad de β -galactosidasa resultante fue muy inferior a los niveles esperados en relación a la actividad de catalasa detectada bajo las mismas condiciones (Fig. 3, Capítulo II). Sin embargo, al remover la secuencia que codifica para este péptido, la actividad del reportero reflejó los datos obtenidos de actividad de catalasa y la acumulación del mensajero correspondiente (Figs. 6 y 7, Capítulo II). La presencia del péptido señal predicho interfirió con la expresión del gen reportero, posiblemente porque la β -galactosidasa quedó atrapada en el retículo endoplásmico u otros compartimentos intracelulares o bien debido a que se estaba degradando. Al comparar CatB con CatI, se observó que no solamente tienen muy conservada la secuencia del péptido señal, sino también el propéptido (Fig.2 de Kawasaki *et al.*, 1997), incluyendo las dos argininas que constituyen el sitio en que se procesa el péptido para dar origen

a la proteína madura Cat1 (Calera *et al.*, 1997). No se sabe si *cat1* y *catB* se regulen o no de manera similar, aunque al comparar sus regiones regulatorias 5' se observó una identidad global del 38% y se detectaron algunas zonas más conservadas (ver Apéndice II). En *A. fumigatus* la interrupción del gen *cat1* no afectó significativamente la patogenicidad, la sensibilidad al H₂O₂ ni la viabilidad de los conidios en presencia de leucocitos polimorfonucleares activados (Calera *et al.*, 1997). Sin embargo, bajo las condiciones probadas en estos ensayos y de acuerdo con los datos en *A. nidulans*, la mayor actividad de catalasa presente en los conidios es la homóloga de CatA y no la de CatB. Por lo tanto, era de esperarse que no se observaran diferencias en conidios sin Cat1. Resulta claro que Cat1 y CatB son homólogas además de por su similitud a nivel de secuencias nucleotídica y peptídica, porque son reconocidas por el mismo anticuerpo (Fig. 12, Capítulo III).

Regulación de la catalasa B.

Anteriormente se había observado que la acumulación del mensaje de *catB* coincide con la presencia de la actividad de la CatB, por lo que se sugirió un control transcripcional del gen (Kawasaki *et al.*, 1997). En el presente trabajo, el estudio de la regulación del gen *catB* mediante las fusiones *catB::lacZ* demostró que, efectivamente, la regulación es principalmente a nivel transcripcional. Se obtuvieron tres transformantes con una sola integración de la fusión *lacZ* en el locus *argB*, cada una con diferentes deleciones de la región regulatoria 5' del gen *catB*. Las transformantes empleadas fueron la TLK42(-3500), la TLK50(-993) y la TLK56(-413), las cuales contienen fragmentos cada vez más pequeños de la región 5' de CatB. Al analizar el comportamiento de estas tres fusiones durante el crecimiento, se observó que de las 18 h en adelante, aparentemente se desreprimió la expresión del reportero en la TLK50(-993) con respecto a la TLK42(-3500) sugiriendo que se había removido una región que podría participar en una regulación negativa del gen *catB* (Fig. 10, capítulo II). Sin embargo, en tiempos anteriores a las 18h, tales como las 8 y 10 h no se observó este efecto. Los datos obtenidos sugieren que secuencias regulatorias contenidas entre la región -993 y -413 se requieren para la regulación positiva del gen *catB* (Fig. 10, Capítulo II).

La catalasa B no solamente se regula durante el crecimiento y la fase estacionaria sino que también responde rápidamente (2 h) a la tensión oxidativa generada por H_2O_2 o por paraquat y a la utilización del ácido úrico como única fuente de nitrógeno (Kawasaki *et al.*, 1997). La regulación de la catalasa A en respuesta a la tensión (oxidativa, osmótica) es completamente diferente a la de la catalasa B. El mensaje de *catA* se acumula en respuesta a la tensión pero la proteína está ausente, indicando una regulación postranscripcional (Navarro y Aguirre, en preparación). Por lo tanto, la CatB es la encargada de responder rápidamente a la tensión oxidativa. La respuesta antioxidante en microorganismos se ha estudiado principalmente en *E. coli* y en eucariotos, el modelo más estudiado es la levadura *S. cerevisiae*. En *E. coli*, la respuesta a la tensión oxidativa dado por la presencia de H_2O_2 durante el crecimiento exponencial está mediado por el factor OxyR, el cual es responsable de la inducción de por lo menos nueve genes diferentes. Entre ellos se encuentran la catalasa-peroxidasa HPI (*katG*), la glutatión reductasa (*gorA*) y una proteína que participa en la protección del DNA contra el daño oxidativo (*dps*) (Christman *et al.*, 1989). Durante la fase estacionaria, el factor RpoS regula la expresión de por lo menos 30 genes que participan en la osmoprotección, en los cambios en morfología celular y en la respuesta general a la tensión. En cuanto a la respuesta a la tensión oxidativa, RpoS regula, al igual que OxyR, la expresión de *katG*, *gorA* y *dps*, y a diferencia de OxyR, regula además a *katE* (catalasa HPII; Siegele y Kolter, 1992; Hengge-Aronis, 1993). La respuesta al superóxido está mediada por el activador transcripcional SoxS, el cual regula, entre otros genes, a *sodA*, el cual codifica para la superóxido dismutasa dependiente de Mn (Greenberg *et al.*, 1990). En *S. cerevisiae* la catalasa citosólica responde, a través de los sitios STRE, a la tensión oxidativa generado por H_2O_2 , a la alta osmolaridad y a la limitación de nitrógeno (Bissinger *et al.*, 1989; Schüller *et al.*, 1994). Las tensiones por limitación de carbono, choque de calor y etanol también inducen a la catalasa T a través de los factores transcripcionales Msn2p/Msn4p, los cuales se unen a los sitios STRE (Schüller *et al.*, 1994; Martínez-Pastor *et al.*, 1996; Schmitt y McEntee, 1996; ver Fig. 2 de la Introducción). Esta catalasa también se induce por hemo mediante el factor Hap1p (Winkler *et al.*, 1988). La MnSOD (*SOD2*) de *S. cerevisiae* se induce durante la fase estacionaria y esta regulación depende del factor Hap2/3/4/5 y de sitios STRE (Flattery-O'Brien *et al.*, 1997).

En el presente trabajo, la utilización de fusiones *catB::lacZ* ha permitido estudiar la regulación del gen *catB*. Hasta ahora se ha definido una región de aproximadamente 500 pb en el extremo 5' de *catB*, la cual participa tanto en la regulación durante la fase estacionaria de crecimiento, como en la respuesta a la tensión oxidativa causado por el paraquat (ver Fig. 10, Capítulo II de Resultados). La presencia de paraquat durante 2 h, fue capaz de lograr una inducción del reportero semejante a la obtenida a las 28 h de crecimiento en un medio mínimo (aproximadamente 1400 U de β -galactosidasa). No se sabe si estas dos respuestas estén mediadas exactamente por las mismas regiones regulatorias. Podría considerarse la posibilidad de que se genere tensión oxidativa durante la fase estacionaria del crecimiento, dada por la pérdida de poder reductor durante la limitación de nutrientes y en tal caso un mismo factor transcripcional mediaría la activación de *catB* en respuesta a la tensión oxidativa y durante la fase estacionaria.

En *S. cerevisiae* tanto la catalasa T como la MnSOD se inducen durante la limitación de nutrientes. Cuando la levadura crece en un medio completo, RAS1 y RAS2 están activas y se encargan de activar a la adenilato ciclasa teniendo como consecuencia un aumento en AMPc. Este se une a la subunidad reguladora (BCY1) de la proteína cinasa A y ésta fosforila a varias proteínas originando una gran variedad de respuestas a nivel transcripcional y metabólico que estimulan el crecimiento celular (Belazzi *et al.*, 1991). Cuando hay limitación de nutrientes, como podría ser en la fase estacionaria o en un medio mínimo, el AMPc disminuye y las células entran a un estado de reposo (Belazzi *et al.*, 1991). La catalasa T se induce en un medio mínimo, pero en medio rico se encuentra reprimida. Este control está dado por la ruta RAS-AMPc mencionada anteriormente (Bissinger *et al.*, 1989; Belazzi *et al.*, 1991). En el promotor de *CTT1* hay dos sitios STRE funcionales (Marchler *et al.*, 1993) que se requieren para inducir el gen en respuesta a la limitación de nitrógeno, fósforo, azufre y carbono (Bissinger *et al.*, 1989; Martínez-Pastor *et al.*, 1996; ver Fig. 2 de la Introducción). La MnSOD (*SOD2*) de *S. cerevisiae* se induce aproximadamente 6.5 veces al entrar en la fase estacionaria y esta regulación se debe en parte al cambio a una fuente de carbono no fermentable y en parte a la limitación de nutrientes. Al igual que la catalasa T, *SOD2* se regula negativamente por los niveles intracelulares de AMPc y esta regulación depende parcialmente de elementos STRE localizados

en el promotor del gen. La SOD2 también se induce mediante el complejo HAP2/3/4/5, el cual se une a un sitio diferente del promotor. Para poder anular la respuesta a la fase estacionaria, se requiere mutagenizar tanto los sitios STRE como el sitio de unión del complejo HAP (Flattery-O'Brien *et al.*, 1997).

Cuando las cepas con la fusión *catB::lacZ* (TLK42, TLK50 y TLK56) se sembraron en un medio rico en presencia de X-Gal se apreció que, a diferencia de lo observado en medio mínimo, no se indujo el reportero, es decir, no se apreció una tinción azul. Probablemente la catalasa B se regule de manera similar a la catalasa T de *S. cerevisiae*, es decir, en presencia de nutrientes se reprima y en limitación de éstos, se induzca. No se sabe si la regulación de CatB también dependa de los niveles intracelulares de cAMP. Som y Kolaparthi (1994) clonaron y secuenciaron el gen *ras* de *A. nidulans* e hicieron fusiones de este gen con el promotor inducible de la alcohol deshidrogenasa (*alcA*). Estas fusiones contenían un gen Ras silvestre y mutantes que resultan en formas permanentemente activas de ras (Ras-GTP) o inactivas (Ras-GDP) integrados en *argB*. Como *ras* es un gen esencial, todas estas fusiones contienen además la copia silvestre del gen. Para definir si la sobreexpresión de Ras afectaba la expresión de las catalasas de *A. nidulans*, se hicieron extractos totales de proteínas de las cepas con las fusiones mencionadas y se corrieron en un gel nativo teñido para actividad de catalasas. Lo que se observó fue que en medio mínimo, al sobreexpresar Ras en cualquiera de sus formas, se indujo la CatB a un nivel mucho más elevado que cualquiera detectado anteriormente (Navarro y Aguirre, en preparación). Cuando se hizo el mismo experimento en medio completo, no se observó la inducción de la catalasa B (Navarro y Aguirre, en preparación). La interpretación de estos datos podría ser que en medio completo *catB* recibe tanto la señal de inducción mediada por Ras como la señal de represión mediada por la presencia de nutrientes en el medio y que esto anula la inducción. En medio mínimo, la única señal sería la de Ras y por lo tanto, se observa la inducción. Otro aspecto que no se ha definido es si la señal dada por Ras se debe a la presencia de especies de oxígeno reactivas. Sin embargo, al añadir DPI, que es un inhibidor de la NADPH oxidasa la cual genera superóxido, se observó una inducción menor de CatB que resultó ser dependiente de la concentración empleada del inhibidor (Navarro y Aguirre, en preparación).

Estos datos sugieren que la inducción de CatB por sobreexpresión de *ras* está mediada por especies de oxígeno reactivas.

Para cuantificar los efectos de Ras en la regulación de la catalasa B se hicieron diploides que contienen tanto la fusión *alcA::ras* (GTP o GDP) como las fusiones *catB::lacZ* con las diferentes delecciones del extremo 5'. Estos diploides se estriaron en diferentes medios que permiten inducir *alcA* a varios niveles. Los medios contenían además, X-Gal. En medio represivo para *alcA*, no se observó tinción azul para ninguno de los diploides, mientras que en condiciones de inducción intermedia, se observó que el diploide menos teñido correspondió con el que contiene menos región regulatoria 5' (413 pb) fusionada a *lacZ*. Los diploides que contienen 3500 o 993 pb de región 5' de *catB* adquirieron una tinción semejante. Estos resultados sugieren que las secuencias contenidas en los mismos 580 pb que median la respuesta a la fase estacionaria y a la tensión oxidativa, son responsables de la respuesta a la señal generada por la sobreexpresión de Ras. En la Figura 15 se esquematiza un posible modelo de regulación del gen *catB* basado en los datos generados en el presente trabajo.

La motivación para el desarrollo de esta tesis provino de la propuesta de que el estrés oxidativo causa la diferenciación en microorganismos. Aunque la mutación de las catalasas A y B no tuvo efectos notables en la conidiación, la inducción de CatB durante el crecimiento y la conidiación así como la aparición de CatA en los conidios sugiere que ocurre una tensión oxidativa durante la diferenciación de *A. nidulans*. El estudio de las catalasas representa por lo tanto, un enfoque adecuado para acercarse al entendimiento de la relación entre la tensión oxidativa y la diferenciación.

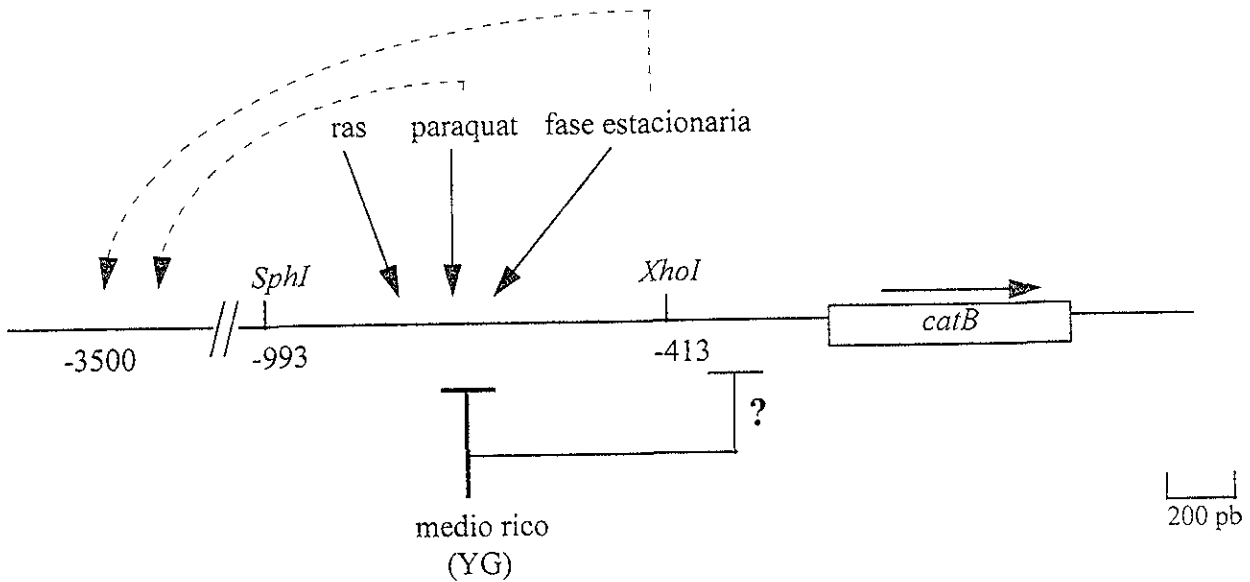


Figura 15. Factores que regulan la expresión del gen *catB* a nivel transcripcional. Las condiciones que indujeron *catB* fueron el tratamiento con el paraquat, la fase estacionaria de crecimiento (este trabajo) y la sobreexpresión de *ras* (Navarro y Aguirre, sin publicar). El crecimiento en medio rico reprimió la expresión de *catB*. La evidencia de la inducción por paraquat y por la fase estacionaria proviene tanto de la medición de actividad de CatB como de la expresión del reportero *catB::lacZ*. Las flechas punteadas indican que las secuencias responsables de una parte de la inducción (aproximadamente el 38%) dada por paraquat y la fase estacionaria se encuentran río arriba del sitio -993 (ver Fig.10). La evidencia para la represión de *catB* en medio rico sólido (YG: extracto de levadura 0.5%, glucosa 2%) proviene únicamente de tinción con X-Gal utilizando el reportero *catB::lacZ*. La sobreexpresión de Ras-GTP puede causar la producción de especies de oxígeno reactivas (Irani *et al.*, 1997) mientras que el paraquat genera superóxido, por lo que podría proponerse que la respuesta a ambas condiciones está mediada por un mismo factor transcripcional. Quedaría por demostrar si durante la fase estacionaria se producen especies de oxígeno reactivas y el mecanismo por el cual el medio rico reprime a *catB*.

CONCLUSIONES

1. El gen *catB* codifica para una catalasa de 721 aminoácidos más parecida a la CatI de *A. fumigatus* (78% de identidad) y a la CatR de *A. niger* (61%) que a la CatA del propio *A. nidulans* (40%), lo cual sugiere un origen evolutivo distinto para CatA y CatB.
2. El gen *catB* se regula durante el ciclo de vida de *A. nidulans*. El mensaje de *catB* comienza a acumularse alrededor de las 10 h de germinación y continúa induciéndose durante el crecimiento y el desarrollo asexual pero está ausente en conidios.
3. La expresión de CatB también se regula en condiciones de tensión medioambiental. La catalasa B se induce por la tensión oxidativa, generada por el tratamiento con H₂O₂ o paraquat, por choque de calor y por el crecimiento en ácido úrico como única fuente de nitrógeno. La catalasa B no responde a la tensión osmótica.
4. La mutación del gen *catB* produce mutantes sensibles al tratamiento con H₂O₂, en un estado particular del ciclo de vida de *A. nidulans* (colonias jóvenes).
5. Las mutantes *catB*⁻ o *catA*⁻/*catB*⁻ no presentan ningún fenotipo evidente durante la esporulación.
6. Una parte importante de la catalasa B se encuentra asociada a la pared celular de las hifas en crecimiento.
7. La correlación entre la acumulación de mensaje y la actividad detectada en geles nativos aunado a los datos obtenidos con las fusiones *catB::lacZ* indican que la regulación de *catB* ocurre principalmente a nivel transcripcional.
8. Se definió una región de 580 pb en el extremo 5' de *catB* que es importante tanto para la respuesta a la tensión oxidativa como durante la fase estacionaria.
9. Utilizando mutantes dobles *catA*⁻/*catB*⁻, se detectó una tercera catalasa denominada C que se expresa durante la fase estacionaria tardía del crecimiento. En geles nativos, la CatC tiene una movilidad electroforética mayor que las catalasas A o B.

PERSPECTIVAS

Las perspectivas de este trabajo con respecto a la regulación de *catB* incluye la definición de la funcionalidad de los posibles sitios de unión a factores de transcripción detectados en la región regulatoria 5' del gen *catB*. Hasta el momento se ha definido una región de 580 pb que es necesaria para la regulación apropiada tanto durante la fase estacionaria de crecimiento, como en respuesta a la tensión oxidativa, por lo que el análisis se enfocaría en estas secuencias. Para llevar a cabo este estudio, se propone hacer mutagénesis dirigidas de los sitios de interés o bien, deleciones unidireccionales. Otra posibilidad sería el análisis del reportero *catB::lacZ* en mutantes afectadas en genes que codifican para factores transcripcionales que podrían participar en la respuesta a la tensión oxidativa, tales como *meaB*, *hapC* o *uaY*.

El aislamiento de mutantes regulatorias, incapaces de expresar el gen *catB* apropiadamente, es un enfoque complementario para tratar de entender la regulación del gen *catB* y la respuesta antioxidante en general. Para este fin, sería importante partir de una cepa con una doble integración de la fusión *catB::lacZ* (TLK40) y utilizar los métodos de selección sugeridos en este trabajo. Al aislar mutantes, el primer paso sería la definición de grupos de complementación y posteriormente, la caracterización de éstos.

También es importante la caracterización bioquímica de la catalasa C, principalmente el determinar si posee o no actividad de peroxidasa, así como su localización intracelular. La tinción con diamino bencidina (DAB, Van Dijken *et al.*, 1975) de una cepa *catA⁻/catB⁻* podría indicar si la catalasa C es o no peroxisomal.

REFERENCIAS

- Aguirre, J. 1992. *Aspergillus nidulans* como sistema experimental, y la esporulación como modelo de diferenciación celular y regulación genética. *Ciencia* 43: 445-450
- Aguirre, J. 1993. Spatial and temporal controls of the *Aspergillus brIA* developmental regulatory gene. *Mol Microbiol* 8(2): 211-218.
- Akiyama, Y. 1995. TFSEARCH ver 1.3. dirección <http://pdap1.trc.rwcp.or.jp/research7db/TFSEARCH.html>
- Altuvia, S., Weinstein-Fischer, D., Zhang, A., Postow, L. y Storz, G. 1997. A small, stable RNA induced by oxidative stress: role as a pleiotropic regulator and antimutator. *Cell* 90: 43-53
- Amabile-Cuevas, C.F. y Demple, B. 1991. Molecular characterization of the *soxRS* genes of *Escherichia coli*: two genes control a superoxide stress regulon. *Nucleic Acids Res.* 19: 4479-4484
- Aramayo, R. y Timberlake, W.E. 1993. The *Aspergillus nidulans yA* gene is regulated by *abaA*. *EMBO J.* 12(5): 2039-2048
- Ariza, R.R., Cohen, S.P., Bachhawat, N., Levy, S.B. y Demple, B. 1994. Repressor mutations in the *marAB* operon that activate oxidative stress genes and multiple antibiotic resistance in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 176(1): 143-148.
- Ariza, R.R., Li, Z., Ringstad, N. y Demple, B. 1995. Activation of multiple antibiotic resistance and binding of stress-inducible promoters by *Escherichia coli* Rob protein. *J. Bacteriol.* 177(7): 1655-1661
- Aviv, M., Giladi, H., Schreiber, G., Oppenheim, A.B. y Glaser, G. 1994. Expression of the genes coding for the *Escherichia coli* integration host factor are controlled by growth phase, *rpoS*, ppGPP and by autoregulation. *Mol Microbiol.* 14(5): 1021-1031.
- Baldwin, J.L. y Natvig, D.O. 1995. The cloning and characterization of the *Neurospora crassa* catalase gene, *cat-1*. In 18th Fungal Genetic Conference, Abstract p 31. Asilomar, CA.
- 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(3): 585-592.
- Bissinger, P.H., Wieser, R., Hamilton, B. y Ruis, H. 1989. Control of *Saccharomyces cerevisiae* catalase T gene (*CTT1*) expression by nutrient supply via the RAS-cyclic AMP pathway. *Mol Cell Biol* 9: 1309-1315.
- Bohringer, J., Fischer, D., Mosler, G. y Hengge-Aronis, R. 1995. UDP-glucose is a potential intracellular signal molecule in the control of expression of σ^+ -dependent genes in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 177(2): 413-422.
- Bossier, P., Fernandes, L., Rocha, D. y Rodrigues-Pousada, C. 1993. Overexpression of *YAP2*, coding for a new yAP protein, and *YAP1* in *Saccharomyces cerevisiae* alleviates growth inhibition caused by 1,10-phenanthroline. *J. Biol. Chem.* 268(31): 23640-23645.
- Bradford, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254
- Brakhage, A. y van den Brulle, J. 1995. Use of reporter genes to identify recessive *trans*-acting mutations specifically involved in the regulation of *Aspergillus nidulans* penicillin biosynthesis genes. *J. Bacteriol.* 177(10): 2781-2788.

- Brody, H., Griffith, J., Cuticchia, A.J., Arnold, J. y Timberlake, W.E. 1991. Chromosome-specific recombinant DNA libraries from the fungus *Aspergillus nidulans*. *Nucleic Acids Res.* **19**: 3105-3109.
- Brown-Peterson, N.J. y Salin, M.L. 1993 Purification of a catalase-peroxidase from *Halobacterium halobium* characterization of some unique properties of the halophilic enzyme *J Bacteriol* **175**(13): 4197-4202
- Calera, J.A., Paris, S., Monod, M., Hamilton, A.J., Debeaupuis, J.P., Diaquin, M., López-Medrano, R., Leal, F. y Latgé, J.P. 1997 Cloning and disruption of the antigenic catalase gene of *Aspergillus fumigatus* *Infect Immun* **65**(11): 4718-4724
- Cendrin, F., Jouve, H.M., Gaullard, J., Thibault, P. y Zaccari, G. 1994. Purification and properties of a halophilic catalase-peroxidase from *Haloarcula marismortui*. *Biochem Biophys Acta* **1209**: 1-9.
- 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**(5): 2646-2652.
- Christman, M.F., Morgan, R.W., Jacobson, F.S. y Ames, B.N. 1985. Positive control of a regulon for defenses against oxidative stress and some heat-shock proteins in *Salmonella typhimurium* *Cell* **41**: 753-762
- Christman, M.F., Storz, G. y Ames, B.N. 1989 OxyR, a positive regulator of hydrogen peroxide-inducible genes in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*, is homologous to a family of bacterial regulatory proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* **86**: 3484-3488
- Claiborne, A. y Fridovich, I. 1979 Purification of the o-dianisidine peroxidase from *Escherichia coli* B *J Biol Chem* **254**(10): 4245-4252
- Clutterbuck, A.J. 1974. *Aspergillus nidulans*. en *Handbook of Genetics*. Ed King, R.C. Plenum Press, Nueva York, E. U. p. 447-510
- Cohen, S.P., Hachler, H. y Levy, S.B. 1993 Genetic and functional analysis of the multiple antibiotic resistance (*mar*) locus in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* **175**(5): 1484-1492
- Cohen, G., Fessl, F., Traczyk, A., Rytka, J. y Ruis, H. 1985 Isolation of the catalase A of *Saccharomyces cerevisiae* by complementation of the *cta1* mutation *Mol Gen. Genet* **200**(1): 74-79.
- Coleman, S.T., Tseng, E. y Moye-Rowley, W.S. 1997. *Saccharomyces cerevisiae* basic region-leucine zipper protein regulatory networks converge at the *ATR1* structural gene *J. Biol Chem* **272**(37): 23224-23230.
- Compan, I. y Touati, D. 1993. Interaction of six global transcription regulators in expression of manganese superoxide dismutase in *Escherichia coli* K-12 *J Bacteriol.* **175**(6): 1687-1696.
- Davies, K.J., Sevanian, A., Muakkassah-Kelly, S.F. y Hochstein, P. 1986. Uric acid-iron ion complexes: a new aspect of the antioxidant function of uric acid. *Biochem. J.* **235**: 747-754.
- del Río, L.A., Gómez Ortega, M., Leal López, A. y López Gorgé, J. 1977. A more sensitive modification of the catalase assay with the Clark oxygen electrode. *Anal Biochem* **80**: 409-415
- d'Enfert, C. y Fontaine, T. 1997. Molecular characterization of the *Aspergillus nidulans treA* gene encoding an acid trehalase required for growth on trehalose. *Mol. Microbiol.* **25**(1): 203-216
- Devereux, J., Haeblerli, P. y Smithies, O. 1984 A comprehensive set of sequence analysis programs for the VAX. *Nucleic Acids Res* **12**: 387-395

- Einerhand, A.W.C., Kos, W.T., Distel, B. y Tabak, H.F. 1993. Characterization of a transcriptional control element involved in proliferation of peroxisomes in yeast in response to oleate. *Eur. J. Biochem.* **214**: 323-331.
- Ellenberger, T.E., Brandl, C.J., Struhl, K. y Harrison, S.C. 1992. The GCN4 basic-region-leucine zipper binds DNA as a dimer of uninterrupted α -helices: crystal structure of the protein-DNA complex. *Cell* **71**: 1223-1237.
- Engelberg, D., Klein, C., Martinetto, H., Struhl, K. y Karin, M. 1994. The UV response involving the RAS signaling pathway and AP-1 transcription factors is conserved between yeast and mammals. *Cell* **77**: 381-390.
- Fernandes, L., Rodrigues-Pousada, C. y Struhl, K. 1997. Yap, a novel family of eight bZIP proteins in *Saccharomyces cerevisiae* with distinct biological functions. *Mol. Cell Biol.* **17**(12): 6982-6993.
- Filipits, M., Simon, M.M., Rapatz, W., Hamilton, B. y Ruis, H. 1993. A *Saccharomyces cerevisiae* upstream activating sequence mediates induction of peroxisome proliferation by fatty acids. *Gene* **132**: 49-55.
- Flattery-O'Brien, J.A., Grant, C.M. y Dawes, I.W. 1997. Stationary-phase regulation of the *Saccharomyces cerevisiae* *SOD2* gene is dependent on additive effects of HAP2/3/4/5- and STRE-binding elements. *Mol. Microbiol.* **23**(2): 303-312.
- Forsburg, S.I. y Guarente, L. 1989. Identification and characterization of HAP4, a third component of the CCAAT-bound HAP2/HAP3 heteromer. *Genes Dev.* **3**: 1166-1178.
- 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**(5): 989-998.
- Fraaije, M.W., Roubroeks, H.P., Hagen, W.R., Van Berkel, W.J.H. 1996. Purification and characterization of an intracellular catalase-peroxidase from *Penicillium simplicissimum*. *Eur. J. Biochem.* **235**: 192-198.
- Gaffe, V., Tenberge, K.B. y Tudzynski, P. 1997. Catalase as a potential pathogenicity factor in *Claviceps purpurea*. Ninteenth Fungal Genetics Conference, Asilomar, Ca.
- Georgellis, D., Lynch, A.S., Lin, E.C.C. 1997. *In vitro* phosphorylation study of the Arc two-component signal transduction system of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **179**(17): 5429-5435.
- Goldberg, I. y Hochman, A. 1989. Purification and characterization of a novel type of catalase from the bacterium *Klebsiella pneumoniae*. *Biochim. Biophys. Acta* **991**: 330-336.
- Gralla, E.B., Thiele, D.J., Silar, P. y Valentine, J.S. 1991. ACE1, a copper-dependent transcription factor, activates expression of the yeast copper, zinc superoxide dismutase gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**: 8558-8562.
- Grant, C.M., Collinson, L.P., Roe, J.H., Dawes, I.W. 1996. Yeast glutathione reductase is required for protection against oxidative stress and is a target gene for Yap-1 transcriptional regulation. *Mol. Microbiol.* **21**(1): 171-179.
- Greenberg, J.T., Monach, P., Chou, J.H., Josephy, P.D. y Demple, B. 1990. Positive control of a global antioxidant defense regulon activated by superoxide-generating agents in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**: 6181-6185.
- Greenberg, J.T., Chou, J.H. y Monach, P.A. 1991. Activation of oxidative stress genes by mutations at the *soxQ/cfxB/marA* locus of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **173**: 4433-4439.
- Grey, M. y Brendel, M. 1994. Overexpression of the *SNQ3/YAP1* gene confers hyperresistance to nitrosoguanidine in *Saccharomyces cerevisiae* via a glutathione independent mechanism. *Curr. Genet.* **25**: 469-471.

- Gruer, M.J. y Guest, J.R. 1994 Two genetically-distinct and differentially-regulated aconitases (AcnA and AcnB) in *Escherichia coli*. *Microbiology* **140**: 2531-2541.
- Gunsalus, R.P. 1992. Control of electron flow in *Escherichia coli*: coordinated transcription of respiratory pathway genes. *J. Bacteriol.* **174**(22): 7069-7074.
- 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. Protection against oxidants in biological systems: the superoxide theory of oxygen toxicity en *Free radicals in biology and medicine* 2a. ed Oxford University Press, Nueva York 86-187
- Hamer, J.E. y Timberlake, W.E. 1987 Functional organization of the *Aspergillus nidulans trpC* promoter *Mol. Cell Biol.* **7**(7). 2352-2359.
- Hansberg, W. y Aguirre, J. 1990. Hyperoxidant states cause microbial cell differentiation by cell isolation from dioxygen *J. Theor. Biol.* **142**. 201-221
- Hantke, K. 1982 Negative control of iron uptake systems in *Escherichia coli* *FEMS Microbiol Lett* **44** 53-57
- Harris, H. y Hopkinson, D.A. 1976. Handbook of enzyme electrophoresis in human genetics. North-Holland Publishing Co., Amsterdam. pp 1-2.
- Harshman, K.D., Moye-Rowley, W.S., y Parker, C.S. 1988 Transcriptional activation by the SV40 AP-1 recognition element in yeast is mediated by a factor similar to AP-1 that is distinct from GCN4. *Cell* **53**: 321-330
- Hartig, A. y Ruis, H. 1986. Nucleotide sequence of the *Saccharomyces cerevisiae CTT1* gene and deduced amino-acid sequence of yeast catalase T *Eur J Biochem.* **160**: 487-490.
- Hearn, V.M., Wilson, E.V. y Mackenzie, D.W.R. 1992 Analysis of *Aspergillus fumigatus* catalases possessing antigenic activity *J. Med. Microbiol* **36**. 61-67.
- Hengge-Aronis, R. 1993. Survival of hunger and stress. the role of rpoS in early stationary phase gene regulation in *Escherichia coli* *Cell* **72**: 165-168.
- Hidalgo, E. y Demple, B. 1994 An iron-sulfur center essential for transcriptional activation by the redox-sensing SoxR protein. *EMBO J* **13**(1) 138-146.
- Hinnebusch, A.G. 1988. Mechanisms of gene regulation in the general control of amino acid biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Rev* **52**: 248-273.
- Hinnebusch, A.G. 1994 Translational control of *GCN4* an *in vivo* barometer of initiation-factor activity *TIBS* **19**: 409-414.
- Hirata, D., Yano, K. y Miyakawa, T. 1994. Stress-induced transcriptional activation mediated by *YAP1* and *YAP2* genes that encode the Jun family of transcriptional activators in *Saccharomyces cerevisiae* *Mol. Gen. Genet* **242**. 250-256.
- Hochman, A. y Goldberg, I. 1991 Purification and characterization of a catalase-peroxidase and a typical catalase from the bacterium *Klebsiella pneumoniae*. *Biochim Biophys Acta* **1077** 299-307
- Huisman, G.W. y Kolter, R. 1994 Sensing starvation: a homoserine lactone-dependent signaling pathway in *Escherichia coli*. *Science* **265**: 537-539

- Inoue, H., Nojima, H y Okayama, H 1990. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* **96**: 23-28.
- Irani, K., Xia, Y., Zweier, J L , Sollott, S J , Der, C J., Fearon, E.R , Sundaresan, M., Finkel, T., Goldschmidt-Clermont, P.J 1997 Mitogenic signaling mediated by oxidants in Ras-transformed fibroblasts. *Science* **275** 1649-1652
- Iuchi, S. y Lin, E C C 1992 Mutational analysis of signal transduction by ArcB, a membrane sensor protein responsible for anaerobic repression of operons involved in the central aerobic pathways in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **174**(12): 3972-3980.
- Iuchi, S 1993 Phosphorylation/dephosphorylation of the receiver module at the conserved aspartate residue controls transphosphorylation activity of histidine kinase in sensor protein ArcB of *Escherichia coli*. *J Biol. Chem* **268**(32): 23972-23980.
- Jair, K.W., Yu, X., Skarstad, K., Thony, B., Fujita, N , Ishihama, A. y Wolf, R.E Jr 1996. Transcriptional activation of promoters of the superoxide and multiple antibiotic resistance regulons by Rob, a binding protein of the *Escherichia coli* origin of chromosomal replication. *J Bacteriol.* **178**(9): 2507-2513.
- Jamieson, D.J. y Storz, G 1997 Transcriptional regulators of oxidative stress responses. In *Oxidative stress and the molecular biology of antioxidant defenses*. John G. Scandalios (ed). Cold Spring Harbor Laboratory Press 91-115
- 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 and is involved in Cu/Fe utilization and stress resistance in yeast. *EMBO J.* **12**(13): 5051-5056.
- Kafer, E. 1977. Meiotic and mitotic recombination in *Aspergillus* and its chromosomal aberrations. *Adv. Genet.* **19**: 33-131
- Kawasaki, L., Wysong, D., Diamond, R y Aguirre, J. 1997. Two divergent catalase genes are differentially regulated during *Aspergillus nidulans* development and oxidative stress. *J. Bacteriol.* **179**(10). 3284-3292.
- Klotz, M G., Klassen, G R , Loewen, P C 1997 Phylogenetic relationships among prokaryotic and eukaryotic catalases. *Mol Biol. Evol* **14**(9): 951-958
- Kuge, S. y Jones, N 1994 *YAP1* dependent activation of TRX2 is essential for the response of *Saccharomyces cerevisiae* to oxidative stress by hydroperoxides. *EMBO J.* **13**(3). 655-664
- Kuge, S , Jones, N., Nomoto, A 1997. Regulation of yAP-1 nuclear localisation in response to oxidative stress. *EMBO J* **16**(7). 1710-1720.
- Kullik, I y Storz, G 1994 Transcriptional regulators of the oxidative stress response in prokaryotes y eukaryotes. *Redox Report* **1**: 23-29.
- Kullik, I , Stevens, J., Toledano, M B., y Storz, G 1995. Mutational analysis of the redox-sensitive transcriptional regulator OxyR. Regions important for DNA binding and multimerization. *J Bacteriol* **177**(5) 1285-1291
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680

- Lazazzera, B A., Beinert, H., Khoroshilova, N, Kennedy, M.C. y Kiley, P J. 1996. DNA binding and dimerization of the Fe-S-containing FNR protein from *Escherichia coli* are regulated by oxygen. *J. Biol. Chem.* **271**(5). 2762-2768
- Levine, A, Tenhaken, R., Dixon, R., y Lamb, C. 1994. H₂O₂ from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. *Cell* **70**: 583-593.
- Levy, E., Eyal, Z. y Hochman, A. 1992. Purification and characterization of a catalase-peroxidase from the fungus *Septoria tritici*. *Arch. Biochem. Biophys.* **296**: 321-327
- Li, Z. y Demple, B. 1994. SoxS, an activator of superoxide stress genes in *Escherichia coli* purification and interaction with DNA. *J. Biol. Chem.* **269**(28). 18371-18377
- Liochev, S I. y Fridovich, I. 1992. Fumarate C, the stable fumarate of *Escherichia coli*, is controlled by the *soxRS* regulon. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **89**: 5892-5896.
- Liochev, S I, Hausladen, A, Beyer, W F, Jr., y Fridovich, I. 1994. NADPH-Ferredoxin oxidoreductase acts as a paraquat diaphorase and is a member of the *soxRS* regulon. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **91**: 1328-1331.
- Liu, X. y Thiele, D.J. 1996. Oxidative stress induces heat shock factor phosphorylation and HSF-dependent activation of yeast metallothionein gene transcription. *Genes Dev.* **10**: 592-603.
- Lledías, F. y Hansberg, W. 1998. Induction and modification of catalase under cell differentiation and stress conditions. (manuscrito en preparación)
- Lledías, F., Rangel, P. y Hansberg, W. 1998. Oxidation of catalase by singlet oxygen. *J. Biol. Chem.* **273**(17): 10630-10637.
- Loewen, P.C. y Hengge-Aronis, R. 1994. The role of the sigma factor σ^S (katF) in bacterial global regulation. *Annu. Rev. Microbiol.* **48**: 53-80
- López-Medrano, R., M.C. Ovejero, J A. Calera, P. Puente, y F. Leal. 1995. An immunodominant 90-kilodalton *Aspergillus fumigatus* antigen is the subunit of a catalase. *Infect. Immun.* **63**(12): 4774-4780.
- Loprasert, S., Negoro, S. y Okada, H. 1988. Thermostable peroxidase from *Bacillus stearothermophilus*. *J. Gen. Microbiol.* **134**: 1971-1976
- Marchler, G., Schüller, C., Adam, G. y Ruis, H. 1993. A *Saccharomyces cerevisiae* UAS element controlled by protein kinase A activates transcription in response to a variety of stress conditions. *EMBO J.* **12**(5). 1997-2003
- Martin, R.G. y Rosner, J.L. 1995. Binding of purified multiple antibiotic-resistance repressor protein (MarR) to mar operator sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **92**: 5456-5460.
- Martínez-Pastor, M T., Marchler, G, Schuller, C, Marchler-Bauer, A, Ruis, H y Estruch, F. 1996. The *Saccharomyces cerevisiae* zinc finger proteins Msn2p and Msn4p are required for transcriptional induction through the stress-response element (STRE). *EMBO J.* **15**(9): 2227-2235
- McNabb, D S., Tseng, Kelly, A-S y Guarente, L. 1997. The *Saccharomyces cerevisiae* Hap5p homolog from fission yeast reveals two conserved domains that are essential for assembly of heterotetrameric CCAAT-binding factor. *Mol. Cell. Biol.* **17**(12): 7008-7018

- Melville, S B y Gunsalus, r.P 1996. Isolation of an oxygen-sensitive FNR protein of *Escherichia coli* interaction at activator and repressor sites of FNR-controlled genes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **93**(3): 1226-1231
- Miller, J.H. 1972. *Experiments in molecular genetics* Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York, E.U. p: 352-355
- Morris, S.L., Nair, J y Rouse, D.A. 1992. The catalase-peroxidase of *Mycobacterium intracellulare*. nucleotide sequence analysis and expression in *Escherichia coli* *J Gen Microbiol* **138**: 2363-2370
- Moye-Rowley, W.S., Harshman, K.D. y Parker, C.S. 1989. Yeast *YAP1* encodes a novel form of the jun family of transcriptional activator proteins. *Genes Dev* **3** 283-292.
- Navarro, R.E., Stringer, M.A., Hansberg, W, Timberlake, W.E. y Aguirre, J. 1996. *catA*, a new *Aspergillus nidulans* gene encoding a developmentally regulated catalase. *Curr. Genet.* **29**: 352-359.
- Nunoshiba, T., de Rojas-Walker, T, Wishnok, J.S, Tannenbaum, S R y Demple B. 1993 Activation by nitric oxide of an oxidative-stress response that defends *Escherichia coli* against activated macrophages *Proc. Natl Acad Sci. USA* **90**: 9993-9997.
- Oliveiro, S., Robinson, G.S., Struhl, K., Spiegelman, B.M. 1992. Yeast GCN4 as a probe for oncogenesis by AP-1 traanscription factors. transcriptional activation through AP-1 sites is not sufficient for cellular transformation. *Genes Dev.* **6**: 1799-1809
- Papagiannopoulos, P, Andrianopoulos, A., Sharp, J.A., Davis, M. A. y Hynes, M J 1996 The *hapC* gene of *Aspergillus nidulans* is involved in the expression of CCAAT-containing promoters. *Mol. Gen Genet.* **251** 412-421.
- Pérez-Esteban, B, Gómez-Pardo, E. y Peñalva, M A. 1995. A *lacZ* reporter fusion method for the genetic analysis of regulatory mutations in the pathways of fungal secondary metabolism and its application to the *Aspergillus nidulans* penicillin pathway *J. Bacteriol.* **177**(21) 6069-6076
- Pfeifer, K, Kim, K.S., Kogan, S y Guarente, L 1989 Functional dissection and sequence of the yeast *HAP1* activator *Cell* **56**: 291-301
- Pontecorvo, G. 1953. The Genetics of *Aspergillus nidulans* *Adv. Genet* **5**: 141-238.
- Prestridge, D.S. 1991 SIGNAL SCAN: A compter program that scans DNA sequences for eukaryotic transcriptional elements *CABIOS* **7**. 203-207.
- Roe, B A., Cupfer, D., Clifton, S y Prade, R. 1997. *Aspergillus nidulans* cDNA sequencing project. Funded by NSF-EPSCoR program. <http://www.genome.ou.edu/asper.htm>
- Roth, J. 1985. The Protein A-Gold (pAg) technique- a qualitative and quantitative approach for antigen localization on thin sections. en *Techniques in Immunocytochemistry*. Vol. 1. Bullock, G.R. y Petrusz, P. (eds). Academic Press, Nueva York, E.U. p. 108-133.
- Rottensteiner, H.P., Kal, A., Filipits, M., Binder, M., Hamilton, B, Tabak, H.F y Ruis, H. 1996. Pip2p: A transcriptional regulator of peroxisome proliferation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO. J.* **15**(12). 2924-2934.
- Ruis, H. y Koller, F. 1997. Biochemistry, molecular biology, and cell biology of yeast and fungal catalases. en *Oxidative stress and the molecular biology of antioxidant defenses*. John G Scandalios (ed) Cold Spring Harbor Laboratory Press. 309-342.

Sambrook, J., Fritsch, E.F. y Maniatis, T. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual, 2a ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York.

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

Schmitt, A.P. y KcEntee, K. 1996 Msn2p, a zinc finger DNA-binding protein, is the transcriptional activator of the multistress response in *Saccharomyces cerevisiae* Proc Natl Acad. Sci. 93 5777-5782

Schnell, N., Krems, B. y Entian, K.D. 1992. The *PARI (YAP1/SNQ3)* gene of *Saccharomyces cerevisiae*, a *c-jun* homologue, is involved in oxygen metabolism. Curr. Genet. 21 269-273.

Schuller, C., Brewster, J.L., Alexander, M.R., Gustin, M.C. y Ruis, H. 1994 The HOG pathway controls osmotic regulation of transcription via the stress response element (STRE) of the *Saccharomyces cerevisiae CTT1* gene. EMBO J 13(18): 4382-4389.

Siegele, D.A. y Kolter, R. 1992. Life after log J. Bacteriol 174(2): 345-348

Simon, M., Binder, M., Adam, G., Hartig, A. y Ruis, H. 1992 Control of peroxisome proliferation in *Saccharomyces cerevisiae* by *ADRI*, *SNF1 (CAT1, CCRI)* and *SNF4 (CAT3)*. Yeast 8: 303-309.

Simon, M., Pavlik, P., Hartig, A., Binder, M., Ruis, H., Cook, W.J., Denis, C.L. y Schanz, B. 1995. A C-terminal region of the *Saccharomyces cerevisiae* transcription factor *ADR1* plays an important role in the regulation of peroxisome proliferation by fatty acids. Mol Gen Genet 249. 289-296.

Skoneczny, M., Chelstowska, A. y Rytka, J. 1988 Study of the coinduction by fatty acids of catalase A and acyl-CoA oxidase in standard and mutant *Saccharomces cerevisiae* strains Eur. J Biochem. 174 297-302

Spiro, S. y Guest, J.R. 1991. Adaptive responses to oxygen limitation in *Escherichia coli* Trends. Biochem Sci 16: 310-314.

Stephen, D.W.S., Rivers, S.L. y Jamieson, D.J. 1995 The role of the *YAP1* and *YAP2* genes in the regulation of the adaptive oxidative stress responses of *Saccharomyces cerevisiae*. Mol Microbiol. 16: 415-423

Stojilkovic, I. y Hantke, K. 1995. Functional domains of the *Escherichia coli* ferric uptake regulator protein (Fur) Mol. Gen Genet. 247 199-205

Storz, G., Tartaglia, L.A. y Ames, B.N. 1990 Transcriptional regulator of oxidative stress-inducible genes. direct activation by oxidation. Science 248. 189-194

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

Suárez, T., Oestreicher, N., Kelly, J., Ong, G., Sankarsingh, T. y Scazzocchio, C. 1991a. The *naY* positive control gene of *Aspergillus nidulans*. fine structure, isolation of constitutive mutants and reversion patterns Mol. Gen Genet. 230: 359-368

Suárez, T., Oestreicher, N., Peñalva, M.A. y Scazzocchio, C. 1991b. Molecular cloning of the *naY* regulatory gene of *Aspergillus nidulans* reveals a favoured region for DNA insertions. Mol Gen Genet 230: 369-375.

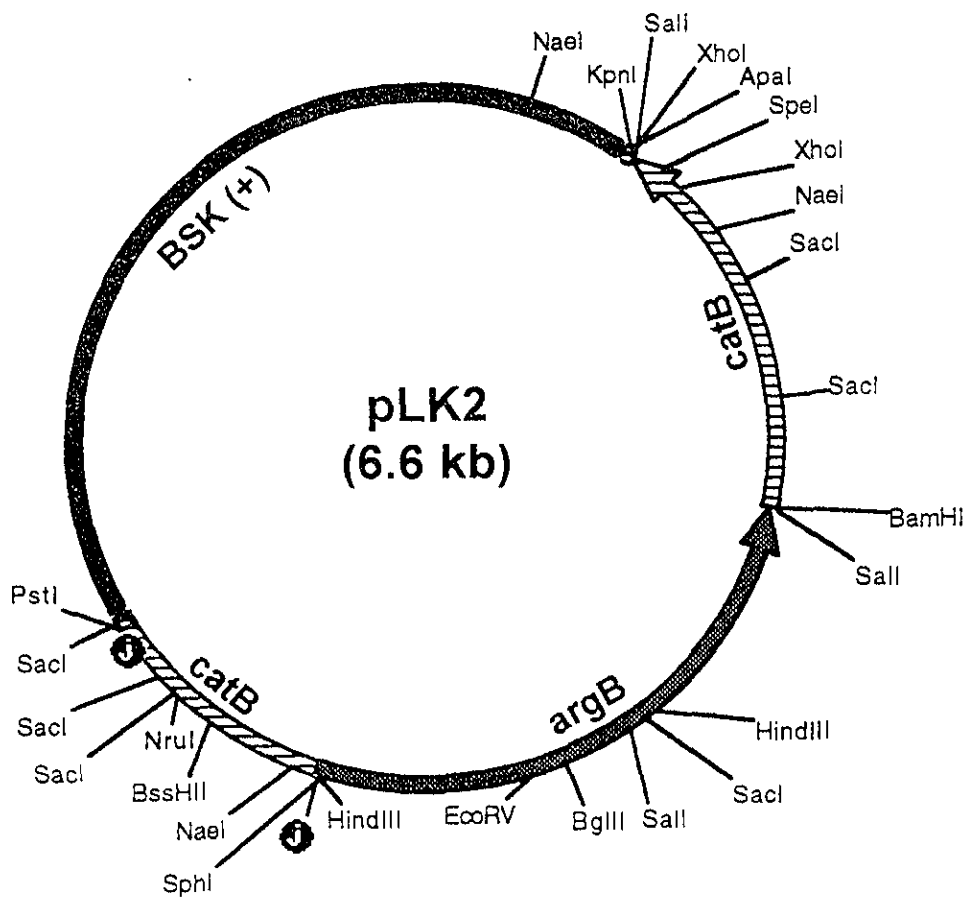
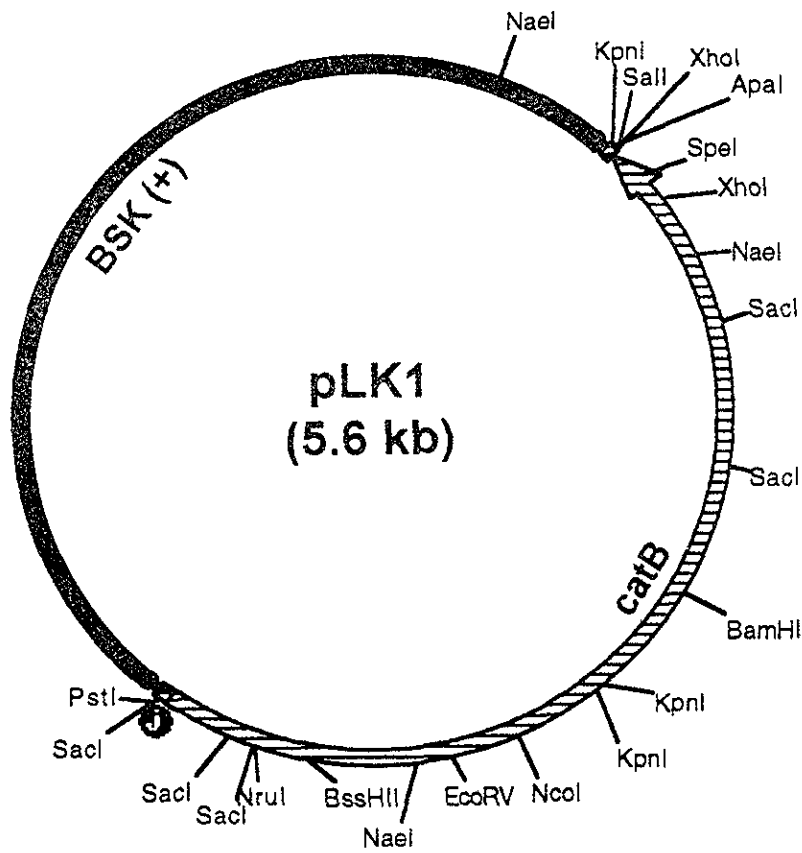
- Suárez, T., Vieira de Queiroz, M., Oestreicher, N. y Scazzocchio, C 1995. The sequence and binding specificity of UaY, the specific regulator of the purine utilization pathway in *Aspergillus nidulans*, suggest an evolutionary relationship with the PPR1 protein of *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* **14**(7). 1453-1467
- Sundaresan, M., Yu, Z. X., Ferrans, V.J., Irani, K., Finkel, T 1995. Requirement for generation of H₂O₂ for platelet-derived growth factor signal transduction. *Science* **270** 296-299.
- Struhl, K. 1988. The JUN oncoprotein, a vertebrate transcription factor, activates transcription in yeast. *Nature* **332**: 649-650
- Tartaglia, L.A., Storz, G. y Ames, B.N. 1989 Identification and molecular analysis of OxyR-regulated promoters important for the bacterial adaptation to oxidative stress. *J. Mol. Biol.* **210**: 709-719.
- Tenberge, K.B. y Eising, R 1995. Immunogold labelling indicates high catalase concentrations in amorphous and crystalline inclusions of sunflower (*Helianthus annuus* L.) peroxisomes. *Histochemical J.* **27**: 184-195.
- Tenberge, K.B., Ruholl, C., Heinze, M. y Eising, R 1997 Purification and immuno-electron microscopical characterization of crystalline inclusions from plant peroxisomes. *Protoplasma* **196** 142-154.
- Timberlake, W.E. 1980. Developmental gene regulation in *Aspergillus nidulans*. *Dev. Biol.* **78** 497-510
- Toda, T., Shimanuki, M. y Yanagida, M 1991 Fission yeast genes that confer resistance to staurosporine encode an AP-1 like transcription factor and a protein kinase related to the mammalian ERK1/MAP2 and budding yeast *FUS3* and *KSS1* kinases. *Genes Dev.* **5**: 60-73.
- Toledano, M.B., Kulik, I., Trinh, F., Baird, P.T., Schneider, T.D. y Storz, G 1994. Ros-dependent shift of OxyR-DNA contacts along an extended DNA-binding site: a mechanism for differential promoter selection. *Cell* **78**: 897-909.
- Towbin, H., Staehelin, T., y Gordon, J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets. Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**(9): 4350.
- 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**(9). 4415-4419
- Tsaneva, I.R., y Weiss, B 1990. *soxR*, a locus governing a superoxide response regulon in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* **172**(8): 4197-4205
- Valenciano, S., De Lucas, J. R., Pedregosa, A., Monistrol, I.F. y Laborda, F 1996. Induction of β -oxidation enzymes and microbody proliferation in *Aspergillus nidulans*. *Arch. Microbiol.* **166**. 336-341
- Van Dijken, J.P., Veenhuis, M., Vermeulen, C.A. y Harder, W. 1975. Cytochemical localization of catalase activity in methanol-grown *Hansenula polymorpha*. *Arch. Microbiol.* **105**: 261-267
- Voet, D. y Voet, J.G 1990. *Biochemistry*. John Wiley & Sons, Nueva York. 1223 pp.
- 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 HPII. *J. Bacteriol.* **173**(2). 514-520
- Wemmie, J.A., Szczypka, M.S., Thiele, D.J., Moye-Rowley, W.S 1994. Cadmium tolerance mediated by the yeast AP-1 protein requires the presence of an ATP-binding cassette transporter-encoding gene, *YCF1*. *J. Biol. Chem.* **269**(51). 32592-32597.

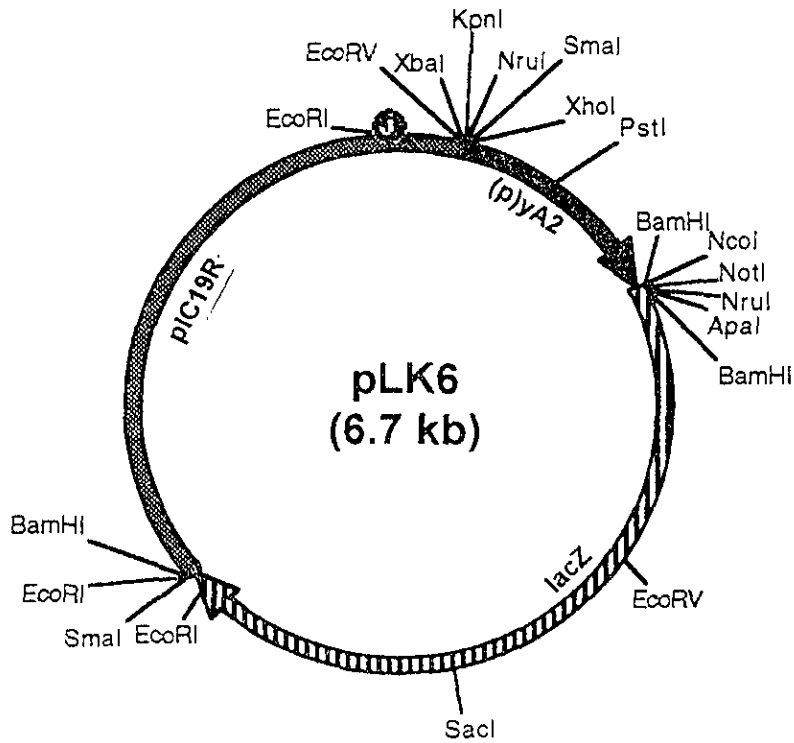
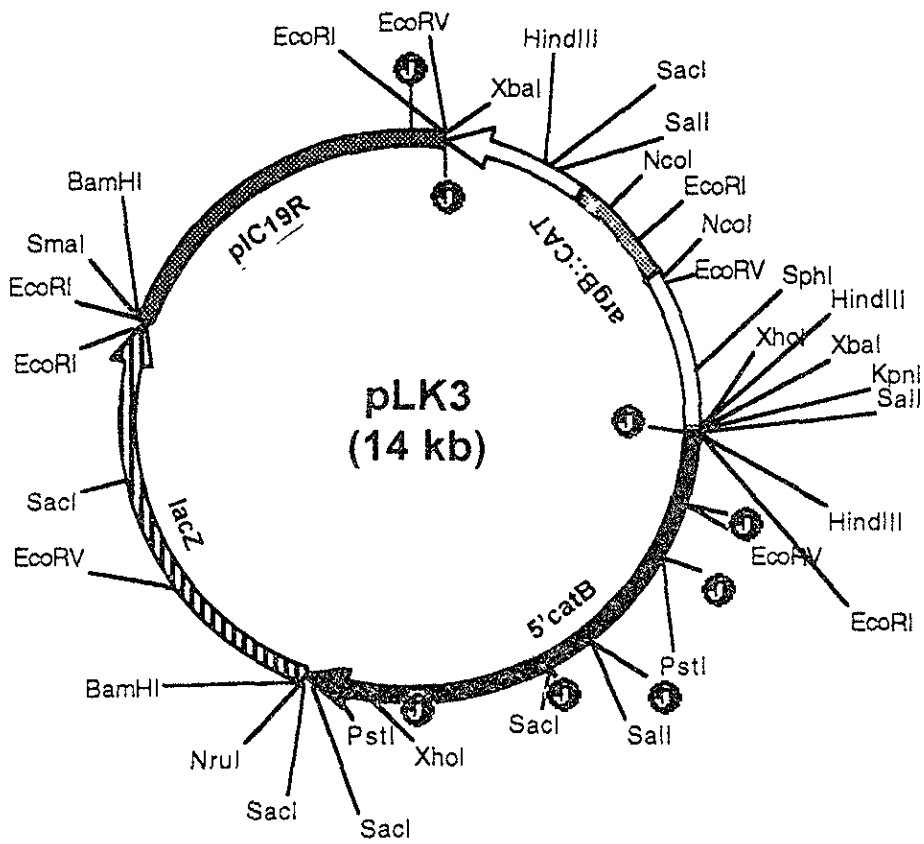
- Wieser, R., Adam, G., Wagner, A., Schüller, C., Marchler, G., Ruis, H., Krawiec, Z. y Bilinski, T. 1991 Heat shock factor-independent heat control of transcription of the *CTTI* gene encoding the cytosolic catalase T of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol Chem.* **266**(19): 12406-12411
- Winkler, H., Adam, G., Mattes, E., Schanz, M., Hartig, A. y Ruis, H. 1988. Co-ordinate control of synthesis of mitochondrial and non-mitochondrial hemoproteins. a binding site for the HAP1 (CYP1) protein in the UAS region of the yeast catalase T gene (*CTTI*). *EMBO J.* **7**(6): 1799-1804.
- Witteveen, C.I. B., Veenhuis, M. y Visser, J. 1992. Localization of glucose oxidase and catalase activities in *Aspergillus niger*. *Appl. Env Microbiol.* **58**(4). 1190-1194
- Wu, J. y Weiss, B. 1991. Two divergently transcribed genes, *soxR* and *soxS*, control a superoxide response regulon in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **173**(9): 2864-2871
- Wu, A., Wemmie, J.A., Edgington, N.P., Goebel, M., Guevara, J.L. y Moye-Rowley, W.S. 1993. Yeast bZip proteins mediate pleiotropic drug and metal resistance. *J. Biol. Chem.* **268**: 18850-18858.
- Wu, A. y Moye-Rowley, W.S. 1994. *GSH1*, which encodes γ -glutamylcysteine synthetase, is a target gene for yAP-1 transcriptional regulation. *Mol. Cell. Biol.* **14**. 5832-5839
- Wu, J., Dunham, W.R. y Weiss, B. 1995. Overproduction and physical characterization of SoxR, a [2Fe-2S] protein that governs an oxidative response regulon in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **270**(17): 10323-10327
- Xing, Y., Fikes, J.D. y Guarente, L. 1993. Mutations in yeast HAP2/HAP3 define a hybrid CCAAT box binding domain. *EMBO J.* **12**(12). 4647-4655
- Yamaguchi-Iwai, Y., Serpe, M., Haile, D., Yang, W., Kosman, D.J., Klausner, R.D. y Dancis, A. 1997. Homeostatic regulation of copper uptake in yeast via direct binding of MAC1 protein to upstream regulatory sequences of *FRE1* and *CTR1*. *J. Biol. Chem.* **272**(28): 17711-17718.
- Yelton, M.M., J. E. Hamer, y W.E. Timberlake. 1984. Transformation of *Aspergillus nidulans* by using a *trpC* plasmid. *Proc Natl Acad Sci. USA* **81**: 1470-1474.
- Yu, B.P. 1994. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol. Rev.* **74**(1). 139-162
- Zheng, M., Aslund, F. y Storz, G. 1998. Activation of the OxyR transcription factor by reversible disulfide bond formation. *Science* **279**. 1718-1721
- Zhu, Z., Labbe, S., Pena, M.M. y Thiele, D.J. 1998. Copper differentially regulates the activity and degradation of yeast Mac1 transcription factor. *J. Biol. Chem.* **273**(3). 1277-1280.
- Zimmermann, C.R., Orr, W.C., Leclerc, R.F., Barnard, E.C. y Timberlake, W.E. 1980. Molecular cloning and selection of genes regulated in *Aspergillus* development. *Cell* **21**. 709-715.
- Zitomer R.S. y Lowry, C.V. 1992. Regulation of gene expression by oxygen in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Rev.* **56**(1): 1-11.

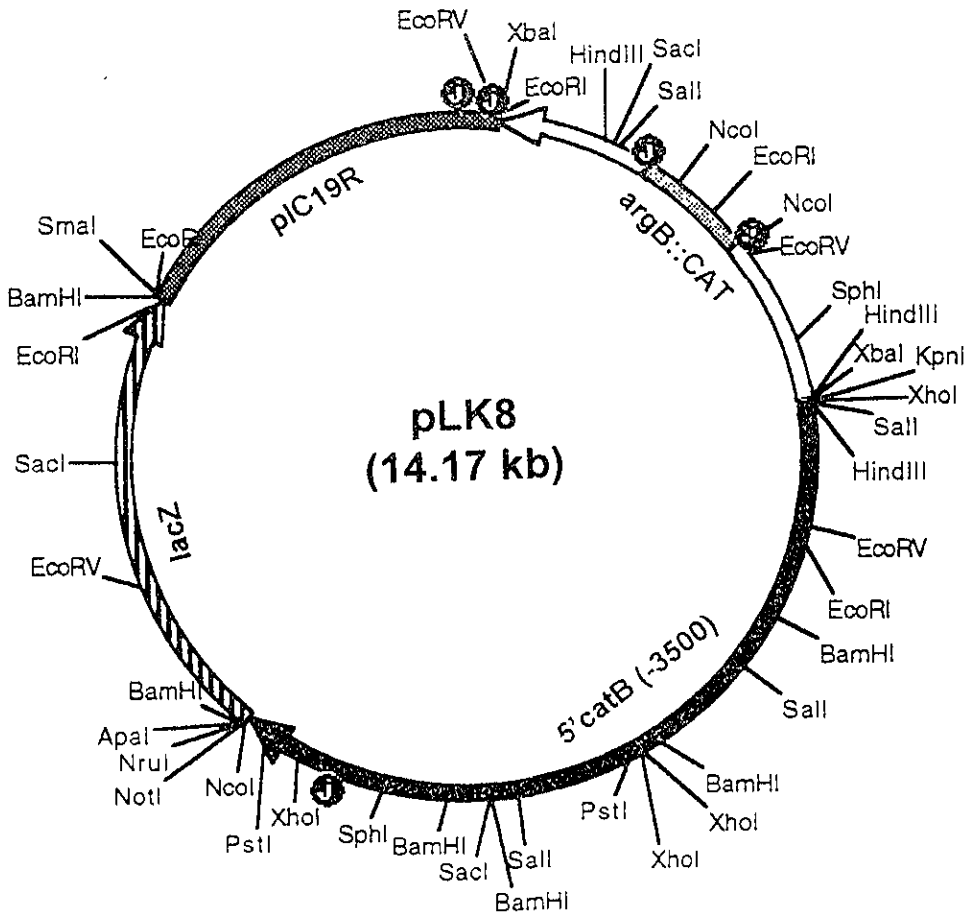
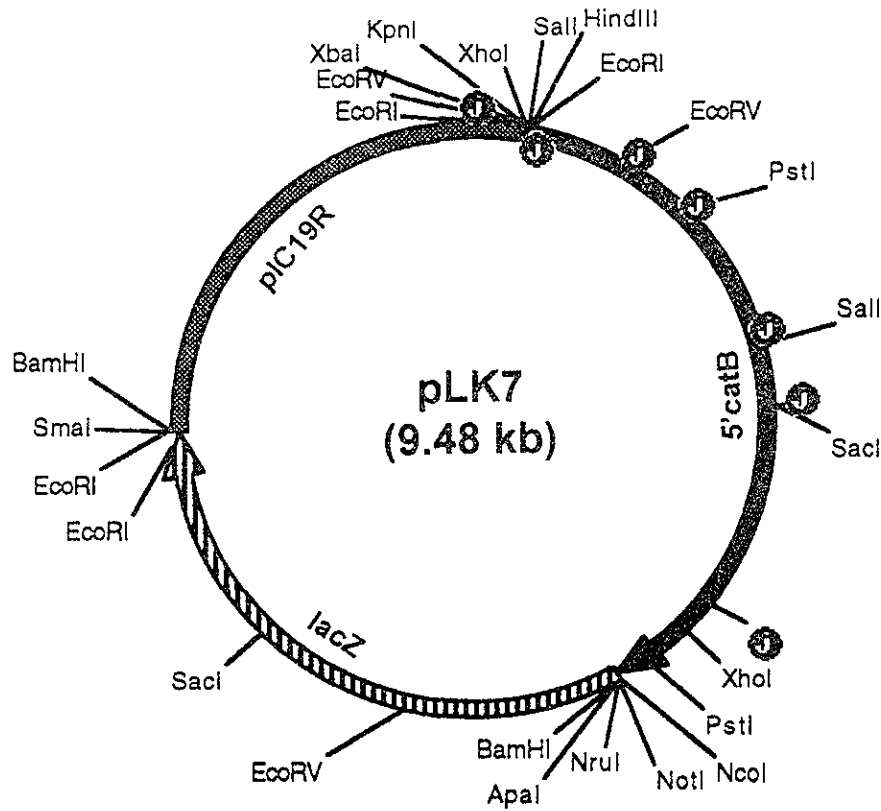
APENDICE I

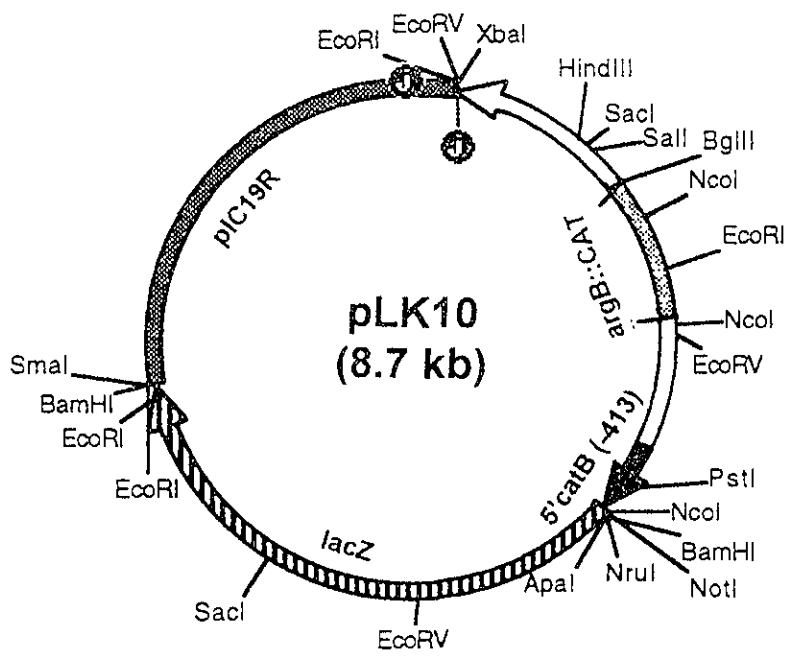
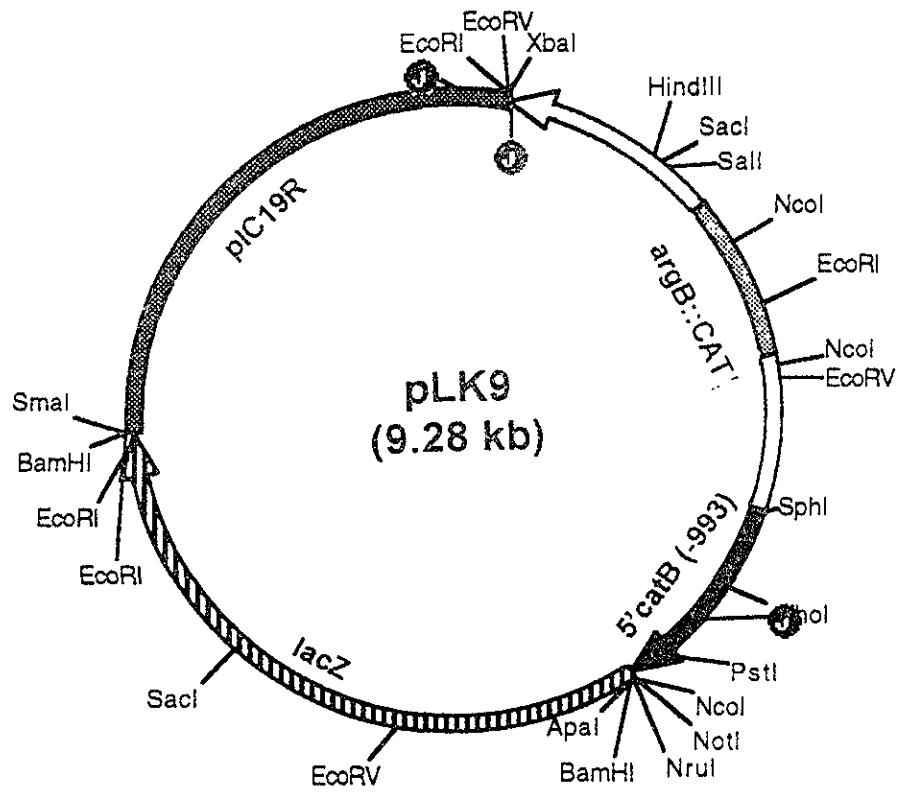
Este apéndice contiene los mapas de restricción de los plásmidos utilizados durante el desarrollo de esta tesis. En cada uno se indica el nombre del plásmido, el peso molecular y las secuencias que contiene. Las enzimas de restricción indicadas corresponden a las de uso más frecuente, incluyendo los sitios importantes para la construcción de los diferentes plásmidos. Sin embargo, es posible que otros sitios de restricción estén presentes, por lo que si se requiere emplear alguno de estos plásmidos, es recomendable consultar el archivo electrónico y corroborar la presencia o ausencia del sitio de interés. También se recomienda digerir el plásmido con las enzimas que se vayan a utilizar para asegurarse de que no haya errores.

Los plásmidos que contienen la clona de *catB* son el pDW1 y pDW2; los empleados para la interrupción del gen *catB* fueron el pLK1 y el pLK2; los utilizados para la obtención de las fusiones *catB::lacZ* fueron: pLK3, pLK6, pLK7, pLK8, pLK9 y pLK10.









APENDICE II

Contiene las comparaciones entre las regiones 5' de *catB* de *A. nidulans* con las de *catB* de *A. fumigatus*, *catR* de *A. niger*, y *treA* de *A. nidulans*. Todas las comparaciones se hicieron utilizando el programa GAP del GCG (Devereux *et al.*, 1984). Las regiones que son más parecidas se indican con un rectángulo. También contiene los resultados obtenidos al comparar el gen *catB* de *A. nidulans* con la base de datos de ESTs de dicho hongo, indicando cuál fue la clona identificada. La secuencia de esta clona se comparó mediante un BLAST con el Genbank y se muestra la región de *catB* a la cual corresponde.

GAP de las regiones regulatorias 5' de los genes *catB* de *A. nidulans* (secuencia en mayúsculas) y *catB* de *A. fumigatus* (secuencia en minúsculas).

Gap Weight: 50 Average Match: 10.000
 Length Weight: 3 Average Mismatch: 0.000

Quality: 2825 Length: 1080
 Ratio: 3.277 Gaps: 6
 Percent Similarity: 38.005 Percent Identity: 38.005

Match display thresholds for the alignment(s):
 | = IDENTITY
 : = 5
 . = 1

sqctb235.txt x bfumup.txt April 20, 1998 17:33 ..

```

1 .....CTGTAATTCAGGGCGGGCCTAGCTTCCCAGTTGTATCG 39
1 acaacagcaaagtataactcgcagtatgctgcgataaagttggaatgagag 50
40 ATCAGATTAATCCTAATTCAGGCGCTGGGCATGCTCGATGTCGATCAGTG 89
51 gtggaaatcgcgatatgaattgccagtgcaacgctcattgaccagca 100
90 TCAGAGCCTGCTCAGGTAAGTACTCGTCGAGACTGGTGTATATCCTCCAATAA 139
101 actggacgggtgagtgacatggagcaaagtggaatgattgtcggttgta 150
140 GCCTACATTGTCTGAGCACAGCAGTCGGCAGTAAACAAA.....GA 180
151 gacttgccaaggtgaagccatcgacatccgaacaaataaaggtgattgtt 200
181 GAACTGCCGATCTCTCCTGTTATTTTCGCTGAGGCGGTCAAACCGGGCAGG 230
201 gaagtggggatggtgggagtggtccagaccgatgctattacaaatatta.c 249
231 CTGGGGGCTCTAGTATGTTGCTATTCTGGGATTGTAAAGTCGGACAGCGG 280
250 caagcatcgcgccctcgaccactttctgtgtgaatgtgaatgtcagcaga 299
281 CCGCAATTATTGTACGATGGACAGATCAAATGATGGCTATTGGCTGATGT 330
300 atacacatcgcatactctagaccggtcaaagt.....agttgatgatca 343
331 TCTGTTTGCAGGCAGGCTTTCTTGTGCCGTACACAATCACACTGCTGTG 380
344 tcttcttcacaagcgaaatgaccattcccgcgaagactggatctgctgtt 393
381 GCCCAATAATAGTGCATAGCCCCGTACGAGTTGGCTGATGCCAAGCCTTG 430
394 gccc..gcaccttccattggaggatgcactgtttgttggactgactaa 441

```

```

431 CAAGGCCAGCTTCCAGTTTCTGTGGGGACTCCAAGAGTTTCCCTTCCAGC 480
    ||  |  ||  |  ||  |  ||  |  ||  |  ||  |  ||  |  ||  |
442 atgggggaatctgactcgttctccccgactgccttcttctttgtgacaaa 491
    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
481 TCGCTGCTATTACCAAGCACTCTGGTTCGAGACCTATACAACATCGCACGG 530
    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
492 ccaagtgtcaggactcaggaacgagtggatagttgaaggagcatcacatc 541
    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
531 TCAACCTCAATTCCAGGTCCCCAACCACCTCATCAGACCATAAATTACTGAT 580
    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
542 gctatcagggttgcgggtctccactgcatcaogtaccttgetgcacttcc 591
    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
581 AGCCAAGCAGATCGCCTGCTCGGCACCACCTGCTTAACCCCGAATAAGAC 630
    ||  ||  ||  ||  ||  ||  ||  ||  ||  ||  ||  ||  ||  ||  ||
592 tatggagtagaccgtttgacttgcataatctcat..atccgcaatattaa 639
    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
631 ATCGCTCCGAGCGTTGCTCGAGCGTTGCTCTGGCCGTTTCTGCTGAACGA 680
    |||  |  |  ||  ||  ||  ||  ||  ||  ||  ||  ||  ||  ||  ||
640 ttcgtctgtttccttgcttagtggttcttggattggttgcacccatgtg 689
    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
681 TGGTGACGTACGTAGGTACTTGCTTTGCGGTGGGAGGTCTTGGATTCTGTG 730
    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
690 gtgatcggcgccccctgctgatactggactgagaagcagtggtttgat 739
    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
731 GAGAAGCTCAGCAACGGCGTCGATTTCGATTTCGTTTCGCGCCTTCCAGACCT 780
    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
740 ggatatataaaccagcctccttgccctctccgat.....ctttccgatcc 784
    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
781 CGCTGCTGAACTAAGCTAAGTGGCTCCGGCTCGCAGCTCCCGTGCCTGCC 830
    |  |  |  ||  ||  ||  ||  ||  ||  ||  ||  ||  ||  ||  ||  ||
785 ccttgatgatcaagcacaagcccaaatggacgcgcttcctttccaatct 834
    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
831 AGGTGGGCCGGGCAGGGCTCATCAATGTGATGGAAAGATGGGAGGCCGTA 880
    ||  ||  ||  ||  ||  ||  ||  ||  ||  ||  ||  ||  ||  ||
835 gtcaccgcataacggagacttatcaaga..... 862

```

:

:

:

GAP de las regiones regulatorias 5' de los genes *catB* (secuencia en mayúsculas) y *treA* (secuencia en minúsculas) de *A. nidulans*.

Gap Weight: 50 Average Match: 10.000
 Length Weight: 3 Average Mismatch: 0.000

Quality: 2549 Length: 1061
 Ratio: 3.319 Gaps: 6
 Percent Similarity: 37.810 Percent Identity: 37.810

Match display thresholds for the alignment(s):
 | = IDENTITY
 : = 5
 . = 1

sqctb235.txt x treaup.txt March 9, 1998 15:45 ..

```

1 CTGTAATTTTCAGGGCGGGCCTAGCTTCCCAGTTGTATCGATCAGATTAAT 50
1 .....aagcttctgtctcaaa 16
51 CCTAATTCGAGCCTGGGCATGCTCGATGTC.GATCAGTGTGAGAGCCTG 99
17 aagaagttcgaattatggaacactgggtgacatatacagctgaggggttc 66
100 CTCAGGTACTCGTCGAGACTGGTTGTATATCCTCCAATAAGCCTACATTG 149
67 acaatataactaatggtatgctgattatcacgtctgctcccccttcgctcg 116
150 TCTGAGCACAGCAGTCCGGCAGTAAACAAAGAGAACTGCCGATCTCTCCTG 199
117 ggcaaatcctggagaccccggt.....gtttgtcccattcccgac 157
200 TTATTTTCGCTGAGGCGGTCAAACCGGGCAGGCTGGGGGCTCTAGTATGTT 249
158 cgagtgagccgacttcggacgtcgctgaattaccgggctaattgtgggac 207
250 GCTATTCTGGGATTGTAAAGTCCGACAGCGGCCGCAATTATTGTACGATG 299
208 gatgttctctaatagtctcttccacgagcatc..cacttgttcatcgtea 255
300 GACAGATCAAATGATGGCTATTGGCTGATGTTCTGTTTGCAGGCAGGCTT 349
256 gaccaaacgcagtgccctttttgaggacccgcaaacgtcggaaagtata 305
350 TCTTGTGCCGTACACAATCACACTGCTGTGGCCCAATAATAGTGCATAG 399
306 ccacgcgctc..aagttgcgcggaagcaaccgctccgctggtactgcaacg 353
400 CCCCCTACGAGTTGGCTGATGCCAAGCCTTGCAAGGCCCAAGCTTCCAGTT 449
354 tcaatggcgccgggagctggactggttacgaacagggcactcccgcgtg 403
450 TCTGTGGGGACTCCAAGAGTTTCCTTCCAGCTCGCTGCTATTACCAAGCA 499
404 gctgtcccttgaacttcccttccaatcaaggaccggccttgatcttccgt 453
500 CTCTGGTCGAGACCTATACAACATCGCACGGTCAACCTCAATTCCAGGTC 549
454 ggctg..agattccccgctaccaagaatggtccagaagaatcaaaaagt 501

```


Clona de cDNA identificada utilizando la secuencia de DNA del gen *catB* en una comparación Blastn contra la base de datos de ESTs de *A. nidulans* (versión Nov 97)

o8b12a1.f1.seq

TYPE: EST
 STATUS: New
 EST#: o8b12a1.f1
 CLONE: Aspergillus Nidulans cDNA
 ERROR:
 P_END: 3'
 SEQ_PRIMER: M13-20
 DNA_TYPE: cDNA
 HOMOLGY:

gi:1737410	(U80671) catalase [Emmerliella nidulans]	-3	19	2.9e-20	1
gi:181D:e265450	(U97783) catalase [Aspergillus fumigatus]	-3	289	6.7e-24	1
gi:2431866	(U97571) catalase [Aspergillus fumigatus]	-3	289	6.7e-24	1
gi:16897716	(U87850) catalase [Aspergillus fumigatus]	-3	275	2.1e-22	1
gi:358749	(115474) catalase [Aspergillus niger]	-3	252	6.4e-20	1
gi:840716	(220132) catR gene product [Aspergillus...]	-3	252	6.4e-20	1
gi:340716	(220138) catR [Aspergillus niger]	-3	252	6.4e-20	1

SEQUENCE:

GCAAAGCTCTCGTCCACGGCATCGGCAACGTACACGCCCTCGACGGCG
 GTGTTGATACCAGCGTTGTTGAAAGCAGTGGAGCCGCTGCCAAGAGC
 AGCGACTGGCTTACCGAAGCGGAAAGCATCAACGAGGATTCGAGGG
 GACGGCCGGCAGGGTAGAGGGTTGAGCTGGAGTTGGCCGCGGACTTGG
 CACCGAAGAGCTTCTCCGCTCCAGGGGCAACAACGACGGCGTCAAAC
 GAATGGCGTCAGAGGCAGAGTAGGTCTGGTTCACGCCGTTGGAGAAG
 CGTTCAGCGACGACAATGACGTCCAGGTTGTCGTTGGAGAGCTCGGCC
 TTCAGAGCAGTAGCCGCGCTGAAGGATTCCTCTGCGTCA

QUERY

0 50 100 150 200 250 300 350

Sequences producing significant alignments:

Score E (bits) Value

<u>gb U80672 ENU80672</u>	Emericella nidulans catalase (CatB) gene, co...	<u>724</u>	0.0
<u>emb X64522 BLCIFIL</u>	B.lanceolatum mRNA for cytoplasmic intermedi...	<u>36</u>	2.6
<u>gb L27825 EMEVERA1AA</u>	Emericella nidulans (varA) gene, complete ...	<u>36</u>	2.6
<u>gb M90534 TRBDSPGNFM</u>	Trypanosoma cruzi protein 1 of a dispersed...	<u>36</u>	2.6
<u>gb AF004296 AF004296</u>	Rhodobacter sphaeroides cyclopropane fatty...	<u>36</u>	2.6

gb|U80672|ENU80672 Emericella nidulans catalase (CatB) gene, complete cds
Length = 2969

Score = 724 bits (365), Expect = 0.0
Identities = 372/373 (99%), Positives = 372/373 (99%), Gaps = 1/373 (0%)

Query: 1 gcaaagctctcgtccacggcatcggcaacgtacacgcctcgacggcggtggtgatacca 60
|
Sbjct: 2630 gcaaagctctcgtccacggcatcggcaacgtacacgcctcgacggcggtggtgatacca 2571

Query: 61 gcgttggtcgaaagcagtgaggccgctgccaaagagcagcgactggcttaccgaagcggaa 120
|
Sbjct: 2570 gcgttggt-cgaaagcagtgaggccgctgccaaagagcagcgactggcttaccgaagcggaa 2512

Query: 121 agcatcaacgaggatttcgaggggacggccggcagggttagagggttgagctggagttggc 180
|
Sbjct: 2511 agcatcaacgaggatttcgaggggacggccggcagggttagagggttgagctggagttggc 2452

Query: 181 cgcggaacttggcaccgaagagcttctccgctccaggggcaacaacgacggcgctcaaactg 240
|
Sbjct: 2451 cgcggaacttggcaccgaagagcttctccgctccaggggcaacaacgacggcgctcaaactg 2392

Query: 241 aatggcgctcagaggcagagtaggtctggttcacgccggttgagagaagcgttcagcgacgac 300
|
Sbjct: 2391 aatggcgctcagaggcagagtaggtctggttcacgccggttgagagaagcgttcagcgacgac 2332

Query: 301 aatgacgtccaggttgctggttgagagctcggccttcagagcagtagccgcgctgaagga 360
|
Sbjct: 2331 aatgacgtccaggttgctggttgagagctcggccttcagagcagtagccgcgctgaagga 2272

Query: 361 ttctctgcgtca 373
|
Sbjct: 2271 ttctctgcgtca 2259