

00591 8

249



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

REGULACION DEL GEN *catA* DURANTE
LA ESPORULACION DE *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

BIOL. ROSA ESTELA NAVARRO GONZALEZ

ASESOR: DR. JESUS AGUIRRE LINARES

México, D. F.

1998

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

21 9399



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.

Ernesto te dedico este trabajo por todo el cariño. Gracias por escuchar mis resultados con tanta paciencia, por todas las críticas y sugerencias.

También dedico este trabajo a toda mi familia, a mi mamá y a la memoria de mi papá porque sin su ayuda y cariño no hubiera logrado esta meta. A mis hermanos Lupe, Rafael, Carmen y Javier que me han apoyado siempre que los necesito y por ser también buenos amigos. A mis cuñados Arturo y Faby por su amistad. A mis sobrinitos Talía, Rafa, Edgarrín y Karis que hacen la vida más divertida.

Agradecimientos

Agradezco a los miembros del comité tutorial de Maestría y Doctorado: Dra. Alicia González, Dr. Guillermo Aguilar, Dr. Luis Servín, Dr. Enrique Morett y Dr. Jesús Aguirre por su asesoría para la realización del trabajo.

Agradezco a los miembros del Jurado: Dra. Amelia Farrés, Dr. Roberto Coria, Dra. Alejandra Covarrubias, Dr. Luis Servín, Dra. Alicia González, Dr. Alejandro Zentella y Dr. Guillermo Aguilar por la revisión y críticas de este trabajo.

Agradezco a la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) por la beca otorgada para la realización de mis estudios de Doctorado y al Programa de Apoyo de Estudios de Posgrado por el donativo para la compra de material para investigación e impresión de este trabajo.

Agradezco a la Dra. Amelia Farrés Coordinadora del Doctorado en Ciencias Bioquímicas y a la Sra. Leticia García por la ayuda y asesoría en los trámites escolares.

Este trabajo se realizó bajo la asesoría del Dr. Jesús Aguirre en el Departamento de Genética Molecular del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM.

Gracias al Dr. Jesús Aguirre por todos estos años de estudio y aprendizaje. Ojalá que los proyectos sigan avanzando tan bien y cosechen muchos éxitos.

Gracias a mis compañeros del laboratorio y anexos: Rosalinda, Laurita, Shaday, Fernando, Adriana, Mónica, Denhi, Isaac, Olivia, Adelaida, Yesika, Miguel, Daniel, Gabriela, Tere y Paty por compartir este espacio y tantas horas de plática y discusión académica.

Gracias a los Dres. Wilhelm Hansberg, Alejandro Zentella y Amelia Farrés por darme tantos consejos y estar siempre dispuestos a escucharme.

Gracias a Rosalinda, Mónica, Fernando, Laurita, Adriana, Shaday e Isaac por su amistad y por compartir su conocimiento conmigo.

Gracias también a mis amigos Carmen, Ernesto, Luis, Consuelo, Angélica, José, Gerardo, Ma. Elena y Lulú por escucharme y apoyarme siempre.

CONTENIDO

Resumen.....	1
Abstract.....	4
Introducción.....	6
Objetivos.....	16
Materiales y Métodos.....	17
Resultados y Discusión.....	29
Capítulo I. <i>catA</i> , un gen nuevo de <i>Aspergillus nidulans</i> que codifica para una catalasa regulada durante el desarrollo.....	30
Capítulo II. El control postranscripcional regula la localización célula-específica de la catalasa A durante el desarrollo en <i>Aspergillus nidulans</i>	44
Capítulo III. Estrategias para estudiar los mecanismos de regulación postranscripcional del gen <i>catA</i>	51
Capítulo IV. Caracterización de la región río arriba del inicio de la transcripción de <i>catA</i>	64
Conclusiones y Modelo de regulación de <i>catA</i>	68
Bibliografía.....	74
Apéndice I.....	81

RESUMEN

La esporulación asexual del hongo *Aspergillus nidulans* (conidiación) representa un buen modelo para abordar problemas de regulación genética y diferenciación celular. La clona de cDNA CAN5 es una de las muchas aisladas en base a la inducción específica de su ARNm durante la conidiación. El gen correspondiente a CAN5 predice un polipéptido de 744 aminoácidos con un alto grado de similitud con catalasas de diversas fuentes, por lo cual fue denominado *catA* (Navarro, 1995). La determinación de la actividad de catalasa en geles de poli(acrilamida) de proteínas nativas reveló la existencia de dos bandas de actividad. La banda con mayor movilidad electroforética representa la actividad predominante durante el crecimiento vegetativo y se induce durante la esporulación. La segunda actividad de catalasa aparece después de la inducción de la esporulación y es predominante en esporas asexuales (conidias). Recientemente se ha detectado una tercera actividad de catalasa, la cual se encuentra en estudio (Kawasaki y Aguirre, sin publicar). El mensajero de *catA* no se detectó en micelio en crecimiento, pero se indujo notablemente durante la esporulación y se acumuló en esporas, sugiriendo que *catA* codificaría para la catalasa de las conidias (Navarro, 1995).

En este trabajo nos planteamos como objetivos determinar cuál de las catalasas detectadas estaba codificada por *catA*, así como el estudio de la regulación de dicho gen. La interrupción de *catA* eliminó la catalasa de las conidias, sin afectar las catalasas presentes durante el crecimiento, indicando la existencia de al menos tres genes de catalasa en *A. nidulans*. Las conidias de una mutante *catA*⁻ resultaron mucho más sensibles al peróxido de hidrógeno, que las de una cepa silvestre (Navarro *et al.*, 1996). De hecho, una parte importante de la catalasa A se inmunolocalizó en la pared celular de las conidias. *CatA* parece ser muy estable, ya que el mensaje de *catA* desapareció a las 4 h de germinación (Navarro y Aguirre, sin publicar) mientras que la actividad de catalasa puede detectarse hasta las 10 h (Kawasaki *et al.*, 1997).

A pesar de que *catA* es un gen que se regula durante la conidiación, la acumulación del ARNm resultó independiente de los genes reguladores de la conidiación *brlA*, *abaA* y *wetA* (Navarro *et al.*, 1996). Una mutante nula en *brlA* es incapaz de producir conidias, pero puede llevar a cabo el ciclo sexual y producir esporas sexuales (ascosporas). Encontramos que a pesar de que en el micelio de esta mutante se acumula el mensajero de *catA*, no fue posible detectar la proteína correspondiente ni por su actividad enzimática, ni con anticuerpos específicos en ensayos tipo "Western Blot". Por el contrario, las ascosporas producidas por la

mutante nula en *brlA* mostraron altos niveles de actividad de catalasa A, indicando que el gen *catA* está sujeto a regulación postranscripcional.

Para estudiar los mecanismos que participan en esta regulación, fusionamos 1400 pb de la región reguladora 5' del gen *catA* con el gen reportero *lacZ*. Esta fusión produce un ARNm que incluye la región 5' del mensajero de *catA* que no se traduce (5'UTR), así como los primeros 4 aminoácidos de CatA. Una cepa silvestre con una sola copia de esta fusión, integrada en el locus *argB*, presentó una actividad baja de β -galactosidasa durante las primeras 12 h de conidiación, la cual se incrementó ~50 veces a las 25 h, y 620 veces en las conidias aisladas. En congruencia con estos resultados, la expresión espacial del reportero *catA::lacZ* se restringió a ciertos tipos celulares del conidióforo (métulas, fiálides y conidias). En cambio, en un fondo genético *brlA*⁻, el gen *catA::lacZ* mostró niveles bajos de expresión a lo largo de la conidiación (33-94 U entre 12 y 49 h). En una mutante en el gen *stuA*, en la cual el patrón celular del conidióforo está alterado, se detectó un incremento de β -galactosidasa de 8.3 veces en conidias con respecto al micelio no diferenciado, indicando que parte de la regulación de la expresión de *catA::lacZ* es independiente de *stuA*. También se observó una acumulación del mensajero de *catA* cuando el micelio vegetativo se incubó en condiciones de tensión oxidativa, osmótica o de privación de nutrientes. Sin embargo, la actividad de CatA se restringió a las conidias producidas durante la privación de carbono. Nuestros resultados apoyan un modelo en el cual la traducción del mensaje de *catA*, acumulado durante la conidiación o en respuesta a condiciones de tensión, depende de los procesos morfogénicos involucrados en la formación de esporas tanto asexuales como sexuales. También ponen en relieve la existencia de mecanismos independientes del gen *brlA* capaces de regular la localización de productos específicos de las esporas (Navarro y Aguirre, 1998).

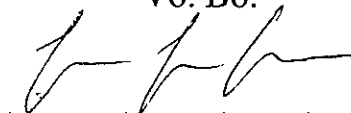
Con el propósito de probar que la región 5'UTR del mensajero de *catA* participa en la regulación de la traducción, se sustituyó la mayor parte de ésta por la región 5'UTR del mensajero del gen *alcA*, en la fusión *catA::lacZ* descrita previamente. *alcA* codifica para la ADHI, se reprime por glucosa y se induce por etanol y su promotor es muy usado para sobreexpresar genes. La actividad de β -galactosidasa derivada de la fusión *catA::lacZ* que contiene la región 5'UTR de *alcA* se comportó de manera semejante a la derivada de la fusión *catA::lacZ* original, tanto en un fondo silvestre, como en uno *brlA*⁻. Estos hallazgos son contradictorios con la hipótesis de que la región 5'UTR del mensajero de *catA*

regula la expresión de la catalasa en las esporas a través de un mecanismo de inhibición de la traducción. Sin embargo, la sustitución de la región 5'UTR no fue total, por lo que las secuencias de *catA* aún presentes en la segunda fusión *catA::lacZ* podrían ser las responsables de la inhibición de la traducción.

En una estrategia alternativa, decidimos poner al gen *catA* bajo el control del promotor *alcA*, usando las regiones 5'UTR correspondientes a *catA* o *alcA* y expresar las dos fusiones en micelio vegetativo. Se encontró una menor actividad de CatA y menor acumulación de ARNm con la fusión con la región 5'UTR de *catA* que con la de *alcA*, sugiriendo un papel de la región 5'UTR de *catA* en la estabilidad del mensaje. Sin embargo, parte de este mensaje fue capaz de traducirse, lo cual podría deberse a que la inhibición de la traducción es incompleta o a que esta no ocurre en condiciones distintas de la conidiación.

Como se mencionó antes, existen condiciones de tensión fisiológica que inducen el mensaje de *catA*, por lo que decidimos expresar ambas fusiones *alcA::catA* en condiciones de tensión oxidativa, como son la presencia de paraquat o durante la exposición del micelio al aire. Con ambas fusiones se observó un aumento notable en la acumulación del ARN mensajero. En el caso de la fusión *alcA::catA* con la región 5'UTR de *alcA*, dicho aumento correspondió con un incremento claro en la actividad de catalasa A. Por lo contrario, en el caso de la fusión *alcA::catA* con la región 5'UTR de *catA*, el aumento en la actividad de catalasa A fue marginal. Estos datos muestran que la exposición del micelio al aire (condición fisiológica en la cual se induce la conidiación), tiene los mismos efectos, en términos de acumulación del mensaje de *catA*, que el tratamiento con paraquat y que en estas condiciones la región 5'UTR del mensaje de *catA* es capaz de inhibir la traducción de dicho mensaje. Adicionalmente, nuestros experimentos han revelado la regulación del promotor del gen *alcA* por tensión oxidativa.

Vo. Bo.



Dr. Jesús Aguirre Linares

ABSTRACT

Asexual sporulation (conidiation) in the ascomycete *Aspergillus nidulans* constitutes an attractive model system for studies in gene regulation and cell differentiation. The CAN5 cDNA is one of several clones isolated based on transcript induction during conidiation. The sequence of the corresponding gene predicts a 744-amino-acid-residue polypeptide with high similarity to catalase genes and was hence designated, *catA* (Navarro, 1995). Catalase activity determination in native gels revealed two bands of activity. One of the bands represented the major activity during vegetative growth and was induced during sporulation. The second catalase activity appeared after the induction of sporulation and was the predominant activity in asexual spores (conidia). Recently, a third catalase has been detected (Kawasaki and Aguirre, unpublished). *catA* mRNA is barely detectable in growing mycelia but undergoes a high induction during conidiation, remaining stable in isolated conidia. This suggested that *catA* encoded the conidial catalase (Navarro, 1995).

The purpose of this work was to determine if *catA* encoded a catalase and to study the regulation of this gene. The disruption of *catA* abolished the major spore catalase without eliminating the vegetative activities, indicating the existence of at least three catalase genes in *A. nidulans*. *catA*-disrupted mutants produced spores that were sensitive to hydrogen peroxide as compared to wild-type spores (Navarro *et al.*, 1996) and in fact, CatA was immunolocalized to the conidial cell wall. The *catA* mRNA was degraded during germination (Navarro and Aguirre, unpublished). However, catalase A activity was present for a longer time, suggesting a higher protein stability (Kawasaki *et al.*, 1997).

catA mRNA accumulation was not dependent upon the developmental regulatory genes *brlA*, *abaA* nor *wetA*. Using a developmental mutant affected in the *brlA* gene, unable to form conidia but capable of producing sexual spores (ascospores), we demonstrated that the *catA* mRNA accumulated during induction of conidiation did not produce a CatA protein. In contrast, high levels of catalase A activity were detected in the ascospores produced by this mutant, indicating that the *catA* gene is posttranscriptionally regulated. The same type of regulation was observed for a *catA::lacZ* translational gene fusion, suggesting that the *catA* message 5' untranslated region (5'UTR) could be involved in translational control during development. In a wild type strain, β -galactosidase activity driven from the *catA::lacZ* reporter fusion was low in hyphae, increased 50 fold during conidiation and 620 fold in isolated conidia. Consistent with this, the spatial expression of the

reporter gene was restricted to metulae, phialides and conidia. Conidia-associated expression was retained in a *stuA* mutant, in which conidiophore cell pattern is severely deranged. *catA* mRNA accumulation was also observed when vegetative mycelia was subject to oxidative, osmotic and nitrogen or carbon starvation stress. Nevertheless, catalase A activity was restricted to the conidia produced under nutrient starvation. Our results provide support for a model in which translation of the *catA* message RNA, accumulated during conidiation or in response to different types of stress, is linked to the morphogenetic processes involved in asexual and sexual spore formation. Our findings also indicate that *brlA*-independent mechanisms regulate the expression of genes encoding spore-specific products (Navarro and Aguirre, 1998).

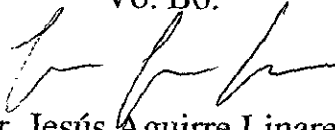
To test the importance of the 5'UTR of *catA* mRNA, we constructed a *catA::lacZ* fusion in which most of the corresponding *catA* 5'UTR was replaced by the *alcA* mRNA 5'UTR. *alcA* codes for ADHI and it is repressed by glucose and induced by ethanol. The regulation of this new fusion was very similar to that observed for the *catA::lacZ* fusion containing the 5'UTR of the *catA* mRNA. These results suggest that the regions of the *catA* 5'UTR mRNA left in the second fusion are sufficient for the translational regulation of *catA*.

In another set of experiments, we use the *alcA* promoter to overexpress *catA* mRNAs containing either the *alcA* or the *catA* 5'UTR regions. Unexpectedly, the second mRNA accumulated to much lower levels. However, this fact did not prevent a partial induction of catalase A activity. These results suggest that the *catA* mRNA 5'UTR destabilizes the message during growth and that, under these conditions, translational repression is not efficient.

Since the *catA* mRNA accumulates during oxidative stress, we decided to induce the *alcA::catA* fusions when exposing the organism to air or to the oxidizing agent paraquat. With both fusions, a notable increase in mRNA accumulation was observed. In the case of the *catA* mRNA containing *alcA* mRNA 5'UTR, this increase corresponded with a clear induction of catalase A activity. In contrast, catalase A activity was much lower when expressing the *catA* message containing *catA* mRNA 5'UTR.

These data show that exposure of mycelia to air (a physiological condition for induction of conidiation) is equivalent, in terms of *catA* mRNA accumulation, to a paraquat treatment and that under these conditions the *catA* message RNA 5'UTR is able to inhibit translation. In addition, our experiments have unveiled a transcriptional regulation of the *alcA* gene by oxidative stress.

Vo. Bo.



Dr. Jesús Aguirre Linares

RESUMEN

La esporulación asexual del hongo *Aspergillus nidulans* (conidiación) representa un buen modelo para abordar problemas de regulación genética y diferenciación celular. La clona de cDNA CAN5 es una de las muchas aisladas en base a la inducción específica de su ARNm durante la conidiación. El gen correspondiente a CAN5 predice un polipéptido de 744 aminoácidos con un alto grado de similitud con catalasas de diversas fuentes, por lo cual fue denominado *catA* (Navarro, 1995). La determinación de la actividad de catalasa en geles de poliacrilamida de proteínas nativas reveló la existencia de dos bandas de actividad. La banda con mayor movilidad electroforética representa la actividad predominante durante el crecimiento vegetativo y se induce durante la esporulación. La segunda actividad de catalasa aparece después de la inducción de la esporulación y es predominante en esporas asexuales (conidias). Recientemente se ha detectado una tercera actividad de catalasa, la cual se encuentra en estudio (Kawasaki y Aguirre, sin publicar). El mensajero de *catA* no se detectó en micelio en crecimiento, pero se indujo notablemente durante la esporulación y se acumuló en esporas, sugiriendo que *catA* codificaría para la catalasa de las conidias (Navarro, 1995).

En este trabajo nos planteamos como objetivos determinar cuál de las catalasas detectadas estaba codificada por *catA*, así como el estudio de la regulación de dicho gen. La interrupción de *catA* eliminó la catalasa de las conidias, sin afectar las catalasas presentes durante el crecimiento, indicando la existencia de al menos tres genes de catalasa en *A. nidulans*. Las conidias de una mutante *catA* resultaron mucho más sensibles al peróxido de hidrógeno, que las de una cepa silvestre (Navarro *et al.*, 1996). De hecho, una parte importante de la catalasa A se inmunolocalizó en la pared celular de las conidias. CatA parece ser muy estable, ya que el mensaje de *catA* desapareció a las 4 h de germinación (Navarro y Aguirre, sin publicar) mientras que la actividad de catalasa puede detectarse hasta las 10 h (Kawasaki *et al.*, 1997).

A pesar de que *catA* es un gen que se regula durante la conidiación, la acumulación del ARNm resultó independiente de los genes reguladores de la conidiación *brlA*, *abaA* y *wetA* (Navarro *et al.*, 1996). Una mutante nula en *brlA* es incapaz de producir conidias, pero puede llevar a cabo el ciclo sexual y producir esporas sexuales (ascosporas). Encontramos que a pesar de que en el micelio de esta mutante se acumula el mensajero de *catA*, no fue posible detectar la proteína correspondiente ni por su actividad enzimática, ni con anticuerpos específicos en ensayos tipo "Western Blot". Por el contrario, las ascosporas producidas por la

mutante nula en *brlA* mostraron altos niveles de actividad de catalasa A, indicando que el gen *catA* está sujeto a regulación postranscripcional.

Para estudiar los mecanismos que participan en esta regulación, fusionamos 1400 pb de la región reguladora 5' del gen *catA* con el gen reportero *lacZ*. Esta fusión produce un ARNm que incluye la región 5' del mensajero de *catA* que no se traduce (5'UTR), así como los primeros 4 aminoácidos de CatA. Una cepa silvestre con una sola copia de esta fusión, integrada en el locus *argB*, presentó una actividad baja de β -galactosidasa durante las primeras 12 h de conidiación, la cual se incrementó ~50 veces a las 25 h, y 620 veces en las conidias aisladas. En congruencia con estos resultados, la expresión espacial del reportero *catA::lacZ* se restringió a ciertos tipos celulares del conidióforo (métulas, fiálides y conidias). En cambio, en un fondo genético *brlA*⁻, el gen *catA::lacZ* mostró niveles bajos de expresión a lo largo de la conidiación (33-94 U entre 12 y 49 h). En una mutante en el gen *stuA*, en la cual el patrón celular del conidióforo está alterado, se detectó un incremento de β -galactosidasa de 8.3 veces en conidias con respecto al micelio no diferenciado, indicando que parte de la regulación de la expresión de *catA::lacZ* es independiente de *stuA*. También se observó una acumulación del mensajero de *catA* cuando el micelio vegetativo se incubó en condiciones de tensión oxidativa, osmótica o de privación de nutrientes. Sin embargo, la actividad de CatA se restringió a las conidias producidas durante la privación de carbono. Nuestros resultados apoyan un modelo en el cual la traducción del mensaje de *catA*, acumulado durante la conidiación o en respuesta a condiciones de tensión, depende de los procesos morfogénicos involucrados en la formación de esporas tanto asexuales como sexuales. También ponen en relieve la existencia de mecanismos independientes del gen *brlA* capaces de regular la localización de productos específicos de las esporas (Navarro y Aguirre, 1998).

Con el propósito de probar que la región 5'UTR del mensajero de *catA* participa en la regulación de la traducción, se substituyó la mayor parte de ésta por la región 5'UTR del mensajero del gen *alcA*, en la fusión *catA::lacZ* descrita previamente. *alcA* codifica para la ADHI, se reprime por glucosa y se induce por etanol y su promotor es muy usado para sobreexpresar genes. La actividad de β -galactosidasa derivada de la fusión *catA::lacZ* que contiene la región 5'UTR de *alcA* se comportó de manera semejante a la derivada de la fusión *catA::lacZ* original, tanto en un fondo silvestre, como en uno *brlA*⁻. Estos hallazgos son contradictorios con la hipótesis de que la región 5'UTR del mensajero de *catA*

regula la expresión de la catalasa en las esporas a través de un mecanismo de inhibición de la traducción. Sin embargo, la sustitución de la región 5'UTR no fue total, por lo que las secuencias de *catA* aún presentes en la segunda fusión *catA::lacZ* podrían ser las responsables de la inhibición de la traducción.

En una estrategia alternativa, decidimos poner al gen *catA* bajo el control del promotor *alcA*, usando las regiones 5'UTR correspondientes a *catA* o *alcA* y expresar las dos fusiones en micelio vegetativo. Se encontró una menor actividad de CatA y menor acumulación de ARNm con la fusión con la región 5'UTR de *catA* que con la de *alcA*, sugiriendo un papel de la región 5'UTR de *catA* en la estabilidad del mensaje. Sin embargo, parte de este mensaje fue capaz de traducirse, lo cual podría deberse a que la inhibición de la traducción es incompleta o a que esta no ocurre en condiciones distintas de la conidiación.

Como se mencionó antes, existen condiciones de tensión fisiológica que inducen el mensaje de *catA*, por lo que decidimos expresar ambas fusiones *alcA::catA* en condiciones de tensión oxidativa, como son la presencia de paraquat o durante la exposición del micelio al aire. Con ambas fusiones se observó un aumento notable en la acumulación del ARN mensajero. En el caso de la fusión *alcA::catA* con la región 5'UTR de *alcA*, dicho aumento correspondió con un incremento claro en la actividad de catalasa A. Por lo contrario, en el caso de la fusión *alcA::catA* con la región 5'UTR de *catA*, el aumento en la actividad de catalasa A fue marginal. Estos datos muestran que la exposición del micelio al aire (condición fisiológica en la cual se induce la conidiación), tiene los mismos efectos, en términos de acumulación del mensaje de *catA*, que el tratamiento con paraquat y que en estas condiciones la región 5'UTR del mensaje de *catA* es capaz de inhibir la traducción de dicho mensaje. Adicionalmente, nuestros experimentos han revelado la regulación del promotor del gen *alcA* por tensión oxidativa.

ABSTRACT

Asexual sporulation (conidiation) in the ascomycete *Aspergillus nidulans* constitutes an attractive model system for studies in gene regulation and cell differentiation. The CAN5 cDNA is one of several clones isolated based on transcript induction during conidiation. The sequence of the corresponding gene predicts a 744-amino-acid-residue polypeptide with high similarity to catalase genes and was hence designated, *catA* (Navarro, 1995). Catalase activity determination in native gels revealed two bands of activity. One of the bands represented the major activity during vegetative growth and was induced during sporulation. The second catalase activity appeared after the induction of sporulation and was the predominant activity in asexual spores (conidia). Recently, a third catalase has been detected (Kawasaki and Aguirre, unpublished). *catA* mRNA is barely detectable in growing mycelia but undergoes a high induction during conidiation, remaining stable in isolated conidia. This suggested that *catA* encoded the conidial catalase (Navarro, 1995).

The purpose of this work was to determine if *catA* encoded a catalase and to study the regulation of this gene. The disruption of *catA* abolished the major spore catalase without eliminating the vegetative activities, indicating the existence of at least three catalase genes in *A. nidulans*. *catA*-disrupted mutants produced spores that were sensitive to hydrogen peroxide as compared to wild-type spores (Navarro *et al.*, 1996) and in fact, CatA was immunolocalized to the conidial cell wall. The *catA* mRNA was degraded during germination (Navarro and Aguirre, unpublished). However, catalase A activity was present for a longer time, suggesting a higher protein stability (Kawasaki *et al.*, 1997).

catA mRNA accumulation was not dependent upon the developmental regulatory genes *brlA*, *abaA* nor *wetA*. Using a developmental mutant affected in the *brlA* gene, unable to form conidia but capable of producing sexual spores (ascospores), we demonstrated that the *catA* mRNA accumulated during induction of conidiation did not produce a CatA protein. In contrast, high levels of catalase A activity were detected in the ascospores produced by this mutant, indicating that the *catA* gene is posttranscriptionally regulated. The same type of regulation was observed for a *catA::lacZ* translational gene fusion, suggesting that the *catA* message 5' untranslated region (5'UTR) could be involved in translational control during development. In a wild type strain, β -galactosidase activity driven from the *catA::lacZ* reporter fusion was low in hyphae, increased 50 fold during conidiation and 620 fold in isolated conidia. Consistent with this, the spatial expression of the reporter gene was restricted to metulae, phialides and conidia. Conidia-associated expression was retained in a *stuA* mutant, in which conidiophore cell pattern is

severely deranged. *catA* mRNA accumulation was also observed when vegetative mycelia was subject to oxidative, osmotic and nitrogen or carbon starvation stress. Nevertheless, catalase A activity was restricted to the conidia produced under nutrient starvation. Our results provide support for a model in which translation of the *catA* message RNA, accumulated during conidiation or in response to different types of stress, is linked to the morphogenetic processes involved in asexual and sexual spore formation. Our findings also indicate that *bria*-independent mechanisms regulate the expression of genes encoding spore-specific products (Navarro and Aguirre, 1998).

To test the importance of the 5'UTR of *catA* mRNA, we constructed a *catA::lacZ* fusion in which most of the corresponding *catA* 5'UTR was replaced by the *alcA* mRNA 5'UTR. *alcA* codes for ADHI and it is repressed by glucose and induced by ethanol. The regulation of this new fusion was very similar to that observed for the *catA::lacZ* fusion containing the 5'UTR of the *catA* mRNA. These results suggest that the regions of the *catA* 5'UTR mRNA left in the second fusion are sufficient for the translational regulation of *catA*.

In another set of experiments, we use the *alcA* promoter to overexpress *catA* mRNAs containing either the *alcA* or the *catA* 5'UTR regions. Unexpectedly, the second mRNA accumulated to much lower levels. However, this fact did not prevent a partial induction of catalase A activity. These results suggest that the *catA* mRNA 5'UTR destabilizes the message during growth and that, under these conditions, translational repression is not efficient.

Since the *catA* mRNA accumulates during oxidative stress, we decided to induce the *alcA::catA* fusions when exposing the organism to air or to the oxidizing agent paraquat. With both fusions, a notable increase in mRNA accumulation was observed. In the case of the *catA* mRNA containing *alcA* mRNA 5'UTR, this increase corresponded with a clear induction of catalase A activity. In contrast, catalase A activity was much lower when expressing the *catA* message containing *catA* mRNA 5'UTR.

These data show that exposure of mycelia to air (a physiological condition for induction of conidiation) is equivalent, in terms of *catA* mRNA accumulation, to a paraquat treatment and that under these conditions the *catA* message RNA 5'UTR is able to inhibit translation. In addition, our experiments have unveiled a transcriptional regulation of the *alcA* gene by oxidative stress.

INTRODUCCIÓN

I. La esporulación asexual en *Aspergillus nidulans* como modelo experimental de diferenciación celular.

En el laboratorio estamos interesados en entender los procesos que dan origen a la diferenciación celular en microorganismos. Para estudiar este fenómeno hemos elegido como modelo experimental al hongo filamentoso *A. nidulans*, el cual es manipulable a nivel genético. *A. nidulans* presenta tres diferentes etapas en su ciclo de vida, las cuales se muestran en la Figura 1. El ciclo asexual comienza con la germinación de una espora para producir micelio. Cuando dicho micelio se expone al aire o a privación de nutrientes, algunas de las hifas forman septos que delimitan un compartimento llamado célula pie, a partir de la cual se forma un tallo (Clutterbuck, 1969; Skromne *et al.*, 1995). La célula tallo se alarga hasta que forma una vesícula en la punta y a través de numerosas gemaciones de la vesícula se forman las métulas. Las métulas forman las fiálides, las cuales pueden ser consideradas como células nodrizas que dan origen a las esporas asexuales uninucleadas, también conocidas como conidias. Las conidias son estructuras de resistencia y propagación que se caracterizan por la acumulación de un pigmento verde. Con la germinación de las conidias se establece un nuevo ciclo asexual.

Una vez concluida la esporulación asexual se inicia la etapa de la esporulación sexual. *A. nidulans* es homotálico; la reproducción sexual se realiza en un mismo talo (no hay sexos separados). Las esporas sexuales, también llamadas ascosporas, están contenidas dentro de sacos conocidos como ascas. Un asca madura contiene ocho esporas, ya que la meiosis es seguida por una duplicación mitótica. Los ascas están contenidos dentro de una estructura denominada cleistotecio, el cual contiene cientos de ascas. Las ascosporas tienen una estructura muy parecida a una concha de molusco y durante la germinación la ascospora se abre como una almeja para dar paso al tubo germinal. Poco se sabe acerca de la regulación genética de este proceso (Champe *et al.*, 1994).

El ciclo parasexual de *A. nidulans* se inicia cuando dos cepas genéticamente distintas se fusionan formando un heterocarión. En ciertas condiciones dos núcleos se fusionan y se forman espontáneamente diploides heterocigotos. Estos pueden ser haploidizados usando diversas drogas que afectan la formación del uso mitótico. Durante la haploidización, los ocho pares de cromosomas segregan independientemente, por lo que un haploide generado de esta manera puede poseer

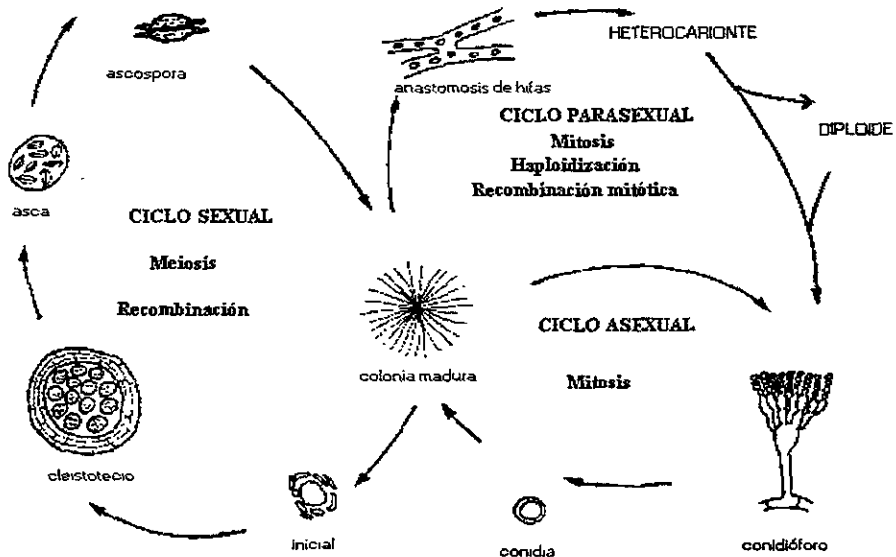


Figura 1. Ciclo de vida de *Aspergillus nidulans*. El micelio vegetativo está constituido de células filamentosas llamadas hifas, las cuales crecen apicalmente y por ramificación sub-apical. El conjunto de hifas o micelio puede contener un solo tipo de núcleos (homocariote) o núcleos diferentes (heterocariote). En ocasiones, núcleos genéticamente diferentes se fusionan formando cepas diploides heterocigotas. La pérdida espontánea de uno o más cromosomas causa la formación de haploides recombinantes (con cromosomas de ambas cepas haploides parentales) en un proceso denominado ciclo parasexual. El ciclo sexual lleva a la producción de ascas dentro de cuerpos fructíferos llamados cleistotecios; dentro de los ascas se encuentran las ascosporas. La fase asexual del ciclo comienza con la formación de una célula pie que forma un tallo. Este se diferencia en la parte superior formando el conidióforo, el cual consiste de una vesícula multinucleada, la cual por gemación produce méticas, filídes y finalmente conidias (Tomada de Martinelli, 1994).

cromosomas de ambos padres. Esta parte del ciclo de vida del hongo es muy útil para asignar mutaciones a un cromosoma. En *A. nidulans* se han caracterizado una gran cantidad de mutantes afectadas en el proceso de conidiación. Algunos de estos genes corresponden a genes reguladores que activan o reprimen otros genes y que actúan a diferentes tiempos y niveles.

Entre los genes reguladores del proceso de conidiación destacan *brlA*, *abaA* y *wetA* los cuales fueron definidos y caracterizados por Clutterbuck (Clutterbuck, 1969; Martinelli y Clutterbuck, 1971) (Figura 2) y posteriormente se clonaron y

secuenciaron (Johnstone *et al.*, 1985; Boylan *et al.*, 1987; Adams *et al.*, 1988; Mirabito *et al.*, 1989; Miller *et al.*, 1991; Marshall y Timberlake, 1991).

El gen *brlA* actúa más temprano y se requiere continuamente durante la conidiación, desde la formación de la vesícula hasta la formación de las conidias (Mirabito *et al.*, 1989). Las mutantes en el gen *brlA* detienen el desarrollo del conidióforo antes de la formación de la vesícula. En cambio, el crecimiento vegetativo y la reproducción sexual no se ven afectados (Figura 2-B). La expresión forzada del gen *brlA* causa la formación de conidias en la punta de las hifas en un cultivo líquido. La secuencia de *brlA* tiene homología con los factores transcripcionales del tipo dedos de zinc. Este gen no se transcribe en el micelio ni en las esporas (Aguirre, 1993).

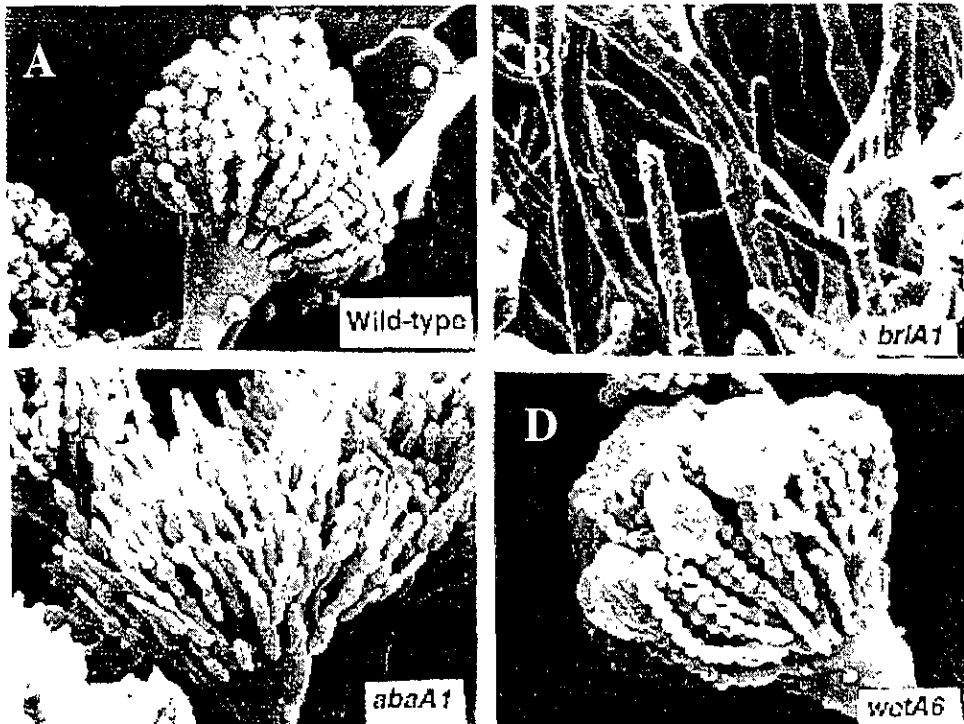


Figura 2 Mutantes en la esporulación asexual de *A. nidulans*. Microfotografías de microscopía electrónica de barrido de conidióforos de la cepa silvestre (A) y mutantes afectadas en la conidiación. B, *brlA*, C, *abaA1* y D, *wotA6* (Boylan, 1987)

El gen *abaA* (Figura 2C) codifica para una proteína reguladora que se une al ADN. Su mutación provoca que el desarrollo del conidióforo llegue hasta la formación de vesículas y mótulas reiteradas que asemejan las cuentas de un abaco, de ahí su nombre (Aramayo y Timberlake, 1993; Andrianopoulos y Timberlake, 1994).

wetA es otro gen importante para la esporulación y a pesar de que su mutación no altera la formación del conidióforo. Las conidias de organismos *wetA* no alcanzan la madurez (Figura 2-D), debido a que se hidratan con facilidad y se lisan. La inducción forzada de este gen causa la expresión de algunos genes específicos de las conidias, lo cual apoya su posible papel de gen regulador. La secuencia de este gen no se parece a ningún otro reportado anteriormente (Marshall y Timberlake, 1991).

Las mutantes en el gen *stuA* producen conidióforos enanos con paredes delgadas pero con conidias aparentemente normales. Las mótulas y fiálides pueden estar ausentes, en cuyo caso las conidias se producen directamente de la vesícula (Figura 4C, Capítulo II). Además, las mutantes *stuA* son estériles en el ciclo sexual. En *A. nidulans* el gen *stuA* codifica para un represor de la transcripción, sin embargo, en la levadura se ha visto que puede actuar como un activador débil (Clutterbuck, 1969; Dutton *et al.*, 1997).

II. El peróxido de hidrógeno en la tensión oxidativa y la regulación celular.

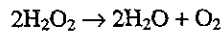
Fuentes de generación del peróxido de hidrógeno y su papel como especie reactiva de oxígeno.

La hipótesis publicada por Hansberg y Aguirre en 1990, propone que la diferenciación celular en microorganismos es una respuesta a un estado de tensión oxidativa. En el laboratorio estamos interesados en encontrar si durante las etapas de diferenciación de *A. nidulans* ocurre tensión oxidativa.

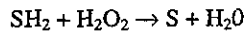
En la tensión oxidativa se incrementa la generación de varias especies de oxígeno reactivas, las cuales pueden generar daño celular al reaccionar con diversos componentes celulares como son las proteínas, ácidos nucleicos, lípidos y azúcares. La especie reactiva superóxido, se genera *in vivo* a través de diversos procesos, principalmente en la cadena de transporte de electrones (Halliwell y Gutteridge, 1984). Esta especie es

descompuesta en peróxido de hidrógeno y oxígeno por medio de la enzima superóxido dismutasa.

Para estudiar la tensión oxidativa, en las células de *A. nidulans* decidimos enfocarnos en el estudio de las catalasas. Estas enzimas, junto con las peroxidasas, son las encargadas de la detoxificación del peróxido de hidrógeno *in vivo*, al llevar a cabo la siguiente reacción:



mientras que las peroxidasas realizan la reacción:



donde SH_2 representa un sustrato aceptor de electrones.

El H_2O_2 es una especie de oxígeno reactiva muy importante ya que si no se controla, puede llegar a generar el radical hidroxilo a través de la reacción de Fenton. El radical hidroxilo es la especie de oxígeno más reactiva que se conoce.

El H_2O_2 intracelular proviene de diversas fuentes, generalmente a través de la dismutación, espontánea o enzimática, del radical superóxido. La enzima superóxido dismutasa (SOD) dismuta el radical superóxido a peróxido de hidrógeno. La cadena de transporte de electrones de la mitocondria es una fuente bien documentada de H_2O_2 a través de la producción de superóxido (Hauptmann y Cadenas, 1997).

Otra fuente es la NADPH oxidasa de fagocitos. La oxidasa toma NADPH y produce superóxido mientras que la oxidasa específica de NADH produce tanto superóxido como peróxido de hidrógeno. Por otra parte, la xantina oxidasa y la xantino deshidrogenasa producen superóxido y peróxido de hidrógeno, respectivamente. También la urato oxidasa, acil-CoA oxidasa, L-gluconolactona oxidasa y monoamina oxidasa son fuentes de peróxido de hidrógeno (Hauptmann y Cadenas, 1997).

El papel del superóxido y el peróxido de hidrógeno como moléculas de señalización celular.

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) pueden causar daño severo a las células (Halliwell y Gutteridge, 1984); sin embargo, su importancia no sólo radica en el daño que causan. Recientemente las ROS se han propuesto como segundos mensajeros que transmiten señales inter e intracelulares. Una de las principales respuestas de una planta a la invasión de un microbio es un aumento en el consumo de oxígeno que se conoce como explosión oxidativa. Cuatro vías de consumo de oxígeno se encuentran funcionando durante esta respuesta la respiración mitocondrial, la peroxidación de lípidos, la reducción bivalente de oxígeno a peróxido de hidrógeno y la reducción monovalente de oxígeno a superóxido. Esta última vía es la que se considera más característica de esta respuesta, a través de la NADPH oxidasa (Jacks, T.H. y Davidonis, G.H., 1996; Levine *et al.*, 1994).

NF- κ B es un factor transcripcional de células eucariotes que es activado *in vitro* por peróxido de hidrógeno e *in vivo* por una gran variedad de agentes, tales como los ésteres de forbol, las citocinas, etc (Meyer *et al.*, 1993). Se ha propuesto que algunos de estos agentes actúan a través de la producción de especies de oxígeno reactivas (H_2O_2). Por otra parte, se sabe que se requieren antioxidantes para regenerar la función de ciertos factores transcripcionales. En el caso de NF- κ B, las peroxirredoxinas juegan un papel muy importante en su función (Jin *et al.*, 1997; Choi *et al.*, 1998). Las peroxirredoxinas son enzimas encargadas de reducir los hidroperóxidos usando como donadores de electrones a la tioredoxina u otros tioles. Se ha propuesto que una peroxirredoxina de humano regula la actividad de NF- κ B a través de la modulación de la fosforilación de la proteína I κ B- α en el citoplasma (Choi *et al.*, 1998; Jin *et al.*, 1997). También se ha sugerido que los oxidantes y/o antioxidantes pueden regular la función de la cinasa que fosforila a I κ B; sin embargo, se desconoce como se lleva a cabo este proceso (Jin *et al.*, 1997).

En fibroblastos se ha reportado que una forma activa de Ras produce una gran cantidad de especies reactivas de oxígeno, en particular superóxido (Irani *et al.*, 1997). La producción de superóxido no ocurre durante la sobreexpresión de la forma dominante negativa de Ras, Rac o en presencia

de antioxidantes. Por otra parte, no se detectó actividad de las cinasas tipo MAPK y la cinasa de c-Jun cuando se sobreexpresó la forma activa de Ras, sugiriendo un mecanismo de acción de Ras independiente de la vía clásica de cinasas (Irani *et al.*, 1997). En el laboratorio también hemos observado que Ras de *A. nidulans* (Som y Kolaparthi, 1994) es capaz de activar a la catalasa B cuando se sobreexpresa. Esta inducción pudiera estar mediada a través de una NADPH oxidasa no descrita (Navarro y Aguirre, sin publicar).

III. Catalasas presentes en estructuras de resistencia o de vida latente.

Las especies de oxígeno reactivas tradicionalmente han sido vistas como tóxicas para la célula. Sin embargo, como se ha mencionado antes, recientemente se ha sugerido que también pueden jugar un papel importante en el señalamiento celular. En este contexto resulta interesante conocer los mecanismos de regulación de las catalasas, dado su papel central en la detoxificación del peróxido de hidrógeno. A su vez, el peróxido de hidrógeno es una fuente de otras especies de oxígeno reactivas en la célula (Halliwell y Gutteridge, 1984).

La existencia de varias catalasas sugiere múltiples funciones para estas enzimas en diversos compartimentos celulares o tejidos; durante diferentes etapas del desarrollo o en distintas condiciones. La asociación de una catalasa con estados específicos de diferenciación, tales como, esporas, semillas o formas de resistencia, sugieren que dichas catalasas juegan un papel importante en la sobrevivencia de dichas estructuras.

En *Escherichia coli* se han descrito dos genes de catalasas. *katG* codifica para una catalasa-peroxidasa que se induce durante la fase de crecimiento logarítmico (Triggs-Raine *et al.*, 1988). Esta catalasa es inducida por el factor transcripcional OxyR en respuesta al peróxido de hidrógeno (Demple y Amábile-Cuevas, 1991). Las catalasas HPII y, en menor medida HPI de *E. coli*, se inducen durante la fase estacionaria; sin embargo la primera no se activa por peróxido de hidrógeno como la HPI. Su regulación depende del factor sigma *rpoS*, el cual regula la entrada a la fase estacionaria de crecimiento (Hengge-Aronis, 1993; Eisenstark, *et al.*, 1996). Durante esta fase estacionaria se inducen aproximadamente 43 genes que dependen del factor sigma *rpoS*. Entre estos genes se encuentran las catalasas HPI, HPII y también otros genes involucrados en resistencia a tensión, tales como las enzimas que participan en la síntesis de la

trehalosa, un morfógeno, la glutatión reductasa y algunos otros (Eisenstark, *et al.*, 1996). Durante la fase estacionaria las células cambian de forma, se vuelven más pequeñas, redondas y altamente resistentes a condiciones de tensión. Hengge-Aronis (1993) ha sugerido que los cambios sufridos en esta etapa del desarrollo vuelven a *E. coli* un organismo más complicado de lo que se le había considerado, y que se podría pensar en la fase estacionaria del crecimiento como un estado diferenciado, similar al de una spora. Otras catalasas bacterianas que se inducen durante a la fase estacionaria del crecimiento se muestran en la Tabla I (Tomada de Loewen, 1997).

Bacillus subtilis es un microorganismo que ha sido muy estudiado por su proceso de esporulación. De las tres catalasas que se han descrito en esta bacteria solo la catalasa KatX está presente en las esporas. Esta catalasa no se induce por peróxido de hidrógeno y es regulada por el factor σ^F , el cual es específico de la esporulación. Recientemente se ha mostrado que la mutación de *katX* hace más sensibles a las germínulas al peróxido de hidrógeno, lo cual indica la importancia de esta catalasa para proteger a las esporas en condiciones de tensión oxidativa (Bagyan *et al.*, 1998).

Microorganismo	Catalasa
<i>Bacillus firmus</i>	CatIII
<i>Bacillus subtilis</i>	KatA
<i>Deinococcus radiodurans</i>	CatB
<i>Escherichia coli</i>	KatE
<i>Pseudomonas syringae</i>	CatF
<i>Salmonella typhimurium</i>	KatE
<i>Staphylococcus aureus</i>	sin nombre
<i>Streptomyces coelicolor</i>	Cat1, 4, 5

Tabla I. Catalasas que se inducen durante la fase estacionaria en bacterias (Tomada de Loewen, 1997).

En plantas también se han descrito varios genes de catalasa dentro de un mismo organismo. Este es el caso para el tabaco, el maíz y *Arabidopsis* (Scandalios *et al.*, 1997). En el maíz existen tres genes de catalasas, *Cat1*, *Cat2* y *Cat3*. Estos genes presentan expresión espacial/temporal distintas y responden a condiciones ambientales diversas (Scandalios *et al.*, 1997). Las proteínas muestran localizaciones diversas dentro de la célula y en diversos tejidos. La CAT-1 es la

única catalasa que se expresa en polen maduro, endospermo, aleurona y el escutelo. Conforme avanza el desarrollo, los niveles de CAT-1 en el escutelo bajan mientras los de CAT-2 aumentan. Ambas catalasas están presentes en los glioxisomas y el citoplasma. CAT-1 y CAT-3 están presentes en hojas y en semillas. CAT-2 esta presente en las hojas verdes mientras CAT-1 y CAT-3 están en las hojas del mesófilo. La CAT-3 ha sido co-aislada con la fracción mitocondrial. En las semillas las tres catalasas están presentes, aunque en distintos tejidos (Scandalios *et al.*, 1997).

En *Saccharomyces cerevisiae* se han encontrado dos genes de catalasa, CTT1 y CTA1. CTT1 corresponde a una catalasa citosólica mientras que CTA1 es peroxisomal (Hartig y Ruis, 1986; Cohen *et al.*, 1985). La existencia de dos genes en este organismo se explica fácilmente debido a que las enzimas tienen diferente localización. Se desconoce la regulación de estas catalasas durante la esporulación del hongo. El gen CTT1 se reprime por glucosa y se induce en respuesta a una gran variedad de condiciones de tensión metabólica como son: privación de nutrientes, choque de calor, alta osmolaridad y tensión oxidativa (revisado en: Ruis y Koller, 1997).

En *Neurospora crassa* se han encontrado tres catalasas. La cat-1 se encuentra presente durante el crecimiento, el desarrollo y las esporas. La cat-2 aparece en esporas y condiciones de tensión por calor, mientras que la cat-3 está acumulada en esporas (Chary y Natvig, 1989; Lledías *et al.*, 1998; Lledías y Hansberg, sin publicar; Michán y Hansberg, sin publicar).

Las catalasas no son la únicas enzimas antioxidantes que se encuentran acumuladas en esporas. En cebada y *A. thaliana* se encontró una peroxirredoxina en semillas. Se ha sugerido que esta enzima está encargada de proteger a las semillas durante la desecación y durante la latencia (Haslekas *et al.*, 1998).

En *A. nidulans* hemos descrito dos catalasas que se regulan diferencialmente durante la esporulación asexual. Inicialmente, la determinación de actividad de catalasa en geles de proteínas nativas reveló la existencia de dos bandas de actividad. La banda con mayor movilidad electroforética representó la actividad predominante durante el crecimiento vegetativo mostrando una inducción durante la esporulación. La segunda actividad de catalasa presentó menor movilidad electroforética, apareciendo después de la inducción de la esporulación y es la actividad predominante en esporas asexuales (conidias) (Navarro *et al.*, 1996). Recientemente, se ha descubierto la presencia de una tercera catalasa, la cual se

acumula en la fase estacionaria tardía (Kawasaki y Aguirre, sin publicar). Estas tres catalasas tienen mecanismos de regulación diferentes ya que aparecen en condiciones metabólicas y de crecimiento particulares para cada una de ellas y aún no se conoce los mecanismos que median esta regulación.

La clona de cDNA CAN5 fue aislada como un mensaje que se acumula durante la esporulación asexual. La secuencia del gen correspondiente mostró una alta identidad con genes de catalasa por lo que fue denominado *catA* (Navarro, 1995). El ARNm de CAN5 es casi indetectable en micelio en crecimiento, se induce notablemente durante la esporulación y se encuentra muy acumulado en esporas aisladas (Navarro, 1995) por lo que es muy probable que codifique para la catalasa de las conidias. En este trabajo se planteo determinar para que catalasa codifica *catA* y estudiar la regulación de dicho gen. En otro trabajo Kawasaki *et al.* caracterizaron el gen correspondiente a la catalasa del crecimiento, estudiaron su regulación y lo nombraron *catB*. La interrupción de este gen hace al micelio en crecimiento más sensible al peróxido de hidrógeno que el micelio de una cepa silvestre (Kawasaki *et al.*, 1997). La catalasa B ha sido localizada en la pared celular del micelio en crecimiento. *catB* se induce en presencia de tensión oxidativa. También se ha observado una inducción de la actividad de la catalasa B en respuesta a la sobreexpresión de Ras de *A. nidulans* y se piensa que esta respuesta esta mediada a través de la NADPH oxidasa, ya que al sobreexpresar la forma activa de Ras en presencia de un inhibidor de la NADPH oxidasa no se observa dicha inducción (Navarro y Aguirre, sin publicar). Este resultado sugiere que la activación de *catB* puede deberse a una tensión oxidativa provocada por Ras de acuerdo a lo que encontró el grupo de Irani *et al.* (1997).

JUSTIFICACIÓN

Este trabajo es parte de un proyecto general que pretende comprender la regulación de la respuesta a la tensión oxidativa en eucariotes. En el laboratorio trabajamos con el hongo filamentoso *A. nidulans* porque es un sistema experimental en el cual se han desarrollado una gran cantidad de herramientas metodológicas a nivel de genética clásica y molecular. En particular, estamos interesados en estudiar la diferenciación celular en microorganismos como una respuesta a la tensión oxidativa, de acuerdo con la propuesta de Hansberg y Aguirre (1990).

HIPÓTESIS

Para estudiar la tensión oxidativa en *A. nidulans* elegimos a las catalasas como modelo de estudio. En particular este trabajo se centra en el estudio de un gen de catalasa. La clona de cDNA CAN5 codifica para una catalasa denominada *catA*; esta clona fue aislada como un transcrito que se induce durante la esporulación. De acuerdo a los geles de actividad de catalasa se encontró una banda de actividad que se induce durante la esporulación, por lo que se piensa que *catA* codifica para esta enzima. El objetivo general de este trabajo es estudiar los mecanismos de regulación del gen *catA*.

OBJETIVOS PARTICULARES

- I. Evaluación del efecto de la interrupción del gen *catA*.
- II. Caracterización de mutantes afectadas en el gen *catA* en cuanto a su sensibilidad a la tensión oxidativa.
- III. Determinación de la localización celular de la catalasa A.
- IV. Estudio de la regulación de la expresión del gen *catA* durante la diferenciación celular y en condiciones de tensión medio ambiental.
- V. Estudio de los mecanismos de regulación de la expresión del gen *catA*, utilizando fusiones con el gen reportero *lacZ* de *E. coli*, el promotor inducible del gen *alcA*, así como mutantes afectadas en la esporulación asexual.

JUSTIFICACIÓN

Este trabajo es parte de un proyecto general que pretende comprender la regulación de la respuesta a la tensión oxidativa en eucariotes. En el laboratorio trabajamos con el hongo filamentoso *A. nidulans* porque es un sistema experimental en el cual se han desarrollado una gran cantidad de herramientas metodológicas a nivel de genética clásica y molecular. En particular, estamos interesados en estudiar la diferenciación celular en microorganismos como una respuesta a la tensión oxidativa, de acuerdo con la propuesta de Hansberg y Aguirre (1990).

HIPÓTESIS

Para estudiar la tensión oxidativa en *A. nidulans* elegimos a las catalasas como modelo de estudio. En particular este trabajo se centra en el estudio de un gen de catalasa. La clona de cDNA CAN5 codifica para una catalasa denominada *catA*; esta clona fue aislada como un transcrito que se induce durante la esporulación. De acuerdo a los geles de actividad de catalasa se encontró una banda de actividad que se induce durante la esporulación, por lo que se piensa que *catA* codifica para esta enzima. El objetivo general de este trabajo es estudiar los mecanismos de regulación del gen *catA*.

OBJETIVOS PARTICULARES

- I. Evaluación del efecto de la interrupción del gen *catA*.
- II. Caracterización de mutantes afectadas en el gen *catA* en cuanto a su sensibilidad a la tensión oxidativa.
- III. Determinación de la localización celular de la catalasa A.
- IV. Estudio de la regulación de la expresión del gen *catA* durante la diferenciación celular y en condiciones de tensión medio ambiental.
- V. Estudio de los mecanismos de regulación de la expresión del gen *catA*, utilizando fusiones con el gen reportero *lacZ* de *E. coli*, el promotor inducible del gen *alcA*, así como mutantes afectadas en la esporulación asexual.

MATERIALES Y MÉTODOS

I. Medios de cultivo de *A. nidulans* y de *E. coli* y cepas utilizadas en este trabajo.

El medio de cultivo empleado para crecer *A. nidulans* es el descrito por Käfer (1977) adicionado con los requerimientos necesarios para cada cepa. Para las cepas *brlA*⁻ se usó tartrato de amonio 20 mM (3.68 g/l) como fuente de nitrógeno. Los medios de cultivo y el material se esterilizaron a una presión de 1.4 Kg/cm², a 121°C por 20 min. En la Tabla I se describe el genotipo de las cepas utilizadas en este trabajo.

Tabla I. Cepas de *A. nidulans* empleadas en este trabajo.

CEPA	GENOTIPO	ORIGEN
AJC7.1	<i>biA1; brlA1, veA1</i>	Boylan <i>et al.</i> 1987
CRN1	<i>catA</i> (~1500' p/l):: <i>lacZ</i> (<i>argB</i> ⁺ / <i>argB</i> ::CAT); <i>metG1; niiA4, brlA17, veA1</i>	Este trabajo. TRN3 X CRN1.
CRN10	<i>biA1; argB2; pyroA4; niiA4, brlA17, veA1</i>	J. C.
CRN2	<i>stuA1, pabaA1, catA</i> (~1500 p/l):: <i>lacZ</i> (<i>argB</i> ⁺ / <i>argB</i> ::CAT); <i>trpC801, veA1</i>	Este trabajo. TRN3 X UI-7.
CRN3	<i>medA26, pabaA1, catA</i> (~1500 p/l):: <i>lacZ</i> (<i>argB</i> ⁺ / <i>argB</i> ::CAT); <i>trpC801, veA1</i>	Este trabajo. TRN3 X UI-24.
CRN6	<i>pabaA1, ΔargB::trpCΔB, catA::argB, trpC801, niiA4, brlA17, veA1</i>	Este trabajo. TRN1 X CRN10.
CRN7	<i>catA</i> (~1500 p) (<i>alcA l</i> :: <i>lacZ</i> (<i>argB</i> ⁺ / <i>argB</i> ::CAT); <i>metG1; niiA4, brlA17, veA1</i>	Este trabajo. CRN10 X TRN5.
CRN8	<i>pabaA1; catA</i> (~1500 p/l):: <i>lacZ</i> (<i>argB</i> ⁺ / <i>argB</i> ::CAT); <i>niiA4, brlA17, veA1</i>	Este trabajo. TRN3 X CRN10.
CRN9	<i>pabaA1; , catA</i> (~1500 p) (<i>alcA l</i> :: <i>lacZ</i> (<i>argB</i> ⁺ / <i>argB</i> ::CAT); <i>niiA4, brlA17, veA1</i>	Este trabajo. TRN5 X CRN10.
FGSC-26	<i>biA1; veA1</i>	FGSC
PW1	<i>biA1; argB2; metG1; veA1</i>	P. Weglenski
RMS011	<i>pabaA1, γA2; ΔargB::trpCΔB; veA1, trpC801</i>	Stringer <i>et al.</i> 1991
TLK12	<i>pabaA1, γA2; ΔargB::trpCΔB; ΔcatB, trpC801, veA1</i>	Kawasaki, <i>et al.</i> 1997
TRN1	<i>pabaA1, γA2; ΔargB::trpCΔB catA::argB; trpC801, veA1</i>	Este trabajo.
TRN2	<i>biA1; catA</i> (~1500 p/l):: <i>lacZ</i> (<i>argB</i> ⁺ / <i>argB</i> ::CAT); <i>metG1; veA1</i>	Este trabajo.
TRN3	<i>biA1; catA</i> (~1500 p/l):: <i>lacZ</i> (<i>argB</i> ⁺ / <i>argB</i> ::CAT); <i>metG1; veA1</i>	Este trabajo.
TRN4	<i>biA1; alcA</i> (500 p) (<i>catA1</i> :: (<i>argB</i> ⁺ / <i>argB</i> ::CAT); <i>metG1; veA1</i>	Este trabajo.
TRN5	<i>biA1, catA</i> (~1500 p) (<i>alcA l</i> :: <i>lacZ</i> (<i>argB</i> ⁺ / <i>argB</i> ::CAT); <i>metG1; veA1</i>	Este trabajo.

TRN6	<i>biA1, catA (~1500 p) (alcA l)::lacZ (argB⁺/argB::CAT); metG1; veA1</i>	Este trabajo.
TRN7	<i>biA1, alcA (~450 p/l)::catA (argB⁺/argB::CAT); metG1, veA1</i>	Este trabajo.
TTA292	<i>biA1; argB::alcA(p)::brlA; metG1; veA1</i>	Adams <i>et al.</i> 1988
TTAP715	<i>biA1; alcA (p)::fabM::argB; ΔargB::trpCΔB; metG1; veA1, trpC801</i>	Marhoul, J.F. and Adams, T.H. 1995
UI-24	<i>medA26, pabaA1, ya2; trpC801, veA1</i>	Bruce Miller
UI-7	<i>stuA1, ya2, pabaA1; trpC801, veA1</i>	Bruce Miller

Los cultivos conidiantes de *A. nidulans* se crecieron según la técnica de Law y Timberlake (1980) con las modificaciones de Aguirre, *et al.* (1990). Los medios se inocularon a una concentración de 5×10^5 conidias/ml en un matraz Erlenmeyer y se incubaron a 37° C, por 18 h, con una agitación constante de 300 rpm. Para inducir la conidiación, se filtraron de 50 a 100 ml de cultivo y se expusieron al aire, y se tomaron muestras en diferentes tiempos. Las muestras se secaron en toallas absorbentes, se congelaron en nitrógeno líquido y se guardaron a -70° C.

Para estudiar esporulación en líquido se siguió el procedimiento descrito por Skromne *et al.*, (1995). Se inocularon esporas en matraces a una densidad de 5×10^5 conidias/ml, se crecieron por 18 h a 37° C y agitación constante de 300 rpm. Es importante conservar la relación de medio y aire en el matraz, por lo que, en el caso de matraces de 250 ml se usaron 50 ml de medio y en el caso de matraces de 2 l se usaron 400 ml de medio. Después de la incubación, el cultivo se filtró y se lavó con 50 ml de medio mínimo (mm) sin carbono o sin nitrógeno y se transfirió a un matraz con el medio. La incubación se continuó por 24 h más en las mismas condiciones. Se colectó el micelio filtrando por Miracloth; las esporas pasan a través del Miracloth, por lo que para colectarlas se usaron filtros Millipore de 0.22 μM.

La inducción de la transcripción del gen *alcA* se hizo creciendo 15 h en mm-glucosa, conservando la proporción 50 ml de medio en un matraz de 250 ml. Posteriormente se transfirió el micelio a medio con 200 mM de etanol (sin glucosa), por 3 h (Adams y Timberlake, 1990).

Para probar condiciones de tensión metabólica, los cultivos se crecieron de la misma forma por 12 h (50 ml de medio en matraces de 250 ml) y después de este tiempo se transfirieron a medios con diferentes tratamientos y se incubaron por 2 ó 3 h más, dependiendo del tipo de estrés (Kawasaki *et al.*, 1997). Se usó

ácido úrico (0.8 mg/ml) como única fuente de nitrógeno por 2 h; sorbitol 1 M por 3 h; paraquat 5 mM por 2 h; peróxido de hidrógeno 0.5 mM (se agregó cada 30 min por 2 h); choque de calor a 42° C; cloruro de sodio 1 M por 3 h; etanol al 4% como única fuente de carbono por 3 h y privación de carbono o nitrógeno por 3 h.

Para los cultivo de *E. coli* se empleó el medio de Luria-Bertani (Sambrook *et al.*, 1989).

II. Técnicas de Biología Molecular.

Las hibridaciones tipo Northern y Southern Blot se hicieron siguiendo técnicas estándares (Sambrook *et al.*, 1989); para una descripción más detallada ver Navarro (1995). La extracción de ADN genómico se hizo de acuerdo con Timberlake (1980). El ARN se obtuvo con el estuche TRIzol (GIBCO BRL, USA).

La secuenciación de ADN se realizó con el método de terminación de cadena de Sanger *et al.* (1977), de acuerdo al protocolo del estuche de Sequenase Versión 2.0 de la compañía USB (USA). Para mayor detalle ver Navarro (1995).

Los vectores se purificaron utilizando el procedimiento de purificación por columnas de Qiagen y de acuerdo a las especificaciones del proveedor. Las células competentes (XL1-Blue) se prepararon según Inoue *et al.* (1990). Las transformaciones de *E. coli* y minipreparaciones de plásmidos se hicieron con técnicas estándares (Sambrook *et al.*, 1989).

Las sondas para hibridación se obtuvieron de la siguiente manera. Para hibridar con *catA*, se digirió el plásmido CAN5 (Navarro *et al.*, 1996) con PstI y se usó la banda de 1.5 kb. Para *lacZ* se digirió el plásmido pREN8 (Navarro y Aguirre, en prensa) con PstI/EcoRI y se utilizó la banda de 3 kb. En el caso de actina se usó la banda de 2 kb proveniente de la digestión con KpnI y BamHI del pSF5 (Fidel *et al.*, 1988). Para *argB* se usó la banda de EcoRI de 1.7 kb del pDC1 (Navarro y Aguirre, 1998). Finalmente, para *alcA* se utilizó una banda de 3 kb del plásmido pJA1 digerido con EcoRI y XhoI.

La transformación de *A. nidulans* se llevó a cabo de acuerdo con Yelton *et al.*, (1984) y se emplearon 5 µg de ADN para transformar.

A continuación se describen con detalle algunas técnicas de Biología Molecular importantes para el laboratorio.

A. Extensión de Oligonucleótidos (Primer extension, según Sambrook *et al.*, 1989).

Los oligonucleótidos se cuantificaron usando 2 μl de la muestra original en un volumen de 1 ml de agua. Se leyó la densidad óptica (OD) de la muestra en el espectrofotómetro a 260 nm. Para conocer la concentración del oligonucleótido se aplicó la siguiente fórmula:

$$\text{concentración (pmol}/\mu\text{l}) = \text{OD}_{260} \times 500^* / (0.01 \times N)$$

en donde * es la dilución usada (en este caso 500) y N es el número de nucleótidos del oligonucleótido.

I. Fosforilación de oligonucleótidos.

1. Se mezclaron en un tubo los siguientes componentes:

Agua (DEPC)	-
PNK Buffer 10X	1 μl
Oligonucleótido (5 pmol)	5 μl
γ -ATP ³² *	2.7 μl
PNK (BRL)	1 μl
Vol. Final	10 μl

*Amersham, Redivue γ -ATP³², 6000 Ci/mmol, 10mCi/ml.

2. Se incubó 1 hora a 37° C.

3. Se limpió el oligonucleótido por columnas NENSORB™20 (Dupont) siguiendo las indicaciones del fabricante. La muestra colectada se dejó secar en el SAVANT por 1 h a temperatura media y se resuspendió en 10 μl . Para cuantificar la cantidad de marca incorporada al oligonucleótido se pusieron 2 μl del oligonucleótido en 1 ml de líquido de centelleo y se llevaron a un contador de centelleo. Se usaron oligonucleótidos marcados con 2 000 000 a 3 000 000 cpm.

II. Reacción de Transcriptasa Reversa.

1. Alineamiento del oligonucléotido.

En un tubo se mezclaron:

Agua (DEPC)	----
ARN 20 µg de ARN total o 5 µg de Poly A +	
NaCl 2.5M *	1.66 µl
Tris-HCl 1 M pH 8 *	0.66 µl
Oligonucléotido 0.5 pmol	1-2 µl
Vol. Final	<hr/> 22.32 µl

* Se preparan con agua tratada con DEPC.

2. Se incubó por 3 min a 90° C y se dejó bajar la temperatura lentamente hasta 42° C. Esto se puede hacer poniendo un bloque térmico a 90° C y después sacar el bloque y dejarlo enfriar sobre la mesa.

3. A la mezcla de reacción se le agregó lo siguiente. Cuando hay varias reacciones se preparó la mezcla para todas en un solo tubo y se tomó la cantidad necesaria y se agregó a cada tubo de reacción:

ARNsin (Promega) (100 U/µl)	0.5µl
RT Buffer 5X (BRL)	7.2µl
DTT 10 mM	3.7µl
dNTP's 2mM	1 µl
Transcriptasa rev.* (18 U/µl)	0.5 µl

* Superscript Reverse Transcriptase, GIBCO, BRL.

4. Se incubó 1 hora a 42° C.

5. Se precipitó la reacción con 10 µl AcNH₄ 10M pH 4 (según Sambrook *et al.*, 1989) y 100 µl de Et-OH absoluto. Se agitó la mezcla y se incubó toda la noche a -70° C.

6. Se centrifugó por 15 min a 4° C en una microfuga. Se retiró el sobrenadante y se lavó la pastilla dos veces con 100 µl de etanol al 70%.
7. Se dejó secar la pastilla y se resuspendió en 4 µl de agua (DEPC) y 4 µl de "Stop Solution" (Kit de Sequenase). Se cargaron 4 µl en un gel de secuencia.

Observaciones:

- Para evitar bandas inespecíficas se recomienda disminuir la concentración de oligonucleótido.
- El oligonucleótido que se usó fue de 20 bases, la longitud de este oligonucleótido es adecuada aunque durante su diseño debe evitarse que forme híbridos con el mismo y por lo tanto no se secuestre. También debe cuidarse que no haga hibridaciones inespecíficas dentro del mismo gen con el que se está trabajando.
- Para lograr una banda más definida se pueden variar las concentraciones de ARN.
- Se recomienda hacer una reacción de secuencia usando el mismo oligonucleótido marcado para ver que la fosforilación ha funcionado, así como, una reacción de secuencia convencional con ³⁵S.
- Es importante tomar todas las precauciones necesarias para trabajar con ARN y radioactividad. Usar guantes y usar soluciones preparadas con agua tratada con DEPC.

B. Amplificación de extremos 3' de ARNm usando el estuche 3' RACE de GIBCO BRL (USA).

Para sintetizar el cDNA de *catA*, se usó 1 µg de ARN total de conidias en un volumen total de 10 µl. Se agregó 1 µl de una solución 10 µM del oligonucleótido AP (se encuentra en el estuche). Se calentó 10 minutos a 70° C, se enfrió en hielo por 1 min y se centrifugó. Se agregaron:

10X PCR Buffer	2 µl
25 mM MgCl ₂	2 µl
10 mM dNTP's	1 µl
0.1 M DTT	2 µl

Se incubó la mezcla a 42° C por 5 min. Se agregó un μl de transcriptasa reversa (SuperScript II RT) y se incubó a 42° C por 50 min. Posteriormente se calentó a 70° C por 15 min, se enfrió a temperatura ambiente y se centrifugó. Se agregó 1 μl de Amasa H (Promega), se mezcló e incubó por 20 min a 37° C.

Una vez que el cDNA estuvo sintetizado se procedió a amplificarlo por PCR utilizando 2 μl de la mezcla de cDNA. Se hizo la siguiente mezcla (μl):

Agua	36.5 μl
Buffer PCR 10X	5 μl
25 mM MgCl ₂	3 μl
dNTP 10 mM	1 μl
oligonucleótido, cat28 10 μM	1 μl
oligonucleótido, AUAP 10 μM	1 μl
cDNA	2 μl
Taq Polimerasa (Promega)	0.5 μl

Se calentó de 1-2 min a 94° C toda la mezcla sin la Taq, después se agregó y se continuo con el PCR. El volumen final es de 50 μl .

Programa:

Paso	Temperatura	Tiempo
1.	94° C	3 min
2.	94° C	30 seg
3.	50° C	30 seg
4.	72° C	2 min y 30 seg
5. Ir al paso 2, 30 veces	--	--
6.	4° C	--

Después de terminada la reacción de PCR, se tomaron 10 μl y se corrieron en un gel. Después de observar el producto de PCR del peso

esperado, este se limpió con las columnas Wizard de Promega según las instrucciones del fabricante. Después se digirió con las enzimas EcoRI/Sall y se clonó en un BKS(-). Una vez clonado el producto de PCR, se llevó a cabo su secuenciación por el método de Sanger.

III. Construcción de plásmidos.

Para construir una fusión entre el promotor y la región 5'UTR de *alcA* con la secuencia codificadora de *catA* (pREN21) se diseñaron los siguientes oligonucleótidos:

past30140: GGA CTA GTT GAT AGT TCC CAC TTG TCC G

past30525: GAA CTA GTA GCC ATT TTG AGG CGA GGT GAT AGG

Estos corresponden al extremo 5' del promotor de *alcA* (past30140) representados en el plásmido pAST30 y al extremo 3' de la región 5'UTR del mensajero de *alcA* (past30525) (Son y Kolaparthi, 1994). Al oligonucleótido past30140 se le agregó un sitio de corte para la enzima SpeI (secuencia subrayada) y al otro oligonucleótido se le agregaron 14 nucleótidos que incluyen el codón ATG del gen de catalasa A y el sitio de restricción SpeI presente en *catA*. Se hicieron amplificaciones por PCR usando estos oligonucleótidos y como templado el plásmido pAST30. Se usó la enzima elongasa (GIBCO BRL, USA), esto es muy importante ya que esta es una mezcla de Taq polimerasa y otra polimerasa termoresistente con actividad de exonucleasa capaz de reparar errores durante la amplificación. Para amplificar este producto se hicieron curvas de cloruro de magnesio, agregando los componentes de la mezcla como se indica a continuación:

MgCl ₂	1mM (μ l)	1.5mM (μ l)	2 mM (μ l)
Agua desionizada	30	30	30
Buffer A 5X	10	5	0
dNTP's 10 mM	1	1	1
pAST30 1 ng/ μ l	5	5	5

past30140 100 ng/μl	1.5	1.5	1.5
past30525 100 ng/μl	1.5	1.5	1.5

El volumen final fue de 50 μl. Después de calentar a 94° C 1-2 min, se agregó 1 μl de elongasa y se continuó con los ciclos de PCR con el siguiente programa:

Paso	Temperatura	Tiempo
1.	94° C	3 min
2.	94° C	30 seg
3.	40° C	45 seg
4.	72° C	4 min
5. Ir al número 2, 25 veces	--	--
6.	4° C	--

Con 1.5 mM de MgCl₂ se obtuvo el producto esperado (aproximadamente 400 pb). Se limpió el producto con las columnas Wizard, se cortó con SpeI y se ligó en el plásmido BKS(-). La ligación se hizo usando el estuche de ligaciones rápidas de Boehringer, la mezcla de ligación se incubó toda la noche a 16° C. Se obtuvieron más de 300 transformantes, se hicieron 10 minipreparaciones y se obtuvieron 7 clonas con el inserto. Se tomó 1 clona, se secuenció por el método de Sanger para ver que no tuviera errores y se subclonó en el plásmido pREN10 que contiene la región codificadora de *catA* y el marcador selectivo *argB*. Se revisó que la construcción quedara en el marco correcto de lectura y a este plásmido se le llamó pREN21.

Para construir el plásmido con las regiones promotoras de *alcA* y la secuencia correspondiente a la región 5'UTR y la región codificadora de *catA*, se diseñaron dos oligonucleótidos. Uno de ellos contenía secuencias reguladoras 5' de *alcA*, justo antes del inicio de la transcripción (pren111001), y el otro 10 nucleótidos antes del primer inicio de la transcripción de *catA* (pren11197). La secuencia de los oligonucleótidos se muestra a continuación:

pren11197 pAT AAC CTT AAT TTT CTG CAG CCA G
 pren111001 pGT TGG TGA GAC TGA GAA CC

Estos oligonucleótidos se mandaron sintetizar fosforilados para poder ligarlos después de un PCR inverso, utilizando como templado el plásmido pREN11 (ver apéndice al final de la tesis). Este plásmido contiene una fusión completa entre el promotor de *alcA* y 1400 pb de las regiones reguladoras, la región 5'UTR y las secuencias codificadoras de *catA*.

Se esperaba un producto de PCR de aproximadamente 3600 pb por lo que se hicieron curvas de DMSO y glicerol.

DMSO (%)	1.5	2.0	2.5	2	2
Glicerol (%)	4	4	4	3	5
Agua (estéril)	25.2	25	24.7	26	24
Buffer A 5X	0	0	0	0	0
Buffer B 5X	10	10	10	10	10
dNTP's 10 mM	1	1	1	1	1
pREN11 1 ng/μl	5	5	5	5	5
pre11197 100 ng/μl	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5
pre111001 100 ng/μl	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5
DMSO (concentrado, μl)	0.8	1	1.3	1	1
Glicerol (50%, μl)	4	4	4	3	5

Volumenes en μl.

Se calentó a 94° C de 1-2 min, se agregó un μl de elongasa y se continuó con el PCR. El volumen final fue de 50 μl. El programa de PCR que se usó fue el mismo que se describió anteriormente. El producto de PCR esperado se obtuvo usando 2% DMSO/4% glicerol, 2.5% DMSO/4% glicerol y 2% DMSO/5% glicerol. Los productos de los tres tubos se purificaron por columnas Wizard, se liofilizaron por 30 min en el SAVANT y se resuspendieron en 10 μl de agua. 4 μl del producto se ligaron toda la noche según el protocolo anterior.

Se obtuvieron 7 transformantes de *E. coli*, de las cuales se secuenciaron dos para confirmar las regiones promotoras de *alcA* y 5'UTR de *catA*. Se subclonó el producto de PCR usando sitios para SpeI en el vector pREN10. Se checó por

secuencia que la construcción estuviera en el marco de lectura correcto. A este plásmido se le denominó pREN20.

IV. Determinación de la actividad de β -galactosidasa y catalasa.

Los extractos de proteína se obtuvieron de micelio liofilizado o esporas purificadas. El micelio se rompió usando una espátula y perlas de vidrio y las esporas con 8 ciclos de 1 min en vortex y un min en hielo. Se agregó un volumen de perlas por un volumen de amortiguador/micelio, se rompió en tubos de plástico de 10 ml. Para romper las esporas se usaron perlas de vidrio (Sigma, diámetro 710-1, 180 μ m). Se usó un amortiguador con HEPES 20 mM, DTT 1 mM pH 7.2. Después de romper, las muestras se centrifugaron por 15 min a 12 000 rpm y a 4° C, se hicieron diluciones 1:50 y la proteína se cuantificó con el método de Bradford (1976).

El gel nativo para proteínas se preparó al 8.5% según el método de Laemmli (1970) sin β -Mercaptoetanol, sin SDS y sin hervir las muestras. Para la tinción del gel por actividad de catalasa se utilizó el método de Harris y Hopkinson (1976) modificado por Chary y Natving (1989).

Para la determinación de la actividad de β -galactosidasa se siguió el procedimiento de Miller (1972). Esta técnica 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. Inmunolocalización de catalasa A.

El anticuerpo que se usó para reconocer a la catalasa A fue donado por el laboratorio del Dr. Wilhelm Hansberg. Este anticuerpo fue hecho por Fernando Lledías utilizando a la catalasa comercial de *A. niger* (SIGMA, C-3515) para inmunizar conejos. Después de probar que este anticuerpo fue capaz de reconocer a CatA se utilizó para inmunolocalizar a esta enzima.

Se utilizaron conidias de la cepa silvestre FGSC-26 y la cepa mutante *catA*⁻ TRN1. Estas conidias se fijaron con glutaraldehído al 3% disuelto en amortiguador 0.1 M de cacodialato de sodio pH 7.2, se deshidrataron en series de etanol y se embebieron en resina L-white. Los cortes se trataron con una diluciones de 1:50, 1:100 y 1:500 del anticuerpo en BSA 1% (Suero de albumina

METODOLOGÍA

de bovino). Posteriormente los cortes se incubaron con anticuerpos marcados con oro (SIGMA, Protein A-10 nm colloidal gold labeled). Se siguió el protocolo para inmunolocalizar proteínas con la técnica de Proteína A-Oro (pAg) reportado por Roth (1985).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados de esta tesis se presentan en cuatro capítulos:

Capítulo I. Contiene los resultados de la interrupción del gen *catA*, la caracterización de la mutante correspondiente, la regulación del gen *catA* a nivel de la acumulación del mensajero durante la esporulación y la demostración de que esta acumulación es independiente de los principales factores transcripcionales que regulan la esporulación asexual en *A. nidulans*. Estos datos están incluidos en un artículo publicado en la revista "Current Genetics" (Navarro *et al.*, 1996). En este mismo capítulo se describen datos no publicados sobre la regulación del mensajero de *catA* durante la germinación y la inmunolocalización de la catalasa A.

Capítulo II. En este capítulo se reporta la regulación del gen *catA* a nivel postranscripcional. Con el uso de un reportero se pudo definir que la región 5'UTR de *catA* es responsable de la inhibición de la traducción del mensajero, hasta el momento de la formación de las esporas. También se muestra que el mensajero de *catA* se acumula en condiciones de tensión oxidativa, osmótica y en limitación de nutrientes. Estos resultados se encuentran descritos en un manuscrito que se encuentra en prensa en la revista "Journal of Bacteriology" (Navarro y Aguirre, 1998).

Capítulo III. Incluye resultados no publicados, encaminados a entender el mecanismo de regulación postranscripcional del gen *catA*. Durante el curso de estos experimentos se encontró que el promotor del gen de *alcA* es sensible a tensión oxidativa. Este tipo de regulación no ha sido descrito antes y nos parece importante describirlo.

Capítulo IV. Incluye la secuencia de las regiones reguladoras de *catA* contenidas en la fusión *catA::lacZ*. Dentro de esta región se encontraron algunas secuencias que presentan parecido con cajas consenso de unión a varios factores transcripcionales. También se encontró otro gen que no muestra similitud con ningún otro contenido en las bases de datos y que se regula durante la conidiación.

Capítulo I. Resumen del artículo:

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.

La esporulación asexual de *Aspergillus nidulans* también conocida como conidiación es un buen sistema para estudiar la regulación genética y el desarrollo. La clona de cDNA conocida como CAN5 es una de muchas aisladas como transcritos que se inducen durante la conidiación. En este artículo presentamos la caracterización molecular del gen correspondiente a la clona CAN5, demostrando que codifica para una catalasa regulada durante el desarrollo, por lo cual se le denominó *catA*. Este gen codifica para un péptido de 744 aminoácidos que muestra una alta similitud con catalasas. La similitud de *catA* con catalasas de procariotes es mayor que con catalasas de otros hongos. El mensaje de *catA* es casi indetectable durante el crecimiento del micelio, se induce durante la esporulación y la mayor acumulación se presenta en conidias aisladas. Sin embargo, la expresión de *catA* no depende de los genes reguladores de la esporulación *bria*, *abaA* o *wetA*. Las determinaciones de actividad de catalasa en geles de proteína nativos revelaron la existencia de dos bandas de actividad. Una de estas bandas representa la mayor actividad durante el crecimiento vegetativo y se induce durante la esporulación. La segunda actividad de catalasa apareció después de la inducción de la esporulación y fue predominante en esporas aisladas. La interrupción de *catA* eliminó la actividad mayoritaria de catalasa en conidias sin afectar la actividad de la catalasa vegetativa, indicando la existencia de por lo menos dos genes de catalasa en este hongo. Las mutantes sin *catA* producen esporas que son más sensibles a un tratamiento con peróxido de hidrógeno, en comparación con esporas de una cepa silvestre.

ORIGINAL PAPER

Rosa E. Navarro · Mary A. Stringer · Wilhelm Hansberg
William E. Timberlake · Jesús Aguirre

catA, a new *Aspergillus nidulans* gene encoding a developmentally regulated catalase

Received: 28 August / 10 October 1995

Abstract *Aspergillus nidulans* asexual sporulation (conidiation) is a model system for studying gene regulation and development. The CAN5 cDNA is one of several clones isolated based on transcript induction during conidiation. Here we present the molecular characterization of its corresponding gene, demonstrating that it encodes a developmentally regulated catalase, designated *catA*. The *catA* 744-amino-acid-residue polypeptide shows significant identity to other catalases. Its similarity to prokaryotic catalases is greater than to other fungal catalases. *catA* mRNA is barely detectable in growing mycelia, highly induced during sporulation, and present in isolated spores. However, *catA* expression is not dependent on the developmental regulatory genes *brlA*, *abaA* and *wetA*. Direct catalase activity determination in native gels revealed the existence of two bands of activity. One of these bands represented the major activity during vegetative growth and was induced during sporulation. The second catalase activity appeared after the induction of sporulation and was the predominant activity in spores. Disruption of *catA* abolished the major spore catalase without eliminating the vegetative activity, indicating the existence of at least two catalase genes in *A. nidulans*. *catA*-disrupted mutants produced spores that were sensitive to H₂O₂, as compared to wild-type spores. The increase in the activity of the vegetative catalase and the appearance of a second catalase during asexual sporulation is consistent with the occurrence of an oxidative stress during development.

Key words *Aspergillus* · Catalase · Oxidative stress · Sporulation · Spore resistance · Development · Gene regulation

Introduction

The asexual reproductive pathway (conidiation) of the filamentous fungus *Aspergillus nidulans* is a good model system for studying development and gene regulation. This process is initiated when non-differentiated mycelia are exposed to air or starved for nutrients in liquid culture (Clutterbuck 1969; Adams et al. 1988; Skromne et al. 1995) and culminates with the formation of asexual spores (conidia) formed on specialized structures, called conidiophores. Genetic and molecular studies have identified several regulatory genes that play fundamental roles in this process (Clutterbuck 1969; Timberlake and Clutterbuck 1994). It has been estimated from mutational studies that 40–150 loci are required for spore production, whereas molecular studies indicate that perhaps over 1000 diverse mRNAs preferentially accumulate during conidiation (for a review see Timberlake and Clutterbuck 1994). The discrepancy between these estimates suggests that many genes may have subtle or redundant functions during conidiation, making it difficult or impossible to detect their mutant phenotype. The existence of a large collection of cDNA and genomic clones corresponding to developmentally regulated genes (Zimmermann et al. 1980; Boylan et al. 1987), in conjunction with gene-disruption technologies, provides an approach for understanding the contributions of previously unidentified genes to cell differentiation and development. This approach led to the discovery of the *rodA* and *denA* genes, encoding spore-specific, cell wall-associated hydrophobic proteins, called hydrophobins (Stringer et al. 1991; Stringer and Timberlake 1995).

Partial sequencing of the CAN5 cDNA clone, corresponding to an anonymous, developmentally regulated transcript (Boylan et al. 1987), revealed a high degree of identity to catalases, suggesting the presence of a condi-

R. E. Navarro · W. Hansberg · J. Aguirre (✉)
Departamento de Microbiología,
Instituto de Fisiología Celular,
Universidad Nacional Autónoma de México,
Apartado Postal 70-242, 04510 México, D. F.

M. A. Stringer
Novo Nordisk Biotech, Inc., 1445 Drew Avenue,
Davis, CA 95616, USA

W. E. Timberlake
Mycro Pharmaceuticals Inc., Building 300,
One Kendall Square, Cambridge, MA 02139, USA

Communicated by O. C. Yoder

ation-specific catalase. Catalases are ubiquitous enzymes responsible for H₂O₂ detoxification, preventing the formation of the very reactive hydroxyl radical (Halliwell and Gutteridge 1990). Our work has implicated reactive oxygen species in inducing and controlling conidiation in *Neurospora crassa* (Toledo and Hansberg 1990; Toledo et al. 1991; Hansberg et al. 1993; Toledo et al. 1994) and microbial cell differentiation in general (Hansberg and Aguirre 1990). Thus, the existence of a sporulation-specific catalase might be related to mechanisms through which the organism reacts to oxidative stress during sporulation. Here we demonstrate that the CAN5 gene encodes a developmentally regulated catalase, designated *catA*, whose expression is independent of the key developmental regulatory genes, *brlA*, *abaA* and *weiA*. The *catA* polypeptide accumulates preferentially in conidia. Disruption of *catA* had no detectable effect on sporulation, but did lead to formation of conidia that were sensitive to H₂O₂. Thus, the likely role of *catA* is to protect spores from H₂O₂ damage prior to or during germination. We also present evidence for the existence of another catalase which is the major activity in vegetative cells that is also induced during asexual sporulation, suggesting that the H₂O₂ production increases during *A. nidulans* development.

Materials and methods

Strains and growth conditions The *A. nidulans* strains used were RMS011 (*pabaA1*, Δ *argB::trpCΔB*, *veA1*, *trpC801*, Stringer et al. 1991), FGSC26 (*brlA1*, *veA1*, Fungal Genetics Stock Center), AJC1.22 (*brlA1*, *veA1*, *weiA6*; Clutterbuck 1969), AJC7.1 (*brlA1*, *brlA1*, *veA1*; Boylan et al. 1987), TA080 (*brlA1*, *brlA42*, *veA1*; Mirabito et al. 1989), SJA17 (*pabaA1*, *brlA/lacZ*, *abaA2*, *veA1*; Aguirre 1993), TOS1 and TOS2 (*pabaA1*, Δ *argB::trpCΔB*, *catA::argB*, *trpC801*, *veA1*; this work). Strains were grown in supplemented minimal-nitrate medium (Käfer 1977). For developmental cultures, conidia or ascospores were used to inoculate liquid cultures which were grown for 18 h at 37°C. Mycelia were filtered and exposed to air as described by Aguirre (1993). The restrictive temperature for the *weiA6* and *brlA42* temperature-sensitive developmental mutants was 42°C. Hydrogen peroxide sensitivity was tested by incubating a spore suspension containing 1 × 10⁶ spores/ml with different H₂O₂ concentrations for 20 min. This suspension was diluted 1:100 and plated on standard medium. The number of colony forming units (CFU) was determined after 2 days at 37°C. The H₂O₂ sensitivity of *catA*-disrupted strains TOS1/TOS2 was also assayed in Petri dishes by spreading 100 µl of a 200-mM H₂O₂ solution just before spore plating.

Nucleic acid sequencing and sequence comparisons. A chromosome-specific genomic library (Brody et al. 1991) was screened under very stringent conditions with the *Pst*I insert from pCAN5. Hybridizing cosmids W7E08, W2C09 and SW22C01 were isolated from chromosome III. The cDNA clone pCAN5 and sub-clones from its corresponding genomic version (pOS1 and pOS2) were sequenced on both strands by using oligonucleotide primers, as indicated in Fig. 1, by using standard dideoxynucleotide chain-termination reactions (Sanger et al. 1977). Transcription-initiation sites were determined by primer extension reactions with the oligonucleotide 5'-GTGTCGTGG FAATATCGAC-3' and standard protocols (Sambrook et al. 1989). The genomic sequence is available at GenBank (accession number U37803). Sequence similarity and catalase alignments were done with the GCG programs FASTA, PILEUP and PRETTY (Deveraux et al. 1984). Evolutionary analysis of selected catalases was done with the programs DISTANCES and GROW-TRIL from GCG.

Clone construction and *A. nidulans* transformation. Standard techniques were used for plasmid constructions (Sambrook et al. 1989). Cloning and selection of pCAN5 have been reported (Boylan et al. 1987). Two overlapping fragments of the genomic cosmid W22C01 were subcloned into pBluescriptII KS (Stratagene, La Jolla, Calif.), a 5-kb *Apal* fragment in pREN1 and a 4-kb *SacI* fragment in pOS1 (see Fig. 1). A plasmid used to disrupt *catA*, pREN2, was generated from pOS1A by replacing the *SphI-KpnI* fragment with a *SphI-KpnI* *argB* fragment from pDC1 (Aramayo et al. 1989). Strain RMS011 was transformed with pREN2 by standard techniques (Yelton et al. 1984). Two transformants were analyzed by Southern blotting and shown to contain pREN2 single integrations (TOS1 and TOS2).

Nucleic acid isolation and hybridization analysis. Total DNA was isolated as described by Timberlake (1980). Total RNA was isolated by using a RNeid plus kit (Bio-101, La Jolla, Calif.). DNA samples were digested with restriction enzymes and fractionated in agarose gels. RNA was fractionated in formaldehyde-agarose gels. Gels were transferred to Hybond-N Nylon membranes and hybridized as suggested by the manufacturer (Amersham). The *Pst*I cDNA insert from pCAN5 was ³²P-labeled by using random primers (BRL) and used as the *catA*-specific probe. An *argB*-specific *Hind*III fragment was used as an RNA loading control.

Catalase activity determination in native polyacrylamide gels. Protein extracts were prepared by resuspending ground, lyophilized mycelia or freshly collected conidia [purified by Miracloth filtration (Calbiochem) and centrifugation] in 20 mM HEPES; 1 mM PMSF; 1 mM DTT. Conidia and unfractionated conidiating cultures were vortexed in this buffer with glass beads for 1 min and cooled on ice for another 1 min for a total of eight cycles. After removing cell debris by centrifugation in a microfuge for 15 min at 4°C, the total protein concentration was determined (Bradford 1976). Equal amounts (25–40 µg) of protein were loaded onto native polyacrylamide gels prepared with an 8% resolution gel and a 5.1% stacking gel. Gels were run at 100–120 V at 4°C in a Miniprotein II Cell (Bio-Rad) until 1 h after the bromophenol dye reached the end of the gel. Catalase activity was detected as described (Harris and Hopkinson 1976; Chary and Natvig 1989).

Results

CAN5 encodes a catalase

The CAN5 cDNA clone (Boylan et al. 1987, Stringer et al. 1991) was hybridized to a chromosome-specific cosmid library (Brody et al. 1991) to detect corresponding genomic clones. Three cosmids were identified. The restriction map of one cosmid was used to subclone the CAN5-coding sequence (Fig. 1). The nucleotide sequence of CAN5 and its corresponding gene contained a single ATG-initiated open reading frame, interrupted by a 49-bp intron (Fig. 2), predicting a 744 amino-acid residue polypeptide ($M_r = 83\,969$). A search of GenBank indicated a high degree of sequence similarity to catalases from many different organisms. We therefore provisionally designated the gene *catA*. The three *catA*-containing cosmids were previously assigned to *A. nidulans* chromosome III (Brody et al. 1991). We confirmed this location by probing chromosomes separated by CHEF gel electrophoresis (Brody and Carbon 1989) with the cDNA CAN5 clone (data not shown). In fact, the *catA*-containing cosmid SW22C01 has been included in the physical map (Wang et al. 1994) for chromosome III in the same contig as the *areA* gene.

356

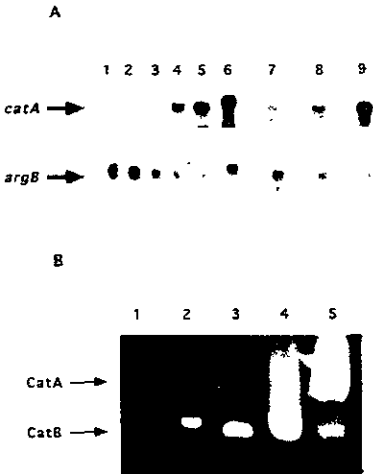


Fig. 4. A, B Developmental regulation of catalases. **A** Total RNA extracted from growing mycelia (lane 1), mycelia induced to conidiate for 6, 12 and 25 h (lanes 2–4, respectively) or from isolated conidia (lane 5) was fractionated in formaldehyde-agarose gels, transferred to a Nylon membrane, and hybridized with the *Pst*I fragment from pCAN5. Lanes 6–9 contained total RNA from the developmental mutants *bria42* (lane 6), *abaA2* (lane 7), *wetA6* (lane 8), and the relevant wild-type strain FGSC26 (lane 9) which were induced to conidiate for 25 h at 42°C. As a loading control, the same membrane was hybridized with an *argB*-specific probe. **B** Cell-free soluble protein extracts prepared from mycelia before or during conidiation or from isolated conidia were separated in a native polyacrylamide gel and stained to detect catalase activity (lane numbers 1–5 as in A). The different times of development correspond to the following morphologies: samples from 0 h of development (18 h of growth) contained growing hyphae, 6 h, conidiophore stalks, 12 h, conidiophores and immature conidia; 25 h, mature conidiophores and conidia

that the developmental regulation of *catA* depends on unknown genes different from *bria*, *abaA* and *wetA*.

Two differentially regulated catalases exist in *A. nidulans*

The occurrence of multiple catalases within individual species is well documented (Loewen et al. 1985; Chary and Natvig 1989; Marchler et al. 1993). We therefore investigated if *A. nidulans* also contained more than one catalase. Protein extracts were prepared from cells that had been induced to sporulate for different times, fractionated in native polyacrylamide gels, and stained to detect catalase activity (Chary and Natvig 1989). Figure 4 B shows that two bands of catalase activity were detected. The faster-migrating band activity increased during development, representing the major activity in samples from 0–25-h, but was a minority component in isolated spores. By contrast, the slower-mobility band activity was barely detectable in

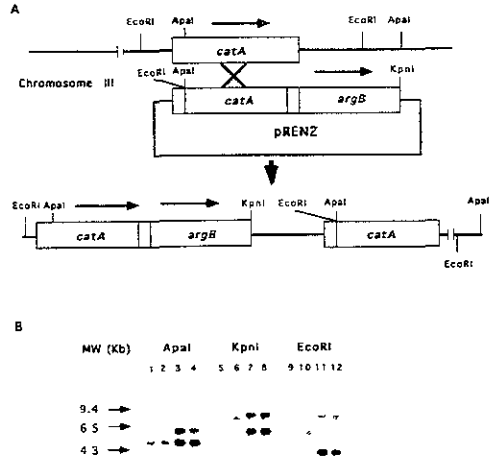


Fig. 5. A, B Disruption of the *catA* gene. **A** Plasmid pREN2 was constructed by using the *argB* gene as a selectable marker and the *Apal*-*Sph*I *catA* fragment, which deletes 65 amino acid residues from the amino terminus and 127 amino acid residues from the carboxyl terminus. pREN2 was used to transform the *argB*-deleted strain RMS011 to arginine independence. **B** Total DNA from strains FGSC26 (lanes 1, 5 and 9), RMS011 (lanes 2, 6 and 10), transformants TOS1 (lanes 3, 7 and 11) and TOS2 (lanes 4, 8 and 12) was digested with the indicated restriction enzymes and used for Southern-blot analysis using the *Pst*I *catA* fragment from pCAN5 as a probe. Probing with the *argB* gene (data not shown) gave results also consistent with the integration event depicted in A.

0–25 h samples but represented the major activity in isolated conidia.

The correlation of enzyme activity and *catA* mRNA with conidia was consistent with *catA* encoding the major catalase found in isolated spores. To determine if this was the case we disrupted the *catA* gene. Plasmid pREN2, containing the *A. nidulans argB* gene as a selectable marker and an internal fragment from *catA* (an *Apal*-*Sph*I coding fragment lacking the first 65 amino acids from the putative protein amino-terminus and the last 127 amino acids from the carboxyl-terminus), was used to transform strain RMS011 to arginine independence. Figure 5 A summarizes the event expected upon integration of pREN2 at *catA*. Figure 5 B shows a Southern-blot analysis of two independent transformants (TOS1 and 2) containing a single copy of plasmid pREN2 at the *catA* locus. The band pattern was fully consistent with the predicted integration event.

Isolated conidia from the two transformants were used to prepare protein extracts that were then analyzed for catalase activity in native gels. Figure 6 A shows that conidia from FGSC26 and from RMS011 contained the two bands of activity previously detected, with the slower-migrating band being the major activity. This band was absent from the transformants TOS1 and TOS2. By contrast, the faster-

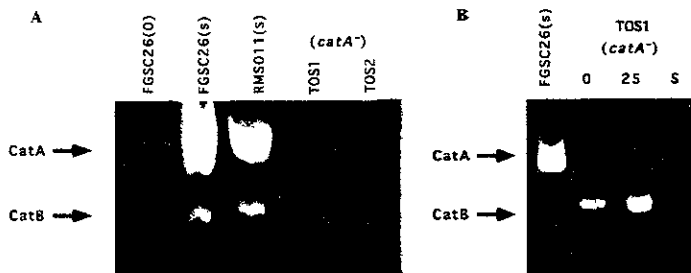


Fig. 6 A, B Effects of *catA* disruption on catalase activity. **A** protein extracts were prepared from isolated conidia from FGSC26 (s), RMS011, and the *catA*-disrupted strains TOS1 and TOS2. Proteins were fractionated in native polyacrylamide gels and used to determine catalase activity. An 18-h growth sample from strain FGSC26 was included as a reference (*left lane*). **B** the *catA*-disrupted strain TOS1 was grown for 18 h (0) and induced to sporulate for 25 h. The corresponding protein extracts were processed for catalase activity determination as before. Spore samples from strains FGSC26 and TOS1 are included as a reference (s). Developmental changes were as indicated in Fig. 4.

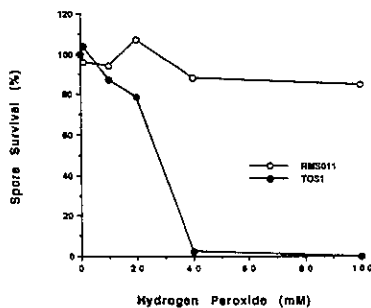


Fig. 7 Conidia from *catA*-disrupted strains are sensitive to H_2O_2 . Conidia from strain RMS011 and the *catA*-disrupted strain TOS1 were used to prepare spore suspensions containing 1×10^8 spores/ml and the indicated H_2O_2 concentrations. These suspensions were incubated at room temperature for 20 min, diluted 100 times and then plated on standard minimal medium. The number of colony forming units (CFU) was determined after 2 days at 37°C. The results shown are mean values from two independent experiments (100% survival corresponded to 1091 and 1264 colonies for strains RMS011 and TOS1, respectively). The H_2O_2 sensitivity of *catA*-disrupted strains can also be assayed in Petri dishes (see Materials and methods).

migrating catalase was present, although reduced, in the two transformants.

To determine if disruption of *catA* affected the other major catalase, transformant TOS1 was grown in liquid culture for 18 h and then induced to sporulate. Figure 6B shows that the catalase activity present in growing cultures was not affected by *catA* disruption. Indeed, it was also induced during development as found for a *catA*⁺ strain (Fig. 5)

Phenotype of *catA*⁻ mutants

Because CatA activity accumulated preferentially in conidia and we did not observe obvious alterations in the pattern of conidiation, we looked for phenotype associated with spore functions (i.e., spore longevity, resistance to stress, germination, etc.). The conidia from the *catA*⁻ strains appeared normal and germinated efficiently under standard growth conditions. However, they were killed by a 20-min incubation with 100 mM H_2O_2 , a condition that virtually did not affect the spores from *catA*⁺ strains (Fig. 7). This sensitivity to H_2O_2 was also observed in Petri dishes overlaid with 100 μ l of 200 mM H_2O_2 prior to spore plating.

Discussion

The data presented in this paper show that the developmentally regulated *A. nidulans* CAN5 cDNA clone defines a gene, which we designated *catA*, that encodes a catalase that accumulates preferentially in conidia. The conclusion that this represents a novel genetic locus is based on the absence of previous published descriptions of (1) genes encoding catalase in *A. nidulans* or (2) chromosome-III genes whose mutant phenotypes resemble those of the *catA*⁻ mutants we produced by gene disruption. *catA* is regulated, at least in part, at the level of transcript accumulation. *catA* mRNA was barely detectable in vegetative cells and increased during conidiation beginning at a time corresponding to conidium formation. Both *catA* mRNA and CatA protein preferentially accumulated in isolated spores. However, accumulation of *catA* mRNA was not dependent on *brlA*, a gene encoding a major transcriptional regulator of conidiation-specific genes (Clutterbuck 1969; Adams et al. 1988; Chang and Timberlake 1993), nor on two other developmental regulatory genes, *abaA* and *wetA* (Clutterbuck 1969; Mirabito et al. 1989; Marshall and Timberlake 1991; Andrianopolous and Timberlake 1994). The *wetA* gene has been shown to be involved in the regulation of genes whose mRNA, like the *catA* mRNA, accumulates in spores (Boylan et al. 1987; Marshall and Timberlake 1991). Thus, the developmental expression of *catA* does not require conidia formation and presumably depends on unknown genes acting separately from *brlA*.

catA is a member of a growing class of *A. nidulans* genes that are developmentally important but had not been identified by classical mutational approaches, perhaps due to the fact that the mutant phenotypes are too subtle to be readily detected in major mutant screens. This may explain the long-standing discrepancy between the number of conidiation-specific genes estimated from mutational versus molecular analyses (see Timberlake and Clutterbuck 1994). Moreover, it suggests that continued studies of anonymous genes in this system may provide important insights into the subtle contributions to form and physiology made by the hundreds of developmentally regulated genes known to exist (Zimmerman et al. 1980).

The deduced *CatA* polypeptide contains 744 amino-acid residues and has significant sequence similarity with many other catalases (Fig. 3; data not shown). *CatA*, *A. niger* catalase-R (Fowler et al. 1993), and *E. coli* catalase HP11 (encoded by the *katE* gene; von Ossowski et al. 1991) are larger than other reported catalases. Notably, the *CatA* polypeptide is most similar to *E. coli* HP11 (von Ossowski et al. 1991) than to other fungal catalases. In fact, evolutionary analysis of several catalases, using different algorithms from the GCG programs DISTANCES and GROW-TREE, always grouped together *E. coli* and *A. nidulans* (data not shown), suggesting a common origin for the *katE* and *catA* genes.

E. coli stationary phase cells can be considered as a differentiated state resulting from a specific pattern of gene expression that includes *katE*, and depends on the *rpoS* gene (Loewen et al. 1985; Hengge-Aronis 1993). In *Zea mays*, three different catalases regulated in the tissues of developing seedlings are known (Rendenbaugh et al. 1988). Other catalases are associated with developmental processes, such as the *B. subtilis* catalase 2, which accumulates in stationary phase cells and spores (Loewen and Switala 1987), and *N. crassa* catalase-3, which, like *CatA*, accumulates in conidia (Chary and Natvig 1989). Thus, developmental regulation of catalases is likely to be widespread in prokaryotes and eukaryotes. Spore-associated catalases have been proposed to provide protection from H_2O_2 generated by visible and ultraviolet light irradiation or other forms of environmental stress (Chary and Natvig 1989). Catalase and other antioxygenic enzymes have also been correlated with conidial longevity (Munkres 1990). In the case of *A. nidulans* *CatA*, the enzyme provides conidia with protection from the toxic effects of H_2O_2 (Fig. 7), a compound that can be present in many of the natural substrates for this organism (e.g., decaying vegetation) or can be generated from the catabolism of different compounds, thus providing a potential selective advantage. The likely presence of spore-associated catalases in fungal plant pathogens is potentially relevant for the plant infection process, since it has been shown that plant systemic acquired resistance involves a sustained increase in H_2O_2 concentration (Chen et al. 1993).

The selective advantages that might be provided by differentially regulated expression of multiple catalases is unclear. In this regard, we detected a second catalase activity in *A. nidulans* that was present in vegetative cells and

also increased during conidiation. Moreover, a second catalase gene from *A. nidulans* has been cloned from a chromosome VIII-specific library and has been sequenced (Richard Diamond et al., personal communication). The predicted polypeptide shows a high degree of identity to *CatA* and very likely corresponds to the *CatB* activity detected in our experiments. Determination of the physiological functions of this second catalase will require further experimentation.

The observed increases in catalases during *A. nidulans* conidiation might reflect enhanced production of H_2O_2 and other forms of activated oxygen during development, consistent with the proposed occurrence of a hyperoxidant state during microbial cell differentiation (Hansberg and Aguirre 1990). In this proposal, activated oxygen species are important not only to inactivate growth-related functions (Toledo et al. 1994) but also to regulate gene expression, as has been shown in bacteria (Allen 1993), plant signal transduction (Chen et al. 1993), human T cells (Schreck et al. 1991), and during apoptosis (Hockenbery et al. 1993). *A. nidulans* offers an excellent experimental system for investigating the role of activated oxygen species in regulating cell growth and differentiation.

Acknowledgements This work was supported by grants Nos. IN208994 from DGAPA-UNAM and 400346-S-1552N from CONACyT, México. Cloning of *CAN5* was supported by NIH grant GM-37886 to W.E.T. We thank Olivia Sánchez for her help in isolating *catA* genomic clones and subcloning experiments and E. Morrett and H. Barrios (IBT-UNAM) for their help with the primer extension experiments. We are also grateful to Dr. Richard Diamond (Boston University Medical center) and his collaborators for sharing with us their unpublished data.

References

- Adams TH, Boylan MT, Timberlake WE (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
- Allen JF (1993) Redox control of transcription: sensors, response regulators, activators and repressors. FEBS Lett 332:203-207
- Andrianopoulos A, Timberlake WE (1994) The *Aspergillus nidulans abaA* gene encodes a transcriptional activator that acts as a genetic switch to control development. Mol Cell Biol 14:2503-2515
- Aramayo R, Adams TH, Timberlake WE (1989) A large cluster of highly expressed genes in dispensable for growth and development in *Aspergillus nidulans*. Genetics 122:65-71
- Boylan MT, Mirabito PM, Willett CE, Zimmerman CR, Timberlake WE (1987) Isolation and physical characterization of three essential conidiation genes from *Aspergillus nidulans*. Mol Cell Biol 7:3113-3118
- Bradford M (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 72:248-254
- Brody H, Carbon J (1989) Electrophoretic karyotype of *Aspergillus nidulans*. Proc Natl Acad Sci USA 86:6260-6263
- Brody H, Griffith J, Cuticchia AJ, Arnold J, Timberlake WE (1991) Chromosome-specific recombinant DNA libraries from the fungus *Aspergillus nidulans*. Nucleic Acids Res 19:3105-3109
- Chang YC, Timberlake WE (1993) Identification of *Aspergillus nidulans brlA* response elements (BREs) by genetic selection in yeast. Genetics 133:29-38

- Chary P, Natvig DO (1989) Evidence for three differentially regulated catalase genes in *Neurospora crassa*: effects of oxidative stress, heat shock and development. *J Bacteriol* 171:2646-2652
- Chen Z, Silva H, Klessig DF (1993) Active oxygen species in the induction of plant systemic acquired resistance by salicylic acid. *Science* 262:1883-1886
- Cohen G, Rapatz W, Ruis H (1988) Sequence of the *Saccharomyces cerevisiae* CTA1 gene and amino-acid sequence of catalase A derived from it. *Eur J Biochem* 176:159-163
- Clutterbuck AJ (1969) A mutational analysis of conidial development in *Aspergillus nidulans*. *Genetics* 63:317-327
- Devereux J, Haeblerly P, Smithies O (1984) A comprehensive set of sequence analysis programs for the VAX. *Nucleic Acids Res* 12:387-395
- Fita I, Rossman MG (1985) The active center of catalase. *J Mol Biol* 185:21-37
- Fowler T, Rey MW, Vahä-Vahe P, Power SD, Berka RM (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
- Halliwel B, Gutteridge JMC (1990) Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods Enzymol* 186:1-85
- Hansberg W, Aguirre J (1990) Hyperoxidant states cause microbial cell differentiation by cell isolation from dioxygen. *J Theor Biol* 142:201-221
- Hansberg W, de Groot H, Sies H (1993) Reactive oxygen species associated with cell differentiation in *Neurospora crassa*. *Free Rad Biol Med* 14:287-293
- Harris H, Hopkinson DA (1976) Handbook of enzyme electrophoresis in human genetics. North-Holland Publishing Co., Amsterdam
- Henge-Aronis R (1993) Survival of hunger and stress: the role of *spo5* in early stationary phase gene regulation in *E. coli*. *Cell* 72:165-168
- Hockenbery DM, Oltvai ZN, Yin X, Millman CL, Korsmeyer SJ (1993) Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis. *Cell* 75:241-251
- Kafer E (1977) Meiotic and mitotic recombination in *Aspergillus* and its chromosomal aberrations. *Adv Genet* 19:33-131
- Loewen PC, Switala J (1987) Multiple catalases in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 169:3601-3607
- Loewen PC, Switala J, Triggs-Raine B (1985) Catalases HPI and HPII in *Escherichia coli* are induced independently. *Arch Biochem Biophys* 243:144-149
- Marchler G, Schuller C, Adam G, 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* 12:1997-2003
- Marshall MA, Timberlake WE (1991) *Aspergillus nidulans wetA* activates spore-specific gene expression. *Mol Cell Biol* 11:55-62
- Mirabito PM, Adams TH, Timberlake WE (1989) Interactions of three sequentially expressed genes control temporal and spatial specificity in *Aspergillus* development. *Cell* 57:859-868
- Munkres KD (1990) Genetic coregulation of longevity and anti-oxidenzymes in *Neurospora crassa*. *Free Rad Biol Med* 8:355-361
- Murthy MRN, Reid TJ III, Scignano A, Tanaka N, Rossman MG (1981) Structure of beef liver catalase. *J Mol Biol* 152:465-499
- Ossowski J von, Mulvey MR, Loco PA, Borys A, Loewen PC (1991) Nucleotide sequence of *Escherichia coli katE*, which encodes catalase HPII. *J Bacteriol* 173:514-520
- Redinbaugh MG, Wadsworth GJ, Scandalios JG (1988) Characterization of catalase transcripts and their differential expression in maize. *Biochim Biophys Acta* 1049:219-222
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Cold Spring Harbor, New York
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 74:5463-5467
- Schreck R, Rieber P, Baeuerle PA (1991) Reactive oxygen intermediates are apparently widely used messengers in the activation of the NF- κ B transcription factor and HIV-1. *EMBO J* 10:2247-2258
- Schroeder WA, Shelton JR, Robertson B, Apell G, Fang RS, Bonaventura J (1982) The complete amino-acid sequence of bovine liver catalase and the partial sequence of bovine erythrocyte catalase. *Arch Biochem Biophys* 214:397-412
- Simon M, Adam G, Rapatz W, Ruis H (1991) The *Saccharomyces cerevisiae* ADR1 gene is a positive regulator of transcription of genes encoding peroxisomal proteins. *Mol Cell Biol* 11:699-704
- Skromne I, Sánchez O, Aguirre J (1995) Starvation stress modulates the expression of the *Aspergillus nidulans brlA* regulatory gene. *Microbiology* 141:21-28
- Stringer MA, Timberlake WE (1995) *dewA* encodes a fungal hydrophobin component of the *Aspergillus* spore wall. *Mol Microbiol* 16:33-44
- Stringer MA, Dean RA, Sewall TC, Timberlake WE (1991) *Rodletless*, a new *Aspergillus* development mutant induced by direct gene inactivation. *Genes Dev* 5:1161-1171
- Timberlake WE (1980) Developmental gene regulation in *Aspergillus nidulans*. *Dev Biol* 78:497-510
- Timberlake WE, Clutterbuck AJ (1994) Genetic regulation of conidiation. In: Martinielli SD, Kinghorn JR (eds) *Aspergillus*: 50 years on. Progress in Industrial Microbiology, vol. 29. Elsevier, Amsterdam, pp 383-427
- Toledo I, Hansberg W (1990) Protein oxidation related to morphogenesis in *Neurospora crassa*. *Exp Mycol* 14:184-189
- Toledo I, Noronha-Dutra A, Hansberg W (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
- Toledo I, Aguirre J, Hansberg W (1994) Enzyme inactivation related to a hyperoxidant state during conidiation of *Neurospora crassa*. *Microbiology* 140:2391-2397
- Triggs-Raine BL, Doble BW, Mulvey MR, Sorby PA, Loewen PC (1988) Nucleotide sequence of *katG*, encoding catalase HPI of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 170:4415-4419
- Wang Y, Prade RA, Griffith J, Timberlake WE, Arnold J (1994) A fast random cost algorithm for physical mapping. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:11094-11098
- Yelton MM, Hamer JE, Timberlake WE (1984) Transformation of *Aspergillus nidulans* by using a *trpC* plasmid. *Proc Natl Acad Sci USA* 81:1470-1474
- Zimmerman CR, Orr WC, Leclerc RF, Barnard EC, Timberlake WE (1980) Molecular cloning and selection of genes regulated in *Aspergillus* development. *Cell* 21:709-715

Regulación del mensaje de *catA* durante la germinación.

Durante la germinación la actividad de la catalasa A va disminuyendo gradualmente, reduciendo su actividad notablemente después de 10 h de germinación, y es casi indetectable a las 18 h de crecimiento (Kawasaki *et al.*, 1997). Para saber como se regula el mensaje de *catA* durante la germinación, repetimos el experimento de Kawasaki *et al.* (1997) pero en esta ocasión para hacer un análisis tipo “Northern blot”. Como se observa en la Figura 8 de este capítulo, el mensaje de *catA* desaparece rápidamente durante la germinación. Encontramos niveles muy bajos de mensaje a las 2 h y siendo indetectables a las 4 h. Estos datos indican que la actividad de la catalasa A observada después de 2 h de germinación no parece provenir de síntesis *de novo*, ya que el mensajero correspondiente prácticamente desaparece después de las 4 h. A su vez, esto sugiere que la catalasa A es muy estable durante la germinación y que su actividad se va diluyendo conforme crece el cultivo. Aunque no se descarta la posibilidad de síntesis *de novo* proveniente de ARNm en tan bajos niveles que resulte imposible detectar en ensayos tipo Northern blot.

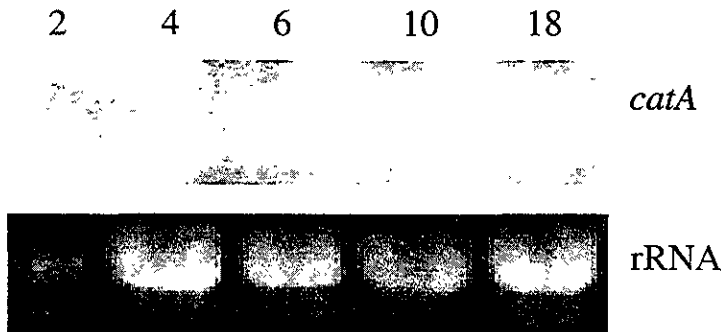


Figura 8. Acumulación del mensajero de *catA* durante la germinación. Conidias de la cepa silvestre PW1 se germinaron en medio mínimo suplementado. Se colectaron muestras a los tiempos indicados (horas). Se extrajo ARN total de las muestras y se corrió en un gel desnaturante para ARN, el cual se transfirió a una membrana de nylon y se hibridó con una sonda específica para *catA*. Para mostrar la cantidad de ARN cargada en cada carril se muestra una foto del ARN ribosomal 25S. Los tiempos indicados corresponden a las siguientes morfologías. 2 h, conidias hinchadas; 4 h, conidias hinchadas con tubos germinales pequeños; 6 y 10 h, hifas creciendo activamente y 18 h, hifas en fase preestacionaria.

Inmunolocalización de la catalasa A.

Como en *A. nidulans* existen por lo menos tres catalasas una posible explicación de esta redundancia genética es que estas catalasas esten destinadas a compartimentos celulares diferentes. Por esta razón decidimos inmunolocalizar a la catalasa A.

Para saber en donde se encontraba localizada la catalasa A en las conidias, decidimos hacer experimentos de inmunolocalización. Se utilizó un anticuerpo hecho por Fernando Lledías, en el laboratorio del Dr. Wilhelm Hansberg, dirigido contra una catalasa comercial de *A. niger* (SIGMA, C-3515). En la Figura 9 se muestra que este anticuerpo es capaz de reconocer un antígeno en un gel de proteínas nativas, el cual comigra con la actividad de catalasa A (no se muestra) y se encuentra ausente en una mutante *catA*⁻ (cepa TOS1).

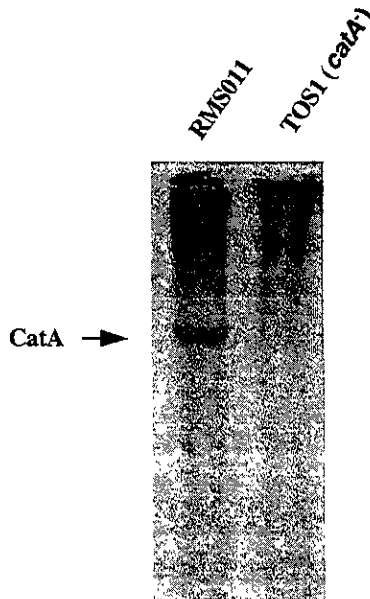


Figura 9. Detección de catalasa A en un ensayo tipo "Western Blot", utilizando extractos de conidias y un anticuerpo dirigido contra una catalasa comercial de *A. niger*. Se prepararon extractos de proteína de conidias de la cepa silvestre RMS011 y la mutante *catA*⁻, TOS1. Se corrieron 40 µg del extracto en un gel

de proteínas nativas, el cual se electrotransfirió a una membrana de nitrocelulosa, la cual se incubó con una dilución de 1:100 del anticuerpo

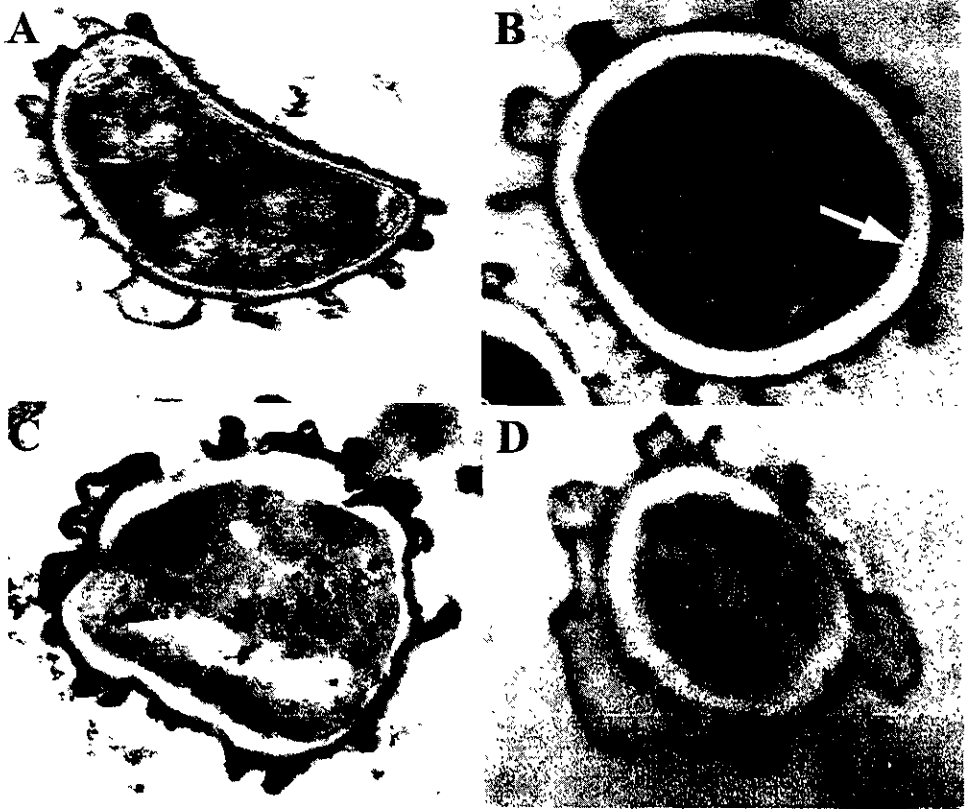


Figura 10 Inmunolocalización de la catalasa A en conidias. Conidias de la cepa silvestre FGSC-26 y la mutante *cata*, TRN1 se fijaron e incluyeron en resina "L-white". Distintos cortes se incubaron en presencia de una dilución 1:100 del anticuerpo. Posteriormente, se lavaron con BSA al 1% y se incubaron con un segundo anticuerpo que contiene la proteína A acoplada con oro y se repitió el lavado. Se observaron los cortes en el microscopio electrónico. A, conidia de la cepa FGSC-26 sin anticuerpo primario. B, conidia FGSC-26 con anticuerpo primario. C, conidia de la mutante *cata*, sin anticuerpo primario. D, conidia de la cepa *cata* con anticuerpo primario. La flecha en B indica las partículas de oro en la pared celular de una conidia.

Para inmunolocalizar a la catalasa A se hicieron cortes de conidias de la cepa silvestre y de una mutante *catA*⁻ y se incubaron con el anticuerpo. Como se observa en la Figura 10 B, una parte importante de la catalasa A se detectó en la pared celular de las conidias. Es claro que parte de la catalasa A debe estar localizada en el citoplasma, ya que todas las muestras analizadas en geles nativos provienen de extractos crudos de proteína soluble. Aunque en la cepa *catA*⁻ también se observan algunas partículas marcadas con oro, estas no se encuentran localizados en ningún lugar específico (Fig. 10 D). Cortes incubados sin el anticuerpo primario no presentan partículas marcadas con oro, por lo que la reacción es específica (Fig. 10 A y C). La catalasa A presenta una secuencia semi-conservada en el extremo amino terminal que podría estar implicada, como péptido señal, en la exportación de la proteína a la pared celular (Calera *et al.*, 1997). La localización de parte de la catalasa A en la pared celular de las conidias es consistente con el papel protector que dicha catalasa ofrece a las conidias en contra de peróxido de hidrógeno exógeno (Navarro *et al.*, 1996). A pesar de que la mayoría de la catalasa A se inmunolocalizó en la pared celular es importante señalar que parte de ella también se encuentra localizada en el citoplasma ya que todas las preparaciones para medir catalasa se obtienen de extractos crudos.

Definición del sitio de poliadenilación del mensajero de *catA*.

La región 3' que no se traduce de los ARN mensajeros puede tener regiones importantes para la regulación de sus mensajes, por esta razón decidimos determinar esta región en el mensaje de *catA*.

TTATCTCACT	GCCTCGGTAC	TTGTATTTC	TTTATTATGG	ATTACCCCC	AGGCGTTGGC	TGTTTCGACC
				#	*	
TATATGTATC	GTAACGAAGT	ATATGACTGA	ATGCAGTATA	TCATAATTAC	TATACTCAA	TCTTCTCTC

Figura 11. Sitio de poliadenilación del mensajero de *catA*. El sitio de poliadenilación de *catA* se determinó sintetizando cDNA con el oligonucleótido *cat28*. Posteriormente, se amplificó el cDNA por PCR usando el oligonucleótido *cat28* y AUAP (BRL). El producto de PCR se clonó y se secuenció. Subrayado se muestra el codón de termino. Con un signo de número (#) y en negrillas se muestra el sitio de termino de la clona CAN5 (Navarro *et al.*, 1996) y con un asterisco y en negrillas el sitio de poliadenilación determinado en este experimento.

Para localizar el sitio de poliadenilación del mensajero de *catA* se usó el estuche de GIBCO BRL (USA) "3' race system for rapid amplification of cDNA ends". Se usó el oligonucleótido cat28 (ggcgaattcatggctactagtagtaccgc) para hacer cDNA usando ARN total de conidias. Este oligonucleótido tiene un sitio de restricción para EcoRI y el ATG de *catA*. Con este oligonucleótido y el uso del oligonucleótido AUAP, que es complementario a parte de la secuencia del oligonucleótido AP que se usa para hacer el cDNA, se amplificó la región codificadora de *catA*.

Se obtuvo un producto de PCR de aproximadamente 2400 pb usando los oligonucleótidos cat28 y AUAP. Se clonó el producto de PCR usando los sitios de restricción EcoRI y Sall en el vector BKS(-). Se obtuvieron 6 transformantes y se secuenciaron tres. A la clona 7 se le denominó pREN22 y contiene el cDNA de *catA* desde el codón de inicio hasta el sitio de poliadenilación. El sitio de poliadenilación se muestra en la Figura 11.

Capítulo II. Resumen del artículo:

Navarro, R.E. y Aguirre, J. 1998. Posttranscriptional control mediates cell type-specific localization of catalase A during *Aspergillus nidulans* development. *J. Bacteriol.* En prensa.

En el hongo *Aspergillus nidulans* se han identificado dos genes de catalasa regulados diferencialmente. El gen *catA* pertenece a una serie de transcritos que se inducen específicamente durante la esporulación asexual o conidiación, y codifica para una catalasa acumulada en conidias. Usando una mutante del desarrollo afectada en el gen *brlA*, que es incapaz de formar esporas asexuales (conidia) pero capaz de formar esporas sexuales (ascosporas), demostramos que el mensaje de *catA* acumulado durante la inducción de la conidiación no generó el péptido CatA. Por el contrario, se detectaron altos niveles de actividad de la catalasa A en las ascosporas producidas por esta mutante, indicando que el gen *catA* es regulado a nivel postranscripcional. Este mismo tipo de regulación se observó para una fusión traduccional *catA::lacZ*, sugiriendo que la región 5' que no se traduce (5'UTR) del mensajero de *catA* pudiera estar involucrada en el control de la traducción durante el desarrollo.

En una cepa silvestre, la actividad de β -galactosidasa derivada de la fusión *catA::lacZ* fue baja en hifas, se incrementó 50 veces durante la conidiación y hasta 620 veces en conidias aisladas. En congruencia con estos resultados, la expresión espacial del reportero se localizó en mótulas, fiálides y conidias. Esta expresión del gen reportero asociado a las conidias se mantuvo en una mutante *stuA*, en la cual el patrón celular del conidióforo está muy alterado. También se detectó la acumulación del mensaje de *catA* cuando el micelio vegetativo fue expuesto a condiciones de tensión oxidativa, osmótica y de privación de nutrientes. Sin embargo, la actividad de la catalasa A se detectó únicamente en las esporas producidas durante la privación de nutrientes. Nuestros resultados apoyan un modelo en el cual la traducción del mensajero de *catA*, acumulado durante la conidiación o en respuesta a distintos tipos de tensión ambiental, depende de los procesos morfogénicos involucrados tanto en la formación de esporas asexuales como sexuales, al mismo tiempo que muestra la operación de mecanismos independientes del gen *brlA* para regular la localización de productos específicos de las esporas.

Posttranscriptional Control Mediates Cell Type-Specific Expression of Catalase A during *Aspergillus nidulans* Development

ROSA E. NAVARRO AND JESÚS AGUIRRE*

Departamento de Genética Molecular, Instituto de Fisiología Celular,
Universidad Nacional Autónoma de México, 04510 México, D.F.

Received 19 May 1998/Accepted 17 August 1998

Two differentially regulated catalase genes have been identified in the fungus *Aspergillus nidulans*. The *catA* gene belongs to a class whose transcripts are specifically induced during asexual sporulation (conidiation) and encodes a catalase accumulated in conidia. Using a developmental mutant affected in the *brlA* gene, which is unable to form conidia but capable of producing sexual spores (ascospores), we demonstrated that the *catA* mRNA accumulated during conidiation but did not produce CatA protein. In contrast, high levels of catalase A activity were detected in the ascospores produced by this mutant, indicating that the *catA* gene is posttranscriptionally regulated. The same type of regulation was observed for a *catA:lacZ* translational gene fusion, suggesting that the *catA* message 5' untranslated region could be involved in translational control during development. In a wild-type strain, β -galactosidase activity driven from the *catA:lacZ* gene fusion was low in hyphae and increased 50-fold during conidiation and 620-fold in isolated conidia. Consistent with this finding spatial expression of the reporter gene was restricted to metulae, phialides, and conidia. Conidium-associated expression was maintained in a *staA* mutant, in which the conidiophore cell pattern is severely deranged. *catA* mRNA accumulation was also observed when vegetative mycelia was subject to oxidative, osmotic, and nitrogen or carbon starvation stress. Nevertheless, catalase A activity was restricted to the conidia produced under nutrient starvation. Our results provide support for a model in which translation of the *catA* message, accumulated during conidiation or in response to different types of stress, is linked to the morphogenetic processes involved in asexual and sexual spore formation. Our findings also indicate that *brlA*-independent mechanisms regulate the expression of genes encoding spore-specific products.

The asexual sporulation (conidiation) pathway of the fungus *Aspergillus nidulans* represents an excellent model system for studying the mechanisms controlling development and pattern formation in multicellular eukaryotes. The formation of the asexual reproductive apparatus is initiated when nondifferentiated hyphae are exposed to air or starved for nutrients in liquid culture (11, 30, 34). The asexual spores (conidia) are produced by the conidiophore, a multicellular structure composed of a basal foot cell, an aerial stalk terminating in a multinucleate vesicle, a layer of uninucleate cells called metulae, and a layer of uninucleate, sporogenous cells or phialides (28). This developmental pathway is dependent on the *brlA* regulatory gene (1, 11), which is necessary for expression of most of the conidiation-specific genes that have been identified (35).

Although conidiophore differentiation involves the activation of several hundred genes (21, 34, 35), the functions of only a few have been elucidated. The *yaA* gene, encoding a conidial lactase (5, 12), the *wA* gene, encoding a polyketide synthase necessary for conidium pigmentation (22), the *rodA* and *dewA* genes, which encode conidial cell wall-associated hydrophobic proteins (32, 33), and the *catA* gene, encoding the conidium-associated catalase A (27), are examples of known functions related to conidial attributes. In contrast to *yaA*, *wA*, *rodA*, and *dewA* genes, *catA* mRNA accumulation is not dependent on the *brlA* gene (27).

Two divergent and differentially regulated catalase genes

have been found in *A. nidulans* (19, 27). Conidia from *catA* null mutants are H₂O₂ sensitive (27), whereas *catB* null mutants, unable to produce the vegetative catalase B, are H₂O₂ sensitive at the hyphal stage (18). More recently, a catalase C has been detected in *catA catB* double mutants (17a). The mechanisms that mediate the differential regulation of these catalases during development and oxidative stress are not known.

In this work, we studied the mechanisms responsible for the cell type-specific localization of catalase A. We present evidence indicating that the *catA* message accumulates in a translationally inactive form under a variety of stress conditions and that *catA* translation is linked to morphogenetic processes involved in formation of metulae, phialides, and asexual or sexual spores. We found that regulatory sequences present in the *catA* message 5' untranslated region (UTR) and first four codons are sufficient to confer *catA*-like regulation to the reporter gene *lacZ* under different conditions.

The operation of *brlA*-independent mechanisms regulating the expression of a gene encoding a spore-specific product such as catalase A suggests that this could represent a general mechanism during development in *A. nidulans* and other fungi.

MATERIALS AND METHODS

Strains and growth manipulations. The genotypes of *A. nidulans* strains used in this study are listed in Table 1. Strains CRN1 and CRN8 are sexual progeny from TRN3 × CRN10, CRN10 is from cross AJC9 47 (A. J. Clutterbuck), CRN2 is from TRN3 × U1-7, and CRN6 is from TRN3 × CRN10. All strains were grown in supplemented minimal-nitrate or minimal-ammonium (20 mM ammonium tartrate) medium (18). Developmental cultures were conducted as described previously (27). For *brlA* mutants, mycelia were scraped from 5-day-old colonies in petri dishes, fragmented, and used to inoculate liquid cultures (3) Standard genetic (29) and transformation (36) techniques were used.

Plasmid, A 6 kb *LoRI catA* containing fragment from cosmid SW22C01 (27) was cloned into Bluescript KS (Stratagene, La Jolla, Calif.) to generate pREN1. pREN1 was digested with *SpeI* and religated to remove most of the *catA*

* Corresponding author. Mailing address. Departamento de Genética Molecular, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 70-242, 04510 México, D.F. Phone (525) 622-5651. Fax (525) 622-5630. E-mail: jaguirre@ifci.unam.mx

TABLE 1. *A. nidulans* strains used in this work

Strain	Genotype	Reference or source
AJCT7.1	<i>brlA1; brlA1 veA1</i>	8
CRN1	<i>catA</i> (~1400 pfl): <i>lacZ</i> (<i>argB</i> ⁺ / <i>argB</i> ⁻ CAT), <i>metG1; nuA4 brlA17 veA1</i>	This work
CRN10	<i>brlA1, argB2; ppaA4; nuA4 brlA17 veA1</i>	A. J. Chutterbuck
CRN2	<i>stuA1 pabaA1 catA</i> (~1400 pfl): <i>lacZ</i> (<i>argB</i> ⁺ / <i>argB</i> ⁻ CAT); <i>trpC801 veA1</i>	This work
CRN6	<i>pabaA1 ΔargB trpCΔB catA. argB trpC801 nuA4 brlA17 veA1</i>	This work
CRN8	<i>pabaA1; catA</i> (~1400 pfl): <i>lacZ</i> (<i>argB</i> ⁺ / <i>argB</i> ⁻ CAT); <i>nuA4 brlA17 veA1</i>	This work
FGSC-26	<i>brlA1; veA1</i>	Fungal Genetic Stock Center
PW1	<i>brlA1; argB2; metG1; veA1</i>	P. Wegienka
RMS011	<i>pabaA1 yA2; ΔargB. trpCΔB; veA1 trpC801</i>	32
TLK12	<i>pabaA1 yA2; ΔargB. trpCΔB; ΔcatB trpC801 veA1</i>	18
TRN1	<i>pabaA1 yA2; ΔargB:trpCΔB catA. argB; trpC801 veA1</i>	This work
TRN3	<i>brlA1; catA</i> (~1400 pfl): <i>lacZ</i> (<i>argB</i> ⁺ / <i>argB</i> ⁻ CAT), <i>metG1; veA1</i>	This work
UI-7	<i>stuA1 yA2 pabaA1; trpC801 veA1</i>	B Miller

coding region and generate plasmid pREN7. A ~1.4-kb *KpnI*-*NotI* fragment containing the putative *catA* upstream regulatory sequences was obtained from pREN7 and used to replace the *yA* promoter in plasmid pRA42 (6), to generate pREN8. This results in a gene fusion consisting of *catA* upstream regulatory sequences, the first four codons of *catA*, and two extra codons (Ser and Arg) derived from Bluescript sequences, fused to the *lacZ* region contained in pRA42 (see Fig. 2). Plasmid pREN8, used to transform strain RMS011 (32) to generate the *catA*-disrupted strain TRN1, was made by cloning the ~600-bp *Bam*HI *catA* fragment from pOSIA (27) into plasmid pDC1 (4).

Nucleic acid isolation, manipulation, and hybridization analysis. Total RNA was isolated by using TRIZOL (GIBCO BRL), fractionated in formaldehyde-agarose gels, transferred to Hybond-N nylon membranes (Amersham), and hybridized as suggested by the manufacturer. Radioactive probes were ³²P labeled by using random primers (GIBCO BRL). Probes were the 1.5-kb *Pvu*I fragment from pCAN5 (27) for *catA*, the 2-kb *KpnI*-*Bam*HI fragment from pSF5 (14) for *actin*, the 3-kb *Pvu*I-*Eco*RI fragment from pREN8 for *lacZ*, and the 1.7-kb *Eco*RI fragment from pDC1 for *argB*. Southern blot analysis was used to select trans-

formants carrying a single copy of pREN8 integrated at the *argB* locus. Total DNA was isolated as described by Timberlake (34). Transcription initiation sites for *catA* and *catA*:*lacZ* genes were determined by primer extension reactions using oligonucleotide prena4707 (5' tggcggcgtatggagatgcatga 3').

Enzyme activity determination. Catalase activity was determined in native polyacrylamide gels (20 to 40 μg of protein) as described previously (27). β-Galactosidase activity in protein extracts and 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside (X-Gal) staining were determined as reported elsewhere (3). Total protein was determined by the method of Bradford (9) or Smith et al. (31) for diluted samples.

Submerged sporulation. For starvation experiments, 50-ml cultures in 250-ml flasks were grown for 18 h, filtered through Miracloth, washed once with minimal-glucose nitrate-free medium, resuspended in 50 ml of either glucose-free or nitrogen-free medium (250 ml flask), and incubated further as reported elsewhere (30).

RESULTS

catA mRNA translation is linked to spore formation. We have reported that the *catA* mRNA accumulates during conidiation in *A. nidulans* developmental mutants affected in the *brlA* gene (27). Except for the stalk, *brlA* null mutants fail to produce all conidiophore cell types. However, they are able to undergo sexual development and produce meiotic spores called ascospores (11). Results in Fig. 1A show that the *catA* message was virtually undetectable during growth (0 h of conidiation) in either wild-type or *brlA1* null mutant strains, whereas high levels of *catA* mRNA were apparent in both strains after 25 h of conidiation. When protein extracts from these samples were used to determine catalase activity in native gels, CatA activity was detected in 25-h samples from the wild-type strain but not from the *brlA1* mutant (Fig. 1B). In contrast, ascospores formed by a *brlA* null mutant, which requires several days of incubation, contained high levels of a catalase activity that comigrated with CatA. This activity was absent in ascospores from a *brlA17 catA* double mutant, thus confirming that CatA accumulates to high levels in sexual spores (Fig. 1B) just as it does in asexual spores (27). An antibody that recognizes CatA failed to detect the CatA antigen in a Western blot analysis using 25-h protein samples from the *brlA1* mutant (not shown), arguing against the presence of an inactive form of CatA in those samples.

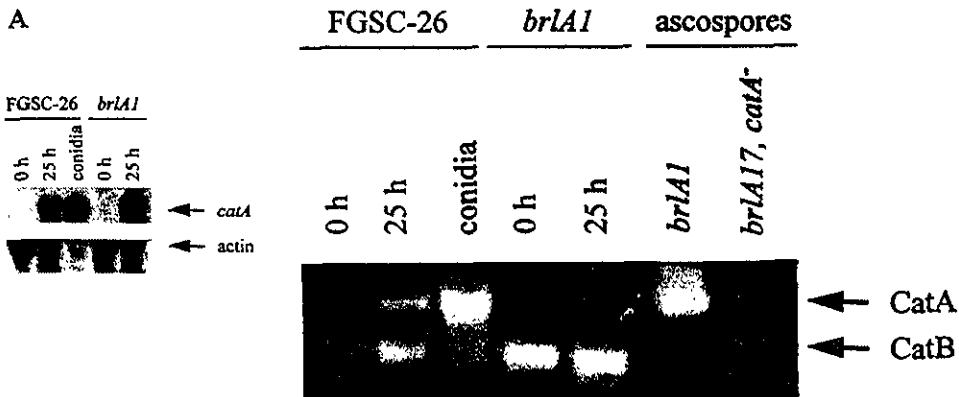


FIG. 1. *catA* mRNA accumulation and catalase activity during growth and conidiation in wild-type and *brlA1* mutant strains. (A) Total RNA extracted from growing mycelia (0 h of conidiation), mycelia induced to conidiate for 25 h, or isolated conidia in formaldehyde-agarose gels, transferred to a nylon membrane, and hybridized to the *catA* *Pvu*I fragment from pCAN5 and an actin-specific probe from pSF5. (B) Cell-free soluble protein extracts, prepared from samples at 0 and 25 h of conidiation, isolated conidia (20 μg), or ascospores (40 μg), were separated in a native polyacrylamide gel and stained for catalase activity (27). Samples corresponding to strains FGSC-26 (wild type), AJCT7 (*brlA1*), and CRN6 (*brlA17 catA*) are indicated. Catalase A and B positions are shown by arrows.

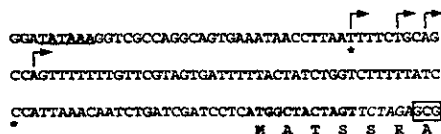


FIG. 2. *catA* regulatory and coding sequences present in the *catA::lacZ* gene fusion included in pREN8. Arrows indicate transcription initiation sites determined by primer extension previously (27) or in this work (*). A black dot indicates the 5' end of *catA* cDNA clone C1g70a1.2 reported at the *A. nidulans* expressed sequence tag database (29b). *catA* putative coding sequences are shown in boldface; a putative TATA box is underlined (27). The first codon from *E. coli lacZ* containing plasmid pRA42 (6) is boxed.

These results suggested that the *catA* mRNA detected in a *briA* mutant induced to conidiate is not translated unless spores are formed, in this case by the alternative sexual developmental pathway.

A *catA::lacZ* fusion containing *catA* message 5' UTR is regulated during sporulation and highly expressed in spores. To further understand the regulation of the *catA* gene, we constructed plasmid pREN8, containing *catA* upstream sequences extending from the proposed fourth codon to bp -1400 fused to the *E. coli lacZ* gene (Fig. 2). pREN8 also contained the *argB::CAT* fusion to direct integration of this construct to the *argB* locus (17). Eighteen *Arg*⁺ transformants obtained after transforming strain PW1 with plasmid pREN8 were subjected to Southern blot analysis. Strain TRN3, which contains a single copy of pREN8 integrated at *argB*, was chosen for further analysis. Results in Fig. 3A show low levels of β -galactosidase specific activity (7 to 14 U) in samples from 0 to 12 h of development. In contrast, high levels of activity were detected by 25 (733 U) and 49 (670 U) h of conidiation, and much higher levels were found in isolated conidia (9,430 U). This pattern of β -galactosidase activity matched that reported for catalase A activity during conidiation (27). Control strain PW1 contained virtually undetectable levels of β -galactosidase activity during growth and conidiation.

To evaluate if the *catA::lacZ* fusion was regulated as the bona fide *catA* gene in a *briA* null mutant background, the reporter gene was introduced by genetic crosses into a *briA17* background, to generate strain CRN1. As shown in Fig. 3A, 34 U of β -galactosidase activity was detected before induction of conidiation. Virtually no increase in enzyme activity was observed after 25 h of conidiation, and only a minor increase was detected after 49 h (Fig. 3A), whereas the *catA::lacZ* message was accumulated in samples from both CRN1 and the wild-type strain TRN3 after 25 (not shown) and 49 (Fig. 3B) h. Ascospores formed by the *briA17* null mutant strain CRN8 contained high levels of β -galactosidase activity (884 U), as opposed to ascospores formed by a *briA17* mutant lacking the *catA::lacZ* fusion, which showed undetectable levels of enzyme activity.

The transcription initiation sites of the *catA::lacZ* reporter gene were determined by primer extension using RNA from wild-type and *briA17* mutant strains, and no differences were detected between them. An initiation site in addition to those previously reported (27) was detected in both *catA* and *catA::lacZ* (Fig. 2). Therefore, the *catA::lacZ* fusion used here contains the sequences necessary for proper regulation during development. The *catA* message 5' UTR is likely responsible for coupling translation to either asexual or sexual spore development.

Spatial expression of the *catA::lacZ* fusion in wild-type and *stuA* mutant strains. The spatial expression of the *catA::lacZ*

reporter was determined by in situ β -galactosidase activity detection using the chromogenic substrate X-Gal. Results in Fig. 4 show that conidiophore cell types corresponding to metulae, phialides, and spores were all stained in strain TRN3 (Fig. 4A), whereas no staining was detected in control strain PW1 (Fig. 4B). This staining pattern is consistent with the time course results shown in Fig. 3, since the increase in β -galactosidase activity by 25 h corresponded with the presence of fully developed conidiophores, containing metulae, phialides, and conidiospores.

The *stuA* gene encodes a transcriptional repressor (13) necessary for the proper spatial expression of the *briA* regulatory gene (3) and for normal conidiophore pattern formation and ascosporegenesis (11, 25). We examined the spatial expression of the *catA::lacZ* reporter in a *stuA* mutant background. *stuA* null mutants produce short conidiophores often lacking metulae and phialides but are able to produce conidia (3, 11). Results in Fig. 4C show that β -galactosidase activity was mainly detected in conidia formed directly from vesicles or in some cases from abnormal phialides. The β -galactosidase specific activity in isolated conidia was 393 U, which corresponded to an 8.3-fold increase over the level in samples from 0 h of conidiation. These results indicate that at least part of the conidium-specific expression of the *catA::lacZ* gene fusion can occur in the absence of a functional *stuA* gene.

Different types of stress induce *catA* mRNA accumulation but not catalase A activity. Two catalase genes have been identified in *A. nidulans* (19, 27). The activity of the enzyme encoded by the *catB* gene is induced by oxidative and other types of stress (19). When the same kinds of stresses (Fig. 5) were applied for 3 h to the *catB*-deleted strain TLK12 grown for 12 h, no catalase A activity was detected (not shown), despite the fact that osmotic stress caused by NaCl or sorbitol, starva-

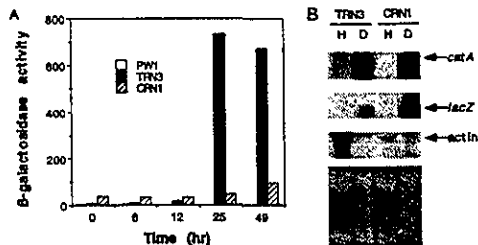


FIG. 3. Expression of *catA* and *catA::lacZ* reporter fusion in wild-type and *briA* mutant strains during conidiation. (A) Plasmid pREN8, containing *catA* gene upstream sequences extending from the fourth proposed codon fused to the *E. coli lacZ* gene, was integrated at *argB* by transformation of the developmentally wild type strain PW1. Transformant TRN3, containing a single copy of pREN8 integrated at *argB*, was crossed to *briA17* mutant strain CRN10 to produce the *briA17* mutant strain CRN1, containing the *catA::lacZ* fusion (Table 1). Both strains were grown in liquid medium for 18 h and induced to conidiate. Water-soluble protein extracts were prepared from samples harvested at the indicated times and assayed for β -galactosidase specific activity (24). The different times of development correspond to the following morphologies: 0 h of development (18 h of growth), undifferentiated hyphae; 6 h, conidiophore stalks; 12 h, conidiophores and first immature conidia; 25 h, mature conidiophores and conidia. β -Galactosidase activity in isolated conidia corresponded to 9,430 U. β -Galactosidase activities corresponding to strains TRN3 and CRN1 shown here and those indicated in the text are mean values from two independent experiments with a maximum variation of 21% with respect to the mean. (B) Total RNA extracted from growing hyphae (H, 18 h of growth) or developmental cultures (D; 49 h of conidiation) was fractionated in formaldehyde-agarose gels, transferred to a nylon membrane, and hybridized to *catA*, *lacZ*, and actin-specific probes. The bottom part shows rRNA bands in the ethidium bromide-stained gel used to prepare the blot.

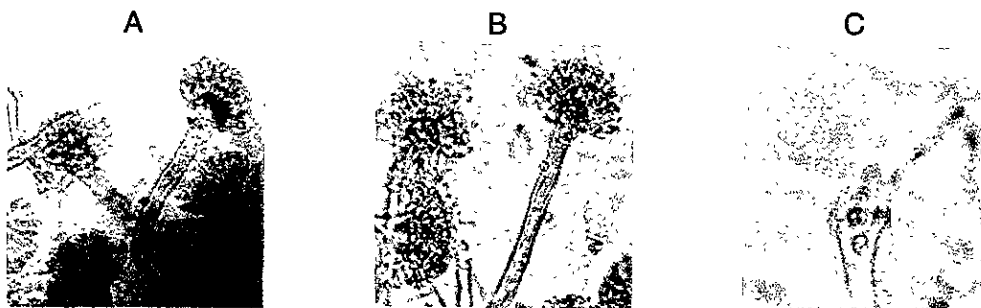


FIG. 4. Spatial expression of the *catA:lacZ* reporter gene in wild-type strains and a *stuA* developmental mutant during conidiation. Developmentally wild type strains TRN3 (A) and PW1 (B) and *stuA* mutant strain CRN2 (C) were grown in petri dishes until colonies conidiated, stained with X-Gal, and examined microscopically as reported previously (2, 3). Blue-stained cell types in conidiophores shown in panel A correspond to metulae, phialides, and conidia. Blue-stained cell types in panel C correspond to conidia formed on top of the vesicle of a stunted conidiophore. Magnifications: (A and B) $\times 240$; (C) $\times 480$.

tion for carbon or nitrogen, and to lesser extent H_2O_2 or paraquat treatment all induced *catA* mRNA accumulation (Fig. 5). These results show that in addition to air exposure (Fig. 1), other types of stress that do not result in spore production can lead to *catA* mRNA accumulation without catalase A activity production.

A. nidulans conidiates in liquid culture after 24 h of carbon and/or nitrogen starvation (30). Since a 3-h starvation for these nutrients resulted in *catA* message accumulation (Fig. 5, lanes 10 and 11), we used strain TRN3 to investigate if catalase A activity was detectable in mycelia starved for glucose during longer times or, if in this case, catalase A activity would be also restricted to conidia. Although the *catA* message was detected in mycelia starved for carbon during 24 h (Fig. 6A, lane 2), catalase A activity was confined to the conidia produced under those conditions (Fig. 6B, lane 3). In agreement with these results, we detected 45 U of β -galactosidase activity in mycelia starved for glucose during 24 h, compared with 468 U in isolated spores.

Taken together, our results provide support for a model in which translation of the *catA* message, which accumulates in response to induction of conidiation or during exposure to different types of stress, is linked to the morphogenetic processes involved in the formation of metulae, phialides, and asexual or sexual spores. In this model, translational regulation would be mediated by the 5' UTR sequences present at the *catA* message.

DISCUSSION

The *A. nidulans* catalase A activity and corresponding mRNA are highly accumulated in conidiospores, where the enzyme provides protection against exogenous H_2O_2 (27). The results presented in this report show that the *catA* gene is subject to posttranscriptional controls and that translational regulation seems to play a major role in the cell type-specific localization of catalase A.

brlA mutants blocked in asexual but not in sexual sporulation accumulated *catA* mRNA after exposure to air but failed to produce a CatA polypeptide. Nevertheless, ascospores formed by a *brlA* mutant contained high levels of catalase A activity, suggesting that translation of the *catA* message did not occur until either asexual or sexual spores started to be formed. This interpretation was further supported by the fact that temporal

and spatial expression of a *catA:lacZ* translational fusion during development in both wild-type and *brlA* mutants paralleled catalase A activity. Because the transcription initiation sites of the *catA:lacZ* reporter corresponded to those of *catA*, elements present in the *catA* message 5' UTR would be responsible for translational regulation during development. The *catA:lacZ* fusion used here contained the first four predicted CatA codons (Fig. 2). It remains to be determined if they play any specific role in translational control.

Conidial localization of β -galactosidase derived from *catA:lacZ* was maintained in a mutant affected in the *stuA* gene (Fig. 4C). However, enzyme activity in samples from 0 h of conidiation was higher in the *stuA* mutant than in a wild-type strain (47 and 9 U, respectively).

Exposure of nondifferentiated mycelia to different stress conditions, particularly to carbon or nitrogen starvation, also led to *catA* mRNA accumulation (Fig. 5). However, translational repression still restricted catalase A to the conidia produced under carbon starvation (Fig. 6). In these conditions, β -galactosidase activities derived from the *catA:lacZ* gene were ~ 10 - and 20-fold higher in isolated conidia than in starved or nonstarved mycelia, respectively. Differences in β -galactosidase activity levels were observed in comparisons of conidia and ascospores or of conidia produced in air and those formed in liquid, which might result from differences in the sporulation

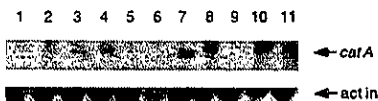


FIG. 5. *catA* mRNA accumulation during different stress conditions. Mycelia from strain TLK12, grown for 12 h in minimal medium at 37°C, were transferred to minimal medium and subjected to the following treatments: lanes 1 and 2, 2 and 3 h in minimal medium, respectively (control); lane 3, 5 mM paraquat for 2 h; lane 4, 0.5 mM hydrogen peroxide for 2 h; lane 5, 0.8 mg of uric acid per ml as the sole nitrogen source for 2 h; lane 6, 42°C for 3 h; lane 7, 1 M sorbitol for 3 h; lane 8, 1 M sodium chloride for 3 h; lane 9, 4% ethanol as the sole carbon source for 3 h; lane 10, minimal medium lacking glucose for 3 h; lane 11, minimal medium lacking nitrate for 3 h. Total RNA from the indicated conditions was fractionated in formaldehyde-agarose gels, transferred to a nylon membrane, and hybridized to a *catA*-specific probe. The same membrane was hybridized to an actin probe as a loading control.

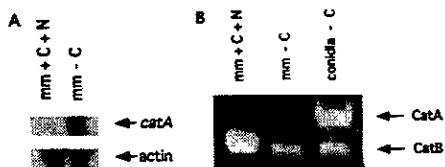


FIG. 6 *catA* mRNA and catalase activity accumulation during starvation-induced submerged sporulation. Strain TRN3 was grown for 18 h in glucose medium and shifted to standard medium (mm + C + N) or medium lacking glucose (mm - C). Samples taken at 24 h were filtered through Miracloth to retain mycelia. The resulting filtrate was passed and rinsed through 0.22- μ m-pore-size Millipore membranes to collect the conidia produced during starvation. (A) Total RNA obtained from starved mycelia was subjected to Northern blot analysis using a *catA*- or actin-specific probe. (B) Corresponding protein extracts were fractionated in a native polyacrylamide gel and used to determine catalase activity (27).

process per se. Despite these differences, β -galactosidase activity was always severalfold higher in spores than in mycelia.

We propose that the cell type-specific localization of catalase A is mediated by the 5' UTR of the *catA* mRNA and occurs in a two-step process. First, the *catA* message would accumulate in a translationally inactive form, in response to different stressful conditions, including exposure to air. This can result from increased *catA* transcription and/or message stabilization. Preliminary results indicate that the stability of the *catA* message changes under different physiological conditions (26a). In a second step, accumulated *catA* mRNA would be targeted to the proper location (metulae, phialides, conidiospores, and ascospores), where it would be translated. Such a process could be related to cytoskeleton remodeling during the shift from polar to budding growth associated with conidiation. The moderate increase in β -galactosidase activity observed in a *brlA* null mutant (Fig. 3A) indicates that translational repression of the *catA::lacZ* mRNA was not complete. It remains to be resolved if the *catA* mRNA 3' UTR sequences play a role in translational repression or other aspects of *catA* posttranscriptional control.

Notable examples of mRNA localization and translational regulation during development are represented by the *bicoid* and *nanos* mRNAs. The translation of both messages at their respective locations is crucial to embryonic polarity in *Drosophila*. For both mRNAs, *cis*-acting determinants have been confined to the 3' UTR, and microtubules have been implicated in their polarized distribution (reviewed in references 15 and 23). Asymmetrical distribution of mRNA and protein occurs during *Saccharomyces cerevisiae* mating-type switching, which requires the *HO* gene. *HO* transcription is prevented in daughter cells by the preferential accumulation of the unstable transcriptional repressor Ash1p and the *ASH1* mRNA. This process is dependent on actin, myosin, and a *cis*-acting element present at the 3' UTR of the *ASH1* mRNA (20, 26).

Translational regulation of the ferritin mRNA is mediated by *cis*-acting sequences included at the 5' UTR, which form a stable hairpin structure termed the iron-responsive element, where a protein binds to inhibit translation (7). Recently, Gu and Hecht (16) reported that a 65-kDa protein binds to the 5' UTR of a testis-specific Cu/Zn superoxide dismutase mRNA and specifically inhibits its *in vitro* translation. Although post-transcriptional regulation of catalase genes has not been directly demonstrated, the redox-sensitive binding of a protein to the 3' UTR of mouse and human catalase mRNAs has been reported (10). BLAST searches using the primary sequence of the 81- to 69-nucleotide pyrimidine-rich *catA* mRNA 5' UTR

(reference 27 and Fig. 2) found neither clear similarities to known sequences nor short upstream open reading frames that could mediate translational regulation. On the other hand, secondary structure analysis using the computer programs FOLD and SQUIGGLS showed only a low stability stem-loop structure (minimum free energy of -6.4), whose significance remains to be studied.

Further research is required to understand the specific mechanisms by which the *catA* gene is posttranscriptionally regulated and to what extent it is regulated at the transcription level. *catA* provides the first example of a gene encoding a conidium-specific product whose mRNA accumulates independently from the *brlA* regulatory gene, but it could represent a general mechanism for other genes such as those corresponding to cDNA clones CAN65, CAN11, CAN77, and CAN32 (8).

A. nidulans also contains the *catB*-encoded catalase B. It is interesting that different types of stress result in the accumulation of both *catA* and *catB* messages but only the *catB* mRNA is readily translated (17a, 18). It is not clear why catalase A is so tightly regulated, but its targeting to spores produced by two very different developmental pathways suggests a fundamental role in spore protection.

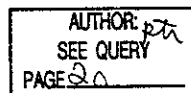
ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants 400346-5-2246PN from CONACYT and IN206097 from DGAPA-UNAM, México. R.E.N. was supported by a scholarship from DGAPA-UNAM.

We thank Fernando Ledfias and Wilhelm Hansberg for providing the catalase antibody and A. J. Clutterbuck for providing *brlA17* mutants. J. Heitman, R. Wharton, and W. Hansberg are acknowledged for critical reading of the manuscript.

REFERENCES

- Adams, T. 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., T. H. Adams, and W. E. Timberlake. 1990. Spatial control of developmental regulatory genes in *Aspergillus nidulans*. *Exp. Mycol.* 14:290-293.
- 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.
- Aramayo, R., and W. E. Timberlake. 1990. Sequence and molecular structure of the *Aspergillus nidulans* *y4* (laccase I) gene. *Nucleic Acids Res.* 18:3415.
- Aramayo, R., and W. E. Timberlake. 1993. The *Aspergillus nidulans* *y4* gene is regulated by *abaA*. *EMBO J.* 12:2059-2068.
- Bastillon, J. P., T. A. Rounhill, C. M. Massonby, R. D. Klausner, and W. H. Burgess. 1994. The iron-responsive element-binding protein: localization of the RNA-binding site to the seconite active-site cleft. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:574-578.
- Boylan, M. T., P. M. Mirabito, C. E. Willett, C. R. Zimmerman, and W. E. Timberlake. 1987. Isolation and physical characterization of three essential conidiation genes from *Aspergillus nidulans*. *Mol. Cell. Biol.* 7:3113-3118.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254.
- Clerch, L. B. 1995. A 3' untranslated region of catalase mRNA composed of a stem-loop and dinucleotide repeat elements binds a 69-kDa redox-sensitive protein. *Arch. Biochem. Biophys.* 317:267-274.
- Clutterbuck, A. J. 1969. A mutational analysis of conidial development in *Aspergillus nidulans*. *Genetics* 63:317-327.
- Clutterbuck, A. J. 1972. Absence of laccase from yellow-spored mutants of *Aspergillus nidulans*. *J. Gen. Microbiol.* 78:423-435.
- Dutton, J. E., S. Johns, and B. L. Miller. 1997. StuAp is a sequence-specific transcription factor that regulates developmental complexity in *Aspergillus nidulans*. *EMBO J.* 16:5710-5721.
- Fidel, S., J. H. Doonan, and N. R. Morris. 1988. *Aspergillus nidulans* contains a single actin gene which has unique intron locations and encodes a γ -actin. *Gene* 70:283-293.
- Gavis, E. R. 1997. Expeditions to the pole: RNA localization in *Xenopus* and *Drosophila*. *Trends Cell Biol.* 7:485-492.
- Gu, W., and N. R. Hecht. 1996. Translation of a testis-specific Cu/Zn super-



- oxide dismutase (SOD-1) mRNA is regulated by a 65-kilodalton protein which binds to its 5' untranslated region. *Mol. Cell. Biol.* 16:4535-4543.
17. Hamer, J. E., and W. E. Timberlake. 1987. Functional organization of the *Aspergillus nidulans* *trpC* promoter. *Mol. Cell. Biol.* 7:2352-2359.
 - 17a. Kawasaki, L., and J. Aguirre. Unpublished data.
 18. K&Sfer, E. 1977. Meiotic and mitotic recombination in *Aspergillus* and its chromosomal aberrations. *Adv. Genet.* 19:33-131.
 19. Kawasaki, L., D. Wysong, R. Diamond, and J. Aguirre. 1997. Two divergent catalase genes are differentially regulated during *Aspergillus nidulans* development and oxidative stress. *J. Bacteriol.* 179:3284-3292.
 20. Long, R. M., R. H. Singer, X. Meng, I. Gonzalez, K. Nasmyth, and R. P. Jansen. 1997. Mating type switching in yeast controlled by asymmetric localization of *ASH1* mRNA. *Science* 277:383-387.
 21. Martellucci, S. D., and A. J. Clutterbuck. 1971. A quantitative survey of conidiation mutants in *Aspergillus nidulans*. *J. Gen. Microbiol.* 69:261-268.
 22. Mayorga, M. E., and W. E. Timberlake. 1992. The developmentally regulated *Aspergillus nidulans* *wa* gene encodes a polypeptide homologous to polyketide and fatty acid synthases. *Mol. Gen. Genet.* 235:205-212.
 23. Micklem, D. E. 1995. mRNA localisation during development. *Dev. Biol.* 172:377-395.
 24. Miller, K. Y. 1972. Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N Y.
 25. Miller, K. Y., J. Wu, and B. L. Miller. 1992. *StuA* is required for cell pattern formation in *Aspergillus*. *Genes Dev.* 6:1770-1782.
 26. Nasmyth, K. and R. Jansen. 1997. The cytoskeleton in mRNA localization and cell differentiation. *Curr. Opin. Cell Biol.* 9:396-400.
 - 26a. Navarro, R. E., and J. Aguirre. Unpublished data
 27. 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.
 28. Oliver, P. T. F. 1972. Conidiophore and spore development in *Aspergillus nidulans*. *J. Gen. Microbiol.* 73:45-54.
 29. Pontecorvo, G., J. A. Roper, I. M. Hemmons, K. D. MacDonald, and A. W. J. Bufton. 1953. The genetics of *Aspergillus nidulans*. *Adv. Genet.* 5:141-283.
 - 29b. Roe, B. A., D. Kupfer, S. Clifton, and R. Prade. *Aspergillus nidulans* cDNA sequencing project. <http://www.genome.ou.edu/asper.html>.
 30. Skromme, L., O. Sanchez, and J. Aguirre. 1995. Starvation stress modulates the expression of the *Aspergillus nidulans* *brA* regulatory gene. *Microbiology* 141:21-28.
 31. Smith, F. K., R. I. Krohn, G. T. Hermanson, A. K. Mallis, F. H. Gartner, M. D. Proveszano, E. K. Fujimoto, N. M. Goeke, B. J. Olson, and D. C. Klentak. 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* 150:76-85.
 32. Stringer, M. A., R. A. Dean, T. C. Sewall, and W. E. Timberlake. 1991. *Rodless*, a new *Aspergillus* developmental mutant induced by directed gene inactivation. *Genes Dev.* 5:1161-1171.
 33. Stringer, M. A., and W. E. Timberlake. 1995. *deuA* encodes a fungal hydrophobin component of the *Aspergillus* spore wall. *Mol. Microbiol.* 16:33-44.
 34. Timberlake, W. E. 1980. Developmental gene regulation in *Aspergillus nidulans*. *Dev. Biol.* 78:497-510.
 35. Timberlake, W. E., and A. J. Clutterbuck. 1994. Genetic regulation of conidiation. *Prog. Ind. Microbiol.* 29:383-427.
 36. 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.

Capítulo III. Estrategias para estudiar los mecanismos de regulación postranscripcional del gen *catA* (Datos no publicados).

Sustitución de la región 5' del mensajero de *catA* que no se traduce (5'UTR) por la de *alcA*.

Los datos incluidos en el capítulo anterior acerca de la regulación de la fusión *catA::lacZ* sugieren que la región 5'UTR de *catA* podría estar involucrada en la inhibición de la traducción del mensaje, hasta el momento de formar esporas o estructuras esporogénicas (Navarro y Aguirre, 1998). Con el propósito de estudiar la importancia de dicha región 5'UTR decidimos intercambiar esta región por la de otro gen, esperando que al sustituir la región que inhibe la traducción por la de un gen "inocuo", el efecto inhibitorio ya no se presentaría y los niveles de actividad de β -galactosidasa derivados de esta segunda fusión *catA::lacZ* se incrementarían notablemente aún en la mutante *brlA* (en contraste con lo reportado en la Figura 3A del Capítulo II).

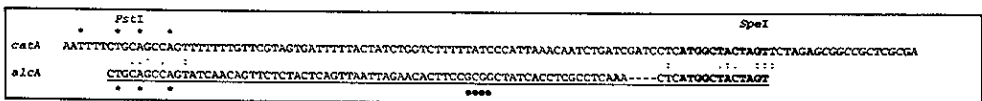


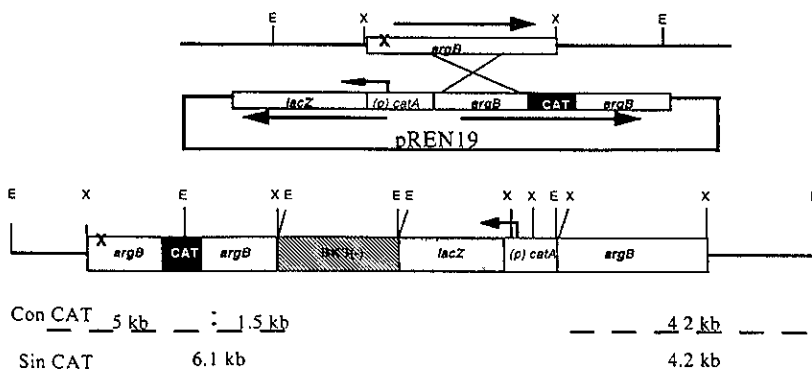
Figura 1. Región 5'UTR del ARNm del gen *alcA* (abajo) utilizada para reemplazar la mayor parte de la región 5'UTR del ARNm de *catA* (arriba) contenida en la fusión *catA::lacZ* (cepa TRN3). Se diseñaron dos oligonucleótidos complementarios equivalentes a la región subrayada, de tal forma que el extremo 5' incluyera el sitio *Pst*I y el extremo 3' el sitio *Spe*I. El plásmido pREN8 fue digerido con *Pst*I y *Spe*I para remover la mayor parte de la región 5'UTR del ARNm de *catA* y se ligó con el fragmento sintético descrito anteriormente. El plásmido resultante se denominó pREN19. Los asteriscos indican los inicios de la transcripción, los puntos señalan las bases que fueron mutadas en la secuencia original de *alcA*, con el fin de introducir el sitio de restricción *Sst*II para manipulaciones posteriores. En negrillas se indican los primeros 4 codones de *catA* presentes en la fusión *catA::lacZ*. Los siguientes dos codones, después de *catA*, corresponden a secuencias derivadas de BKS(-) que contienen un sitio *Nor*I, usado para construir el plásmido original pREN7. Las secuencia en *itálicas* corresponden al plásmido pRA42. Con doble punto se señala la secuencia de *catA* presente en ambas fusiones.

El gen *alcA* codifica para la alcohol deshidrogenasa tipo I de *A. nidulans*. Este es un gen bien estudiado que se reprime por glucosa a través del producto del gen *creA* y se induce por etanol o treonina (este último es un inductor gratuito) a través del producto del gen *alcR*. El gen *alcA* tiene 2 inicios de la transcripción y el que se encuentra río arriba genera una región 5'UTR de 70 bases (Gwynne *et al.*, 1987). En vista de que este promotor es muy usado en *A. nidulans* para inducir la transcripción a voluntad, pensamos que podíamos utilizar la región 5'UTR correspondiente para sustituirla por la de *catA*.

En la Figura 1 se muestra la secuencia de *catA* que fue sustituida por la de *alcA*. El plásmido pREN19 contiene la fusión *catA::lacZ* (Navarro y Aguirre, 1998) con la región 5'UTR del mensajero de *alcA* como se muestra en la Figura 1. Este plásmido se usó para transformar al hongo, obteniéndose 13 transformantes de las cuáles solo dos tenían el evento de recombinación esperado (Figura 2), es decir, una sola copia del pREN19 integrado en el locus *argB*.

Se eligió la transformante TRN5 para hacer cultivos conidiantes. Como se observa en la Figura 3, se tomaron muestras en los tiempos indicados y se determinó actividad de β -galactosidasa. Durante las primeras 12 h se observaron niveles de actividad de 7 ± 3 unidades (U), a las 25 h se observó un incremento en la actividad hasta 657 ± 214 U, lo cual corresponde a un incremento de aproximadamente 94 veces. Comparado con la fusión que tiene la región 5'UTR del mensajero de *catA* (Figura 3, Capítulo II), no existe una diferencia significativa ya que durante la conidiación esta generó un aumento de 105 veces en la actividad de β -galactosidasa. A las 49 h de conidiación se observaron niveles de actividad de 708 ± 136 U, que son muy parecidos a los de 25 h. En conidias aisladas se encontró un incremento de actividad de 12 veces con respecto al de 25 h (8188 ± 77 U).

A



B

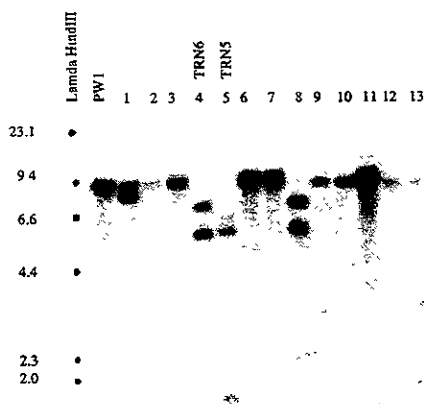


Figura 2. Integración del plásmido pREN19 en el locus *argB*. A) Esquema del evento de integración esperado para el plásmido pREN19 en el locus *argB*. Se ha reportado que con cierta frecuencia el cassette de CAT que interrumpe *argB* se pierde durante la integración. Con línea punteada se señala el peso de las bandas esperadas cuando el cassette de CAT está íntegro. Cuando se digiere el DNA genómico con *EcoRI* y se usa *argB* como sonda, se esperan tres bandas de 5, 4.2 y 1.5 kb. Cuando el cassette de CAT se pierde durante la integración se esperan solo dos bandas, una de 6.1 kb y otra de 4.2 kb. B) El plásmido pREN19 se utilizó para transformar la cepa PW1 y se obtuvieron 13 transformantes. Se extrajo DNA de las transformantes, se digirió con la enzima *EcoRI* y se analizaron por hibridación tipo "Southern" usando *argB* como sonda. La transformante 5 corresponde al patrón de hibridación esperado con el cassette de CAT y se le llamó TRN5. La transformante 4 corresponde al patrón de hibridación sin CAT y se le llamó TRN6.

Posteriormente se realizó una cruce entre la cepa TRN5 y una mutante *brlA*⁻ y se obtuvo la cepa CRN7 y se midió actividad de β -galactosidasa después de la inducción de la conidiación. Como se observa en la Figura 3, los niveles de actividad durante las primeras 25 h llegan hasta 19 ± 5 U. A las 49 h se ve un incremento de solo 3 veces, con respecto a los tiempos anteriores. En cambio, en las ascosporas en esta cepa se detectó una actividad de β -galactosidasa aproximadamente 36 veces mayor que a las 25 h de conidiación (677 ± 11 U). La formación de ascosporas es algo que ocurre después de 1 ó 2 semanas por lo que el ARN acumulado durante la conidiación parece permanecer estable, hasta su traducción durante la ascospogénesis.

En resumen, la sustitución de la región 5'UTR del mensajero de *catA* por la de *alcA* no tuvo el efecto esperado, lo cual puede deberse a varias razones. Una posible explicación estaría relacionada con el hecho de que al hacer la nueva construcción decidimos conservar 15 nucleótidos en el extremo 5' del mensaje, considerando el primer sitio de inicio de la transcripción y otra región de 15 nucleótidos que incluyen 3 nucleótidos antes del ATG y los 4 primeros codones, incluyendo el de inicio de la traducción. Es posible que estas regiones sean suficientes para inhibir la traducción del mensaje en la nueva construcción.

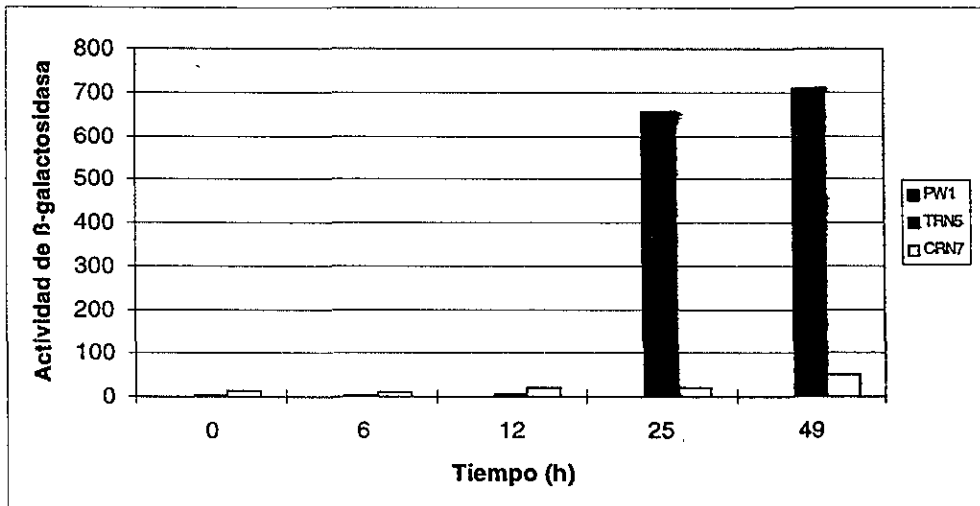


Figura 3. Actividad de β -galactosidasa de las cepas TRN5 y CRN7. La cepa TRN5 proviene de la transformación de la cepa PW1 con el plásmido pREN19 (Figura 2). Esta cepa se cruzó con la cepa CRN10 para obtener una cepa con la fusión *catA(p)::alcA(l)::lacZ* en un fondo *brIA'*. Ambas cepas se crecieron 18 h en medio mínimo y se indujeron a conidiar. Se prepararon extractos solubles de proteína de las muestras colectadas a los tiempos indicados (la morfología correspondiente esta indicada en la Figura 3; Capítulo II) y se determinó actividad de β -galactosidasa. (U/min/mg).

Otra posible explicación es que el mensajero de *alcA* presente algún tipo de regulación no descrito, parecido al de *catA* y que las regiones 5'UTR de *alcA* y *catA* a pesar de no ser similares, compartan cierto grado de regulación. El gen *alcA* se reprime por glucosa y se induce por etanol. La activación del regulón del etanol requiere que se elimine la glucosa del medio, la presencia de un inductor y el

activador AlcR (Felenbok *et al.*, 1988; Mathieu y Felenbok, 1994). En principio, no se espera que un gen que se utiliza en la degradación de etanol se regule durante el desarrollo, ya que este se lleva a cabo en presencia de glucosa. Sin embargo, Marhoul y Adams (1996) encontraron que el mensajero de *alcA* se acumula durante la conidiación en presencia de glucosa. El mensaje se detecta a partir de las 4 h y se encontró hasta las 24 h. Esta regulación es dependiente de *alcR* (Marhoul, 1996). No se conocía si el mensajero de *alcA* se encontraba acumulado en conidias; en experimentos tipo Northern Blot no detectamos el mensaje. Sería interesante determinar actividad de alcohol deshidrogenasa durante la conidiación y ver si esta coincide con la presencia del mensajero de *alcA*. Esto sugeriría que los genes *catA* y *alcA* podrían compartir alguna forma de regulación traduccional durante la conidiación.

Expresión del gen *catA* desde un promotor inducible.

Una estrategia alternativa para tratar de demostrar que la región 5'UTR del mensajero de *catA* es suficiente para inhibir la traducción, consistió en poner a la región codificadora de la catalasa bajo el control del promotor inducible del gen *alcA* usando dos diferentes regiones 5'UTR. En la Figura 4, se representan las regiones comprendidas en cada fusión.

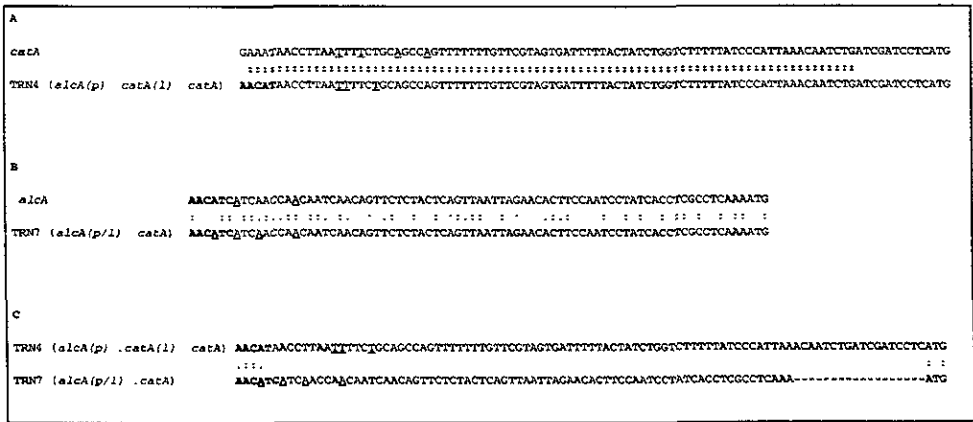


Figura 4. Secuencia de las regiones 5'UTR de los mensajeros de *catA* y *alcA* representados en las cepas TRN4 y TRN7, respectivamente. En A se muestra una comparación entre la región 5'UTR del mensajero de *catA* y la misma región contenida en la cepa TRN4 (5'UTR *catA*). En B se muestra una comparación entre la región 5'UTR del mensajero de *alcA* y la porción contenida en la cepa TRN7 (5'UTR *alcA*). C, muestra la comparación entre las dos regiones en las cepas TRN4 y TRN7. Las letras subrayadas indican los inicios de la transcripción determinados en este trabajo por experimentos de extensión de oligonucleótidos. El doble punto indica bases conservadas entre dos fusiones. Las letras en negrillas indican secuencias del promotor de *alcA*.

Construcción de la fusión *alcA(p/l)::catA* (Cepa TRN7).

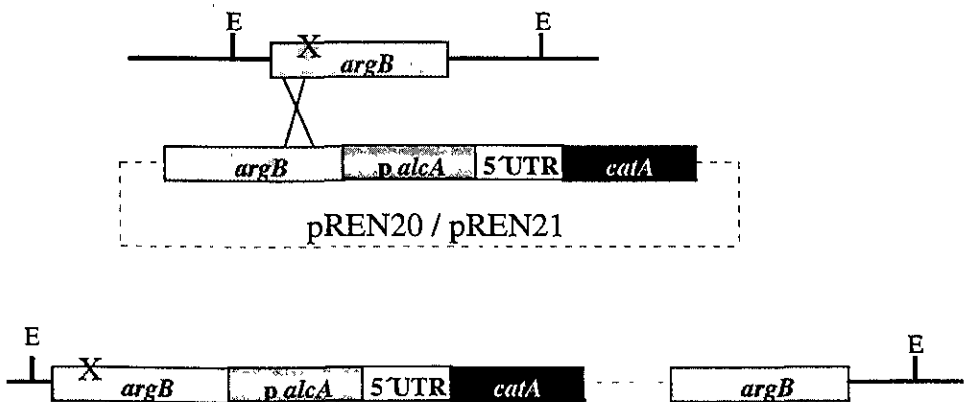
Para fusionar el promotor (p) y la secuencia correspondiente región 5'UTR (l) del mensajero de *alcA* con la región codificadora de *catA*, se diseñaron dos oligonucleótidos (ver secuencia en Materiales y Métodos). Estos corresponden al extremo 5' del promotor de *alcA* (past30140) representada en el plásmido pAST30 y al extremo 3' de la región 5'UTR (past30525). Al oligonucleótido past30140 se le agregó un sitio de corte para la enzima *SpeI* y al otro oligonucleótido se le agregaron 14 nucleótidos que incluyen desde el ATG de la catalasa hasta un sitio

de restricción *SpeI* presente dentro de la secuencia de *catA*. Se hicieron amplificaciones por PCR usando estos oligonucleótidos y como templado el plásmido pAST30. El producto de PCR se clonó y se secuenció para ver que no hubiera errores. Este producto de PCR se subclonó en el plásmido pREN10 que contiene la región codificadora de *catA* y el marcador selectivo *argB*. Se confirmó que la construcción quedara en el marco de lectura correcto y a este plásmido se le llamó pREN21.

Construcción de la fusión *alcA(p)::catA(l)::catA* (Cepa TRN4).

Para construir el plásmido con el promotor y la secuencia 5'UTR correspondiente a *alcA* fusionada a la región codificadora de *catA* se diseñaron dos oligonucleótidos. Uno de ellos contenía el inicio de la región promotora de *alcA*, justo antes del inicio de la transcripción (pren111001), y el otro 10 nucleótidos antes del primer inicio de la transcripción de *catA* (pren11197). Estos oligonucleótidos se utilizaron para hacer un PCR inverso utilizando el plásmido pREN11 que contiene una fusión entre el promotor de *alcA* y el gen *catA* completo. El producto de PCR de aproximadamente 3.5 kb se clonó ligándolo directamente ya que dentro de la región amplificada se encontraba el vector. Se

A



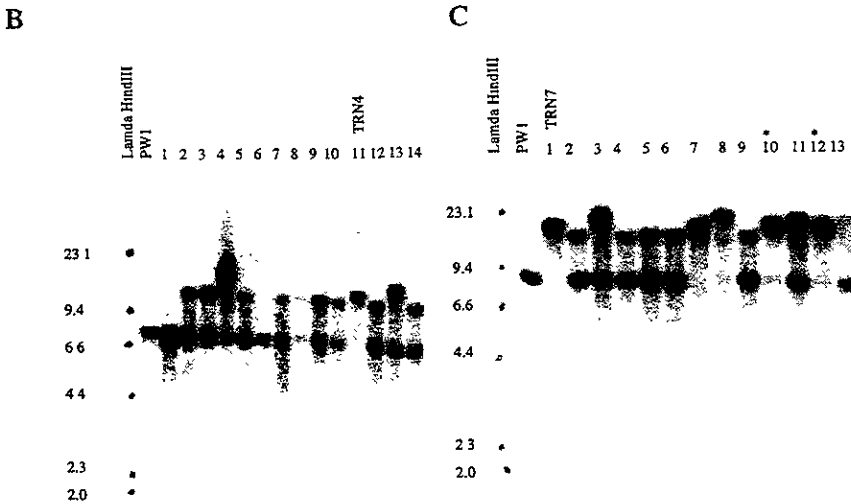


Figura 5. Integración de los plásmidos pREN20 y pREN21 en el locus de *argB* de la cepa PW1. A) Esquema de la integración esperada para los plásmidos pREN20 y pREN21. B) El plásmido pREN20 se usó para transformar a la cepa PW1, se obtuvieron 14 transformantes. Se obtuvo DNA de las transformantes, se digirió con EcoRI y se hizo una hibridación usando *argB* como sonda. De las transformantes solo la 11 mostró el patrón de hibridación esperado. A esta transformante se le llamó TRN4 (5'UTR *catA*). C) Se transformó la cepa PW1 con el plásmido pREN21 y se procedió como en B. Se obtuvieron 13 transformantes de las cuales 3 mostraron el patrón de hibridación esperado (cepas 1, 10 y 11). A la 1 se le denominó TRN7 (5'UTR *alcA*).

secuenciaron las regiones reguladoras de *alcA* y el 5'UTR de *catA*. Se subclonó el producto de PCR usando sitios SpeI en el vector pREN10. Se checó por secuencia que la construcción estuviera en el marco de lectura correcto y a este plásmido se le denominó pREN20. Estos plásmidos se usaron para transformar a la cepa PW1 y la integración esperada se muestra en la Figura 5 A. Se obtuvo una transformante para cada plásmido con el patrón de hibridación con la integración de una sola copia del plásmido en el locus *argB* (Fig. 5B y C). En ambos casos se esperaba que el fragmento original EcoRI de *argB* (~7 kb) aumentara por la integración del plásmido a ~15 kb.

Esperábamos que al inducir la transcripción desde un promotor tan fuerte como lo es *alcA*, el ARNm de *catA* con la región 5'UTR de *catA* (cepa TRN4) se acumulara pero no fuera capaz de traducirse, mientras que el mensaje con la región 5'UTR de *alcA* (cepa TRN7) se acumulara y se tradujera. Se crecieron las cepas PW1 (silvestre), TRN4 (5'UTR *catA*) y TRN7 (5'UTR *alcA*) en medio mínimo con glucosa por 15 h y se transfirieron a medio mínimo con glucosa 1%; glucosa 0.1% o etanol 200 mM por 3 h. Como se observa en el primer panel de la Figura 6, el gen *alcA(p/l)::catA* (TRN7) se regula según lo esperado. Es decir, se reprime por glucosa, se desreprime en baja glucosa y se induce por etanol. En la cepa TRN4 (5'UTR *catA*) se observó poca acumulación del mensajero de *catA*, aún en etanol, aunque una sobreexposición del film correspondiente, permite observar cierta inducción en etanol (ver Figura 7). Para checar que estas diferencias no se debieran a inicios de la transcripción, estos se determinaron por extensión de oligonucleótidos. Como se observa en la Figura 4, la transcripción de ambas fusiones comienza en los sitios esperados.

Estos datos sugieren que la región 5'UTR de *catA* pudiese desestabilizar el mensajero correspondiente en estas condiciones. Sin embargo, parte del poco mensaje acumulado en la cepa TRN4 (5'UTR *catA*) parece traducirse. Como se aprecia en el panel inferior de la Figura 6, en el carril correspondiente a etanol se observa actividad de catalasa A, aunque en menor grado que en la cepa TRN7 (5'UTR *alcA*) en etanol. Habría que recordar que la catalasa A parece ser muy estable (Navarro y Aguirre, este trabajo).

Estos datos sugieren que el posible factor involucrado en la represión de la traducción del ARNm de *catA* pudiera requerir ser activado durante la diferenciación, ya que en las condiciones experimentales empleadas la región 5'UTR correspondiente no impidió del todo la traducción del mensaje. Sin embargo, esta región parece desestabilizar el transcrito en condiciones de no diferenciación. Es importante señalar que la catalasa B se induce notablemente en etanol (Fig. 6).

Expresión del gen *catA* desde el promotor del gen *alcA* en condiciones de tensión.

En el Capítulo II mostramos que el transcrito de *catA* se acumula en condiciones de estrés como son el tratamiento con peróxido de hidrógeno, paraquat, cloruro de sodio, sorbitol o privación de carbono o nitrógeno (Figura 5,

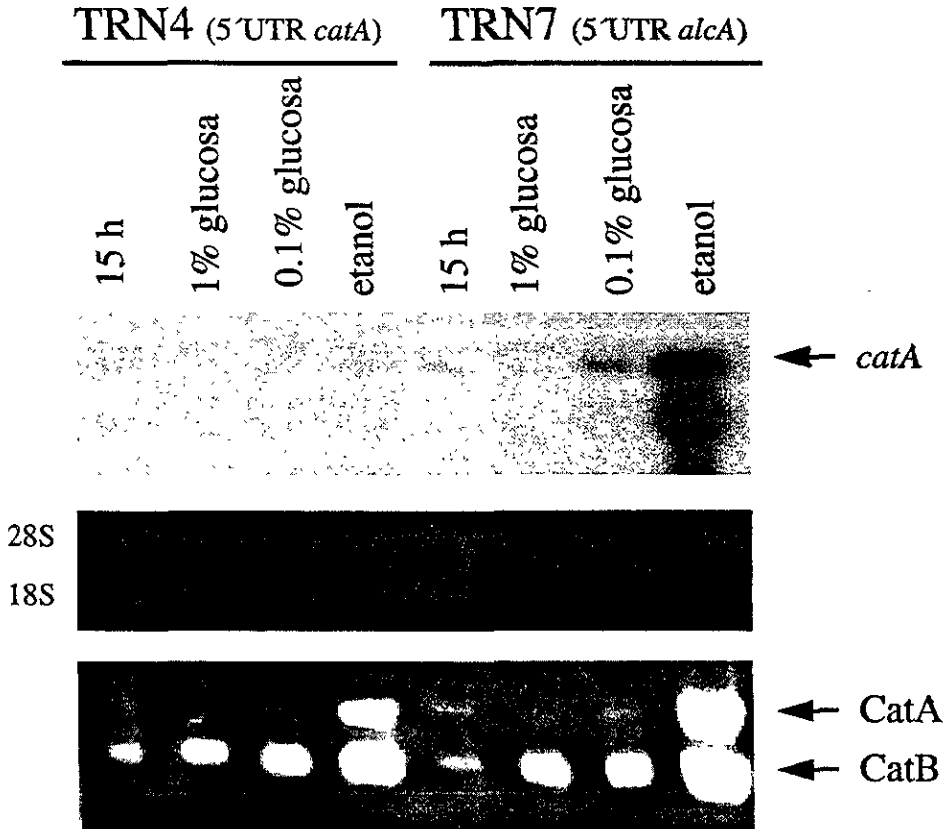


Figura 6. Expresión del gen *catA* desde el promotor del gen *alcA* en las cepas TRN4 (5'UTR *catA*) y TRN7 (5'UTR *alcA*). Las cepas se crecieron en medio mínimo con glucosa por 15 h y se transfirieron por 3 h a medio con 1% de glucosa (medio represor), medio con 0.1% de glucosa (condiciones desrepresoras) o medio con etanol (medio inductor). Se tomaron muestras en las condiciones mencionadas, se extrajo ARN, se corrió en un gel desnaturalizante, se transfirió a una membrana de Nylon y se hibridó con *catA* (panel superior). En el segundo panel se observa una foto de los ARN ribosomales como control del cargado de los gels. En el panel inferior, se observa la actividad de catalasa ensayada en un gel de proteína nativo (40 μ g). El mismo tipo de experimento con la cepa silvestre PW1 no mostró acumulación de ARN ni variaciones en la actividad de CatA en ninguna de las condiciones probadas (datos que no se muestran).

Capítulo II). Sin embargo, en estas condiciones no fue posible detectar actividad de catalasa A. Para determinar si este proceso de acumulación del mensajero se debe a transcripción y/o estabilidad del mensaje, decidimos estudiar el comportamiento de las fusiones *alcA::catA* en condiciones de inducción (etanol) y de tensión oxidativa producida por el agente oxidante paraquat o la exposición al aire. El experimento consistió en inducir la transcripción de las fusiones contenidas en las cepas TRN4 (5'UTR *catA*), TRN7 (5'UTR *alcA*) y la cepa control PW1 en presencia de paraquat o exponiendo el micelio al aire.

Como se observa en la Figura 7, a las 15 h de crecimiento en mm glucosa no hay acumulación de *catA*, con o sin paraquat. Es importante señalar que el mensaje de *catA* se acumula en presencia de paraquat (Navarro y Aguirre, 1998); sin embargo, esta acumulación se observa después de varios días de exposición y la membrana de la Figura 7 tiene una exposición muy corta por lo que no es posible detectar el mensaje. En etanol no hay expresión de *catA* en la cepa PW1, la cual no contiene ninguna fusión *alcA::catA*. En cambio, las cepas TRN4 (5'UTR *catA*) y TRN7 (5'UTR *alcA*) muestran acumulación del mensajero de *catA* en etanol observándose nuevamente una menor acumulación del mensajero de *catA* en la cepa TRN4 (5'UTR *catA*). Tres horas de estímulo con etanol más aire son suficientes para inducir notablemente la acumulación del mensaje. Aunque a las 6 h de etanol más exposición al aire se observa una menor acumulación del mensaje, esto puede deberse simplemente a que si se observa se cargó menos RNA que en los otros carriles de acuerdo con la expresión del gen de actina.

Ya que ambas fusiones responden de la misma manera a la tensión, podríamos decir que las regiones que tienen en común son las responsables de esta respuesta. En lo único que difieren estas construcciones es en la región 5'UTR de los ARNm correspondientes, por lo que existen dos elementos posiblemente involucrados. El primero sería la región codificadora y la región 3'UTR de *catA*. El segundo es el promotor de *alcA*. Como se explicó anteriormente existen datos preliminares de que el mensajero de *alcA* se acumula durante la exposición al aire (Marhoul, 1996). Para responder esta interrogante, se hibridó la membrana anterior usando *alcA* como sonda. Como se observa en el panel central de la Figura 7, se detectó un aumento en la acumulación del mensajero de *alcA* en condiciones de etanol más paraquat o aire, con respecto al control de etanol, aún en la cepa PW1. Estos datos indican que el promotor de *alcA* responde a la tensión oxidativa, lo cual no ha sido descrito anteriormente.

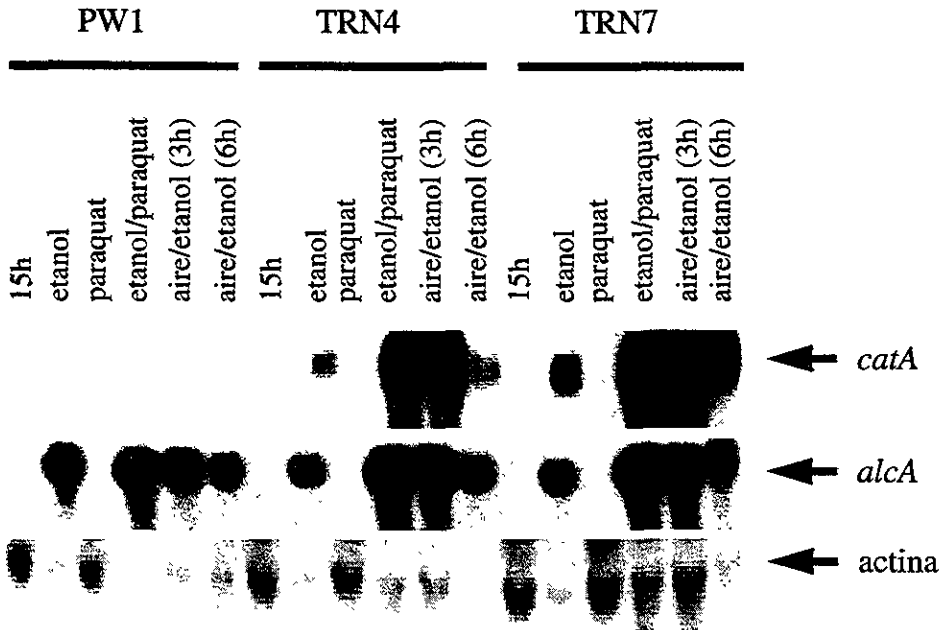


Figura 7. Inducción de *catA* desde el promotor de *alcA* en diferentes condiciones de tensión. Las cepas PW1 (silvestre), TRN4 (5'UTR *catA*) y TRN7 (5'UTR *alcA*), se crecieron por 15 h en medio mínimo glucosa y se transfirieron por 3 h a medio con 200 mM de etanol; 5 mM de paraquat; 200 mM de etanol, 5 mM de paraquat; en medio líquido o sólido (exposición al aire) y combinaciones de etanol y tensión por 3 h o 6 h. De las condiciones indicadas se extrajo RNA, se transfirió a una membrana de Nylon que se usó para hibridar con sondas específicas para *catA*, *alcA* o *actA*.

A pesar de la alta acumulación del mensaje de *catA* observado en la cepa TRN4 (5'UTR *catA*) en etanol/paraquat o etanol/aire, este mensaje parece no traducirse eficientemente. Si comparamos los carriles de etanol más paraquat y etanol más aire (3 h) correspondientes a la cepa TRN4 (5'UTR *catA*), con los carriles correspondientes a la cepa TRN7 (5'UTR *alcA*), observamos mucha más actividad de catalasa A en la cepa TRN7 (5'UTR *alcA*). Estos datos apoyan el efecto de inhibición de la traducción propuesto para la región 5'UTR de *catA*, e indican que el factor que inhibe la traducción está activo en condiciones de tensión oxidativa.

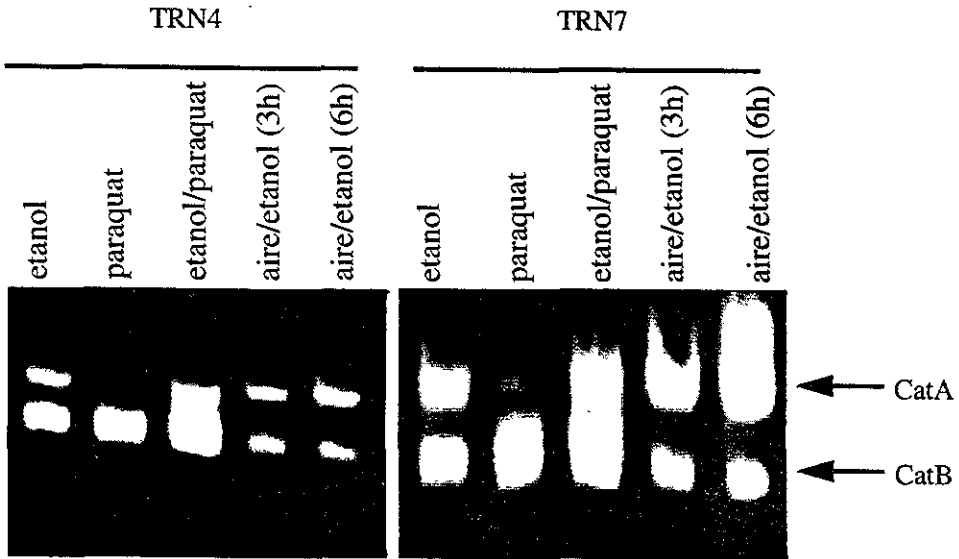


Figura 8. Actividad de catalasa en las cepas TRN4 (5'UTR *catA*) y TRN7 (5'UTR *alcA*) durante la inducción con etanol en condiciones de tensión oxidativa. Se muestra un gel nativo, teñido para detectar actividad de catalasa, utilizando extractos de proteína (40 μ g) provenientes del experimento mostrado en la Figura 7.

Tomados en conjunto, los datos presentados en este capítulo apoyan la hipótesis de que la región 5'UTR del mensajero de *catA* contiene secuencias que inhiben la traducción en condiciones distintas de la esporulación. Es probable que los primeros 15 nucleótidos de dicha región sean responsables de esta inhibición ya que la fusión *catA::lacZ* que los contiene (TRN5) se comportó igual que la fusión con toda la región 5'UTR del ARNm de *catA* (TRN3). Sería interesante mutar esta región y ver su efecto en la traducibilidad del mensajero. Por otra parte, es interesante destacar que el factor encargado de la inhibición de la traducción sólo parece ser activo en condiciones de tensión oxidativa.

En nuestros experimentos no exploramos el papel que puedan jugar las regiones codificadora y 3'UTR de *catA* en la estabilidad de mensaje.

Capítulo IV. Caracterización de la región río arriba del inicio de la transcripción de *catA*.

En el Capítulo II se demostró que una fusión *catA::lacZ* (cepa TRN3, plásmido pREN8) que contenía 1.4 kb de la región río arriba del inicio de la transcripción de *catA*, se regula igual que *catA* (Navarro y Aguirre, 1998). En la Figura 1, se muestra la secuencia de esta zona. Mediante un análisis usando el programa de computo "Signal Scan", que analiza regiones de ADN para buscar secuencias parecidas a sitios de unión para factores de transcripción conocidos en eucariotes (Prestridge, 1991), se encontraron ciertos elementos y algunos de ellos se señalan en la Figura 1.

El elemento ADR-1 se encuentra en la región reguladora de la catalasa CTA1 de levadura. Adr1p es una proteína activadora de la transcripción, que también activa al gen ADH2 que codifica para una alcohol deshidrogenasa de *S. cerevisiae*. Este último gen se reprime por glucosa. Adr1p también es necesaria para la proliferación de los peroxisomas en presencia de ácido oleico (Ruis y Koller, 1997). La secuencia de *catA* contiene 7 posibles elementos ADR-1. *catA* se acumula en privación de carbono (Navarro y Aguirre, 1998), sería interesante analizar si este elemento es responsable de esta respuesta. CREB juega un papel en la regulación de la transcripción dependiente de AMPc y también parece activar genes en respuesta a la entrada de calcio (Montminy, 1997). Las regiones reguladoras de *catA* presentaron 3 posibles cajas de unión para este factor.

Se encontró un posible sitio de unión para el factor transcripcional AP-1, el cual esta compuesto por los productos de los proto-oncogenes c-jun y c-fos, que se inducen en la respuesta antioxidante. La unión de AP-1 al ADN esta regulada por el estado redox (Ruis y Koller, 1997). c-Myc y c-Myb son oncogenes que regulan la proliferación celular y desarrollo en vertebrados (Martin y Paz-Ares, 1997; Facchini y Penn, 1998). En *catA* se encuentra una secuencia parecida al sitio de unión de cada uno de estos factores transcripcionales.

Se encontraron 5 sitios consenso para HapC de *A. nidulans*. Su homólogo, HAP3 de levadura participa en la activación transcripcional de genes regulados por hemo, tales como los citocromos (Zitomer y Lowry, 1992).

Finalmente, se detectaron 4 cajas para GCN4. Este factor transcripcional es importante para la expresión de genes que participan en la síntesis de amino ácidos. Se ha sugerido que Gcn4p controla parcialmente la respuesta a luz ultravioleta. Debido a esto, es posible que pueda jugar algún papel en la tensión oxidativa (Jamieson y Storz, 1997). Debido a que el mensajero de *catA* se acumula en respuesta a privación de nitrógeno (Navarro y Aguirre, 1998), es posible que el homólogo de GCN4 pudiera jugar algún papel en esta regulación.

computadora usando el programa "Signal Scan" (Prestridge, 1991, este programa esta disponible en la dirección de internet: <http://bimas.dcrn.nih.gov/molbio/signal>). Los puntos indican la caja TATA propuesta. Los asteriscos indican inicios de la transcripción, los rectángulos la caja ADR-1, las bases en letras itálicas y subrayadas indican la caja AP-1, las cajas c-Myb y c-Myc se señalan en itálicas y negrillas, HAPC se indica con una caja ovalada, el elemento CREB se señala en negrillas y la caja para GCN4 esta subrayada. Al comparar esta secuencia con la base de datos de cDNA de *A. nidulans*, ESTs (ver la Figura 2) se encontró una C extra que corresponde a la posición 17 y la ausencia de una T y una A entre los nucleótidos 641-642 y 669-670, respectivamente.

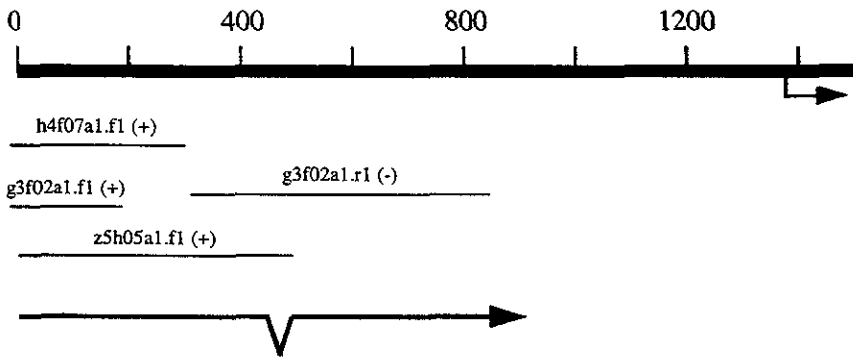


Figura 2. La región 5' del gen *catA* contiene un transcrito con función desconocida. La región de 1.4 kb mostrada en la Figura anterior fue sometida a un análisis tipo BLAST usando la base de datos de clonas de cDNA de *Aspergillus nidulans*, ESTs con el fin de buscar clonas correspondientes a este marco de lectura. Se encontraron cuatro clonas con identidad a diferentes regiones. Todas se señalan con líneas y se da el nombre para cada una de ellas. El signo positivo quiere decir que corresponden a la hebra + y negativo a la hebra complementaria. Las clonas h4f07a1.f1, g3f02a1.f1 y z5h05a1.f1 se superlapan en las regiones que se esquematizan en esta Figura. Posteriormente, se sometió la misma secuencia a un análisis de marcos de lectura abierto (Programa MAP del GCG) y se encontró un marco de aproximadamente 900 nt (flecha). El marco contiene 307 aa, comienza en el nucleótido número dos de la secuencia mostrada en a Figura 1 y termina en el nucleótido 969. La interrupción de la flecha gruesa indica un intrón, de acuerdo con la secuencia de los cDNAs z5h05a1.f1 y g3f02a1.r1. La numeración en la barra gruesa representa la longitud en pares de bases. La flecha en escuadra indica el inicio de la transcripción de *catA*.

Se comparó la región reguladora contenida en la fusión *catA::lacZ* (Figura 1) con las clonas de cDNA de *A. nidulans* de la base de datos ESTs (BLAST) y se encontraron cuatro clonas que presentan una identidad casi total (Figura 2). Ninguna de estas clonas presenta similitud con genes reportados anteriormente en

análisis tipo FASTA a nivel de nucleótidos. Posteriormente, se hizo una búsqueda de marcos de lectura abiertos en la región 5' de *catA* y se encontró un marco de lectura abierto, dentro de los primeros 900 pares de bases, que es interrumpido por un intrón de 46 nt, de acuerdo con la secuencia de las clonas de cDNA z5h05a1.f1 y g3f02a1.r1. Por otra parte, el péptido derivado de esta secuencia no mostró similitud con proteínas reportadas anteriormente en un análisis tipo BLAST.

Usando como sonda un fragmento *ApaI* del plásmido pREN1 (Navarro *et al.*, 1996) que contiene parte de la región codificadora (~500 pb) y regiones río arriba del ATG de *catA* (~2.5 kb) para hibridar un membrana con ARN total de cultivos conidiantes, se detectó un mensaje de peso molecular menor al ribosomal 18S, el cual se regula durante el desarrollo asexual. Se detectó una señal tenue a las 0 h de diferenciación la cual se fue acumulando, observando el máximo de acumulación a las 25 h y no se detectó en conidias aisladas (datos preliminares que no se muestran). Los datos mostrados en este capítulo indican que dentro de las primeras 900 pb de la región mostrada en la Figura 1 se encuentra un gen con función desconocida. Sería interesante remover las secuencias correspondientes y ver si se afecta la conidiación, al tiempo que también se delimitaría mejor la región promotora de *catA*.

CONCLUSIONES Y MODELO DE REGULACIÓN DE *catA*

1.- El hongo *A. nidulans* posee al menos tres genes de catalasa, denominados *catA* (este trabajo), *catB* (Kawasaki *et al.*, 1997) y *catC* (Kawasaki y Aguirre, sin publicar). El gen *catA* predice una catalasa de 744 aminoácidos con una alta similitud con catalasas de procariontes, la cual se localiza en esporas tanto asexuales (conidias) como sexuales (ascosporas) de manera independiente del gen regulador *brlA*, el cual es indispensable para la esporulación asexual. La catalasa A parece ser una enzima muy estable, parte de la cual se localiza en la pared celular de las esporas asexuales lo cual podría estar relacionado con la protección que confiere a dichas esporas contra el H₂O₂ exógeno (Navarro *et al.*, 1996; Navarro y Aguirre, 1998).

2.- La regulación postranscripcional del gen *catA* es el mecanismo molecular que determina la localización celular de la catalasa A. Dicha regulación depende de la región 5'UTR del ARNm de *catA*, la cual parece regular, de manera simultánea, la estabilidad y la traducción del ARNm. El mensajero de *catA* solo se traduce en células del conidióforo (métulas, fiálides y conidias) y en ascosporas (Navarro y Aguirre, 1998; esta tesis).

En base a los resultados obtenidos durante la realización de este trabajo, proponemos el siguiente modelo para explicar la regulación del gen *catA*. En la Figura 1A se muestra una hifa en crecimiento, condición en la que no se detecta ni el mensaje ni la proteína CatA (Navarro *et al.*, 1996). En 1B se muestran hifas sujetas a tensión oxidativa, osmótica o a privación de nutrientes, en donde el mensaje de *catA* se acumuló pero no se detectó actividad de la catalasa A (Navarro y Aguirre, 1998). Proponemos que en estas condiciones el gen *catA* se transcribe, al mismo tiempo que se acumula una proteína, ya sea por síntesis *de novo* o por activación de un polipéptido existente, la cual se une al ARNm estabilizándolo e impidiendo su traducción. Esta proposición se deriva de los experimentos mostrados en el capítulo II en donde se observó que al exponer micelio en crecimiento a diferentes condiciones de tensión fisiológica el ARNm de *catA* se acumuló (Fig. 5, capítulo II); sin embargo no se observó actividad de catalasa A en geles de proteínas nativas en las mismas condiciones de tensión fisiológica (no se muestra). Por otra parte en el capítulo III se mostró que la sobreexpresión de la

cepa TRN4 (fusión *alcA(p)::catA(l)::catA*) durante el crecimiento provocó que el mensaje se acumulara y se tradujera aunque en menor proporción con respecto a la

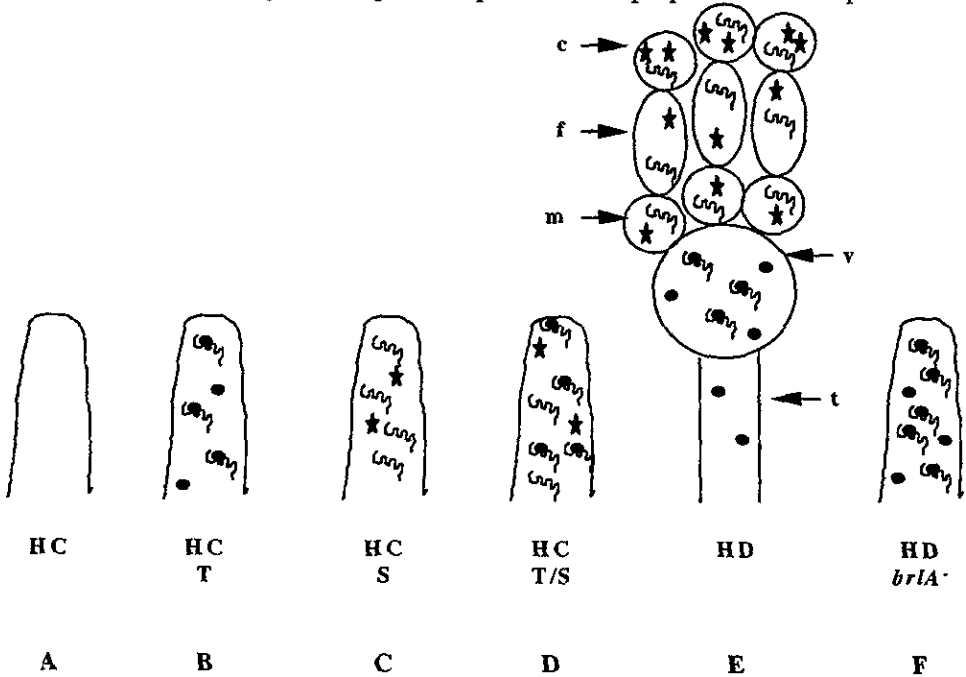


Figura 1. Modelo propuesto para explicar la localización celular específica de la catalasa A y el ARNm correspondiente. El modelo representa seis diferentes condiciones fisiológicas que se discuten en el texto. HC, representa hifas en crecimiento; HD, hifas en diferenciación o conidiación; T, tensión oxidativa, osmótica o por privación de nutrientes; S, sobreexpresión; *brlA* indica una cepa mutante incapaz de conidiar; t, tallo; v, vesícula; m, métulas; f, fiálides; c, conidias. Las líneas onduladas representan ARNm de *catA*; los círculos negros representan una proteína que al unirse al mensajero de *catA* lo estabiliza e inhibe su traducción en cualquier tipo celular distinto de las métulas, fiálides, conidias y ascosporas. Las estrellas representan a la catalasa A.

fusión que no tiene la región 5'UTR de *catA*, cepa TRN7. Sin embargo, una combinación de la sobreexpresión del gen *catA* en presencia de paraquat provocó que el mensaje se acumulará en mayor cantidad pero en la cepa TRN4 (*alcA(p)::catA(l)::catA*) no se observó un aumento en la actividad de catalasa A proporcional a la cantidad de mensaje acumulado (Figs. 7 y 8 del capítulo III). En

la Figura 1C del modelo se muestra que cuando se sobreexpresa *catA* durante el crecimiento si hay traducción del mensaje pero cuando se sobreexpresa en condiciones de tensión oxidativa el mensaje que se acumula no se traduce (Fig. 1D).

Durante la conidiación (Fig. 1E), proponemos que la exposición del micelio al aire es una condición de tensión oxidativa (semejante al tratamiento con el oxidante paraquat; Figs. 7 y 8, capítulo III) como la mostrada en el modelo en la Fig. 1D. A través de un mecanismo desconocido, la proteína inhibidora de la traducción desaparece o se inactiva en mótulas, fiálides y conidias y el mensaje de *catA* se traduce. En una mutante *brlA*⁻ (Fig. 1F), la conidiación no ocurre y por lo tanto, el mensajero de *catA* no se traduce o lo hace pobremente, aún después de muchas horas de exposición al aire. Sin embargo, el ARNm debe permanecer estable para explicar que 1 ó 2 semanas más tarde se traduzca y se acumule catalasa A en las esporas sexuales formadas por una mutante *brlA*⁻ (Navarro y Aguirre, 1998).

Se conocen casos en los que la región 5'UTR de algunos ARN mensajeros une proteínas que impiden su traducción. Este es el caso de la superóxido dismutasa de testículo de ratón (Curtis *et al.*, 1995) a cuya región 5'UTR se le une una proteína que no se ha clonado aún. Por otra parte, se ha encontrado una proteína involucrada en la traducción del mensaje de la proteína D1 del centro de reacción fotosintética (*psbA*) del alga verde *Chlamydomonas reinhardtii*. Esta proteína se une a la región 5'UTR del mensaje y es una proteína de unión a secuencias de poliadeninas (cPABP). Una segunda proteína copurificó con la cPABP y se encontró que modulaba su unión al 5'UTR del mensajero de *psbA* cambiando su potencial redox en respuesta a la luz (Kim y Mayfield, 1997).

Estos datos nos sugieren que es probable que alguna proteína desconocida se una a la región 5'UTR del mensajero de *catA* e impida su traducción, también esta proteína podría estar regulada por un estado redox. La evidencia presentada en este trabajo sugiere que los primeros 15 nt de la región 5'UTR de *catA* son responsables de esta regulación. Sería interesante hacer una delección de estos nucleótidos y probar su importancia. Para probar el modelo propuesto en esta tesis sería interesante estudiar si alguna proteína se une al 5'UTR del mensajero de *catA* y estudiar si su unión al mensajero responde a su estado de oxidación-reducción.

Existe una gran variedad de reportes de mensajeros que se unen al citoesqueleto y son transportados a lugares en donde se requiere su traducción (revisado en St Johnston, 1995 y Micklem, 1995). Aquí solo voy a mencionar un

caso por su relevancia para este trabajo. Durante el ciclo asexual de la levadura *S. cerevisiae*, la célula madre puede cambiar de tipo de apareamiento, mientras que las células hijas no pueden. Esto se debe a la expresión selectiva del gen HO, el cual codifica para una endonucleasa. Esta expresión se debe a la acumulación asimétrica del represor transcripcional, Ash1p en las células hijas, por medio de un proceso dependiente de actina y miosina. Un elemento en la región 3'UTR del mensajero de ASH1 es suficiente para localizar este mensaje (Long *et al.*, 1997). Llama la atención el hecho de que la actividad de la catalasa A es mucho mayor en ciertas estructuras del conidióforo como son métulas, fiálides y conidias. Sería interesante estudiar si la traducción y la probable localización del mensajero de *catA* esta asociada con cambios en el citoesqueleto.

¿Para qué le sirve al hongo un ARN mensajero que se acumula en respuesta a diversas condiciones de tensión fisiológica pero que no es capaz de llegar a formar una enzima? El solo gasto de energía de transcribir un gen que no es capaz de formar una enzima en ciertas condiciones parece absurdo pero existen varias explicaciones. Una podría ser que *catA* surgió de un conjunto de catalasas que responden a diversas condiciones de tensión fisiológica pero que ha perdido la capacidad de ser funcional en dichas condiciones, es decir, que la respuesta de *catA* sea ancestral. La otra respuesta es que para la célula sea muy importante tener una catalasa acumulada en las esporas que las proteja de condiciones adversas, para ello la célula ha creado un mecanismo que asegura que los mensajes importantes para las esporas lleguen a ellas, sin perderse en el camino. En condiciones de tensión metabólica la célula tiene que protegerse y prende su sistema de esporulación. Sin embargo, en otras condiciones como privación de nutrientes que provocan que la célula se diferencie, no parece inútil la acumulación de mensajero de *catA* ya que finalmente va a servir para proteger a las esporas (Navarro y Aguirre, 1998). En otros casos de tensión como son oxidativa y osmótica la célula estaría siendo engañada y acumula el mensajero de *catA*, aunque sería interesante probar si en tiempos más largos de los ensayados el mensaje acumulado se traduce o se degrada.

¿Por qué existen redundancia de genes que codifican para catalasas en *A. nidulans*? Existen tres catalasas en *A. nidulans*, la catalasa B se induce en respuesta a tensión oxidativa y privación de nutrientes (Kawasaki *et al.*, 1997; Navarro y Aguirre, este trabajo). En caso de tensión oxidativa y nutricional la catalasa B defiende a la célula en contra de condiciones adversas. La catalasa C ha

sido descubierta recientemente (Kawasaki y Aguirre, sin publicar) y se induce durante la fase estacionaria y en respuesta a limitación de nutrientes. Tanto la catalasa A como la B se encuentran localizadas en la pared celular del hongo (Navarro y Aguirre, sin publicar; Kawasaki y Aguirre, sin publicar); sin embargo, la expresión temporal de ambas catalasas es diferente. Creemos que existe redundancia de genes para asegurar que cada catalasa se regule en condiciones distintas en donde la célula requiere a estas enzimas.

	CRECIMIENTO	FASE ESTACIONARIA	CONIDIACION	TESION OXIDATIVA	PRIVACION DE NUTRIENTES
<i>catA</i> mensajero	--	N.D.	xxx	x	xx
<i>catB</i> mensajero	xx	N.D.	--	N.D.	xxx
<i>catC</i> mensajero	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
CatA proteína	--	--	XXX	--	--
CatB proteína	XX	XXX	X	XXX	XX
CatC proteína	--	XX	--	--	X

Tabla I. Acumulación de mensajero o de actividad de catalasa en diferentes condiciones de crecimiento y tensión fisiológica. Los guiones significan que no se detectó mensajero o proteína; las cruces indican el grado de acumulación del mensajero o de la proteína y N.D. quiere decir que no fue determinado.

En la tabla I se muestra el patrón de acumulación de mensajero y actividad de catalasa. Durante el crecimiento solo se detecta la actividad de catalasa B y su actividad va aumentando conforme avanza el crecimiento del microorganismo (Navarro *et al.*, 1996), durante la fase estacionaria tardía la actividad de CatB aumenta y la catalasa C comienza a acumularse (Kawasaki y Aguirre, sin publicar). Durante la conidiación la actividad de CatB también aumenta pero su acumulación se ve disminuida en las conidias en donde CatA se encuentra en abundancia (Navarro *et al.*, 1996). En condiciones de tensión oxidativa, el mensajero de *catA* se induce, sin embargo, no se detecta actividad de CatA (Navarro y Aguirre, 1998). En estas mismas condiciones la actividad de CatB aumenta siendo esta catalasa la responsable de la defensa celular. Durante la privación de nutrientes CatC y en mayor medida CatB, aumentan considerablemente su actividad (Kawasaki y Aguirre sin publicar; Navarro y Aguirre sin publicar), mientras el mensajero de *catA* se acumula pero no se traduce hasta que las conidias se han formado varias horas después (Navarro y Aguirre, 1998).

El mensajero de *catA* parece regularse en cierta forma muy parecido a la catalasa CTT1 de *S. cerevisiae*, esta última se induce por tensión oxidativa, osmótica y esta reprimida por carbono (revisado en Ruis y Koller, 1997). Sin embargo, el mensajero de *catA* esta sujeto a un segundo nivel de regulación diferente que impide su traducción hasta el momento de formar esporas (Navarro y Aguirre, 1998).

Se desconoce el papel que juega la transcripción en la acumulación del mensajero de *catA*, pero se cuentan con las herramientas necesarias para responder esta pregunta. Creemos que el estudio de la regulación del gen *catA* es un modelo interesante para entender tanto la respuesta celular antioxidante, como los mecanismos de regulación genética que se utilizan durante la diferenciación celular para expresar funciones de manera selectiva en el tiempo y en el espacio.

Durante la realización de este trabajo se encontró un mecanismo novedoso de regulación de ARNm que podría ser un fenómeno más generalizado para el hongo. Podría ser que algunos de los mensajeros que se acumulan en esporas presenten este tipo de regulación en el que su traducción esta acoplada a la formación de estructuras de resistencia. Aún quedan muchas preguntas por resolver como, ¿Cuál es la proteína encargada de la inhibición de la traducción?, ¿Cuántos mensajeros más presentan este tipo de regulación?, ¿Qué otros mecanismos de regulación operan sobre el gen *catA*?, etc. En este trabajo se generaron varias herramientas que serán de mucha ayuda en tratar de resolver estas interrogantes.

BIBLIOGRAFÍA

- Adams, T.H., Boylan, M.T. y Timberlake, W.E. 1988. *brlA* is necessary and sufficient to direct conidiophore development in *Aspergillus nidulans*. Cell 54:353-362.
- Adams, T.H. y Timberlake, W.E. 1990. Developmental repression of growth and gene expression in *Aspergillus*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:5405-5409.
- Aguirre, J., Adams, T.H. y Timberlake, W.E. 1990. Spatial control of developmental regulatory genes in *Aspergillus nidulans*. Exp. Mycol. 14:290-293.
- Aguirre, J. 1993. Spatial and temporal controls of the *Aspergillus brlA* developmental regulatory gene. Mol. Microbiol. 8:211-218.
- Andrianopoulos, A. y Timberlake, W.E. 1994. The *Aspergillus nidulans abaA* gene encodes a transcriptional activator that acts as a genetic switch to control development. Mol. Cell. Biol. 14:2503-2515.
- Aramayo, R. y Timberlake, W.E. 1993. The *Aspergillus nidulans ya* gene is directly regulated by the *abaA* gene. EMBO J. 12:2039-2048.
- Bagyan, I., Casillas-Martínez L. y Setlow, P. 1998. The *katX* gene, which codes for the catalase in spores of *Bacillus subtilis*, is a forespore-specific gene controlled by σ^F , and *katX* is essential for hydrogen peroxide resistance of the germinating spore. J. Bacteriol. 180:2057-2062.
- Boylan, M.T., Mirabito, P.M., Willett, C.E., Zimmerman, C.R. y Timberlake, W.E. 1987. Isolation and physical characterization of three essential conidiation genes from *Aspergillus nidulans*. Mol. Cell. Biol. 7:3113-3118.
- Bradford, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72:248-254.
- Calera, J.A., Paris, S., Monod, M., Hamilton, A.J., Debeaupuis, J.P., Diaquín, 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.
- Champe, S.P., Nagle, D.L. y Yager, L.N. 1994. Sexual sporulation. en *Aspergillus: 50 years on*. Vol. 29. Elsevier Science B.V., Amsterdam. 430-431.
- Chary, P. y Natvig, D. 1989. Evidence for three differentially regulated catalase genes in *Neurospora crassa*: effects of oxidative stress, heat shock and development. J. Bacteriol. 171:2646-2652.

- Choi, H.J., Kang, S.W., Yang, Ch.H., Rhee, S.G. y Rhy, S.E. 1998. Crystal structure of a novel human peroxidase enzyme at 2.0 Å resolution. *Nat. Struct. Biol.* 5:400-406.
- Clerch, L., Iqbal, J. y Massaro, D. 1991. Perinatal rat lung catalase gene expression: influence of corticosteroid and hyperoxia. *Am. J. Physiol.* 260:L428-433.
- Clerch, L.B. and Massaro, D. 1992. Oxidation-reduction-sensitive binding of lung protein to rat catalase mRNA. *J. Biol. Chem.* 267:2853-2855.
- Clerch, L.B. 1995. A 3' untranslated region of catalase mRNA composed of a stem-loop and dinucleotide repeat elements binds a 69 kDa redox-sensitive protein. *Arch. Biochem. Biophys.* 317:267-274.
- Clerch, L.B., wright, A. y Massaro, D. 1996. Dinucleotide-binding site of bovine liver catalase mimics a catalase mRNA-binding protein domain. *Am. J. Physiol.* L790-L794.
- Clutterbuck, A.J. 1969. A mutational analysis of conidial development in *Aspergillus nidulans*. *Genetics* 63:317-327.
- Cohen, G., Fess, 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.* 200:74-79.
- Curtis, D., Lehmann, R. y Zamore, P.D. 1995 Translational regulation in development. *Cell* 81:171-178.
- Demple, B. y Amáñile-Cuevas, C.F. 1991. Redox redux: The control of oxidative stress responses. *Cell* 67:837-839.
- Dutton, J.R., Johns, S. y Miller, B.L. 1997. StuAp is a sequence-specific transcription factor that regulates developmental complexity in *Aspergillus nidulans*. *EMBO J.* 16:5710-5721.
- Eisenstark, A., Calcutt, M.J., Becker-Hapak, M. e Ivanova, A. 1996. Role of *Escherichia coli* *rpoS* and associated genes in defence against oxidative damage. *Free Rad. Biol. and Med.* 21:975-993.
- Facchino, L.M. y Penn, L.Z. 1998. The molecular role of Myc in growth and transformation: recent discoveries lead to new insights. *FASEB J.* 12:633-651.
- Felenbok, B.D., Scqueval, M.M., Sibley, S., Gwynne, D.I. y Davies, R.W. 1988. The ethanol regulon in *Aspergillus nidulans*: characterization and sequence of the positive regulatory gene *alcR*. *Gene* 74.385-396.

- Fidel, S., Doonan, J.H. y Morris, N.R. 1988. *Aspergillus nidulans* contains a single actin gene which has unique intron locations and encode a γ -actin. *Gene*. 70:283-293.
- Gu, W.C., Morales, C. y Herch, N.B. 1995. In male mouse germ cells Cu/Zn superoxide dismutase (SOD-1) utilizes alternative promoters which produce multiple transcripts with different translational potential. *J. Biol. Chem.* 270:236-243.
- Gu, W. y Hecht, N.B. 1996. Translational of a testis-specific Cu/Zn superoxide dismutase (SOD-1) mRNA is regulated by a 65-kilodalton protein which binds to its 5' untranslated region. *Mol. Cel. Biol.* 16:4535-4543.
- Gwynne, D.I., Buxton, F.P., Sibley, S., Davies, R.W., Lockington, R.A., Scazzocchio, C. y Sealy-Lewis, H.M. 1987. Comparison of the cis-acting control regions of two coordinately controlled genes involved in ethanol utilization in *Aspergillus nidulans*. *Gene* 51:205-216.
- Halliwell, B. y Gutteridge, J.M.C. 1984. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem. J.* 219:1-14.
- Han, J.R., Yiu, G.K. y Hecht, N.B. 1995. Testis/brain RNA-binding protein attaches translationally repressed and transported mRNAs to microtubules. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:9550-9554.
- Harris, H. y Hopkinson, D.A. 1976. Handbook of enzyme electrophoresis in human genetics. North-Holland Publishing Co., Amsterdam. pp:1-2.
- Hartig, A. y Ruis, H. 1986. Nucleotide sequence of the *Saccharomyces cerevisiae* CTT1 gene and deduced aminoacid sequence of yeast catalase T. *Eur. J. Biochem.* 160:487-490.
- Haslekas, C., Stacy, R.A., Nygaard, V., Culiáñez.Macia, F.A. y Aalen, R.B. 1998. The expression of a peroxiredoxin antioxidant gene, *AtPer1*, in *Arabidopsis thaliana* is seed-specific and related to dormancy. *Plant. Mol. Biol.* 36:833-845.
- Hasberg, W. y Aguirre, J. 1990. Hyperoxidant states cause microbial cell differentiation by cell isolation from dioxygen *J. Theor. Biol.* 142:201-221.
- Hauptmann, N. y Cadenas, E. 1997. The oxygen paradox: biochemistry of active oxygen. en *Oxidative stress and the molecular biology of antioxidant defences*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York. 1-20.
- Hengge-Aronis, R. 1993. Survival of hunger and stress: The role of *rpoS* in early stationary phase gene regulation in *E. coli*. *Cell* 72:165-168.

- Inoue, H., Nojima, H. y Okawa, 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, Ch.J., Fearon, E.R., Sundaresan, M., Finkel, T. y Goldschmidt-Clermont, P.J. 1997. Mitogen signaling mediated by oxidants in Ras-transformed fibroblast. *Science*. 275:1649-1652.
- Jacks, T.J. y Davidonis, G.H. 1996. Superoxide, hydrogen peroxide, and the respiratory burst of the fungus infected plant cells. *Mol. Cell. Biochem.* 158:77-79.
- Jackson, R.J. y Wickens, M. 1997. Translational controls impinging on the 5'-untranslated region and initiation factor proteins. *Curr. Opin. Genet. Develop.* 7:233-241.
- Johnstone, I.L., Hughes, S.G. y Clutterbuck, A.J. 1985. Cloning an *Aspergillus nidulans* developmental gene by transformation. *EMBO J.* 4:1307-1311.
- Jamieson, D.J. y Storz, G. 1997. Transcriptional regulators of oxidative stress responses. en: *Oxidative stress and the molecular biology of antioxidant defenses*. Jonh G. Scandalios (ed.). Col Spring Harbor Laboratory Press. 309-342.
- Jin, D.Y., Chae, H.Z., Rhee, S.G. y Jeang, K.T. 1997. Regulatory role for a novel human thioredoxin peroxidase in NF κ B activation. *J. Biol. Chem.* 272:30952-30961.
- Käfer, E. 1977. Meiotic and mitotic recombination in *Aspergillus nidulans* 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.* 179:3284-3292.
- Kim, J. y Mayfield, S.P. 1997. Protein disulfide isomerase as a regulator of chloroplast translational activation. *Science* 278:1954-1957.
- Koloteva, N., Muller, P.P. y McCarthy, J.E. 1997. The position dependence of translational regulation via RNA-RNA and RNA- protein interactions in the 5'-untranslated region of eukaryotic mRNA is a function of the thermodynamic competence of 40S ribosomes in translational initiation. *J. Biol. Chem.* 272:16531-16539.
- Kwon, Y.K. y Hecht, N.B. 1991. Cytoplasmic protein binding to highly conserved sequences in the 3'-untranslated region of mouse protamine 2 mRNA, a translationally regulated transcript of male germ cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:3584-3588.

- Kwon, Y.K. y Hecht, N.B. 1993. Binding of a phosphoprotein to the 3' untranslated region of the mouse protamine 2 mRNA temporally represses its translation. *Mol. Cell. Biol.* 13:6547-6557.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680
- Law, D.J. y Timberlake, W.E. 1980. Developmental regulation of laccase levels in *Aspergillus nidulans*. *J. Bacteriol.* 144:509-517.
- Levine, A., Tenhaken, R., Dixon, R. y Lamb, C. 1994. H₂O₂ from the oxidative bursts orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. *Cell* 79:583-593.
- Lledías, F. Rangel, P y Hansberg, W. 1998. Oxidation of catalase by singlet oxygen. *J. Biol. Chem.* 273:10630-10637.
- Loewen, P.C. Bacterial catalases. 1997. en *Oxidative stress and the molecular biology of antioxidant defences*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York. 273-308.
- Long, R.M., Singer, R.H., Meng, X., Gonzalez, I. Nasmyth, K. y Jansen R.P. 1997. Mating type switching in yeast controlled by asymmetric localization of ASH1 mRNA. *Science* 277:383-387.
- Martinelli, S.D. y Clutterbuck, A.J. 1971. A quantitative survey of conidiation mutants in *Aspergillus nidulans*. *J. Gen. Microbiol.* 69:261-268.
- Marshall, M.A. y Timberlake, W.E. 1991. *Aspergillus nidulans wetA* regulates spore-specific gene expression. *Mol. Cell. Biol.* 11:55-62.
- Mathie, M. y Felenbok, B. 1994. The *Aspergillus nidulans* CREA protein mediates glucose repression of the ethanol regulon at various levels through competition with the ALCR-specific transactivator. *EMBO J.* 13:4022-4027.
- Marhoul, J.F. 1996. Tesis de Doctorado: Isolation and characterization of developmental genes in *Aspergillus nidulans*. Universidad de Texas A&M.
- Martin, C. y Paz-Ares, J. 1997. MYB transcription factors in plants. *Trends. Genet.* 13:67-73.
- Meyer, M., Schreck, R. y Baeuerle, P.A. 1993. H₂O₂ and antioxidants have opposite effects on activation of NF- κ B and AP-1 in intact cells: AP-1 as secondary antioxidant-responsive factor. *EMBO J.* 12:2005-2015.
- Micklem, D.R. 1995. mRNA localization during development. *Dev. Biol.* 172:377-395).

- Miller, K.Y., Toennis, T.M., Adams, T.H. y Miller, B.L. 1991. Isolation and transcriptional characterization of a morphological modifier: the *Aspergillus nidulans* stunted (*stuA*) gene. *Mol. Gen. Evol.* 227:285-292.
- Mirabito, P.M., Adams, T.H. y Timberlake, W.E. 1989. Interactions of three sequentially expressed genes control temporal and spatial specificity in *Aspergillus* development. *Cell* 57:859-868.
- Montminy, M. 1997. Transcriptional regulation by cyclin AMP. *Ann. Rev. Biochem.* 66:807-822.
- Navarro, R. E. 1995. Tesis de Licenciatura: Caracterización de un gen de catalasa de *Aspergillus nidulans*. Facultad de Ciencias, UNAM.
- Navarro, R.E., Stringer, M.A., Hasberg, W., Timberlake, W.E. y Aguirre, J. 1996. *catA*, a new *Aspergillus nidulans* gene encoding a developmentally regulated catalase. *Curr. Genet.* 29:352-359.
- Navarro, R.E. y Aguirre, J. 1998. Posttranscriptional control mediates cell type-specific localization of catalase A during *Aspergillus nidulans* development. 180:000-000. (En prensa).
- Prestridge, D.S. 1991. SIGNAL SCAN: A computer program that scans DNA sequences for eukaryotic transcriptional elements. *Cabios* 7:203-206.
- Reimer, D.L., Bailley, J. y Singh, S.M. 1994. Complete cDNA and 5' genomic sequences and multilevel regulation of the mouse catalase gene. *Genomics* 21:325-336.
- Reimer, D. L. y Singh, S.M. 1996. Distinct mRNA-binding proteins interacting with short repeat sequences of the 3'UTR may be involved in the post-transcriptional regulation of the mouse catalase gene, *Cas-1*. *DNA Cell Biol.* 15:317-328.
- 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. pp:108-133.
- 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*. Jonh G. Scandalios (ed.). Col Spring Harbor Laboratory Press. 309-342.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. y Maniatis, T. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor, N.Y.

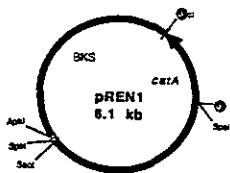
ESTA TEXA NO DEBE SER COPIADA
 SALIR

BIBLIOGRAFÍA

- Scandalios, J.G., Guan, L. y Polidoros, A.N. 1997. Catalases in plants: gene structure, properties, regulation, and expression. en: Oxidative stress and the molecular biology of antioxidant defenses. Jonh G. Scandalios (ed.). Col Spring Harbor Laboratory Press. 309-342.
- Skromne, I., Sánchez O. y Aguirre, J. 1995. Starvation stress modulates the expression of the *Aspergillus nidulans briA* regulatory gene. *Microbiology* 141:21-28.
- St. Jonhson, D. 1995. The intracellular localization of messenger RNAs. *Cell* 81:161-170.
- Son, T. y Kolaparthi, V.S.R. 1994. Developmental decisions in *Aspergillus nidulas* are modulated by Ras activity. *Mol. Cell. Biol.* 14:5333-5348.
- Sundaresan, M., Yu, Z.X., Ferrans, V.J., Irani, K y Finkel, T. 1995. Requirement for generation of H₂O₂ for platelet-derived growth factor signal transduction. *Science* 270:296-299.
- Triggs-Raine, B.L., Doble, B.W., Mulvey, M.R., Sorby, P.A. y Loewen, P.C. 1988. Nucleotide sequence of *katG*, encoding catalase HPI of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 170:4415-4419.
- Yager, L.N. 1992. Early developmental events during asexual and sexual sporulation in *Aspergillus nidulans*. en *Aspergillus*, biology and industrial applications. Ed. Beneett, J.W. y Klich, M.A. Butterworth-Heinemann Publications. Londres. pp:19-42.
- Yelton, M.M. , Hamer, J.E. y Timberlake, W.E. 1984. Transformation of *Aspergillus nidulans* by using a *trpC* plasmid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:1470-1474.
- Zitomer, R.S. y Lowry, C.V. 1992. Regulation of gene expression by oxygen in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Rev.* 56:1-11.

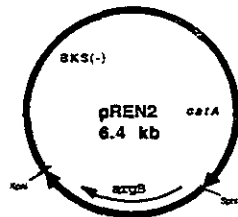
APÉNDICE I

En este apéndice se muestran los plásmidos utilizados para la realización de este trabajo. Todos los plásmidos se encuentran en archivos electrónicos que tienen el mismo nombre. Para cada plásmido se muestra el peso molecular, nombre, sitios de corte que los caracterizan y las secuencias principales que contiene, también se describe brevemente la manera en que se construyeron.



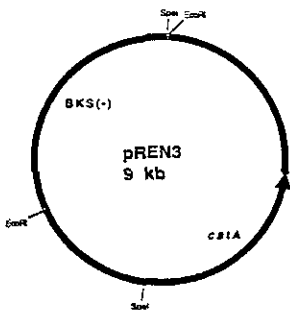
Comentarios

Este es el plásmido pREN1 que contiene la región codificadora de *catA* desde el sitio *SacI* hasta 2.5 kb río arriba de *ATG*. Este fragmento de 3.5 kb digeno con *SacI* del cosmido W22C01 y clonado en BKS-



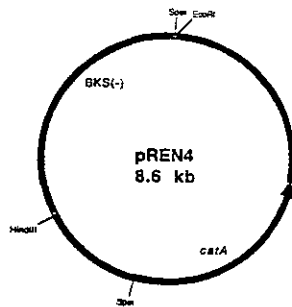
Comentarios:

El plásmido pOS1 se digirió con *SphI*/*XbaI* y la banda de 4.7 kb se usó. Con esta banda y una de 1.7 kb que contiene *argB* proveniente del plásmido pDC1 se construyó este plásmido



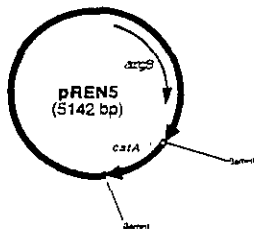
Comentarios.

El cosmido W22C01 se digirió con *EcoRI* y la banda de 8 kb se clonó en BKS(-)



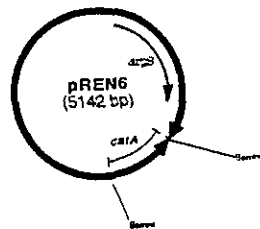
Comentarios

Este es el plásmido pREN4 que proviene de la digestión del pREN3 con *HindIII* con el propósito de quitar un sitio *EcoRV* en el extremo 3' con respecto a *catA* para posteriores manipulaciones.



Comentarios:

Este es el plásmido pREN5 que proviene del pDC1. Un fragmento *BamHI* de 600 pb del pOS1 se clonó en el sitio *BamHI* del pDC1. Este plásmido se usó para interrumpir *catA*.

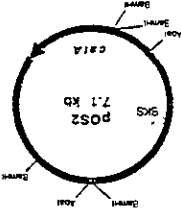


Comentarios:

Este es el plásmido pREN6 que proviene de la clonación de un fragmento *BamHI* de 600 pb del pOS1 en el pDC1. La diferencia con el plásmido pREN5 es la orientación del inserto.

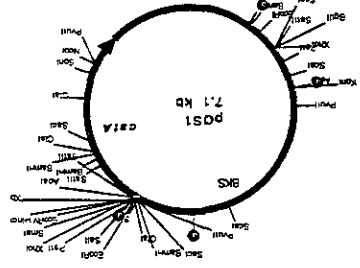
Este es el plásmido POS2 que contiene un fragmento Apal de 4.2 kb proveniente del cosmido W22C01 y está clonado en BKS-

Comentarios:



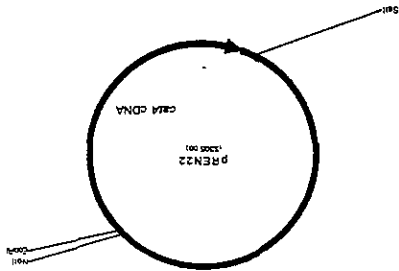
Este es el plásmido POS1 que contiene un fragmento Apal de 4.2 kb proveniente del cosmido W22C01 y está clonado en BKS- (Navarro et al. 1996).

Comentarios:



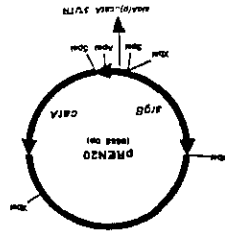
Se amplificó cDNA usando el oligo AP (GIBCO BRL 7'RACE) y del cDNA se hizo PCR usando los oligos ccat2 y AUAP (GIBCO). El resultado fue el cDNA completo de ccat2 que se clonó como un fragmento SalI/EcoRI en un BKS-

Comentarios:



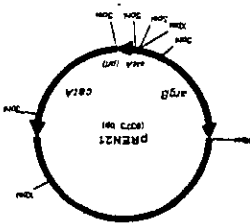
El fragmento SmaI de 0.4 kb proveniente del PREN16 se clonó en el PREN10. Este plásmido se usó para sobreexpresar la ccat2. A demás el promotor de aica con el SUTR de aica

Comentarios:



Este plásmido proviene de la conexión del fragmento SmaI de 0.4 kb del PREN14 en el PREN10. Este plásmido se usó para sobreexpresar ccat2. A demás el promotor y SUTR de aica

Comentarios:



Este es la copia de cDNA CANS (Número de la 1996). Tiene un fragmento de 1288 de del gen ccat2. Este se clonó recientemente en el PstI. El vector es el pBR322

Comentarios:

