

11281



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

INSTITUTO DE FISIOLÓGIA CELULAR
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

NOXA, UNA NADPH OXIDASA HOMÓLOGA A
GP91PHOX, REGULA EL DESARROLLO SEXUAL EN
EL HONGO *Aspergillus nidulans*

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

P R E S E N T A :

M. en IBB MA. TERESA LARA ORTIZ

ASESOR: DR. JESUS AGUIRRE LINARES



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.

Este trabajo se realizó bajo la dirección del Dr. Jesús Aguirre Linares en el departamento de Genética Molecular del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México. La alumna Ma. Teresa Lara Ortiz contó con el apoyo de una beca de CONACyT y complemento de DGEP-UNAM durante la realización de este trabajo.

Dedico este trabajo a mis padres por su cariño y apoyo incondicionales.

A mi hermano Juan por impulsarme a seguir siempre adelante.

Agradecimientos

Agradezco al Dr. Jesús Aguirre Linares por darme la oportunidad de participar en este proyecto tan interesante, por todas sus enseñanzas y por la confianza que me ha brindado.

A mi comité tutorial: Dra. Alejandra Covarrubias Robles y Dr. Wilhelm Hansberg Torres por sus comentarios y sugerencias.

A los miembros del jurado: Dr. Enrique Piña Garza, Dr. Jesús Aguirre Linares, Dr. Diego González Halphen, Dr. Roberto Coria Ortega, Dra. Rosa Navarro González, Dra. Alejandra Covarrubias Robles y Dr. Mario Rocha Sosa por sus observaciones y revisión crítica de este trabajo.

A mis compañeros del laboratorio 107 oriente: Olívia, Karen, Gabriela, Nayelly, Adriana, Luis, José Luis por su amistad y por todos los momentos compartidos.

A mis compañeros del laboratorio 103 oriente: Leonardo, Adelaida, Mauricio y Pablo por su amistad y ayuda constante.

A mis amigos Paty, Rocío, Laurita y Lenin por escucharme, apoyarme y por su valiosa amistad.

RESUMEN	1
INTRODUCCION	3
I. Las principales especies de oxígeno reactivas	3
1.1 La regulación del estado intracelular de oxido/reducción	4
1.2 Las fuentes intracelulares de las EOR	5
1.3 Las enzimas antioxidantes	7
1.4 La NADPH oxidasa en células fagocíticas	8
II. Las NADPH oxidasas en células no fagocíticas	10
2.1 La Familia Nox	10
Nox1	10
Nox3	11
Nox4	12
Nox5	14
2.2 La Familia Duox	16
H-Duox 1/2	16
Ce-Duox 1/2	17
2.3 Los homólogos de gp91phox en plantas	19
III. Las EOR como segundos mensajeros	22
3.1 Proteínas cinasas de serina/treonina	22
3.2 Proteínas cinasas de tirosina	23
3.3 Proteínas Fosfatasas	24
3.4 Proteína cinasa C	24
3.5 Canales de calcio	25
3.6 Factor de transcripción AP-1	26
3.7 Factor de transcripción NFκ-B	27
IV. El papel de Ras y Rac en la producción de EOR	28
V. Las EOR en la diferenciación celular	29
VI. <i>Aspergillus nidulans</i> como modelo experimental	30
OBJETIVOS	33

MATERIALES Y MÉTODOS	34
I. Medios de cultivo y condiciones de crecimiento de <i>Aspergillus nidulans</i> y <i>Escherichia coli</i>	34
II. Inducción del promotor AlcA y determinación de la actividad de Catalasa .	35
III. Inducción del Desarrollo Sexual	36
IV. Ensayo de detección de Especies Reactivas de Oxígeno	36
V. Técnicas de Biología Molecular	37
VI. Obtención de extractos de proteínas de membrana	39
VII. Electroforesis en geles SDS-PAGE	39
VIII. Inmunodetección de proteínas	40
IX. Ensayo de actividad por reducción de NBT	41
RESULTADOS Y DISCUSION	42
Parte I. Resultados publicados	43
Parte II. Resultados sin publicar	44
A) Una triple mutante que carece de la actividad de las catalasas A, B y C ($\Delta catA/B/C$) produce más cleistotecios que una cepa silvestre durante el desarrollo sexual.	44
B) La expresión del gen <i>noxA</i> durante el desarrollo sexual no requiere de los factores transcripcionales StuA y NsdD.	46
C) La modificación de la catalasa B inducida por la sobre-expresión De Ras es independiente de la actividad de NoxA	49
D) Ensayo en gel de la actividad de la NADPH oxidasa	50
DISCUSION GENERAL	53
CONCLUSIONES	61
REFERENCIAS	62

ABREVIATURAS

CHAPS	3-Cholamidopropil dimetil amonio-1-propanosulfonato
DPI	Cloruro de difenil yodonio
EOR	Especies de oxígeno reactivas
EPO	Eritropoietina
FAD	Flavina adenina dinucleótido (oxidado)
GEF	Factor intercambiador de GTP
gp91phox	glicoproteína de 91 kDa, componente catalítico de la NADPH oxidasa fagocítica
GSH	Glutación
HIF- α	Factor de transcripción inducido por hipoxia
H ₂ DCFDA	Diclorohidrofluoresceína diacetato
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
MAPK	Cinasa MAP (Proteína cinasa activada por mitógenos)
NADPH	Fosfato de nicotinamida-adenin-dinucleótido (reducido)
NBT	Cloruro de nitroazul de tetrazolio
O ₂ ⁻	Superóxido
SOD	Superóxido dismutasa
TPO	Tiroperoxidasa
TR	Tioredoxina-reductasa
TRX	Tioredoxina
VSMC	Células del músculo liso vacular

GENES

<i>alcA</i>	gene estructural para la alcohol deshidrogenasa I
<i>alcA(p)</i>	promotor del gen de la alcohol deshidrogenasa
<i>alcR</i>	gene regulador que actúa positivamente
<i>argB</i>	gene estructural para la ornitina carbamoil transferasa
<i>catB</i>	gene estructural para la catalasa B
<i>catA/B/C</i>	genes estructurales para las catalasas A, B y C
<i>creA</i>	gene regulador que actúa negativamente

Tabla I. Fenotipo de las mutantes en los genes reguladores del desarrollo sexual en *A. nidulans*.

gen	producto	mutante	células hülle	cleistotecios
<i>sakA</i>	cinasa de la familia MAPK	$\Delta sakA$	+	+++
<i>noxA</i>	NADPH oxidasa	$\Delta noxA$	+	—
<i>steA</i>	factor de transcripción	$\Delta steA$	+	—
<i>nsdD</i>	factor de transcripción	$\Delta nsdD$	—	—
<i>stuA</i>	factor de transcripción	$\Delta stuA$	—	—

--- No producen las estructuras indicadas

+ Producen en niveles similares a una cepa silvestre

+++ Producen aproximadamente dos veces más que una cepa silvestre

RESUMEN

La NADPH oxidasa de las células fagocíticas es una enzima que genera grandes cantidades de superóxido, a través de la subunidad catalítica gp91phox (Nox2), como parte de un mecanismo de defensa contra microorganismos patógenos. Recientemente se han descrito nuevos miembros de la familia Nox, en plantas y animales, los cuales participan en la generación regulada de superóxido y otras especies de oxígeno reactivas (EOR). Aunque se desconoce la función de la mayoría de estas nuevas Nox, algunas se han involucrado en la regulación de diversos procesos celulares. En este trabajo abordamos el papel de las EOR generadas por una NADPH oxidasa microbiana en la biología del hongo filamentoso *Aspergillus nidulans*. Reportamos la caracterización del gen *noxA* y demostramos que codifica para el primer miembro de una nueva subfamilia de NADPH oxidasas presente en microorganismos eucariotes. La interrupción de *noxA* bloquea la diferenciación de los cuerpos fructíferos sexuales (cleistotecios), sin afectar el desarrollo asexual ó el crecimiento. El gen *noxA* se induce durante el desarrollo sexual, alcanzando su máxima expresión durante la diferenciación de los cleistotecios. Esta expresión no depende de los factores transcripcionales SteA, StuA y NsdD, los cuales también son esenciales para la formación de estos cuerpos fructíferos. En cambio, el desarrollo sexual prematuro observado en mutantes nulas $\Delta sakA$ depende de *noxA* y correlaciona con la desrepresión de este gen. Este dato indica que SakA, una cinasa MAPK que se activa por diversos tipos de estrés, regula el desarrollo sexual a través de la expresión de *noxA* y posiblemente la producción de EOR. Mediante un ensayo de reducción de sales de tetrazolio (NBT) para detectar superóxido, encontramos que las células Hülle y los cleistotecios jóvenes (primordios) producen superóxido en un proceso que se inhibe por DPI, un inhibidor de NADPH oxidasas, y se reduce marcadamente en mutantes $\Delta noxA$. Además, utilizando H_2DCFDA detectamos la generación de H_2O_2 y posiblemente otras EOR en las paredes externas de los primordios, de manera dependiente de NoxA. Al analizar el desarrollo sexual de una mutante afectada en las tres catalasas

principales de *A. nidulans* encontramos que dicha mutante produce más cleistotecios y de menor tamaño con respecto a una cepa silvestre. Estos datos sugieren que mayores niveles de H_2O_2 (y posiblemente otras EOR) en la mutante $\Delta catA/B/C$ inducen la formación de un mayor número de cleistotecios que alcanzan la madurez prematuramente. Aunque nuestros datos muestran el papel esencial de NoxA en la producción de EOR durante la diferenciación sexual, hemos encontrado evidencia de otras fuentes de EOR en *A. nidulans*. Al analizar el papel de NoxA en la posible oxidación de la catalasa B inducida por la sobre-expresión de la GTPasa RasA, encontramos que dicha modificación es independiente de la actividad de NoxA. Además, en ensayos de actividad de reducción del NBT en geles de poliacrilamida, encontramos diversas bandas de actividad presentes en mutantes $\Delta noxA$. El papel esencial de las EOR generadas por NoxA en la diferenciación sexual de *A. nidulans* y la presencia de uno o más genes homólogos de *noxA* en la mayoría de los hongos analizados, sugiere que las NADPH oxidasas y las EOR juegan un papel importante en la fisiología y la diferenciación de los hongos.

INTRODUCCION

Por muchos años se pensó que las EOR sólo podían causar daños celulares al oxidar a las proteínas, la membrana celular y al DNA (Halliwell y Gutteridge, 1989). En 1990 Hansberg y Aguirre propusieron que la diferenciación celular en microorganismos es una respuesta a un estado hiperoxidante, definido éste como toda condición en donde la producción de especies de oxígeno reactivas (EOR) supera la capacidad antioxidante de la célula. En los últimos años han surgido diversos trabajos que muestran que las EOR juegan un papel importante como moléculas reguladoras de procesos biológicos fundamentales tales como la proliferación celular (Burdon *et al.*, 1989), la diferenciación celular (Nose, 2000) (Finkel, 2001) y la muerte celular programada (Banki *et al.*, 1999), (Esteve *et al.*, 1999), (Hockenbery *et al.*, 1993).

I. Las principales especies de oxígeno reactivas

Las especies de oxígeno reactivas se originan principalmente a partir de una reducción incompleta del oxígeno durante la respiración aerobia, como producto de algunas reacciones enzimáticas o por la exposición a agentes externos como la luz, radiaciones, drogas, etc. Las principales EORs son: el ozono (O_3), que se produce por acción de la luz ultravioleta; el oxígeno en singulete (1O_2), que es el O_2 en una forma excitada; el superóxido ($O_2^{\cdot -}$) que es el O_2 que ha captado un electrón; el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), que se forma cuando el superóxido capta otro electrón y se protona; el radical hidroxilo (HO^{\cdot}), un producto que se genera cuando el H_2O_2 se rompe al captar un electrón y que tiene un electrón menos que el otro producto, el ion hidroxilo; el óxido nítrico (NO^*), que se forma por acción de la óxido nítrico sintasa sobre el grupo guanidino de la arginina y, finalmente, el peroxinitrito ($HOONO$), que es el producto de la reacción espontánea el óxido nítrico con el superóxido (Halliwell y Gutteridge, 1989).

1.1. La regulación del estado intracelular de oxido/reducción

En comparación con el ambiente extracelular, el citosol se mantiene normalmente en condiciones reductoras. Esto se logra gracias a la capacidad reductora de grupos tioles intracelulares, principalmente del glutatión (GSH) y la tioredoxina (TRX) (Thannickal y Fanburg, 2000).

El glutatión se sintetiza continuamente dentro de la célula y se degrada fuera de ella. Su biosíntesis esta determinada principalmente por la concentración de los aminoácidos precursores (glu-cys-gly) y compite con la síntesis de proteínas por la disponibilidad de aminoácidos. El glutatión se mantiene en su forma reducida principalmente a través de la GSH reductasa. El GSH reacciona con el hidroxilo, el oxígeno en singulete y de forma más lenta con el superóxido. Cuando las proteínas se exponen a una alta concentración de oxígeno o agentes oxidantes, se oxidan los grupos -SH y el glutatión es capaz de regenerar los sulfhidrilos. Otro papel importante del glutatión es durante el metabolismo de los xenobióticos, a través de la glutatión-S-transferasa (Halliwell y Gutteridge, 1989).

La tioredoxina (TRX) es una proteína de 12 kDa presente en todos los seres vivos (Eklund *et al.*, 1991). Se caracteriza por poseer dos residuos de cisteína en el sitio activo, los cuales proporcionan los grupos sulfhidrilo involucrados en su actividad reductora. La forma oxidada forma un puente disulfuro que es reducido a un ditiol por el NADPH y la enzima tioredoxina reductasa. Así, el sistema de la tioredoxina esta compuesto por la TRX, TRX reductasa y el NADPH (Buchanan *et al.*, 1994) (Fig.1). Diversos grupos han mostrado que la TRX puede regular la actividad de algunas proteínas al unirse directamente a ellas o indirectamente a través de la proteína nuclear Ref-1 (Xanthoudakis y Curran, 1992), (Hirota *et al.*, 1999), (Makino *et al.*, 1999).

1.2 Fuentes intracelulares de las especies de oxígeno reactivas

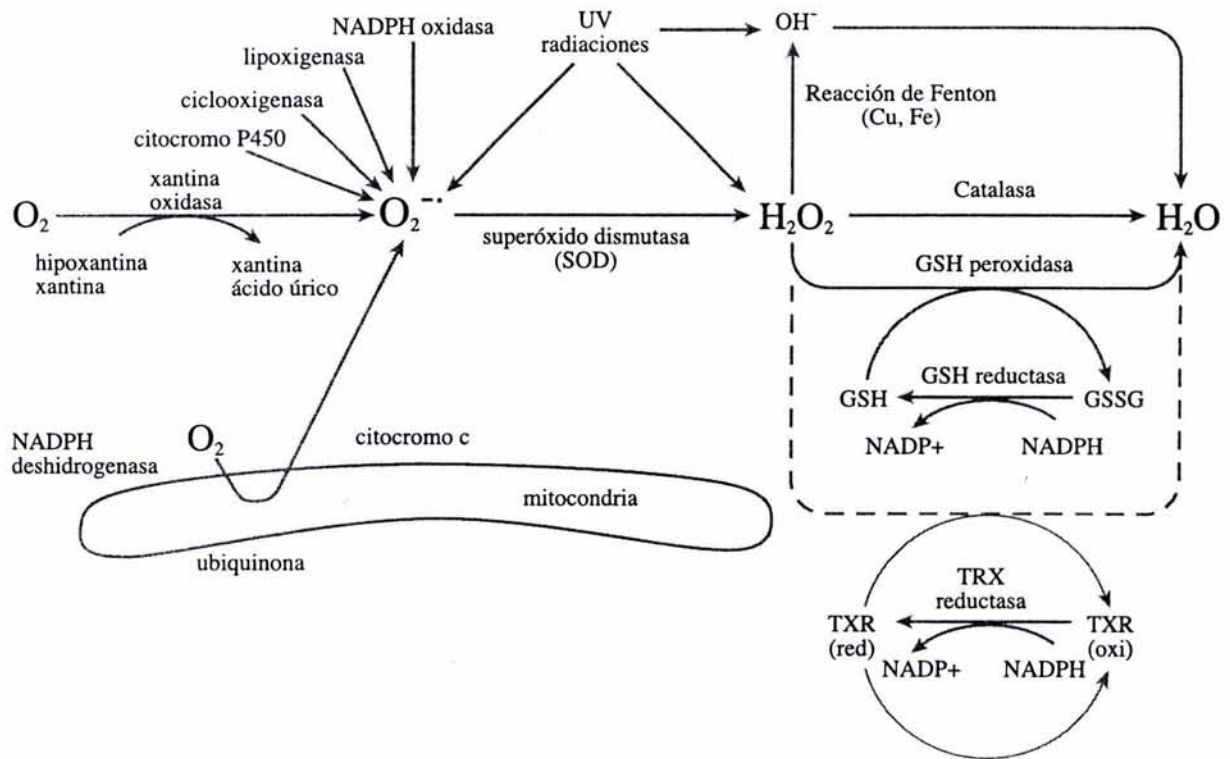
En las células, las EOR se generan por diferentes vías siendo la mitocondria una de las principales fuentes de EOR. Durante la respiración aerobia entre el 1- 2% de los electrones que fluyen por la cadena de transporte de electrónes generan superóxido (Freeman and Crapo, 1982). Este superóxido se libera hacia la matriz mitocondrial. Sin embargo, debido a las altas concentraciones de la superóxido dismutasa mitocondrial, los niveles de superóxido se mantienen bajos y sólo el peróxido de hidrógeno generado por la SOD puede permear la membrana mitocondrial y escapar hacia el citoplasma (Thannickal y Fanburg, 2000).

Otro sitio de transporte de electrones es el retículo endoplásmico liso, el cual contiene enzimas que se encargan de degradar sustancias tóxicas liposolubles y otros productos metabólicos dañinos. La más estudiada es el citocromo P-450, que puede oxidar compuestos tóxicos y xenobióticos a través de la reducción del oxígeno molecular, produciendo superóxido y peróxido de hidrógeno (Kamata y Hirata, 1999).

Los peroxisomas también son una fuente importante de producción de peróxido de hidrógeno celular. Contienen enzimas que generan peróxido de hidrógeno como la glicolato oxidasa, la D-amino ácido oxidasa, la urato oxidasa, la L- α -hidroxiácido oxidasa y la acil-CoA oxidasa. La catalasa peroxidasa utiliza el peróxido de hidrógeno producido por estas oxidasas para oxidar un variedad de substratos en reacciones peroxidativas (Thannickal y Fanburg, 2000).

Además de las oxidasas asociadas a sistemas membranales, existen enzimas solubles que pueden generar EOR. Por ejemplo, durante la degradación de purinas la hipoxantina se oxida sucesivamente a xantina y a ácido úrico por medio de la flavoenzima xantina oxidasa. Las lipoxigenasas son dioxigenasas sin un grupo hemo y su función es oxidar ácidos grasos poli-insaturados como el ácido araquidónico. A partir de este compuesto la lipoxigenasa puede sintetizar leucotrienos por una vía lineal. Por su parte, la ciclooxigenasa, a partir del mismo substrato pero por una vía denominada cíclica, puede sintetizar prostaglandinas y

tromboxanos (Droge, 2002). Estas vías biosintéticas involucran una serie de pasos de oxidación que dan origen a la producción de superóxido (Fig.1).



Modificado de Kamata & Hirata, 1999. *Cell Signal*. 11:1-14

Figura 1. Fuentes intracelulares de especies de oxígeno reactivas

1.3 Las enzimas antioxidantes

Las especies de oxígeno reactivas pueden causar daño a la célula y para contender con este proceso destructivo, las células poseen sistemas enzimáticos de defensa, los cuales actúan para prevenir y reparar los daños ocasionados por las EORs.

Las superóxido dismutasas (SOD) son un grupo de metaloenzimas que catalizan la conversión del anión $O_2^{\cdot -}$ a H_2O_2 y O_2 de manera muy eficiente ($10^9 M^{-1} s^{-1}$) e independiente del pH.

Las catalasas dismutan el H_2O_2 en O_2 y H_2O y lo hacen con una gran eficiencia a cualquier pH. La mayoría de estas enzimas son tetrámeros con una masa de 200 a 260 kDa y cada una de las subunidades esta asociada a un grupo prostético hemo (Lledias *et al.*, 1998).

Las peroxidasas, en general, son las enzimas capaces de reducir hidroperóxidos con agentes reductores diferentes al agua. Dentro de las peroxidasas específicas, la más conocida es la glutatión peroxidasa, la cual reduce el H_2O_2 a través del glutatión (GSH) (Hochman y Shemesh, 1987), (Morris *et al.*, 1992).

Las catalasas/peroxidasas, como su nombre lo indica, presentan ambas actividades. Estas proteínas están compuestas por dos mitades que son semejantes entre sí y ambas, particularmente la del amino terminal, tienen similitud con la secuencia de aminoácidos de la peroxidasa de citocromo *c* de *S. cerevisiae* (Peraza y Hansberg, 2002).

Las peroxirredoxinas son una familia de proteínas descubiertas recientemente. Tienen una masa molecular de aproximadamente 25 kDa y están presentes en procariotes y eucariotes. Estas enzimas son abundantes en citosol y son capaces de reducir el H_2O_2 con electrones donados por el NADPH a través de la tiorredoxina (TRX) y de la tiorredoxina-reductasa (TR). Las peroxirredoxinas son distintas de las peroxidasas en que no presentan cofactores redox como metales y grupos prostéticos. Todas las peroxirredoxinas contienen una cisteína conservada

que parecen ser el sitio de la transferencia de los electrones (Chae *et al.*, 1994) aunque algunas llegan a presentar dos cisteínas.

1.4 La NADPH-oxidasa en células fagocíticas

La NADPH-oxidasa es una enzima multimérica que cataliza la producción de superóxido mediante la reducción parcial del oxígeno, usando NADPH como donador de electrones:



Esta enzima se encuentra en células fagocíticas como neutrófilos y macrófagos. Está constituida por las subunidades gp91phox y p22, que juntas forman el citocromo b₅₅₈ intermembranal; tres proteínas citosólicas conocidas como p67phox, p47phox, p40phox y la GTPasa Rac (Henderson y Chappel, 1996)(Fig. 2).

La subunidad gp91phox (Nox2) contiene dos grupos hemo, el primero está coordinado por las histidinas 101 y 209 y el segundo por las histidinas 115 y 222 y utiliza el FAD como cofactor (Biberstine-Kinkade *et al.*, 2001) (Fig. 3). Se ha sugerido que la proteína p67phox regula la transferencia de electrones en el citocromo desde el NADPH hacia el FAD, mientras que p47phox controla el flujo de electrones del FAD hacia el oxígeno a través de los grupos hemo (Cross *et al.*, 1999).

En células en reposo, p47phox, p67phox y p40phox residen en el citosol como un complejo de 240 kDa. Por su parte, Rac se mantiene en el citosol asociada con una proteína inhibitoria, RhoGDI (Rho Guanine nucleotide Dissociation Inhibitor), y se transloca a la membrana independientemente de los otros componentes citosólicos.

La activación de la NADPH-oxidasa parece ser disparada por dos vías regulatorias: i) la fosforilación de proteínas citosólicas y ii) el intercambio del nucleótido de guanina en la proteína Rac (Fig. 2).

i) La proteína p47phox se fosforila en cuatro residuos de serina por la proteína cinasa C, como consecuencia el complejo citosólico entero migra hacia la membrana, en donde interaccionan con el citocromo b₅₅₈ para ensamblar a la oxidasa activa. El agrupamiento de las proteínas en este complejo esta mediado por la interacción de los dominios SH3 con los dominios ricos en poli-prolina (PLP) presentes en las tres proteínas (Han *et al.*, 1998).

ii) El GDP unido a Rac se intercambia por GTP a través de los factores GEF (guanine exchange factors) como resultado Rac se disocia de la proteína inhibitoria Rho-GDI y se transloca a la membrana en donde se asocia a ella por prenilación.

Existen dos isoformas de la proteína Rac: Rac1 y Rac2. En neutrófilos, la forma predominante es Rac2, mientras que en macrófagos, la NADPH-oxidasa parece estar regulada por Rac1 (Kwong *et al.*, 1993). Ambas proteínas son capaces de unirse a la proteína p67phox.

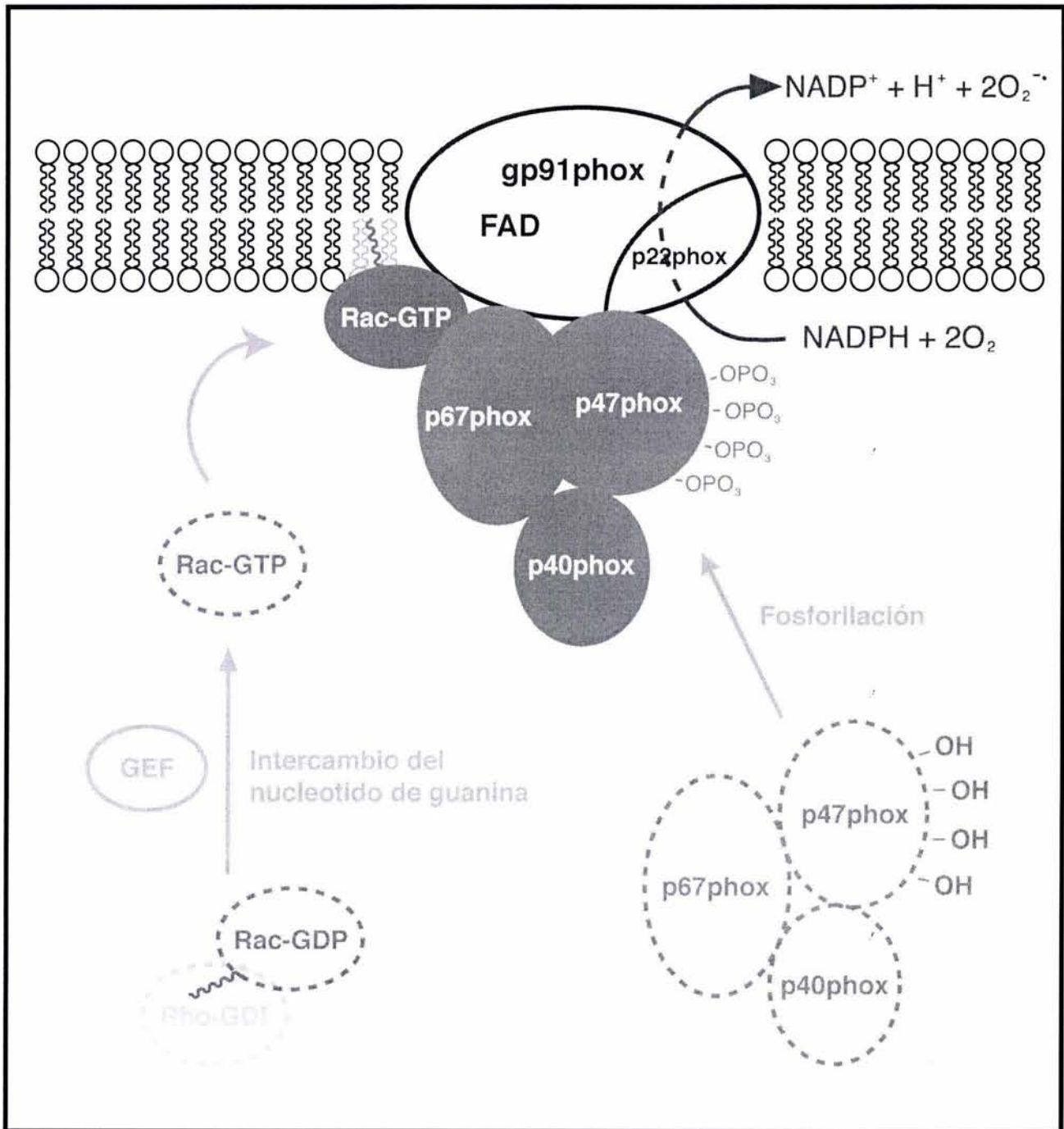


Figura 2. Activación de la NADPH oxidasa en neutrófilos.

II. NADPH oxidasas en células no fagocíticas

Se han descrito proteínas homólogas a gp91phox (Nox2) en células no fagocíticas. Por otro lado, se conoce desde hace tiempo que la estimulación de diversas células no fagocíticas con ligandos como citocinas, factores de crecimiento, hormonas y neurotransmisores induce la generación de especies de oxígeno reactivas. Sin embargo, la cantidad de EOR que producen este tipo de células es mucho menor en comparación a la que produce las células fagocíticas. Recientemente se ha relacionado la producción de EOR producidas en pequeñas cantidades con la regulación de procesos como el crecimiento celular, la mitosis, la transformación celular y la senescencia. Estos datos sugieren que las NADPH oxidasas no fagocíticas juegan un papel regulador esencial en la producción de EOR.

2.1 La Familia Nox

Nox1

Nox1 (también llamado Mox1) fue el primer miembro de la familia Nox en ser clonado a partir de células no fagocíticas. Nox1 se expresa predominantemente en colon y en menor nivel en útero, próstata y músculo liso vascular. El cDNA codifica para una proteína de 564 aminoácidos, 56% idéntica a gp91phox (Nox2) y muy parecida en tamaño y estructura a gp91phox (Suh *et al.*, 1999) (Fig. 3). La sobreexpresión de esta enzima en fibroblastos NIH 3T3, generó un incremento en la producción de EOR y las células mostraron una apariencia transformada, además cuando estas células fueron inyectadas a ratones atímicos originaron la formación de tumores agresivos (Suh *et al.*, 1999). Por otra parte, la supresión de Nox1 endógeno en células del músculo liso vascular (VSMC) disminuyó los niveles de EOR e inhibió la división celular. Todos estos datos indican que Nox1 y las EOR juegan un papel importante en la regulación del ciclo celular y el crecimiento celular.

Otro grupo de investigación que también identificó al gen *nox1* encontró un segundo transcrito producto del procesamiento alternativo del RNAm, el cual codifica

para la proteína Nox1S, de tan sólo 191 aminoácidos. Nox1S contiene 4 de las hélices transmembranales pero carece del dominio de unión a FAD y NADPH (Banfi *et al.*, 2000). En la tercera hélice transmembranal se encuentran las histidinas 111, 115 y 119 que parecen contribuir a la permeabilidad del H⁺ (Fig.4). Este grupo sugiere que Nox1S podría participar en la regulación del pH celular a través de la conductancia de los iones H⁺ (Banfi *et al.*, 2000).

Los elementos de respuesta a antioxidantes (ARE) son secuencias consenso que se encuentran en la región promotora de muchos genes antioxidantes. Un trabajo reciente reportó la activación del promotor ARE4 mediante el H₂O₂ generado por la sobre-expresión de Nox1 en fibroblastos NIH 3T3. Además, se mostró que la activación de ARE4 por H₂O₂ esta mediada por las cascadas de las cinasas JNK y ERK1/2, moduladas por Ras. Aparentemente, el H₂O₂ producido por Nox1 no afecta los niveles del glutatión y la tioredoxina celulares, sugiriendo que este mecanismo de señalización puede ocurrir sin afectar el potencial redox de la célula (Go *et al.*, 2004).

Nox3

Nox3 se expresa principalmente en tejido fetal de riñón y en menor nivel en tejido fetal de hígado, pulmón y bazo (Cheng *et al.*, 2001) . El cDNA de Nox3 codifica para una proteína de 568 aminoácidos y presenta una similitud del 58% con gp91phox (Fig. 4). Aunque no se ha reportado ninguna evidencia funcional de que Nox3 genere superóxido (Banfi *et al.*, 2001), recientemente el análisis genético molecular de ratones con mutaciones específicas en el sistema vestibular del oído interno ha implicado a Nox3 en la generación de los otolitos, los cuales son estructuras cristalinas constituídas por proteínas (principalmente otoconina 90 y en menor proporción otogelina y otoancorina) y carbonato de calcio (Paffenholz *et al.*, 2004). Resulta interesante que la otoconina 90 tiene dos dominios semejantes a la fosfolipasa A2 y contiene más de 20 residuos de cisteína. En este trabajo se describieron una serie de mutaciones alélicas en el locus *het* que afectan al gen

nox3, identificando por primera vez una proteína con una función enzimática clara indispensable para la morfogenesis de las otoconia. El modelo propuesto sugiere que las EOR producidas por Nox3 oxidan las cisteínas presentes en la otoconina 90 induciendo un cambio conformacional que prepararía el camino para la nucleación de los cristales de calcio (Paffenholz *et al.*, 2004).

Nox4

Recientemente se identificó y caracterizó a la oxidasa renal o Renox (también llamada Nox4) como una fuente de superóxido en riñón. La proteína Nox4 de 578 aminoácidos es 39% idéntica a gp91phox y presenta una estructura muy parecida (Fig.4). El hecho de que Nox4 se exprese en el mismo sitio (células del tubo distal) en donde se produce la eritropoietina (EPO) y la demostración de que Nox4 es capaz de producir superóxido, hacen de esta enzima un candidato para detectar el nivel de oxígeno en la corteza renal. La hipótesis más favorecida para explicar la percepción de la concentración del oxígeno propone que el anión superóxido y las EOR derivadas se forman en proporción a la concentración de oxígeno local, dentro de la vecindad de las células que producen EPO. Estas EOR oxidan y desestabilizan al factor de transcripción HIF- α (factor inducido por hipoxia), disminuyendo así la expresión de genes que se inducen por hipoxia, incluyendo a la EPO. Cuando la concentración de oxígeno disminuye, se forma menos superóxido y el HIF- α se estabiliza, elevando así la expresión de genes como el de la EPO. El cloruro de difenil yodonio (DPI), un inhibidor de flavoproteínas, disminuye la síntesis de la EPO, y bloquea la producción de superóxido por Nox4, lo cual es consistente con la idea de que Nox4 actúa como un sensor de oxígeno (Shiose *et al.*, 2001). La identificación de Nox4 como una fuente de superóxido en las células del tubo distal podría tener implicaciones patológicas y fisiológicas importantes, debido a que las EOR tienen un papel significativo en la respuesta hipertrófica tubular a angiotensina II y en la nefrotoxicidad de drogas como ciclosporina y aminoglicósidos (Geiszt *et al.*, 2000).

En los últimos años, se ha reconocido que las EOR juegan un papel importante en la función del sistema cardiovascular. Todos los tipos celulares en la pared vascular producen EOR derivadas de complejos de proteínas similares a la NADPH oxidasa de macrófagos. Al parecer todas las células vasculares expresan múltiples homólogos Nox, los cuales se regulan de manera diferente, sugiriendo que estas oxidasas cumplen diversas funciones (Lassegue y Clempus, 2003).

En un estudio en células endoteliales se midió la producción de superóxido, por medio de quimioluminiscencia y resonancia de electrones y se encontró que las membranas endoteliales producían superóxido de manera dependiente de NAD(P)H, y que dicha actividad no aumentaba por la sobre-expresión de las proteínas recombinantes p47phox y p67phox, a diferencia de lo que ocurre en neutrófilos. Además, se observó una disminución en la producción de superóxido cuando se usó un oligonucleótido antisentido de *nox4*. Estos datos sugieren que Nox4 es la oxidasa responsable de las EOR producidas en células endoteliales (Ago *et al.*, 2004).

Por otra parte, estudios previos mostraron que los adipocitos poseen un sistema que genera H_2O_2 y que se estimula por insulina, además, sugirieron que la actividad catalítica responsable de la producción de H_2O_2 tiene características enzimáticas consistentes con la actividad de una NADPH oxidasa (Krieger-Brauer y Kather, 1992). Más tarde otro grupo mostró que Nox4 se expresa prominentemente en adipocitos sensibles a insulina (Mahadev *et al.*, 2004). En este sistema, la sobre-expresión de una proteína Nox4 que carece de los dominios de unión a NADPH y FAD actúa de manera negativa dominante en una línea celular de adipocitos 3T3-L1, suprimiendo la generación de H_2O_2 estimulada por insulina, la fosforilación del receptor de insulina y su sustrato, y atenuando la activación de las cinasas de señalización corriente abajo, así como la toma de glucosa. También se mostró que al transfectar esta línea celular con un RNA de interferencia pequeño (siRNA) de *nox4* se inhibió la cascada de señalización de la insulina, mientras que la sobre-expresión de la fosfatasa 1B (PTP1B) reducía la fosforilación del receptor de insulina y de su sustrato. En cambio, la sobre-expresión de Nox4 silvestre disminuye la actividad de la fosfatasa significativamente (Mahadev *et al.*, 2004). Estos datos indican que Nox4

podría ser el vínculo entre el receptor de insulina y la generación de EOR que elevan la transducción de la señal de la insulina y sugieren a la fosfatasa 1B como un blanco de la inhibición oxidativa

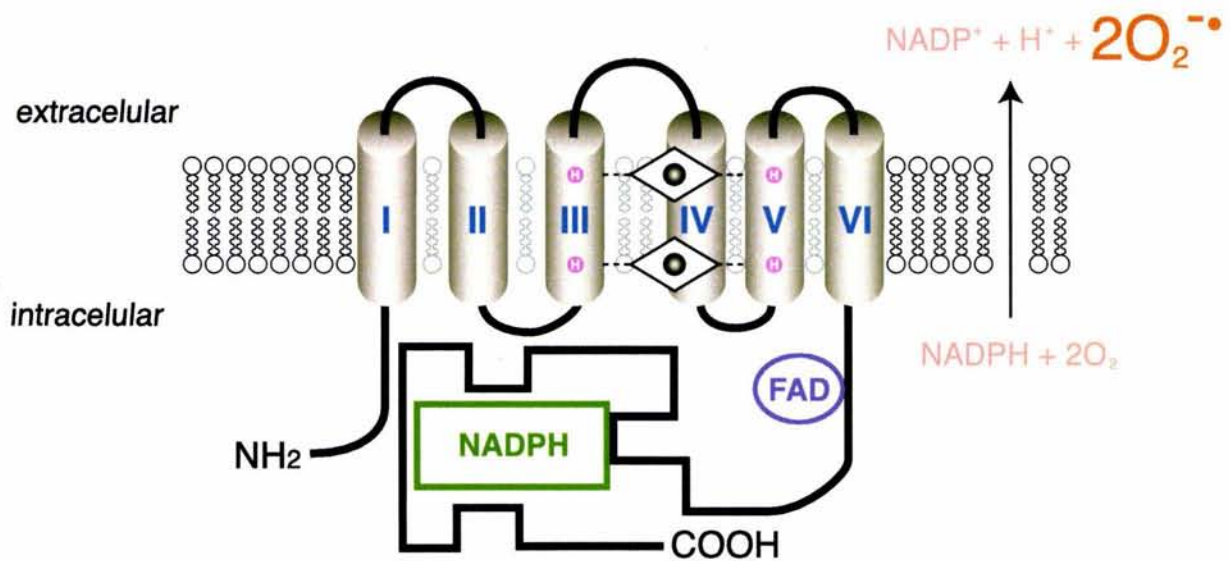


Figura 3. Modelo estructural de la proteína gp91phox (Nox2)

Los números del I - VI indican las posibles regiones transmembranales, los círculos cerrados color rosa, localizados en los segmentos transmembranales III y V, indican las histidinas que coordinan los dos grupos hemo. En el extremo carboxilo terminal se indica el sitio de unión a FAD con un óvalo y el sitio de unión a NADPH con un rectángulo. Las proteínas Nox1, Nox3 y Nox4 muestran una estructura similar.

Nox5

La proteína Nox5 es un miembro distante de la familia Nox. El gen se expresa en testículo, bazo y nódulos linfáticos. El cDNA obtenido de bazo codifica para una proteína de 737 aminoácidos. El extremo carboxilo presenta una estructura similar a gp91phox, sin embargo, a diferencia de los otros miembros de la superfamilia Nox, muestra una extensión amino terminal que contiene cuatro motivos de unión a calcio (Banfi *et al.*, 2001) (Banfi *et al.*, 2004) (Fig. 4). Nox5 también funciona como canal de protones (H⁺), pero a diferencia de Nox1S, Nox5 conduce H⁺ en respuesta a un aumento en la concentración de calcio citosólico. Nox5 genera grandes cantidades de superóxido, de manera dependiente de calcio, mientras que Nox1 y Nox4 parecen generar niveles bajos. En este aspecto Nox5 y gp91phox son muy similares y esto es importante desde el punto de vista fisiológico: las NADPH oxidasas que producen altas cantidades de superóxido lo hacen por periodos de tiempo cortos y se encuentran reguladas. Por el contrario, las enzimas que están activas constitutivamente producen cantidades bajas de superóxido. Además, mientras que gp91phox necesita ensamblar varias subunidades para su activación, Nox5 parece combinar en una misma proteína el módulo regulatorio y el módulo catalítico. Sin embargo, hasta el momento no se puede excluir el papel de p22phox en la actividad de Nox5, debido a que se encontraron niveles muy bajos del RNA mensajero de p22phox en las diferentes líneas celulares que se usaron para transfectar el cDNA de Nox5 y en donde se probó su actividad. Por otra parte, el RNA mensajero de Nox5 es muy abundante en espermatoцитos en paquíteno, de manera que Nox5 podría tener una función en los estadios tempranos de la espermatogénesis, así como en la división celular, la inducción de la apoptosis o la compactación del DNA (Banfi *et al.*, 2001).

Anteriormente mencionamos que las EOR juegan un papel importante en la regulación del crecimiento celular. En un estudio Brar y colaboradores reportaron que la línea celular de cáncer de próstata DU 145 produce EOR (Brar *et al.*, 2003). Estas EOR son críticas para el crecimiento de estas células ya que inhibidores de NADPH oxidasas y antioxidantes bloquean su proliferación. En estas células se

demonstró la presencia de los mensajeros de p22, gp91phox y Nox5, utilizando RT-PCR, y de gp91phox y Nox5 utilizando inmunotinción y microscopía confocal. Sin embargo, al utilizar oligonucleótidos antisentido *nox5* se inhibió la producción de EOR y la proliferación celular de las células DU 145, mientras que oligonucleótidos antisentido p22phox o gp91phox no tuvieron ningún efecto en el crecimiento celular. Estos datos indican que las EOR producidas por Nox5 participan en el crecimiento del cáncer de próstata (Brar *et al.*, 2003).

2.2 La Familia Duox

En humano (h) (De Deken *et al.*, 2000) y en *Caenorhabditis elegans* (Ce) (Edens *et al.*, 2001) se han identificado homólogos a gp91phox de alto peso molecular. Estas proteínas se han nombrado Duox (Dual oxidase) debido a que el extremo carboxilo terminal es homólogo a gp91phox, mientras que el extremo amino terminal es homólogo a las peroxidasas animales. Además, la región central presentan dos dominios de unión a calcio y una α hélice transmembranal (Fig. 4).

H-Duox1/2

La síntesis de la hormona tiroidea implica la iodación de la tiroglobulina, una reacción que es catalizada por la tiroperoxidasa (TPO) en presencia de peróxido de hidrógeno (H_2O_2), en la membrana apical de las células foliculares tiroideas. El sistema que genera el H_2O_2 en la tiroides consiste de una flavoproteína dependiente de calcio que presenta actividad de NADPH oxidasa. Su expresión se estimula por la vía del AMP cíclico a través de la tirotropina (TSH) y su actividad enzimática se dispara esencialmente por la cascada de fosfoinosítidos-calcio. Recientemente, se purificó una flavoproteína a partir de un extracto de membranas tiroideas, se clonó su cDNA y se encontró que codifica para una proteína de 138 kDa por lo que se le llamó p138Tox (Dupuy *et al.*, 1999). Más tarde, otro grupo obtuvo dos clones de cDNA a partir de una búsqueda en una genoteca de células tiroideas. Estas clonas

codifican para una proteína de 1551 aminoácidos llamada ThOX1 y otra de 1548 aminoácidos llamada ThOX2. Al comparar estas secuencias con la proteína de 138 kDa, encontraron que p138Tox corresponde al fragmento carboxilo de ThOX2, pero carece de los primeros 338 aa. Posteriormente ThOX1 se refirió como h-Duox1 y ThOX2 como h-Duox2. Los extremos carboxilo de h-Duox1 y h-Duox2 muestran 53% y 47% de similitud respectivamente con la proteína gp91phox, mientras que en el extremo amino presentan 43% de similitud con la peroxidasa. Ambas proteínas contienen dos motivos de unión a calcio (De Deken *et al.*, 2000). Estas diferencias estructurales entre las proteínas h-Duox1/2 y la gp91phox podrían estar relacionadas con diferencias funcionales. Por ejemplo, la presencia de los dominios de unión a calcio corresponde con la dependencia de calcio de la oxidasa tiroidea. Otro estudio en cultivo primario de tirocitos de perro y de cerdo mostró que el nivel basal de H₂O₂ es muy bajo y se incrementa rápidamente después de la estimulación de la cascada de fosfoinosítidos-calcio. En células PC C13 la producción de H₂O₂ estimulada por ionomicina, se inhibió totalmente por DPI, un inhibidor que compite por el sitio de unión para FAD (De Deken *et al.*, 2002). Esto sugiere que estas proteínas tienen algunas semejanzas con gp91phox pero que se regulan de manera distinta.

Ce-Duox1/2

Las otras proteínas de la familia Duox que se han descrito en *Caenorhabditis elegans* se denominan Ce-Duox. El cDNA de Ce-Duox1 codifica para una proteína de 1497 aminoácidos y contiene los mismos dominios que h-Duox1/2. El segundo transcrito Ce-Duox2 es más corto, codifica para una proteína de 1313 aminoácidos y carece de una porción del extremo carboxilo terminal. Ambas proteínas (Ce-Duox1/2) mostraron 30% de identidad con las Duox de humano (h-Duox1/2). En el extremo amino las Ce-Duox1/2 presentan 20% de identidad con las peroxidosas. Mientras que en el extremo carboxilo muestran 39% de identidad con gp91phox. Por lo tanto, estas proteínas son estructuralmente muy parecidas a las Duox de humano. Ce-Duox1 se expresa en las células hipodérmicas, debajo de la cutícula de los

animales en estado larvario. En la cutícula, el colágeno y otras proteínas de la matriz extracelular se entrelazan a través de uniones di y tri-tirosina. Estas uniones no están presentes en animales que no expresan Ce-Duox, sugiriendo que Ce-Duox1 podría participar en formar las uniones de tirosina y en la biogénesis de la cutícula y la matriz extracelular de colágeno que forman la cubierta exterior de los nemátodos (Edens *et al.*, 2001). Además, las reacciones de entrecruzamiento entre residuos de tirosina se ha reconstituido bioquímicamente usando dominios de peroxidasa de humano (h-Duox) y de *C. elegans* (Ce-Duox1).

Por otro lado, las peroxidasas también se han implicado en la formación de la matriz extracelular, después de la fertilización de los ovocitos de erizo de mar. La fertilización resulta en el entrecruzamiento de residuos de tirosina de las proteínas de la capa externa del ovocito, formando una envoltura de fertilización protectora. Esta reacción es catalizada por una ovoperoxidasa secretada por el ovocito. En este sistema, el peróxido de hidrógeno es generado por una NADPH oxidasa desconocida (Deits *et al.*, 1984).

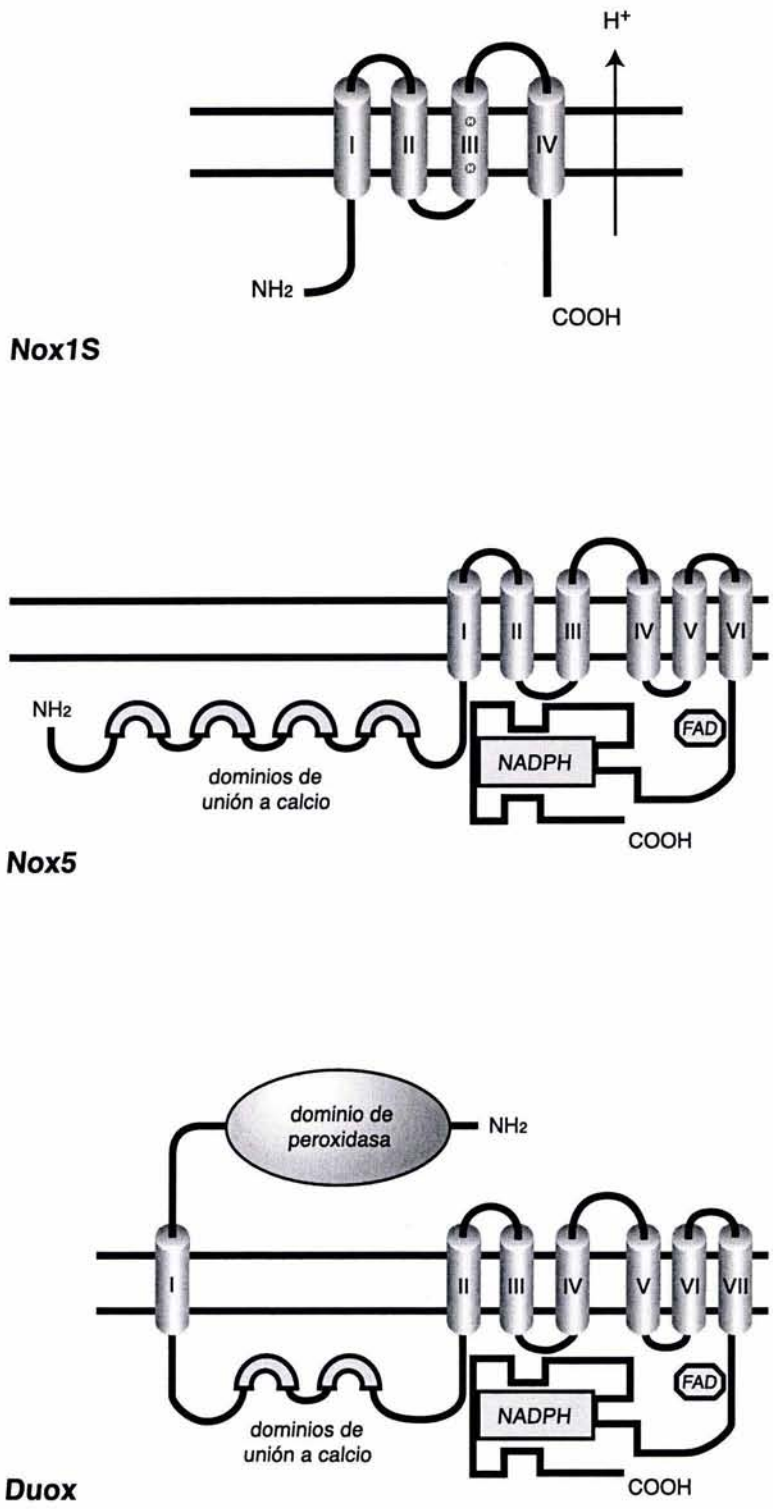


Figura 4. Modelos de la topología transmembranal de las proteínas homólogas a gp91phox

2.3 Los homólogos de gp91phox en plantas

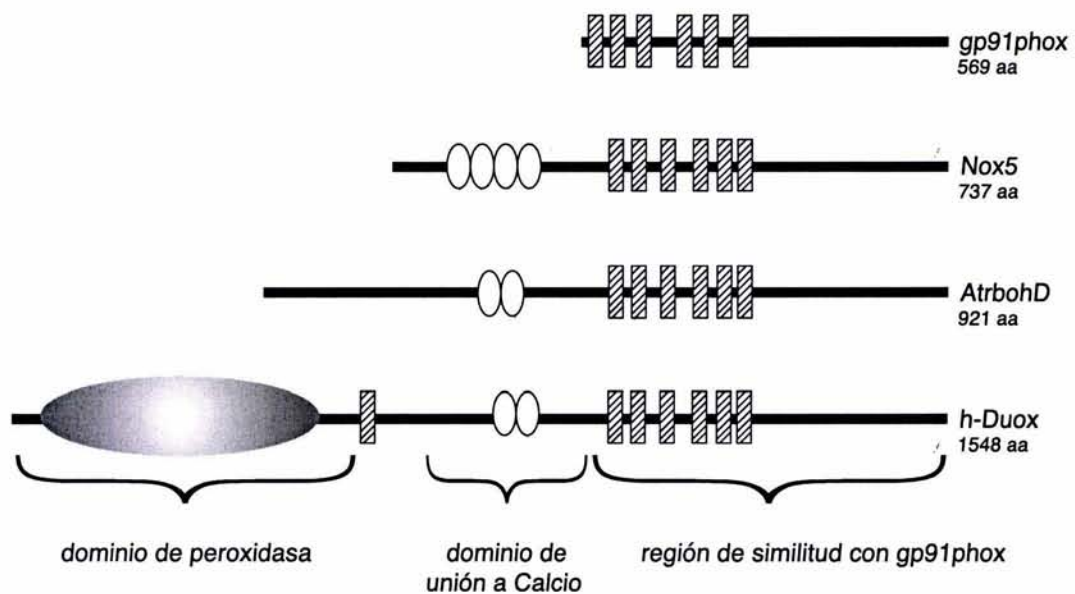
En plantas, el reconocimiento de patógenos causa una “explosión oxidativa” que genera superóxido ($O_2^{\cdot-}$) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Se sugiere que las especies de oxígeno reactivas ($O_2^{\cdot-}$, H_2O_2) podrían inhibir el crecimiento de los patógenos por una acción microbicida directa (Doke *et al.*, 1996), al restringir la penetración microbiana mediante el entrecruzamiento de las glicoproteínas de la pared celular y al activar la biosíntesis del ácido salicílico, el cual da lugar a la inducción de genes relacionados con la defensa (Levine *et al.*, 1996) (Yang *et al.*, 1997). Esto sugiere que las plantas tendrían un mecanismo de respuesta a patógenos análogo al de las células fagocíticas.

En *Arabidopsis thaliana* se han identificado diez homólogos de gp91phox. Los genes de estas clonas de cDNA se llamaron *AtrbohA-J*. Las proteínas codificadas por estos genes muestran una similitud de ~60% con gp91phox, aunque son más grandes (843 a 948 aa) y presentan una extensión amino terminal que contiene regiones conservadas de unión a calcio (Fig. 5), sugiriendo que la actividad de las Nox de plantas se regula por calcio (Keller *et al.*, 1998). Hace un par de años se demostró que mutaciones en los genes *AtrbohD* y *AtrbohF* eliminan la acumulación de EOR durante la respuesta de defensa a las bacterias patógenas *Pseudomonas syringae* (*Pst*) y *Peronospora parasitica* (*Pp*). El gene *AtrbohD* se requiere para producir la mayor parte de EOR observadas después de inocular con *Pst* o *Pp* avirulentas, mientras que *AtrbohF* muestra una contribución menor. Aunque en plantas el H_2O_2 es la principal EOR detectada durante la interacción con muchos patógenos, los datos anteriores demuestran que *AtrbohD* y *AtrbohF* codifican para probables homólogos de una NADPH oxidasa en plantas y sugieren que el $O_2^{\cdot-}$ es la fuente del H_2O_2 detectado (Torres *et al.*, 2002). Hasta el momento no se han encontrado homólogos de p47phox y p67phox en el genoma de *Arabidopsis* (Torres *et al.*, 2002). Esto sugiere que las oxidasas que generan superóxido en plantas se regulan de manera diferente a las oxidasas de células fagocíticas de animales.

Se ha descrito que el calcio es un mediador de la señal del ABA en el cierre de los estomas. Hamilton y Pei (2000) identificaron la presencia de canales de calcio en los estomas de *Arabidopsis* y demostraron que estos canales se estimulaban por EOR de forma dependiente del ABA. Más tarde se demostró que mutantes dobles *AtrbohD/AtrbohF* no pueden llevar a cabo el cierre de los estomas inducido por el ABA, sugiriendo que las EOR son limitantes como segundos mensajeros en la vía de señalización del ABA en *A. thaliana* (Kwak *et al.*, 2003). Por otra parte, se sabe que el calcio también es importante para regular la expansión celular en raíces de *Arabidopsis* (Demidchik *et al.*, 2002). Recientemente se observó la acumulación de EOR en las raíces y sus vellosidades y se demostró que las mutantes *AtrbohC* muestran bajos niveles de EOR, son ineficientes en la toma de calcio extracelular y producen raíces muy cortas. El tratamiento de las raíces de la mutante *AtrbohC* con EOR exógenas suprimió parcialmente el fenotipo de raíces cortas y estimuló la actividad de los canales de calcio. Por el contrario, en una planta silvestre el uso del DPI inhibió la formación de EOR y causó un fenotipo semejante al de la mutante *AtrbohC* (Foreman *et al.*, 2003). Todos estos datos indican que *AtrbohC*, proteína homóloga a gp91phox, controla la producción de EOR, las cuales regulan la expansión celular de plantas a través de la activación de canales de calcio en *Arabidopsis*.




Hasta hace poco no se había demostrado de manera directa que el producto de genes homólogos a gp91phox generaran $O_2^{\cdot -}$. El grupo de Sagi reportó un ensayo de actividad de NADPH oxidasa en gel basado en la reducción de las sales de tetrazolio (NBT), las cuales al reaccionar con el $O_2^{\cdot -}$ cambian de color y se precipitan formando el compuesto formazan. Se mostró que extractos de membranas de plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum*) y de tabaco (*Nicotiana tabacum*) pueden catalizar la producción de $O_2^{\cdot -}$ en geles nativos (Sagi y Fluhr, 2001). Anteriormente ya se había clonado el gen *Lerboh1* de tomate, cuyo producto es homólogo a gp91phox (Marre *et al.*, 1998). El grupo de Sagi generó anticuerpos contra el extremo carboxilo de la proteína *Lerboh1* y por medio de un ensayo de inmunodetección confirmó que el origen de las bandas de actividad (producción de

$O_2^{\cdot-}$) en el gel corresponden a la proteína Lerboh1. La proteína Lerboh1 también tiene un dominio amino terminal con sitios de unión a calcio. En este trabajo se observó un aumento en la intensidad de las bandas de formazan de manera dependiente a calcio, sugiriendo que las NADPH oxidasas de plantas pueden producir $O_2^{\cdot-}$ en ausencia de los componentes citosólicos adicionales de la oxidasa fagocítica (Sagi y Fluhr, 2001), lo cual es consistente con la búsqueda infructuosa en plantas de los genes que codifican para las subunidades p40phox, p47phox y p67phox.



Modificado de Edens et al., 2001. *Journal of Cell Biol.* 154:879-891

Figura 5. Estructura de dominios de las proteínas homólogas a gp91phox

-  Las alfa-hélices transmembranales.
-  Los dominios de unión a Calcio.
-  El dominio de similitud con las peroxidasas.

III Las especies de oxígeno reactivas como segundos mensajeros

En la última década se ha demostrado que la estimulación por factores de crecimiento, citocinas, hormonas y neurotransmisores, de una variedad de tipos celulares, resulta en un incremento en las especies de oxígeno reactivas intracelulares (Finkel, 1998). Esto sugiere un papel para las EOR en la transducción de señales desde la membrana plasmática hacia el citoplasma ó el núcleo. El modo de acción de las EOR podría implicar una interacción directa con receptores específicos o una regulación redox con proteínas como cinasas, fosfatasas y factores de transcripción (Sauer *et al.*, 2001) (Fig. 6).

Proteínas cinasas de Serina/Treonina (cinasas MAP)

Las MAPK (mitogen-activated protein kinase) comprenden una gran familia de proteínas que incluyen a ERK1 y ERK2 (extracellular regulated kinase), JNK (c-Jun N-terminal kinase), p38 y la Big MAPK-1. Las proteínas ERK1/2 están involucradas en la diferenciación y proliferación celular, mientras que JNK y p38 se activan por estrés oxidativo. En células de músculo liso vascular se observó la activación de ERK1/2 por superóxido o peróxido de hidrógeno. (Droge, 2002). JNK se ha implicado en la apoptosis inducida por H₂O₂ en células endoteliales (Sauer *et al.*, 2001). En células mesangiales humanas, Wilmer y su grupo observaron que la activación de ERK2 y JNK, inducida por interleucina-1, se inhibía por antioxidantes sugiriendo que las EOR estaban involucradas en este efecto. Otro grupo encontró que la activación de JNK inducida por interleucina-1 y TNF- α podría estar mediada por H₂O₂ intracelular (Lo *et al.*, 1996). Trabajos realizados en diversas líneas celulares encontraron que la proteína Big MAPK-1 parecía ser mucho más sensible que ERK1/2 al H₂O₂, sugiriendo que esta proteína puede tener un papel importante como sensor del estado redox celular (Abe *et al.*, 1996). En general, se puede decir que la fosforilación de proteínas serina/treonina cinasas debido a la adición externa o a la producción endógena de EOR esta ampliamente documentada (Thannickal y Fanburg, 2000), (Droge, 2002) (Fig. 6).

Proteínas cinasas de Tirosina

No sólo los receptores con actividad de tirosina cinasa sino también las proteínas tirosina cinasa de la familia Src se activan por estrés oxidativo (Kamata y Hirata, 1999). Esta familia incluye a las proteínas Src, Lck, Fyn, ZAP-70 y Syk. En linfocitos T se ha observado que el H_2O_2 , el pervanadato y la luz UV inducen la fosforilación de Lck, Fyn y ZAP-70. La fosforilación de ZAP-70 inducida por la luz UV depende tanto del receptor CD3 como de la proteína tirosina fosfatasa CD45, mientras que la fosforilación inducida por H_2O_2 no requiere de CD45. Esto sugiere que el H_2O_2 y la luz UV transducen la señal a través de diferentes vías. El H_2O_2 también activa a Syk pero en linfocitos B. En neutrófilos las proteínas Lyn y Syk se activan en respuesta a estrés por EOR. Además, se ha observado que existe una interacción entre la familia de las cinasas MAP y la familia Src. Por ejemplo, la activación de JNK por H_2O_2 requiere a Src pero no a Fyn (Yoshizumi *et al.*, 2000). De igual forma la Big MAPK-1 se regula positivamente por Src pero no por Fyn (Abe *et al.*, 1997). En contraste, el H_2O_2 induce la actividad de ERK a través de la vía Ras/Raf en fibroblastos murinos de manera dependiente de Fyn pero independiente de Src (Abe y Berk, 1999). Estos datos sugieren que Src y Fyn tienen dos papeles independientes en la transducción de señales mediadas por EOR.

Sin embargo, aunque aparentemente el estrés oxidativo estimula muchas proteínas cinasas, hasta ahora no hay una evidencia de que los oxidantes activen directamente a las cinasas. No obstante, se ha reportado que al activar proteínas cinasas por estrés oxidativo se observa una inhibición en las proteínas fosfatasas, como en los casos del receptor de insulina (Heffetz *et al.*, 1992), el receptor del EGF (Knebel *et al.*, 1996), la proteína Lck y Fyn (Secrist *et al.*, 1993). Debido a que el nivel de fosforilación de las proteínas celulares está determinado por el balance en la actividad de cinasas y fosfatasas, la inactivación de las fosfatasas resultaría en un aumento en la fosforilación de las proteínas (Kamata y Hirata, 1999). En efecto, se ha demostrado que algunas fosfatasas se inactivan por EOR (Fialkow *et al.*, 1997), (Krejsa y Schieven, 1998), (Garcia *et al.*, 2002), (Liu *et al.*, 2004).

Proteínas Fosfatasas

Todas las proteínas fosfatasas de tirosina contienen un residuo de cisteína esencial en el sitio activo CX_5R , el cual existe como un anión tiolato a pH neutro (Chiarugi y Cirri, 2003). Esta cisteína es un blanco de oxidación por parte del H_2O_2 , lo cual da lugar a la inactivación enzimática. Notablemente, esta modificación es reversible por compuestos tioles como el ditioneitol y el glutatión o por la proteína tioredoxina. La oxidación reversible se demostró para la fosfatasa PTP1B durante la señalización de la insulina y del EGF, y para las PTP de bajo peso molecular durante la estimulación del PDGF. Ambas reestablecen completamente su actividad después de 30 min de haberse activado el receptor. Estas observaciones sugieren que la oxidación de las fosfatasas, en los residuos de cisteína, podría ocurrir *in vivo* en respuesta a las EOR o a un incremento en el potencial redox celular (Cho *et al.*, 2004) (Fig. 6).

Por su parte, también las proteínas fosfatasas de serina/treonina se pueden regular por EOR. Estas fosfatasas contienen dos iones metálicos en su sitio activo (Fe^{2+} y Zn^{2+}) los cuales son susceptibles de oxidación (Cohen, 1997). En una línea celular T de humanos se observó que la actividad de la proteína fosfatasa 2A se reducía después de adicionar H_2O_2 a células intactas (Whisler *et al.*, 1995). Otro grupo mostró que el H_2O_2 , el superóxido y el disulfuro de glutatión inhibían la actividad de la fosfatasa calcineurina de manera dependiente de la dosis, mientras que al incubar la calcineurina con antioxidantes, la actividad de la fosfatasa se incrementaba en relación a las células control (Sommer *et al.*, 2000).

Proteína cinasa C

La proteína cinasa C- α (PKC- α) esta sujeta a una regulación redox celular más complicada. Esta enzima se activa por el diacilglicerol (DG) (Nishizuka, 1992) y este efecto es mimetizado por ésteres de forbol (PMA) (Blumberg, 1991). El sitio de unión para el DG o el PMA esta localizado en una región conservada rica en cisteínas dentro del dominio amino terminal. La PKC- α podría activarse por H_2O_2 en un proceso que involucraría la fosforilación de tirosina en el dominio catalítico

(Konishi *et al.*, 1997). Sin embargo, se ha observado que sólo bajas concentraciones de H_2O_2 estimulan la actividad de cinasa mientras que altas concentraciones la inactivan (Gopalakrishna y Anderson, 1989). De modo que la PKC- α parece estar sujeta a una regulación redox dual en la cual los oxidantes juegan un papel tanto en la supresión como en la estimulación de la actividad (Kamata y Hirata, 1999).

Canales de calcio

El papel del calcio (Ca^{2+}) como segundo mensajero en diversas vías de señalización intracelular ha sido ampliamente estudiado durante muchos años. Sin embargo, poco se sabe de la interrelación entre las señales de Ca^{2+} y las EOR. El fosfatidil inositol 1,4,5 trifosfato (IP3), generado por la fosfolipasa C γ , se une a los canales de Ca^{2+} /receptores del IP3 que se encuentran en el retículo endoplásmico elevando así el nivel de Ca^{2+} citosólico (Berridge, 1993). Estudios posteriores mostraron que las EOR incrementan los niveles de Ca^{2+} , a través de la activación de la fosfolipasa C γ y consecuente producción de IP3 (Qin *et al.*, 1995). No obstante también se ha reportado que el receptor a IP3 por sí mismo se regula por el estado redox de la célula. Berridge y colaboradores encontraron que el glutatión en su forma oxidada (GSSG) promueve la liberación de Ca^{2+} a partir de una poza sensible al IP3 en hepatocitos permeabilizados (Missiaen *et al.*, 1991). Además, la actividad de la ATPasa de Ca^{2+} (Barnes, 2000), el intercambiador Na^{2+}/Ca^{2+} (Goldhaber, 1996) y la calmodulina (Yin *et al.*, 2000) se modulan por el estado redox celular. Los efectos de las EOR sobre el ciclo celular y la señalización de Ca^{2+} son aparentemente dependientes de la dosis. Mientras que bajas concentraciones de EOR tienen un efecto mitogénico, altas concentraciones resultan en un fenotipo de envejecimiento e inducción de apoptosis (Bladier *et al.*, 1997).

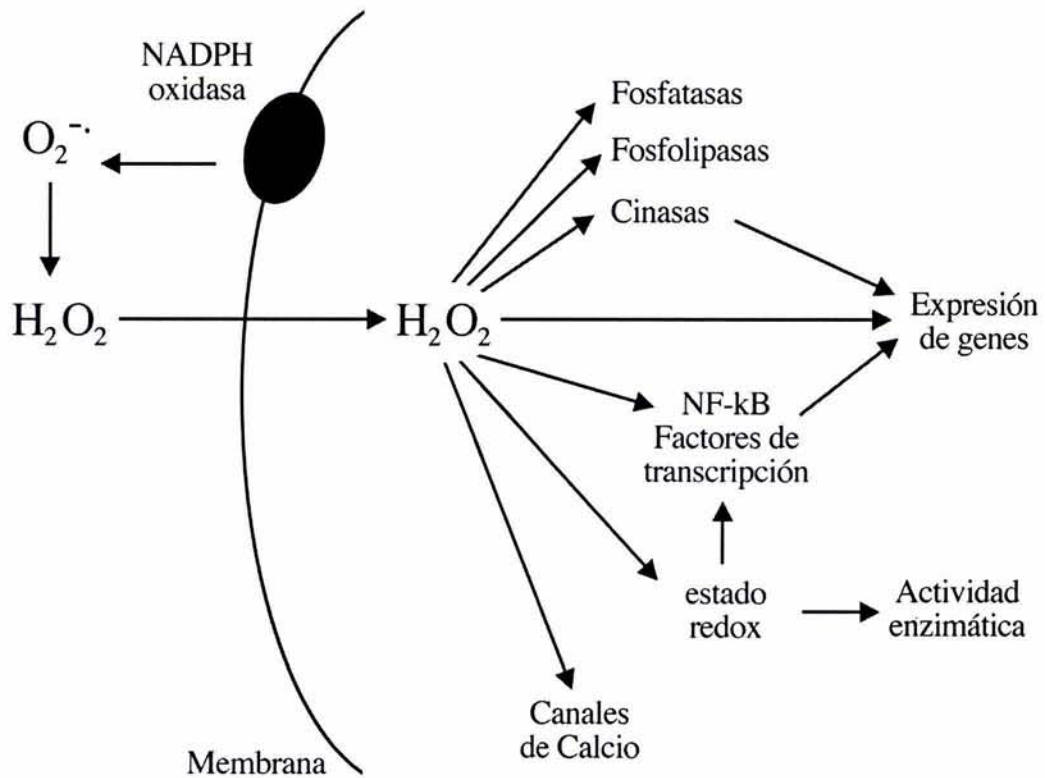
Factor de transcripción AP-1

El factor transcripcional AP-1 está formado por las proteínas c-Fos y c-Jun y esta implicado en múltiples procesos celulares. En linfocitos T, AP-1 esta involucrado en la expresión del gen de interleucina 2 así como otros genes relevantes para la respuesta inmune (Matsuda *et al.*, 1998). Se ha observado que tanto la adición externa de oxidantes como las EOR inducidas por un ligando están implicadas en la activación de AP-1. La fosforilación de c-Fos y c-Jun, necesaria para la activación de AP-1 es mediada por dos cinasas MAP diferentes: JNK y ERK y cada cinasa es activada por un tipo diferente de estrés oxidativo. Como resultado de la activación AP-1 se transloca al núcleo. El dominio de unión al DNA de c-Fos y c-Jun contiene un residuo de cisteína que es sensible al estado redox (Abate *et al.*, 1990), de manera que si se oxida, el heterodímero no se puede unir al DNA. Sin embargo, se ha observado que la tioredoxina y la proteína Ref-1 restablecen la capacidad de unión al DNA de AP-1 (Xanthoudakis y Curran, 1992). Esto sugiere que Ref-1, en asociación con la TRX, reduce el residuo de cisteína crítico.

En levadura, el factor de transcripción Yap1 (de la familia de AP-1), activa la expresión de genes antioxidantes en respuesta a estrés oxidativo (Schnell *et al.*, 1992). Yap1 se encuentra en el citoplasma y se ha observado que después de ser activado por compuestos como H₂O₂, diamida y menadiona se transloca del citoplasma al núcleo. La exportación al núcleo es a través de Crm1/Xpo1 y depende del estado redox. Yap1 contiene una señal de exportación nuclear en su dominio carboxilo terminal, esta señal se encuentra embebida en una región rica en cisteínas. Todos los modelos de regulación de Yap1 sugieren que el estrés oxidativo resulta en la oxidación de por lo menos cuatro de estas cisteínas (Azevedo *et al.*, 2003).

Factor de transcripción NF- κ B

NF- κ B es un heterodímero formado por las proteínas p50 y p65 que está involucrado en respuestas inflamatorias, inmunes y en el crecimiento celular (Baeuerle y Baltimore, 1996). Es el primer factor de transcripción en eucariontes que se demostró que respondía directamente al estrés oxidativo en ciertos tipos celulares (Schreck *et al.*, 1991) (Meyer *et al.*, 1993). En la línea celular Wurzberg (células T), en células L6 (miotubulos del músculo esquelético), en células MCF-7 (miocitos) y en células 70 Z/3 (células B) el factor de transcripción NF- κ B se activa en respuesta a concentraciones micromolares de H₂O₂. Además, esta activación se puede inhibir por antioxidantes como la N-acetil-L-cisteína. El factor de inhibición I- κ B funciona para mantener a NF- κ B en el citoplasma. La activación de NF- κ B ocurre cuando I- κ B se fosforila, después se ubiquitina y finalmente se degrada. Como consecuencia, NF- κ B queda libre y se puede translocar al núcleo. NF- κ B también muestra un residuo de cisteína característico en la región de unión al DNA. La oxidación de la cisteína inhibe la unión al DNA, mientras que la reducción permite unirse al DNA (Galter *et al.*, 1994). Estudios de resonancia magnética nuclear (NMR) han demostrado la unión directa de la tioredoxina al dominio de unión al DNA de NF- κ B, sugiriendo la participación directa de esta proteína en la reactivación de este factor de transcripción (Hirota *et al.*, 1999). Estos datos indican que al igual que AP-1, NF- κ B está sujeto a una regulación redox dual en la cual los oxidantes estimulan el principio de la vía de señalización pero al final de la vía tienen efectos opuestos al inactivar a los factores de transcripción (Kamata y Hirata, 1999) (Fig. 6).



Modificado de Hancock *et al.*, 2001. *Biochem Soc Trans.* 29: 345-350

Figura 6. Posibles blancos de las especies de oxígeno reactivas

IV. El papel de Ras y Rac en la producción de EOR

El ejemplo más claro en el que la proteína Rac está involucrada en la producción de superóxido es en la activación de la NADPH oxidasa en neutrófilos.

Rac es un miembro de la familia Rho (Ras homology) de proteínas monoméricas pequeñas (20-40 kDa) que hidrolizan GTP. En neutrófilos en reposo, Rac se localiza en el citosol formando un complejo con RhoGDI (guanine dissociation inhibitors) a través de un grupo geranilgeranil en su extremo carboxilo terminal, cuando el GDP unido a Rac se intercambia por GTP, a través de factores GEF (guanine exchange factors), la proteína Rac-GTP se ancla a la membrana por prenilación (Vignais, 2002). Una vez en la membrana, Rac se une directamente a p67phox y probablemente a gp91phox (Werner, 2004). La interacción de Rac con p67phox es a través de un dominio llamado "switch I" (Diekmann *et al.*, 1994) mientras que la región "insert" es la que se une con gp91phox (Freeman *et al.*, 1996). El mecanismo detallado de la regulación de Rac sobre la actividad de la NADPH oxidasa no es claro, algunos sugieren que Rac modula la transferencia de electrones al unirse a p67phox (Freeman y Lambeth, 1996), mientras que otros creen que la transferencia de electrones es directamente a través de gp91phox (Diebold y Bokoch, 2001).

Es muy interesante como la producción de superóxido se asoció con cambios fenotípicos en células transformadas. Fibroblastos NIH 3T3 transformados con una isoforma activa de Ras, produjo grandes cantidades de superóxido. Esta producción de superóxido se suprimió por la expresión de isoformas negativas dominantes de Ras o Rac, así como por el tratamiento con DPI (inhibidor de flavoproteínas como las NADPH oxidasas). Además, la proliferación de las células transformadas con Ras activo se inhibió con el antioxidante N-acetil-L-cisteína. Estos datos sugirieron que la proliferación de fibroblastos depende directamente del aumento en la concentración de superóxido regulado por Ras y Rac (Irani *et al.*, 1997).

Se sabe que las proteínas Ras y Rac tienen un papel importante en la organización del citoesqueleto de actina. Recientemente se ha mostrado que la producción de EOR dependientes de Rac juega un papel importante en la adhesión celular. En células endoteliales la forma activa de Rac induce una pérdida rápida de la adhesión

celular mediada por la caderina VE. Además, ésta pérdida de la adhesión ocurre en paralelo y depende de la producción de EOR (van Wetering *et al.*, 2002).

Adicionalmente, se ha observado que la unión a factores de crecimiento como EGF y PDGF promueve la producción de EOR como un intermediario necesario para que proceda la transducción de la señal (Sundaresan *et al.*, 1996). Por ejemplo, receptores al factor de crecimiento epidermal activan a Rac para producir EOR en un proceso sensible a DPI, a través de un mecanismo que depende de la cinasa PI3K (Bae *et al.*, 2000). La generación de EOR disparada por factores de crecimiento a través de Rac regulan a receptores de cinasas de tirosina al inhibir la actividad de fosfatasas de tirosina. Esta inactivación a corto plazo de las fosfatasas incrementa la actividad de los receptores cinasa de tirosina y es necesario para la transducción de la señal (Lee *et al.*, 1998).

V. Las especies de oxígeno reactivas en la diferenciación celular

En eucariontes inferiores se ha propuesto que las EOR juegan un papel importante en la diferenciación celular (Hansberg y Aguirre, 1990). En *Neurospora crassa* se ha observado que al inicio de cada transición morfogénica, ocurre un estado hiperoxidante en el cual se generan especies de oxígeno reactivas por arriba de la capacidad celular para contender con ellas. Evidencias del estado hiperoxidante son la oxidación masiva de proteínas y su degradación (Toledo *et al.*, 1995), un aumento en la actividad de la catalasa y de la superóxido dismutasa (Hansberg y Aguirre, 1990), la pérdida en el poder reductor celular (Toledo *et al.*, 1991), la quimioluminiscencia espontánea dependiente del O₂ y la inhibición de ésta y de la diferenciación celular por antioxidantes (Hansberg *et al.*, 1993).

VI. *Apergillus nidulans* como modelo experimental

A. nidulans es un hongo ascomiceto homotálico, ideal como modelo para estudios genéticos y de diferenciación celular. En respuesta a diferentes señales crece extensamente o elige dos vías distintas de diferenciación celular (Fig. 7). El ciclo asexual o conidiación se caracteriza por la formación de las estructuras reproductivas llamadas conidióforos y por la producción de las esporas asexuales o conidias. Este proceso se induce por ayuno de nutrientes o por exposición al aire (Skromne *et al.*, 1995). Diversos genes involucrados en el desarrollo asexual se han caracterizado genéticamente y se han establecido las interacciones entre ellos. Sin embargo, el desarrollo sexual (formación de cuerpos fructíferos o cleistotecios), el cual se induce por limitación de oxígeno y por ausencia de luz, no se entiende bien a nivel molecular. Sólo unos cuantos genes reguladores que afectan el desarrollo sexual han sido identificados. Por ejemplo: el producto del gen *veA1* codifica para una proteína reguladora dependiente de la luz, la cual reprime el desarrollo asexual y promueve la formación de cleistotecios (Kim *et al.*, 2002). *stuA* y *medA* son genes reguladores que afectan tanto el desarrollo sexual como el asexual. Mutantes en ambos genes son acleistoteciales (Wu y Miller, 1997). Sin embargo, mutantes en *medA* producen masas de células Hülle, mientras que mutantes *stuA* carecen de ellas. *steA* codifica para un factor de transcripción con dedos de Zinc y mutantes $\Delta steA$ son incapaces de formar cleistotecios (Vallim *et al.*, 2000). La interrupción del gen *nsdD* resulta en la ausencia del desarrollo sexual, ya que el producto de este gen corresponde a un factor de transcripción tipo GATA (Han *et al.*, 2001). Sin embargo, aunque se han identificado éstos genes poco se conoce sobre el proceso de esporulación sexual.

Desarrollo del cuerpo fructífero (cleistotecio)

En *A. nidulans*, el ciclo sexual se inicia cuando en ciertos puntos del micelio, las hifas vegetativas se enrollan y fusionan para formar las células Hülle y los primordios. Aunque se ignoran las señales que disparan este proceso, hay evidencia

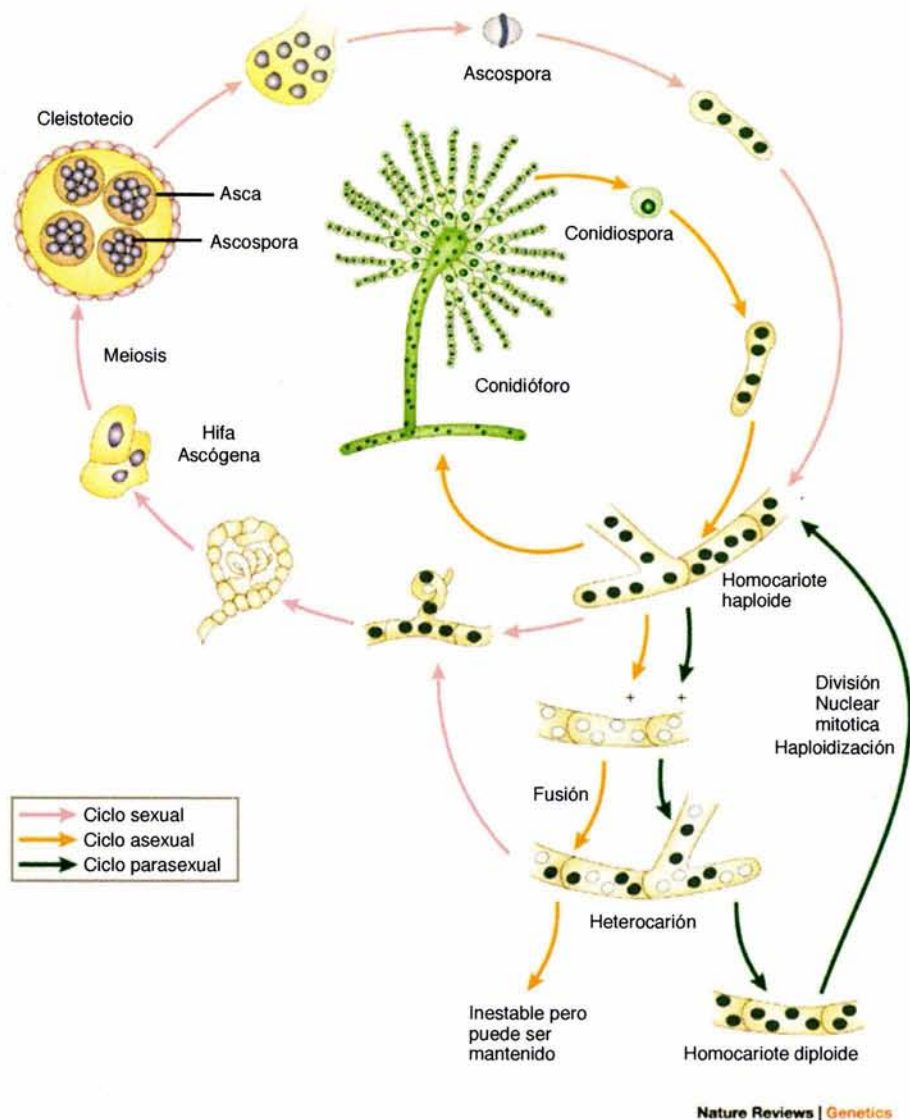


Figura 7. Ciclo de vida de *Aspergillus nidulans*. El micelio vegetativo está constituido de células filamentosas llamadas hifas, las cuales crecen apicalmente. El conjunto de hifas puede poseer núcleos idénticos (homocariones), distintos (heterocariones) o bien, dos núcleos pueden fusionarse para generar un diploide estable o uno transitorio. Este último entra en la fase sexual del ciclo al iniciar el proceso de la cariogamia y proseguir con la meiosis. Esta última es seguida por una división mitótica y de esta manera, se generan ocho ascosporas dentro de unas bolsas llamadas ascas, las cuales a su vez están dentro de un cuerpo fructífero esférico de paredes gruesas llamada cleistotecio. Antes de madurar, las ascosporas sufren una segunda división mitótica para formar el producto final binucleado. Las ascosporas germinan para dar origen a hifas haploides homocarióticas. La fase asexual del ciclo comienza con la formación de una célula pie que forma un tallo, éste se diferencia en la parte superior formando el conidióforo a partir del cual se producirán las conidiosporas.

indirecta de la participación de hormonas sexuales y receptores para dichas hormonas (Seo *et al.*, 2004).

El primordio es un paso inicial en la formación de los cuerpos fructíferos o cleistotecios, las estructuras más complejas que forma *A. nidulans* durante el ciclo sexual, dentro de los cuales se generan las ascosporas o esporas sexuales.

La formación del primordio involucra el desarrollo coordinado de dos tipos de tejidos: el tejido ascógeno que va a dar origen a las ascosporas y una red de hifas estériles que envuelven al tejido ascógeno que finalmente dará origen a la pared del cleistotecio llamada peridio. Al principio el primordio es pequeño, de tan solo 6 μm de diámetro, el centro es unicelular y multinucleado y esta envuelto con una capa suelta de hifas (Fig. 8, estadio 1). Cuando el centro se alarga hasta 10 μm , el número de vueltas de las hifas que lo rodean aumenta formando así una cubierta más completa. En este momento es cuando aparecen las primeras células Hülle (HC) en la vecindad de los primordios (P) (Fig. 8, estadio 2). Conforme el primordio va creciendo (20 μm) el número de capas del peridium se incrementa a tres (Fig. 8, estadio 3). Cuando el diámetro del cleistotecio alcanza las 40 μm de diámetro las capas del peridium se incrementan a seis y el sistema ascógeno se vuelve multicelular (Fig.8, estadio 4). Al alcanzar aproximadamente 100 μm de diámetro la porción central del cleistotecio esta formada de pequeñas células binucleadas. En contraposición, el número de capas del peridium se reduce considerablemente con respecto a los estados tempranos del desarrollo del cleistotecio. Al parecer muchas células de las capas internas del peridium se van desintegrando (Fig.8, estadio 5a). En este estado el cleistotecio joven esta completamente rodeado de células Hülle (HC) (Fig.8, estadio 5b). Cuando el cleistotecio mide entre 120 y 170 μm de diámetro, las células binucleadas del centro se ensanchan y llevan a cabo la cariogamia, la meiosis y una mitosis posterior para dar origen a las ascosporas maduras. En este momento el cleistotecio se ha desarrollado completamente y el peridium esta compuesto de tan sólo dos capas de células aplanadas (Fig.8, estadio 6)(Shon y Yoon, 2002).

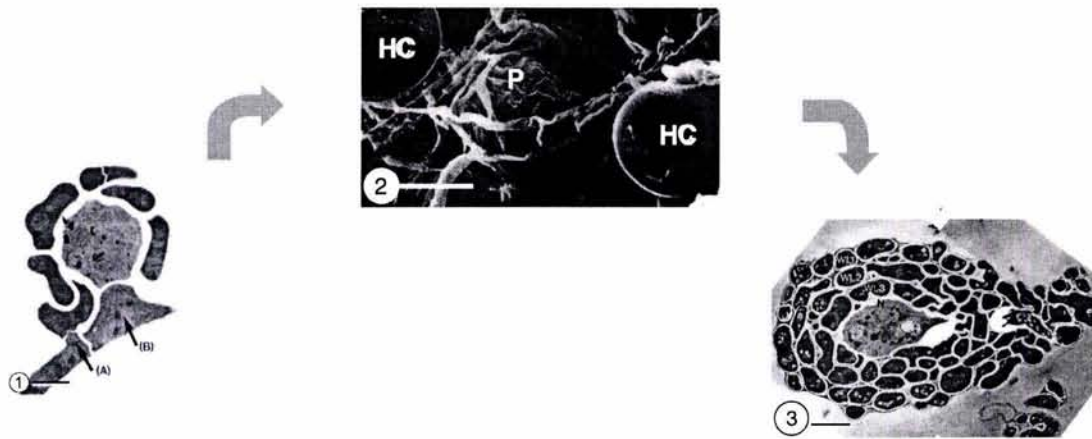
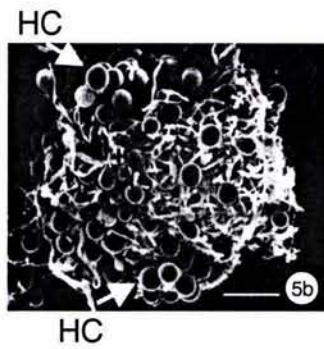
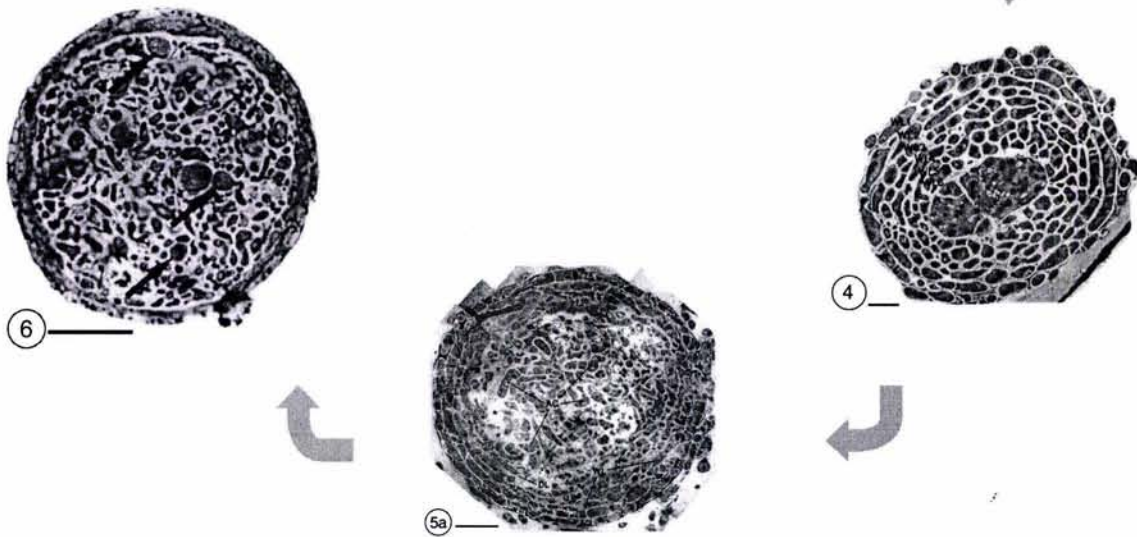


Figura 8.
Desarrollo de un cleistotecio



Las micrografías electrónicas fueron tomadas de Shon & Yoon. *Mycobiology*, 2002.

En nuestro laboratorio encontramos que en *A. nidulans* la sobre-expresión de la proteína Ras causa la posible oxidación de la catalasa B, en un proceso que se inhibe por DPI (inhibidor de la NADPH-oxidasa). Este resultado y el hecho de que en células animales Ras regula la producción de EOR a través de una NADPH oxidasa (Irani *et al.*, 1997), nos llevaron a investigar la existencia de posibles genes para NADPH oxidasa del tipo gp91phox en *A. nidulans*, como objetivo inicial. Este objetivo permitió identificar y caracterizar al gen *noxA* como el primer gen de NADPH oxidasa descrito en microorganismos eucariotos.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Aislar y caracterizar el gen *noxA*.
2. Interrumpir el gen *noxA* y caracterizar la mutante en distintas condiciones de crecimiento.
3. Estudiar la regulación del gen *noxA*.
4. Determinar si el producto del gen *noxA* corresponde a una NADPH oxidasa funcional.
5. Analizar el papel de NoxA en la fisiología y la diferenciación celular de *A. nidulans*.

MATERIALES Y METODOS

I. Medios de cultivo y condiciones de crecimiento de *A. nidulans* y *E. coli*.

El medio de cultivo empleado para crecer *A. nidulans* es el descrito por Käfer (1977) con glucosa al 1% y adicionado con los requerimientos necesarios para cada cepa. Para los medios sólidos se adicionó agar al 1.25% y la temperatura de incubación para los cultivos fue de 37°C. Los cultivos líquidos se crecieron a la misma temperatura y a 300 rpm. Para estos cultivos se emplearon matraces de 250 ml con 50 ml de medio. Todos los medios de cultivo y el material necesario se esterilizaron 121°C durante 20 minutos. En la tabla I se describe el genotipo de las cepas utilizadas en este trabajo.

Tabla I

Cepa	Genotipo	Fuente
RMS011	<i>pabaA1, yA2, ΔargB::trpCΔB; trpC801, veA1</i>	M. Stringer, USA
AST27	<i>biA1; argB⁺::P_{alcA}:AraS^{G17V}; veA1</i>	Tapan Som, 1994
AST29	<i>biA1; argB⁺::P_{alcA}:AraS^{S22N}; veA1</i>	Tapan Som, 1994
CLK43	<i>pabaA1, yA2, veA1</i>	Kawasaki <i>et al.</i> 2003
TOL1	<i>pabaA1, yA2, ΔargB::trpCΔB; ΔsakaA::argB; trpC801, veA1</i>	Kawasaki <i>et al.</i> 2003
COS56	<i>biA1; metG1; ΔsakaA::argB; veA1</i>	O. Sánchez, México, progenie de TOL1 X TJA22
COS70	<i>pabaA1, yA2; ΔsteA::argB, ΔsakaA::argB; veA1</i>	Kawasaki <i>et al.</i> 2003
KHH32	<i>pabaA1, yA2, ΔargB::trpC; ΔnsdD::argB; trpC801</i>	Dong-Min Han
TTL3	<i>pabaA1, yA2, ΔargB::trpCΔB; ΔnoxA::argB; trpC801, veA1</i>	Este trabajo, RMS011
CTL273	<i>biA1; argB⁺::P_{alcA}:AraS^{G17V}; ΔnoxA::argB; trpC801, veA1</i>	Este trabajo, progenie de AST27 X TTL3
CTL298	<i>biA1; argB⁺::P_{alcA}:AraS^{S22N}; ΔnoxA::argB; trpC801, veA1</i>	Este trabajo, progenie de AST29 X TTL3
CTL7	<i>biA1; metG1; ΔnoxA::argB; veA1</i>	Este trabajo, progenie de TTL3 X COS56
CTL9	<i>pabaA1, yA2, ΔnoxA::argB; ΔsakaA::argB;</i>	Este trabajo, progenie

	<i>veA1</i>	de TTL3 X COS56
CTL12	<i>pabaA1; brlA1, veA1</i>	Este trabajo, progenie de CIS20 X CTL7
CTL15	<i>pabaA1, yA2; stuA1</i>	Este trabajo, progenie de TGS1 (G. Soid, México) X UI-7 (B. Miller, USA)
CTL16	<i>pabaA1; ΔnoxA::argB; brlA1, veA1</i>	Este trabajo, progenie de CTL12 X CTL7
CTL17	<i>pabaA1; ΔnoxA::argB; brlA1, veA1</i>	Este trabajo, progenie de CTL12 X CTL7
CTL18	<i>pabaA1; ΔnoxA::argB; brlA1, veA1</i>	Este trabajo, progenie de CTL12 X CTL7
CTL19	<i>pabaA1; ΔnoxA::argB; brlA1, veA1</i>	Este trabajo, progenie de CTL12 X CTL7

II. Inducción del promotor *AlcA* y determinación de la actividad de catalasa

Para inducir la transcripción del gen *alcA* se inocularon 10×10^5 esporas/ml en mm con glucosa. El cultivo se creció por 12 h a 37°C con agitación constante de 300 rpm. Posteriormente se transfirió el micelio a medio con 50 mM de treonina (sin glucosa) por 3 h (Adams y Timberlake, 1990). En algunos casos se añadió 20 μ M de difenil idonio (DPI) justo en el momento de transferir el micelio al medio con treonina.

Los extractos de proteína se obtuvieron de micelio liofilizado. El micelio se rompió agregando un volumen de perlas de vidrio por un volumen de amortiguador/micelio. Se agitó en el vortex y se colocó en hielo por 1 min. Esta operación se repitió 3 veces. Se usó un amortiguador con HEPES 20 mM, DTT 1 mM pH 7.2. Después las muestras se centrifugaron por 15 min a 12 000 rpm a 4°C, el sobrenadante se paso a un tubo nuevo, se mantuvo en hielo y se hicieron diluciones 1:50 para cuantificar la proteína por el método de Bradford (1976).

El gel nativo para proteínas se preparó al 8.5% según el método 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).

III. Inducción del Desarrollo Sexual

Para inducir la formación de cleistotecios se realizaron cultivos a confluencia en condiciones limitantes de oxígeno. Se inocularon 1×10^5 esporas en un tubo con 4 ml de medio mínimo suplementado, glucosa al 2% y agar suave (0.625 g/100 ml). El inóculo se mezcló en el vortex e inmediatamente después se vertió en cajas con MM sólido. Las cajas Petri se dejaron 30 min a temperatura ambiente para que gelificara el agar suave y después se incubaron a 37°C durante 24 h. Transcurrido este tiempo se sellaron las cajas con dos capas de "parafilm" y se continuó la incubación a 37°C por 5 días más.

IV. Ensayo de detección de Especies Reactivas de Oxígeno

Para detectar la producción de superóxido, las conidias de las cepas adecuadas fueron inoculadas en punto en el centro de una caja con mm sólido e incubadas a 37°C. Después de 48 h las cajas fueron selladas con "parafilm" y se continuó la incubación por 72 h más. Transcurrido este tiempo se rasparon muestras de micelio del borde de la colonia, las cuales contenían hifas vegetativas, células Hülle, primordios y/o cleistotecios maduros. Dichas muestras fueron incubadas por 20 min a temperatura ambiente en una solución que contenía 0.3 mM de cloruro de nitroazul de tetrazolio (NBT) y 0.3 mM de NADPH. Después de la reducción de las sales de tetrazolio se produjo un precipitado azul llamado formazan, en este momento las muestras fueron fotografiadas bajo el microscopio.

Para detectar la producción de peróxido de hidrógeno u otras especies reactivas de oxígeno se siguió esencialmente el mismo procedimiento, pero en este caso las muestras fueron incubadas en una solución con 2.5 µg/ml de 5-(γ-6)-carboxi-2',7'-diclorodihidrofluorescein diacetato (H₂DCFDA) y no incluyeron NADPH. Las

muestras teñidas con DCF se observaron usando un microscopio fluorescente Nikon E600 a una longitud de onda de 495 nm de excitación y 500-550 nm de emisión. Las imágenes confocales fueron obtenidas con un sistema de scanner laser MCR 1024 Bio-Rad adaptado a un microscopio invertido Nikon TMD 300. Las muestras fueron excitadas a una longitud de onda de 488 nm y 522-532 nm de emisión. En algunos casos, las muestras de micelio fueron preincubadas por 20 min con un inhibidor de flavoproteínas difenil iodonio (DPI) 50 μ M antes de incubar con los colorantes NBT o H₂DCFDA.

V. Técnicas de Biología Molecular

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

Las células competentes de la cepa XL1-Blue de *E. coli* se prepararon según Inoue *et al* (1990). La transformación de *E. coli* y las minipreparaciones de los plásmidos se llevaron a cabo según Sambrook *et al.* (1989).

La secuenciación del ADN de las construcciones que se realizaron en este trabajo, estuvo a cargo de la Dra. Laura Ongay de la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM.

Las sondas para hibridación se obtuvieron de la siguiente manera. Para hibridar con *noxA*, se digirió el plásmido pTLO5 con Apal y se usó la banda de 1.9 Kb. Para *argB*, se digirió el plásmido pMS12 con BamHI y se usó la banda de 1.7 Kb. En el caso de *cpeA* se digirió del plásmido "cpeA" con la enzima PstI y se usó la banda de 3 Kb. Los fragmentos de ADN se purificaron por el método de QiaQuick de Bio-Rad, siguiendo las especificaciones del proveedor.

La transformación de *A. nidulans* se realizó de acuerdo con Yelton *et al* (1984) y se emplearon 2 μ g de ADN para transformar. Todas las transformantes se analizaron por hibridaciones tipo Southern usando *noxA* como sonda para seleccionar el evento deseado.

La extracción de ADN genómico de *A. nidulans* se realizó de acuerdo con Timberlake (1980). El ARN se obtuvo con el estuche de TRIzol (GIBCO BRL, USA). Las hibridaciones tipo Southern y Northern se hicieron siguiendo las técnicas estándares de Sambrook *et al.* (1989).

Para construir la fusión del gen *noxA* con dos copias del epítipo de hemaglutinina y una etiqueta de 6 histidinas, se diseñaron los siguientes oligodesoxinucleótidos:

Nox18: 5' GTT TAG CGG CCG CCG AAG TGT TCC TTC CAG AAT TT 3'

Nox19: 5' GTT TAG CGG CCG CGC ATC AGT CGT CCT CTC C 3'

Estos corresponden al extremo 3' y al extremo 5' del gen *noxA* respectivamente. Cada oligonucleótidos contiene un sitio de corte NotI en su extremo 5'. Se hicieron amplificaciones por PCR con este par de oligonucleótidos y como templado se usó el cósmido L23F12. Se usó la enzima Pfu. Para amplificar este producto se realizó la siguiente mezcla:

H ₂ O	39.5 µl
Amortiguador 10X con magnesio	5 µl
dNTP's 10 mM	1.5 µl
L23F12 11 ng/µl	2 µl
Nox18 10 µM	1 µl
Nox19 10 µM	1 µl

El PCR se realizó en un termociclador Perkin Elmer 2400 y se llevaron a cabo un total de 35 ciclos. Después de calentar a 94°C por 3 min, se agregó 1 µl de Pfu y se continuó con el siguiente programa:

"hot start"	94°C	2 min
	94°C	30 seg
Alineamiento	55°C	45 seg
Extensión	72°C	2.5 min
	4°C	

El fragmento así amplificado se digirió con la enzima NotI, se purificó por el método de Quia Quike y se clonó en el plásmido pJA7.1 digerido con la misma enzima. El

nuevo vector se llamó pTLO9.1 y con el se hizo una reacción de secuenciación para corroborar que la fusión noxA::HA estuviera en el marco de lectura correcto.

VI. Obtención de extractos de proteínas de membrana.

Para los ensayos de cultivos sumergidos en ayuno de nitrógeno se inocularon 1×10^5 esporas/ ml en 50 ml de MM y se crecieron a 37°C por 18 h a 300 rpm. Después el micelio se filtro por miracloth y se lavó primero con H₂O₂ y después con medio sin nitrógeno, para finalmente cambiar el micelio a un matraz con 50 ml de MM sin nitrógeno. En este medio se creció por 3 h más a 37°C, posteriormente el micelio se colectó al filtrar por miracloth y se congeló inmediatamente en nitrógeno líquido. Las muestras se pulverizaron en morteros con nitrógeno líquido. Se mezcló polvo del micelio con una solución amortiguadora de extracción (MgCl₂ 0.1 mM, EDTA 3 mM, HEPES 50 mM, DTT 1 mM, polivinil pirrolidona 0.6%, PMSF 2 mM y cocktail de inhibidores de proteasas para hongos, pH 7.2) en una relación 1:1 en tubos Falcon de 12 ml. Para romper el micelio, los tubos se agitaron por 30 seg. en vórtex y se mantuvieron en hielo por un minuto; esta operación se repitió cinco veces. La mezcla se transfirió a tubos corex y se centrifugó a 10 000 rpm por 20 min. en el rotor SS-34 de la centrifuga Sorvall. El sobrenadante se pasó a un tubo de 50 ml para el rotor Ti45 y se centrifugó a 40 000 rpm por 40 min, a 4°C, en la ultracentrifuga Ultra-Beckman 7-55. La pastilla se resuspendió en 500 µl de amortiguador de fosfatos de potasio 50 mM pH 7.2. Se hicieron alícuotas de 100 µl y se guardaron a - 70°C. Las proteínas de membrana se cuantificaron empleando el método de Bradford con el reactivo "Bio-Rad Protein Assay" (Bio-Rad). La curva patrón se obtuvo con albúmina de suero de bovino (Sigma-Aldrich).

VII. Electroforesis en geles con SDS

Se solubilizaron de 100 a 150 µg de proteínas de membranas con el detergente zwitterionico CHAPS a una concentración final 0.5% durante 45 min a 4°C en agitación lenta. Posteriormente a cada muestra se le añadió el siguiente

amortiguador (47 mM Tris-HCl pH 7.8, 2% de SDS, 7.5% de glicerol, 40 mM de DTT y 0.002% de azul de bromofenol) y se incubó por 30 min a 45°C. Posteriormente las muestras se centrifugaron en la biofuga Pico (Heraeus) a 11 000 rpm por 2 min a TA. El sobrenadante se cargó en el gel y las muestras se corrieron en una cámara de electroforesis Bio-Rad con una solución amortiguadora (Tris-HCl 25 mM, pH 8.3, glicina 192 mM, SDS 0.1 %) según el protocolo de Laemmli a 100 V en geles con SDS de 1.5 mm de grosor, el gel separador al 8% y el gel concentrador al 5%. Se emplearon marcadores de peso molecular de proteínas preteñidas (Bio-Rad).

VIII. Inmunodetección de proteínas

Después de la electroforesis, las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Bio-Rad) por una hora a 100 V, empleando una cámara (Bio-Rad) y el amortiguador (Tris-HCl 25 mM, pH 8.3, glicina 192 mM, metanol 20%). Las membranas se bloquearon 1 h a TA en agitación con TBS 1X (1L 10X: Tris base 24.2g, NaCl 80g, pH 7.6), tween 20 0.1%, leche descremada 5% y después se realizaron tres lavados con TBS 1X, tween 20 0.1% de 5 min cada uno. El anticuerpo primario anti-gp91phox (Santa Cruz Biotechnology, Inc., EUA) se diluyó 1:1000 en TBS 1X, tween 20 0.1%, leche descremada 2% y se incubó con las membranas a 4°C toda la noche en agitación constante. Posteriormente se realizaron tres lavados de 5 min cada uno con TBS 1X, tween 20 0.1%. El anticuerpo secundario Rabbit Anti-goat IgG (H+L), conjugado con "Horse Radish Peroxidase" (HRP) (No. 31402, Pierce Biotechnology Inc., Rockeford IL, EUA) se diluyó 1:5000 en TBS 1X, tween 20 0.1%, leche descremada 2% y se incubó con la membrana por 1 h. Después se realizaron 3 lavados como se describió anteriormente. Para la detección de la peroxidasa se usó el sustrato quimioluminiscente SuperSignal West Pico (Pierce Biotechnology Inc., EUA) según las instrucciones del fabricante.

IX. Ensayo de actividad por reducción de NBT

- 1) Lavado del gel para sustituir el SDS por Tritón X-100. El gel se incubó en 800 ml del amortiguador Tris-HCl 10 mM pH 7.8, EDTA 2% y Tritón X-100 1%, por 75 min a TA. Después se lavó el gel con 200 ml de la misma solución amortiguadora.
- 2) Lavado del gel para reestablecer la actividad de la NADPH oxidasa. El gel se incubó en 100 ml del amortiguador Tris-HCl 20 mM pH 7.4, MgCl₂ 0.1 mM, FAD 25 μM, DTT 1 mM y CaCl₂ 1 mM; por 45 min a TA.
- 3) Lavado en la solución para revelar las bandas de formazan. El gel se incubó en el amortiguador Tris-HCl 50 mM pH 7.4, MgCl₂ 0.1 mM, CaCl₂ 1 mM, NBT 0.2 mM y NADPH 0.2 mM. La incubación se realizó en la oscuridad por 2 h o más si es necesario, en agitación lenta hasta visualizar las bandas. La reacción se detuvo al incubar el gel en agua.

RESULTADOS Y DISCUSION

Parte I. Resultados publicados:

Lara-Ortiz, T., Riveros-Rosas, H. y Aguirre, J. 2003. "Reactive oxygen species generated by microbial NADPH oxidase NoxA regulate sexual development in *Aspergillus nidulans*". *Molecular Microbiology* **50**(4), 1241 – 1255. Este trabajo incluye la caracterización e interrupción del gen *noxA*, la caracterización de la mutante correspondiente, la regulación del gen *noxA* y la demostración de la producción de EOR dependiente de NoxA, durante la diferenciación sexual de *A. nidulans*.

Parte II. Resultados sin publicar:

- a) Una triple mutante que carece de la actividad de las catalasas A, B y C ($\Delta catA$, $\Delta catB$, $\Delta catC$) produce más cuerpos fructíferos sexuales que una cepa silvestre.
- b) La expresión del gen *noxA* no requiere de los factores transcripcionales StuA y NsdD.
- c) La modificación de la catalasa B inducida por Ras-GTP es independiente de la actividad de NoxA.
- d) Ensayos de posible actividad de la NADPH oxidasa.

Parte I

Lara-Ortiz, T., Riveros-Rosas, H. y Aguirre, J. 2003. "Reactive oxygen species generated by microbial NADPH oxidase NoxA regulate sexual development in *Aspergillus nidulans*". *Molecular Microbiology* **50**(4), 1241 – 1255.

Resumen

La NADPH oxidasa de las células fagocíticas es una enzima que genera grandes cantidades de superóxido, a través de la subunidad catalítica gp91phox (Nox2), como parte de un mecanismo de defensa contra microorganismos patógenos. El descubrimiento de nuevos miembros funcionales de la familia Nox en plantas y animales ha llevado a conceder mayor importancia a las EOR como reguladoras de diversos procesos celulares tales como la defensa, el crecimiento y la transducción de señales. En este trabajo abordamos el papel de las EOR generadas por una NADPH oxidasa microbiana en la biología del hongo filamentoso *Aspergillus nidulans*. Reportamos la caracterización del gen *noxA* y demostramos que codifica para el primer miembro de una nueva subfamilia de NADPH oxidasas presente en eucariotes inferiores. La interrupción de *noxA* bloquea específicamente la diferenciación de los cuerpos fructíferos sexuales (cleistotecios), sin afectar el desarrollo asexual ó el crecimiento. El gen *noxA* se induce durante el desarrollo sexual, alcanzando su máxima expresión durante la diferenciación de los cleistotecios. Dicha expresión no depende de los factores transcripcionales SteA y StuA, los cuales son esenciales para la formación de estos cuerpos fructíferos. En cambio, el desarrollo sexual prematuro observado en mutantes nulas $\Delta sAKA$ depende de *noxA* y correlaciona con la desrepresión de este gen, indicando que SAKA, una cinasa MAPK que se activa por múltiples formas de estrés, regula la producción de EOR. Mediante un ensayo de reducción de sales de tetrazolio (NBT) para detectar superóxido, encontramos que las células Hülle y los cleistotecios jóvenes (primordios) producen superóxido en un proceso que se inhibe por DPI, un inhibidor de NADPH oxidasas, y se reduce marcadamente en mutantes $\Delta noxA$. Además, utilizando H_2DCFDA pudimos detectar que el H_2O_2 y posiblemente otras EOR se generan a través de NoxA en las paredes externas de los primordios. El papel esencial de las EOR generadas por NoxA en la diferenciación sexual de *A. nidulans* y la presencia de uno o dos genes homólogos de *noxA* en los hongos filamentosos, sugiere que las EOR generadas por NADPH oxidasas juegan un papel importante en la fisiología y la diferenciación de los hongos.

Reactive oxygen species generated by microbial NADPH oxidase NoxA regulate sexual development in *Aspergillus nidulans*

Teresa Lara-Ortiz,¹ Héctor Riveros-Rosas² and Jesús Aguirre^{1*}

¹Departamento de Genética Molecular, Instituto de Fisiología Celular, and ²Departamento de Bioquímica, Fac. Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510 México, DF.

Summary

NADPH oxidases (Nox) have been characterized as higher eukaryotic enzymes used deliberately to produce reactive oxygen species (ROS). The recent discovery of new functional members of the Nox family in plants and animals has led to the recognition of the increasing importance of ROS as signals involved in regulation of diverse cellular processes such as defence, growth and signalling. Here, we address the role of NADPH oxidase-generated ROS in the biology of the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. We characterize the *noxA* gene and show that it encodes a member of a novel NADPH oxidase subfamily ubiquitous in lower eukaryotes. Deletion of *noxA* specifically blocks differentiation of sexual fruit bodies (cleistothecia), without affecting hyphal growth or asexual development. Accordingly, the *noxA* gene is induced during sexual development, peaking at the time of cleistothecia differentiation and in parallel with the hülle cell-associated catalase peroxidase gene *cpeA*. This expression pattern is not dependent on transcription factors SteA and StuA, which are essential for cleistothecia formation. In contrast, *noxA*-dependent premature sexual development correlates with *noxA* derepression in Δ *sakA* null mutants, connecting stress MAPK signalling to the regulated production of ROS. Using a nitroblue tetrazolium (NBT) assay to detect superoxide, we found that hülle cells and cleistothecia initials produce superoxide in a process inhibited by NADPH oxidase inhibitor DPI and markedly reduced in Δ *noxA* mutants. Furthermore, using H₂DCFDA, we

detected that H₂O₂ and possibly other ROS are generated in a NoxA-dependent fashion, mainly in the external walls from cleistothecia initials. The essential role of NoxA-generated ROS in *A. nidulans* sexual differentiation and the presence of one or two *noxA* homologues in all analysed filamentous fungi suggest that NADPH oxidase-generated ROS play important roles in fungal physiology and differentiation.

Introduction

All aerobic organisms generate reactive oxygen species (ROS) as inevitable byproducts of normal metabolism, mainly through aerobic respiration. ROS are formed by O₂ excitation (singlet oxygen, ¹O₂; ozone, O₃), its partial reduction (superoxide, O₂^{•-}; hydrogen peroxide, H₂O₂; hydroxyl radical, HO[•]) and the formation of radicals or peroxides with other elements (nitric oxide, NO[•]; peroxy-nitrite, ONOO⁻) or compounds (lipoperoxides). The damaging effects of ROS on DNA, proteins, lipids and other cell components and their role in pathological processes and ageing has long been recognized (Aguirre *et al.*, 1989; Halliwell and Gutteridge, 1989; Beckman and Ames, 1998; McCord, 2000). More recently, the generation of ROS as a regulated process and the diverse roles of ROS in normal cell physiology have become very attractive research areas.

For a long time, the NADPH oxidase (Nox) from animal phagocytic cells represented the only well-studied case of an enzyme involved in the purposeful generation of ROS. This multisubunit oxidase is formed by cytosolic regulatory components Rac, p67*phox*, p47*phox* and p40*phox* and the integral membrane protein flavocytochrome b558, composed of the catalytic subunit gp91*phox* and p22*phox*. Phagocytic cell's Nox uses electrons from NADPH to generate O₂^{•-}, which is then dismutated to H₂O₂, resulting in the 'oxidative burst' used by immune cells in pathogen killing (Babior *et al.*, 2002). Mutations in human gp91*phox* result in the immunological disorder chronic granulomatous disease (Dinauer *et al.*, 1987). Plants contain enzymes homologous to gp91*phox*, which have also been involved in ROS production in response to pathogens (Keller *et al.*, 1998; Torres *et al.*, 2002).

Accepted 28 August, 2003. *For correspondence. E-mail jaguirre@ifc.unam.mx; Tel. (+52) 55 5622 5651; Fax (+52) 55 5622 5630.

New Nox genes have been discovered in animals (Suh *et al.*, 1999; Lambeth *et al.*, 2000) and plants (Torres *et al.*, 1998), suggesting new roles for Nox-generated ROS in eukaryotic cell physiology. Recently, Nox-generated ROS have been implicated in the regulation of cell growth (Suh *et al.*, 1999; Lambeth *et al.*, 2000; Foreman *et al.*, 2003), mitosis (Irani *et al.*, 1997), hormone biosynthesis (Moreno *et al.*, 2002) and oxidation of extracellular matrix (Edens *et al.*, 2001). Additional roles in oxygen sensing (Geiszt *et al.*, 2000), growth factor signalling (Griendling *et al.*, 2000) and fertilization (Banfi *et al.*, 2001) have been proposed.

In lower eukaryotes, ROS have been proposed to play essential roles in lifespan control (Osiewacz, 2002) and cell differentiation (Hansberg and Aguirre, 1990). In *Neurospora crassa*, ROS generated at the start of each of the morphogenetic steps that occur during asexual development (Hansberg *et al.*, 1993) correlate with the oxidation of protein (Aguirre *et al.*, 1989; Toledo *et al.*, 1994), NAD(P)H and glutathione (Toledo *et al.*, 1991), detected during the process. It was proposed that, under those conditions, ROS originate from a metabolic unbalance caused by nutrient starvation and high O₂ tension. More recently, we detected that the NADPH oxidase inhibitor DPI inhibited ROS production in *Aspergillus nidulans* (R. E. Navarro and J. Aguirre, unpublished). Indeed, after confirming the occurrence of a gp91phox homologue in a genomic database, we decided to evaluate the role of such putative Nox in the biology of this fungus.

The ascomycete *A. nidulans* is an important model for genetic studies of cell differentiation. In response to different signals, it grows extensively or undergoes two different developmental pathways. Asexual development (conidiation), which is induced by nutrient starvation or exposure to air, has been well studied (Clutterbuck, 1969; Law and Timberlake, 1980; Martinelli and Kinghorn, 1994; Timberlake and Clutterbuck, 1994; Skromne *et al.*, 1995; Dutton *et al.*, 1997; Adams *et al.*, 1998). In contrast, sexual development (formation of fruiting bodies or cleistothecia), which is induced by oxygen limitation (Hoffmann *et al.*, 2000) and absence of light (Champe *et al.*, 1994), is not well understood at the molecular level. Although several transcription factors regulate cleistothecia formation (Clutterbuck, 1969; Dutton *et al.*, 1997; Hoffmann *et al.*, 2000; Vallim *et al.*, 2000; Han *et al.*, 2001), target genes specifically involved in this process have not been identified.

As a homothallic fungus, *A. nidulans* can perform self-sexual development. Cleistothecia formation involves the co-ordinated development of different types of tissue: ascogenous tissue that will give rise to asci and ascospores, and a network of sterile hyphae that wraps the ascogenous tissue and will ultimately develop into the cleistothecial wall or peridium (Champe *et al.*, 1994; Shon

and Yoon, 2002). In addition, numerous globose cells of unknown function called hülle cells surround cleistothecia initials. It has been suggested that hülle cells work as nurse cells during cleistothecia development and maturation (Hermann *et al.*, 1983; Champe *et al.*, 1994; Shon and Yoon, 2002).

Here, we characterize the *noxA* gene and show that it encodes a member of a novel NADPH oxidase subfamily ubiquitous in lower eukaryotes. We show that ROS are generated in hülle cells and peridium from cleistothecia initials and that NoxA-dependent ROS are essential for sexual differentiation in a process modulated by the SakA stress MAP kinase.

Results

The A. nidulans noxA gene encodes a novel microbial NADPH oxidase homologous to mammalian gp91phox

When this work was initiated, NADPH oxidase enzymes had not been reported in microorganisms. However, initial experiments (R. E. Navarro and J. Aguirre, unpublished) indicated that *A. nidulans* produced ROS in a process that was inhibited by NADPH oxidase inhibitor DPI. This prompted us to search for NADPH oxidase homologues within the *A. nidulans* genomic database from Cereon Genomics LLC (Cambridge, MA, USA), using *Arabidopsis thaliana* NADPH oxidase RbohAp10 (Keller *et al.*, 1998). A DNA fragment likely to encode a NADPH oxidase was used to identify a full-length genomic clone, which was then used to generate entire *noxA* sequence (GenBank accession number AY174088). DNA sequence analysis revealed an open reading frame (ORF) interrupted by three introns, the positions of which were confirmed by sequencing two independent cDNA clones. This ORF predicted a 550-amino-acid polypeptide with a molecular mass of 63 779 Da showing high similarity to gp91phox, the catalytic subunit of the respiratory burst NADPH oxidase from phagocytes and other mammalian Nox enzymes (Dinauer *et al.*, 1987; Babior *et al.*, 2002). Consequently, the corresponding gene was named *noxA* (NADPH oxidase A). gp91phox and other NADPH oxidases use NADPH and O₂ to produce superoxide anions in a regulated process. As shown in Fig. 1, protein NoxA contains features that are conserved in characterized Nox enzymes, namely predicted transmembrane domains, four histidines proposed to participate in haem binding, as well as sequences involved in FAD and NADPH binding (Suh *et al.*, 1999; Geiszt *et al.*, 2000; Lambeth *et al.*, 2000; Arnold *et al.*, 2001; Cheng *et al.*, 2001; Maturana *et al.*, 2001; Babior *et al.*, 2002).

NoxA also shows high similarity to larger Nox enzymes from plants and animal sources. Large Nox from plants contain characteristic Ca²⁺ binding sites towards the NH₂-

Hsgp91phox	MGNWAVNEGLSI-----FVILVWL	19
RnNox1	MGNWLVNHWSV-----LFLVSWL	19
AnNoxA	MGRYPLKSYFAPSKL-----FFYTWF	22
NcNox2	MSYGGYDLRSNTDSSIEKPSERSRWTPLTRMLLSGEMTQERQKELSPREKFDRWMVNEGYRRIFVVFVM	70
Hsgp91phox	GLNVFLEFVWYRVDI PPKFFYTRKLLGSALALARAPAACLNFNCMLILLEPVCRNLLSFLRGSSACCSTR	89
RnNox1	GLNIFLEFVYVFLNYEKSDKYTYTREILGTALALARASALCLNFNSMVLIPVCRNLLSFLRGTCFSFCNHT	89
AnNoxA	GAHIAIFAYGWYHQAKSEPLS-PLNVLSYSVWISRGAGLVLTVDGTLILLEMCRNLVRFRLR-----PKL	85
NcNox2	VLHAIVFAFGFVNYAVKDNLQIARDTFGPTYMIARSAALVLHVDVALVLPVCRTLISLARQT----PLN	136
Hsgp91phox	VRRQLDRNLTFHKMVAWMIALHSAIHTIAHLFNVEVCVNARVNNSDPYSVALSELGDRQNE-SYLNFAK	158
RnNox1	LRKPLDHNLTFFHKLVAYMICIFTAIIHIAHLFNERYRSRSQQAMDGSLASVLSLFLHPEKEDSWLN----	155
AnNoxA	RWLPLDENWFRQVAYATLVFTILHVAHYVNFYNIERKQ-----LR-----	128
NcNox2	GIIQFDKNITFHIITTAWSIFFWSVHTIAHWNFAQIAAKN-----LG----	180
Hsgp91phox	RIKNP-EGGLYLAVTLLAGITGVVITLCLILIIISSTKTIRRSYFEVFWYTHHLEFVIFFIGLAIHGAERI	227
RnNox1	PIQSPNVTVMYAAFTSIAGLTGVAVALVLMVTSAMEFIRNRYFELFWYTHHLEFIYIICLGIHGLGGI	225
AnNoxA	-----PETALQIHYAQPAGVTGHVMLFCMMLMYTTAHRIRQQSFETFWYTHHLEFIPFLGLYTHATGCF	193
NcNox2	-----IYGWLLANFVSGPGWTGYIMLIALTGMVITSVEKTRRANYERFWYTHHMFIIFFFFWSIHGAFCM	245
Hsgp91phox	VRGQTAESLAVHNIITVCEQKISEWGKIK-ECPIQFAGNPPMTWKWIVGPMFLYLCELRVRFWRSQQKV	296
RnNox1	VRGQTEESMSESHPRNCSYSFHEWDKYERSCRSPHFVGGPPESWKWILAPIAFYIFERILRFYRSRQKV	295
AnNoxA	VRDSEAPYSPFAGERFWKHCIGYQG-----WRWELVAGFFYLCELRVREIRALRETE	245
NcNox2	IQPDFAFPCISVGT----TAIGVF-----WQYWMYGGFAYLAERIAREVRGKHKTY	292
Hsgp91phox	ITKVVTHPFTKTEIQMCKKGFKMEVGOYIFVKCPKVKLEWHPFTLTSAPEDDFSIHIRIVGDWTEGLF	366
RnNox1	ITKVVMPCKVLELQMRKRGFTMGIGQYIFVNCPSISFLEWHPFTLTSAPEEFFSIHIRAAGDWTEENLI	365
AnNoxA	IVKVVRRHPYDAMEIQFRKPGFKYKPGQWLEIQVPEVSNQWHPFTITSCPFDDYVSIHVRQVDFTRALG	315
NcNox2	ISKVVQHPNSVCEIQIKKENTKTRAGQYIFFCCPAVSLWQYHPFTLTSAPEDDYISIHVRVVDGDFTROLA	362
Hsgp91phox	NACGCDKQEFQD-----AWKLPKIAVDGPFGTASEDFVSYEVVMLVVGAGIGVTFP	416
RnNox1	RTFEQQHS-----PMPRIEVDGPFGTSEDVQYEVAVLVGAGIGVTFP	409
AnNoxA	DALGCGPAQARDLEGLDPMGMY----EVALQNGQMPKLRVDGPGYGAPEADVFENEIAVLIGTGIGVTPW	381
NcNox2	ETLGCDFDNKKKGDTSKVVGVSQENDEVDPALRRVLPVYVDGPFGSASEDFVKEYEVSVLVVGAGIGVTFP	432
Hsgp91phox	ASILKSVWYKYCNNATNLKLLKIYFYWLCRDTHAFEFWADLLQLLESQMQE----RNNAGFLSYNIYLTG	482
RnNox1	ASFLKSIWYKQRAHNKLTQKIYFYWICRETGAFWFNNLLNSLEQEMDE----LGKPDFLNYRFLTG	475
AnNoxA	ASILKNIWHLRASPDPPRLRRVEFIWVKDITTSFEWFQALLSLEAQSASDAAYQGVSEFLRIHIYLTQ	451
NcNox2	ASILKSIWYRMNYPQKTRLSKVYFFWVCRDFGSFEWERSLLLAIEAQ-----DVDHRIEIHLYLTA	494
Hsgp91phox	--WDESQANHFVHHDEEKDVIITGLKQKTLYGRPNWNEFKTIAS-----QHPNTRIGVFLCG	538
RnNox1	--WDSNIAGHAALNFDRAVDLTGLKQKTSFGRPNWNEFSRIAT-----AHPKSVVGVFLCG	531
AnNoxA	RLDQDTTTTNIYLSVQELDPLTELKSRTNFGRPDFKRLFAMRNLQDQSYMRGLHSHSRTIEIGVYFCG	521
NcNox2	KIKIDDATNIMINDANADKDTITGLRSPNFGRPNDWMI FRGIR-----KLHAPGEAGVFFCG	552
Hsgp91phox	PEALAEATLSKQSI SNSESGPRGVHFI FNKENF	570
RnNox1	PPTLAKSLRKCCRRYSSLDPRKVQFYFNKETF	563
AnNoxA	PNVAARQIKAAASSAST---NEVKFKFWKEHF	550
NcNox2	PKGLGSSLHIFCNKYSE---PGFHFVWGKENE	581

Fig. 1. The *A. nidulans noxA* gene encodes a microbial NADPH oxidase homologous to mammalian gp91phox. The amino acid sequence of NoxA is aligned with human gp91phox (Dinauer *et al.*, 1987), *Rattus norvegicus* Nox1 (Suh *et al.*, 1999) and *Neurospora crassa* Nox2 (NCU02288.1) deduced from genomic sequence assembly version 2 (Galagan *et al.*, 2003) and direct DNA sequencing (K. Alvarez-Delfin, W. Hansberg and J. Aguirre, unpublished). Amino acids conserved in all proteins are shaded. Conserved histidines that are candidates for haem ligation are indicated by asterisks. Transmembrane regions predicted in both gp91phox and NoxA are underlined; the first gp91phox transmembrane region is part of a predicted signal peptide (Cheng *et al.*, 2001). Putative FAD- and NADPH-binding domains are also indicated. Alignment obtained with BioEdit using CLUSTALW was refined manually. NoxA transmembrane regions were predicted using PHD at PREDICTPROTEIN (<http://cubic.bioc.columbia.edu/predictprotein>).

terminal end (Keller *et al.*, 1998; Torres *et al.*, 1998), which are missing in NoxA. Large Nox from animals (Duox) contain a gp91phox homology region at the COOH-terminus and an NH₂-terminal domain homolo-

gous to animal peroxidases (Dupuy *et al.*, 1999; Edens *et al.*, 2001). Therefore, it can be concluded that noxA encodes the first characterized microbial member of the small-type NADPH oxidase family.

Although Nox enzymes from lower eukaryotes had not been characterized, searching GenBank and recently released genomic databases revealed the existence of several NoxA homologues, all from the small-size class, present in filamentous fungi but absent in *Cryptococcus neoformans*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida albicans*. Genomic databases showed that, as in *A. nidulans*, *A. fumigatus* contained a single *noxA* gene. However, cases such as *Neurospora crassa*, *Magnaporthe grisea*, *Fusarium graminearum* and *Phanerochaete chrysosporium*, in which two *noxA* homologues are present, seem to be more frequent (Fig. 2).

The divergent nature of these two homologues is supported by the phylogenetic analysis shown in Fig. 2. Indeed, NoxA is 70% identical to Nox1 from *Podospira anserina* (Lalucque and Silar, 2003) and *N. crassa* (accession number EAA34868), and the position of the first intron in the corresponding genes is conserved. In contrast, NoxA is only 40% identical to *N. crassa* Nox2 (Fig. 1), and there is no conservation in intron position. Our phylogenetic analysis shows that Nox proteins are eukaryotic enzymes (absent in bacteria or archaea), related to the ferric-chelate reductases, a protein family that shows a wide phylogenetic distribution. In agreement

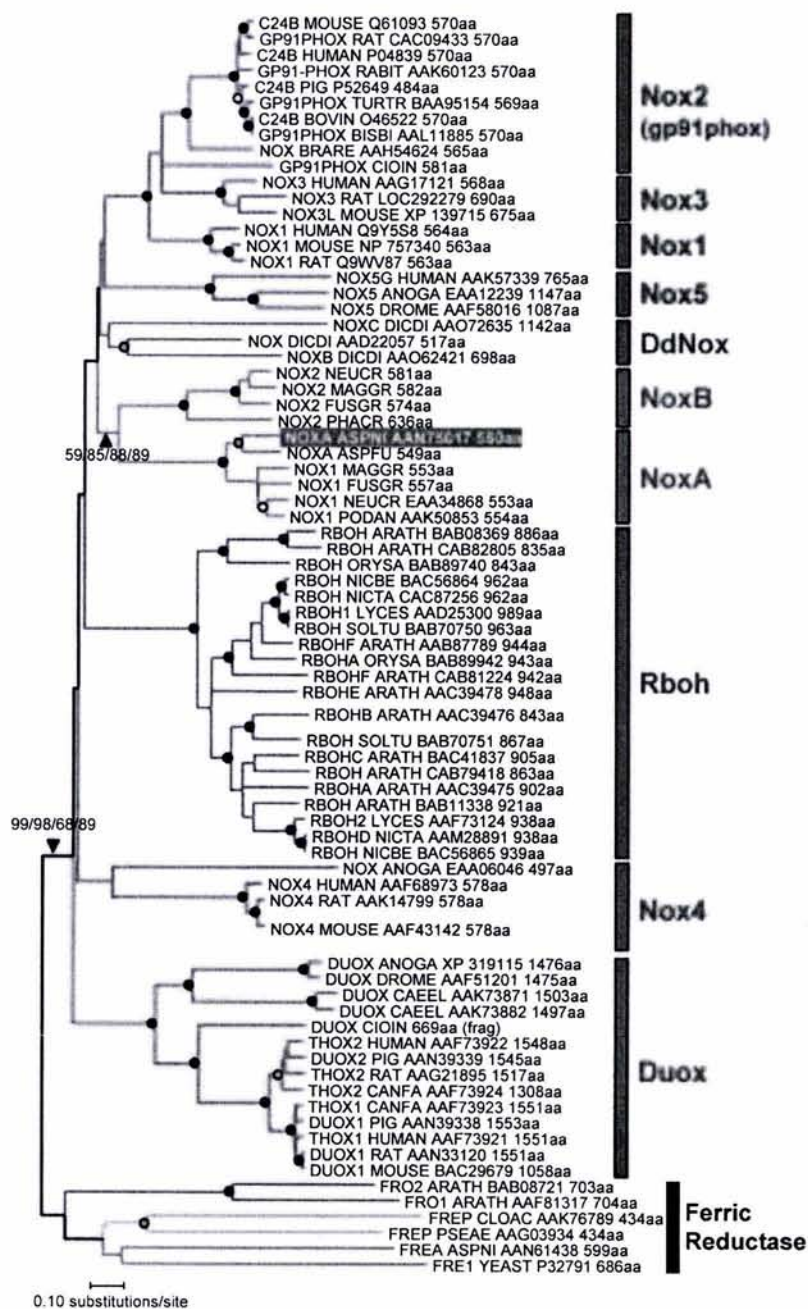


Fig. 2. Phylogenetic analysis of the NADPH oxidase family. Shown is a phylogenetic tree constructed with the transmembrane channel/haem binding domains of available protein sequences belonging to the NADPH oxidase family, using the minimum evolution method. Trees were calculated using MEGA 2.1 (Kumar *et al.*, 2001). Dots indicate nodes supported in >70% (open), >80% (grey) or >90% (closed) of 1000 random bootstrap replicates of all UPGMA, neighbour-joining (NJ), minimum evolution (ME) and maximum parsimony (MP) trees. Bootstrap values for critical nodes are shown as a percentage of 1000 replicates in UPGMA/NJ/ME/MP. Scale bar represents 0.1 amino acid substitutions per site. Obtained trees were rooted using selected ferric reductases, the protein family most related to Nox family. Vertical bars indicate protein subfamilies. Each branch and bar are coloured as follows: red, animals; green, plants; brown, fungi; light blue, protist; orange, bacteria. Sequence names are indicated according to a SWISSPROT-like identifier (Gene_organism), followed by database (GenBank, PIR, SWISSPROT, etc.) accession number and protein amino acid number. Fungal Nox deduced from genomic sequences were obtained from the following sources: *Magnaporthe grisea* (MAGGR) and *Fusarium graminearum* (FUSGR) from the Fungal Genome Initiative at the Whitehead Institute Center for Genomic Research (<http://www-genome.wi.mit.edu/annotation/fungi/fgi/>); *A. fumigatus* (ASPFU) from The Institute for Genomic Research (<http://www.tigr.org/tdb/e2k1/afu1/>) and *Phanerochaete chrysosporium* (PHACR) from the US Department of Energy Joint Genome Institute (<http://www.jgi.doe.gov/programs/whiterot.htm>). *Ciona intestinalis* (CIOIN) gp91phox and Duox were deduced from genomic sequence (Dehal *et al.*, 2002) and cDNA sequences AK113902 and AK112464 (Satou *et al.*, 2002) respectively. A full list of organism names included in the tree is given in *Experimental procedures*.

with proposed protein taxonomy (Riveros-Rosas *et al.*, 2003), 10 clusters of orthologous proteins or subfamilies can be identified inside the Nox family (Fig. 2): two subfamilies from fungi, one from plants, one from the protist *D. discoideum* and six from animals, although three of them are highly related paralogous enzymes [Nox1, Nox2 (gp91phox) and Nox3] forming a monophyletic group. As fungal Nox cluster apart from animal Nox1 and Nox2, we propose NoxA and NoxB as a generic designation for the fungal enzymes, which probably form a monophyletic group. Overall, all Nox subfamilies seem to have evolved in each kingdom through acquisition of other protein domains and/or function specialization. The fact that only a few fungal species such as *S. cerevisiae* and *S. pombe* do not contain *noxA* homologues suggests that the presence of *nox* genes is an ancestral character that some fungi have lost during the course of evolution.

The NADPH oxidase-encoding gene noxA is essential for sexual development

After confirming that *noxA* was expressed in cultures induced to undergo sexual development, we wished to address directly its role in *A. nidulans* physiology through

the targeted deletion of the gene. The *noxA* replacement vector pTLO7 was used to transform the *argB* auxotrophic strain RMS011. Polymerase chain reaction (PCR) analysis of 16 out of 40 Arg⁺ transformants indicated that five contained the expected *noxA* gene replacement event (Fig. 3A), which was then confirmed by Southern blotting. A more detailed Southern blot analysis of strain TTL3 (Fig. 3B) confirmed that, in this mutant, the *argB* marker replaced *noxA* sequence encoding amino acids 255 (D) to 342 (Q), involved in FAD binding (Fig. 1). Comparison of wild-type and $\Delta noxA$ TTL3 strains with respect to hyphal growth, hyphal morphology and asexual (conidiophore) development revealed no differences. However, during sexual crosses, we noticed that, although $\Delta noxA$ mutant strains were able to cross with other common strains, they seemed to be unable to cross with themselves and develop sexual fruiting bodies (self-cleistothecia), as normally happens in homothallic *A. nidulans*. To confirm this, wild-type and $\Delta noxA$ TTL3 strains were induced to develop sexually in confluent plates and analysed by scanning electron microscopy. Indeed, Fig. 4A and B shows that, in contrast to a wild-type strain, $\Delta noxA$ TTL3 did not develop any cleistothecia in self-crossing assays, yet it formed sexual cycle-specific hülle cells. As lack of

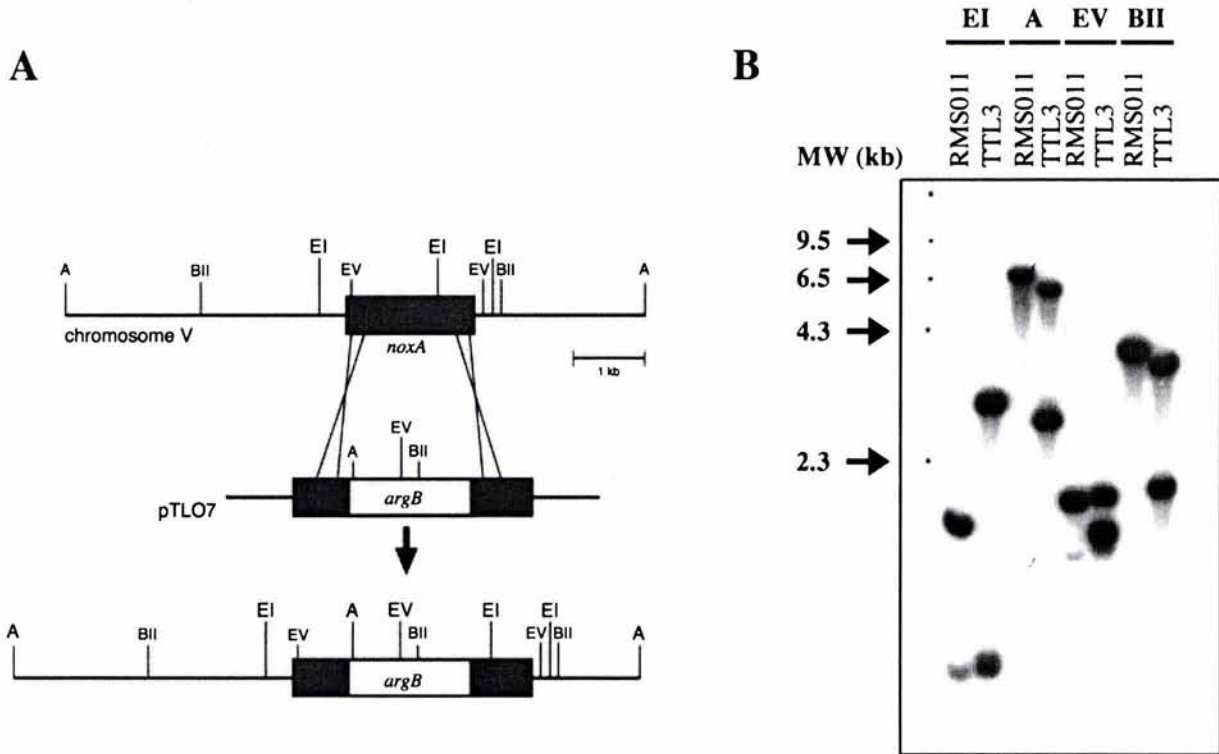


Fig. 3. Targeted disruption of the *noxA* gene.

A. Plasmid pTLO7 was constructed by replacing *noxA* sequence encoding amino acids 255–342 (Fig. 1) with the *argB* gene, used as a selectable marker. Linear pTLO7 was used to transform strain RMS011 to arginine independence. Restriction sites: EI, *EcoRI*; A, *Apal*; EV, *EcoRV*; BII, *BglII*. B. Genomic DNA from strains RMS011 and *noxA* disruption strain TTL3 was digested with the indicated enzymes and subjected to Southern blot analysis using a *noxA*-specific probe.

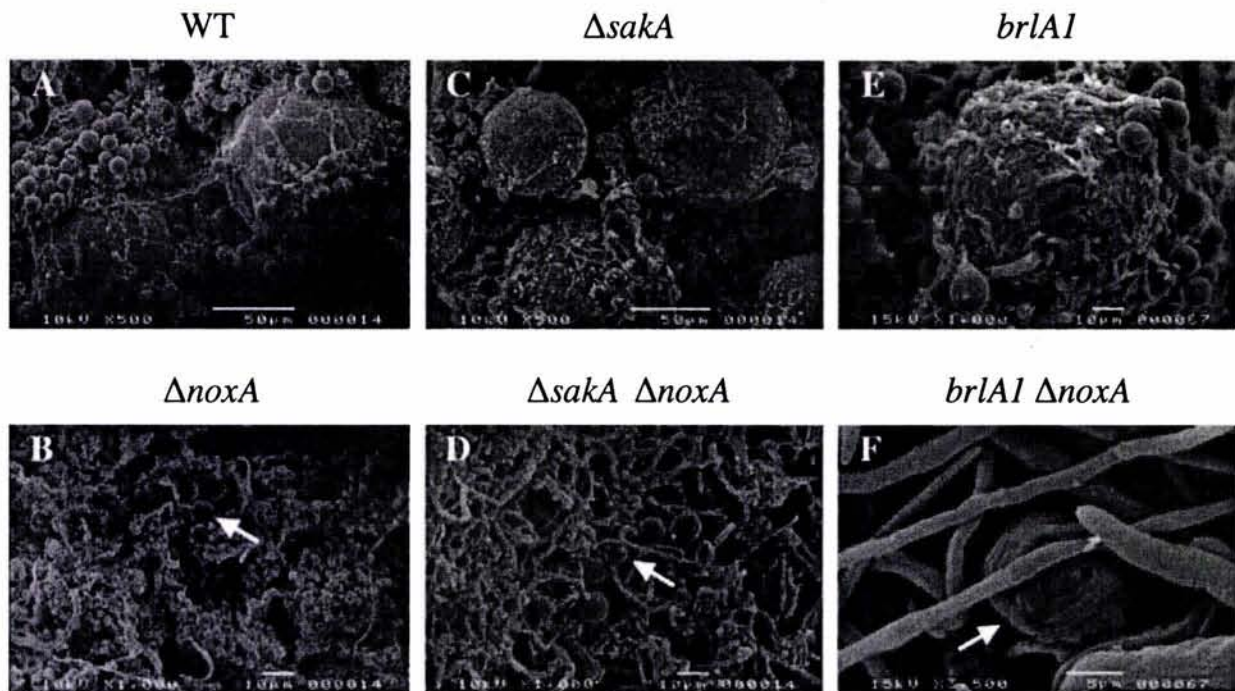


Fig. 4. The *noxA* gene is essential for cleistothecia development. Strains induced to undergo sexual development in confluent (A–D) or point-inoculated (E and F) plates were subjected to electron scanning microscopy to identify cleistothecia and hülle cells (A, C and E), hülle cells (arrows in B and D) and cleistothecia initials (arrow in F). Strains and relevant genotypes: CLK43 (WT), TTL3 ($\Delta noxA$), TOL1 ($\Delta saka$), CTL9 ($\Delta saka \Delta noxA$), CTL12 (*brlA1*), CTL16 (*brlA1 \Delta noxA*); full genotypes included in Table 1. Scale bars: A and C = 50 μ m; B, D and E = 10 μ m; F = 5 μ m.

cleistothecia could be followed in master plates sealed with Parafilm using a stereoscopic microscope, we performed crosses with different strains and confirmed that inability to develop self-cleistothecia segregated with the *argB* marker used to disrupt *noxA*.

We have reported that SakA MAP kinase, involved in stress signal transduction, also regulates sexual develop-

ment. Indeed, $\Delta saka$ mutant strains develop cleistothecia prematurely and in higher numbers than wild type (Kawasaki *et al.*, 2002). To test whether such premature sexual development resulted from activation of an alternative pathway or was dependent on *noxA*, $\Delta saka \Delta noxA$ mutants were generated (Table 1) and induced to develop cleistothecia. $\Delta saka \Delta noxA$ mutant strain CTL9 was

Table 1. *A. nidulans* strains used in this study.

Strain	Genotype	Source
RMS011	<i>pabaA1, yA2, \Delta argB::trpC\Delta B; trpC801, veA1</i>	M. Stringer (USA)
TJA22	<i>biA1; brlA::lacZ(argB+/argB::CAT); metG1; veA1</i>	J. Aguirre (México)
COS56	<i>biA1; metG1; \Delta saka::argB; veA1</i>	O. Sánchez (México), progeny from TOL1 \times TJA22
CIS20	<i>pabaA1; brlA1, veA1</i>	I. Skromne (México), progeny from TJA22 \times AJC7.52 (J. Clutterbuck, UK)
CLK43	<i>pabaA1, yA2; veA1</i>	Kawasaki <i>et al.</i> (2002)
TOL1	<i>pabaA1, yA2, \Delta argB::trpC\Delta B; \Delta saka::argB; trpC801, veA1</i>	Kawasaki <i>et al.</i> (2002)
COS70	<i>pabaA1, yA2; \Delta steA::argB, \Delta saka::argB; veA1</i>	Kawasaki <i>et al.</i> (2002)
TTL3	<i>pabaA1, yA2, \Delta argB::trpC\Delta B; \Delta noxA::argB; trpC801, veA1</i>	This work, RMS011 transformed with pTLO7
CTL7	<i>biA1; metG1; \Delta noxA::argB; veA1</i>	This work, progeny from TTL3 \times COS56
CTL9	<i>pabaA1, yA2, \Delta noxA::argB; \Delta saka::argB; veA1</i>	This work, progeny from TTL3 \times COS56
CTL12	<i>pabaA1; brlA1, veA1</i>	This work, progeny from CIS20 \times TJA22
CTL15	<i>pabaA1, yA2; stuA1</i>	This work, progeny from TGS1 (G. Soid, México) XUI-7 (B. Miller, USA)
CTL16	<i>pabaA1; \Delta noxA::argB; brlA1, veA1</i>	This work, progeny from CTL12 \times CTL7
CTL17	<i>pabaA1; \Delta noxA::argB; brlA1, veA1</i>	This work, progeny from CTL12 \times CTL7
CTL18	<i>pabaA1; \Delta noxA::argB; brlA1, veA1</i>	This work, progeny from CTL12 \times CTL7
CTL19	<i>pabaA1; \Delta noxA::argB; brlA1, veA1</i>	This work, progeny from CTL12 \times CTL7

Deletion of *noxA* in strains CTL9 and CTL16–19 was confirmed by PCR, using primers *argB5'* (5'-CATAAGTCCGCCAGCAGG-3') and *nox10* (5'-GTCCTCTCCTTACCAGC-3'). CTL9 $\Delta saka$ deletion was confirmed using primers *argB5'* and *sty10* (5'-GAGCGAGTGGTTGTAGGC-3').

unable to develop cleistothecia, in sharp contrast to Δ *sakA* mutant TOL1 (Fig. 4C and D).

Although with a delay of at least 12 h, it was clear that Δ *noxA* mutants TTL3 and CTL9 were able to form hülle cells that did not seem to be associated with any cleistothecial structure (Fig. 4B and D). To determine better the stage at which cleistothecial development was blocked in strain TTL3, we carefully examined samples from sexually induced cultures under the microscope, looking for cleistothecia initials or primordia. However, in multiple samples, only a few primordia-like structures were identified buried among high numbers of asexual reproductive structures and conidiospores that are formed before sexual development takes place (Clutterbuck, 1969; Champe *et al.*, 1994). To address this problem, we decided to follow sexual differentiation in the absence of asexual development using *brlA1* null mutants, which are blocked early in this process (Clutterbuck, 1969; Timberlake and Clutterbuck, 1994; Adams *et al.*, 1998).

As with other *brlA1* mutants, CTL12 formed high numbers of cleistothecia surrounded by hülle cells (Fig. 4E). Although somewhat heterogeneous in size, mature CTL12 cleistothecia were hard spherical dark-red pigmented bodies, >100 μ m, that produced viable ascospores. In sharp contrast, *brlA1* Δ *noxA* mutants (CTL16-CTL19) made virtually no hülle cells, but were able to form cleistothecia initials (Fig. 4F). Development of these structures was blocked at different stages (see Figs 4F, 6B and 7D), and only a few reached a maximum diameter of \approx 30 μ m. These larger cleistothecia initials remained as soft tan/yellowish spheres that failed to grow any further and did not produce ascospores. We conclude that, in Δ *noxA* mutants, the sexual cycle initiates and proceeds to the point of cleistothecial initial/hülle cell formation, where further development is completely blocked.

The noxA gene is induced during sexual development and repressed by Saka

Having shown that *noxA* was essential for sexual development in both wild-type and Δ *sakA* strains, we wanted to know whether *noxA* was expressed during this process and if *SakA* regulated its expression. For this purpose, wild-type CLK43 and Δ *sakA* TOL1 strains were sampled for Northern blot analysis along a time course, after sexual development was induced. As shown in Fig. 5A, the initially low *noxA* mRNA levels increased after induction of sexual development, peaked at 48 h and decreased sharply thereafter. Under these conditions, large numbers of hülle cells and cleistothecia primordia were being formed by 48 h and continued to mature by 72 h; most cleistothecia were fully developed after 96 h. To correlate these morphological events with a molecular marker, we monitored the expression of the *cpeA* gene in the same samples, as the catalase-peroxidase encoded by *cpeA* has been shown to be localized in hülle cells during sexual development (Scherer *et al.*, 2002). Indeed, highest *cpeA* expression was observed at 48 h, along with *noxA* (Fig. 5A). In contrast, in Δ *sakA* mutant TOL1, high levels of *noxA* mRNA were detected even before sexual development was induced, remaining high throughout the entire process up to 72 h, and *cpeA* mRNA levels were also detected up to 72 h. However, no *cpeA* expression was detected at 0 h, suggesting that gene derepression in Δ *sakA* mutants is not generalized (Fig. 5B). In summary, these results show that *noxA* mRNA levels increase during sexual development, reaching their maximum at the time of hülle cell/cleistothecia primordia formation. They also suggest that *noxA* derepression in Δ *sakA* mutants is related to premature and abundant sexual development and that *noxA* expression is nor-

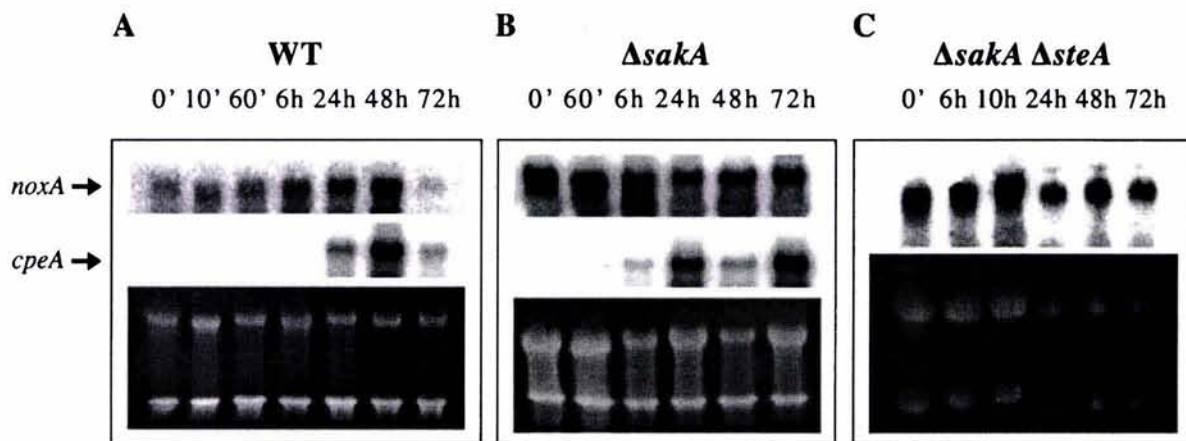


Fig. 5. Induction of *noxA* and *cpeA* genes during wild-type sexual development and *noxA* derepression in Δ *sakA* and Δ *sakA* Δ *steA* mutants. Strains CLK43 (A), TOL1 (B) and COS70 (C) were induced to undergo sexual development in confluent plates. At the indicated time points, samples were collected to extract total RNA and used for Northern blot analysis using *noxA*- (A, B and C) and *cpeA* (A and B)-specific probes. The lower panels show ribosomal RNA as loading controls.

mally repressed by the SakA MAP kinase signalling cascade.

noxA expression does not require transcription factors *SteA* and *StuA*

Transcription factors *SteA* (Vallim *et al.*, 2000) and *StuA* (Clutterbuck, 1969; Dutton *et al.*, 1997) are required for hülle cell and cleistothecia development. To determine whether *noxA* expression was dependent on these factors, $\Delta steA$ and $\Delta stuA1$ null mutant strains were induced to undergo sexual development and sampled for Northern blot analysis. To analyse the role of *SteA* in *noxA* expression, we used the double mutant $\Delta steA \Delta sakA$ strain COS70, as we found before that $\Delta sakA$ sexual development was *steA* dependent (Kawasaki *et al.*, 2002). As shown in Fig. 5C, *noxA* was equally derepressed in $\Delta steA \Delta sakA$ as well as in single $\Delta sakA$ mutants (Fig. 5B), discarding the possibility that lack of cleistothecia in $\Delta sakA \Delta steA$ mutants resulted from lack of *noxA* expression. Likewise, *noxA* induction during sexual development was not affected in *stuA1* mutants (not shown), indicating that *SteA* and *StuA* are involved in regulation of genes different from *noxA*, also needed for sexual development.

NADPH oxidase *NoxA* is involved in the production of ROS during sexual development

After showing that *noxA* encodes a NADPH oxidase essential for sexual development and that its expression is related to cleistothecia formation, we addressed whether there was production of ROS during sexual development and if such a process was dependent on *NoxA*. To follow the different stages of sexual development more easily, we used *brlA1* null mutants CTL12 and CTL16 in point-inoculated plates. Under these conditions, a developmental gradient is established from the centre to the edge of the colony. Mycelial samples containing undiffer-

entiated hyphae, hülle cells, cleistothecia primordia and mature cleistothecia were examined for the ability to generate superoxide by reduction of nitroblue tetrazolium (NBT), which precipitates as a blue/purple formazan upon reduction. As shown in Fig. 6A, high levels of NBT-reducing activity were specifically detected in young primordia and hülle cells, within minutes of incubation with NBT. NBT assays included exogenous NADPH, as this moderately improved activity. Under the tested conditions, NBT-reducing activity was inhibited by DPI, a substrate inhibitor of NADPH oxidases and other flavin-containing enzymes, and was virtually undetectable in non-differentiated hyphae and mature cleistothecia/surrounding hülle cells (not shown). These results show that hülle cells and young cleistothecia reduce NBT in a process stimulated by NADPH and inhibited by DPI, indicating that they produce superoxide in a flavoenzyme-dependent manner.

Next, we examined whether NBT-reducing activity detected in sexual development-specific structures was present in $\Delta noxA$ mutant strain CTL16. As indicated before, we found that, in contrast to strain TTL3 (Fig. 4B), CTL16 (Fig. 4F) and other *brlA1 \Delta noxA* strains showed an almost complete lack of hülle cells but were able to form cleistothecia primordia that showed a tan/yellowish pigmentation. Aside from such pigmentation, no NBT-reducing activity was detected in CTL16 primordia (Fig. 6B) or in the few hülle cells found in this strain (not shown). As $\Delta noxA$ strain TTL3 does form hülle cells, we used it to test whether those cells contained NBT-reducing activity or not. As shown in Fig. 6C, NBT-reducing activity in TTL3 hülle cells was markedly decreased compared with *noxA*⁺ strain CTL12 (Fig. 6A). Taken together, these results indicated that *NoxA* NADPH oxidase is the flavoenzyme responsible for most of the superoxide produced during sexual development in hülle cells and young primordia.

To investigate the production of ROS different from superoxide, we used 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (H₂DCFDA), a cell-permeable ROS indicator

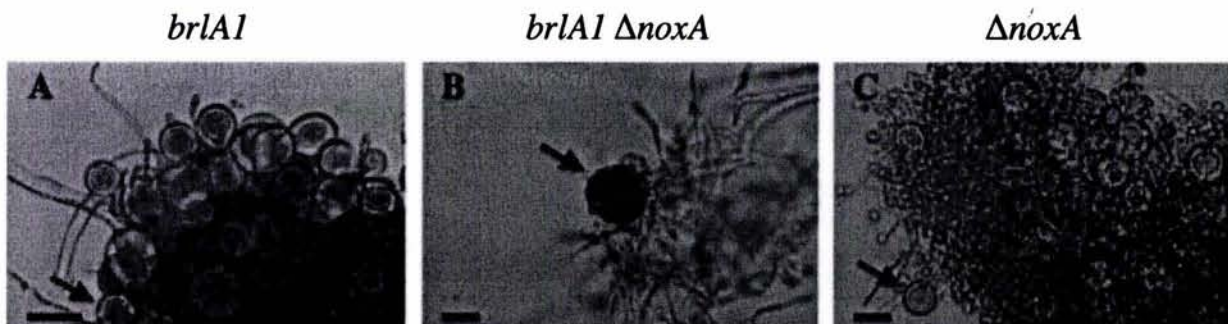


Fig. 6. Hülle cells and cleistothecia initials produce superoxide in a *NoxA*-dependent fashion. Strains CTL12 (A), CTL16 (B) and TTL3 (C) were induced to undergo sexual development in point-inoculated plates. Mycelial samples containing differentiated structures were incubated with nitroblue tetrazolium (NBT) for 20 min and examined by light microscopy. Colourless NBT precipitates as a blue/purple formazan when reduced by superoxide. Arrows indicate hülle cells (A and C) and cleistothecium primordium (B). Scale bars = 10 μ m.

that is non-fluorescent until acetate groups are removed (H_2DCF) by intracellular esterases and oxidation occurs within the cell (DCF). Although H_2DCF can be oxidized by different ROS, it is mainly used to detect H_2O_2 . Samples from cultures induced to undergo sexual development were incubated with H_2DCFDA and examined by fluorescent microscopy. Figure 7A and B shows that DCF -dependent green fluorescence was clearly detected in young cleistothecia at different developmental stages. In contrast, virtually no green fluorescent signal was found in $\Delta noxA$ samples containing cleistothecia primordia of different sizes (Fig. 7C and D). As cleistothecia consist of a network of sterile hyphae surrounding the ascogenous tissue, it was important to determine whether or not DCF -dependent fluorescence was present in both tissues. For this purpose, mycelial samples from strains CTL12 ($noxA^+$) and CTL16 ($noxA^-$) were treated with H_2DCFDA and analysed by confocal microscopy. Indeed, single-plane cross-sections of CTL12 young cleistothecia showed that DCF -dependent fluorescence is localized to the developing wall system or parenchymatous peridial cells (Fig. 7E and F). As before, no green fluorescent signal was detected in samples from $\Delta noxA$ strain CTL16 (not shown). We conclude that NoxA is a NADPH oxidase involved in the production of superoxide, H_2O_2 and possibly other ROS in hülle cells and cleistothecia peridium. These NoxA-dependent ROS are essential for cleistothecia and ascospore development.

Discussion

The noxA gene encodes a member of a novel subfamily of microbial NADPH oxidases

We have found that the NADPH oxidase encoded by the *A. nidulans noxA* gene represents a new subfamily of Nox enzymes, similar to human gp91phox or DdNox present in protozoan *D. discoideum* and prevalent in filamentous fungi. Nox phylogenetic analysis shows that these eukaryotic enzymes, related to the ferric reductase family, have evolved in seven major groups. A first clade includes animal Nox1, Nox2 and Nox3 with sizes from 563 to 690 amino acid residues. Three additional clades in animals are formed by Nox4, Nox5 and Duox, the first belonging to the small Nox (578 amino acids) and the last two to the large Nox class (Nox5, 765–1147 amino acids; Duox, 1308–1551 amino acids). Fungal Nox, with sizes between 550 and 636 amino acids, form another clade. Although closer to the gp91phox type, Nox from protozoan *D. discoideum* do not group well with other Nox and seem to define another group. Finally, plant Nox enzymes (Rboh) with characteristic EF Ca^{2+} binding domains, and sizes between 835 and 989 amino acid residues, form another clade.

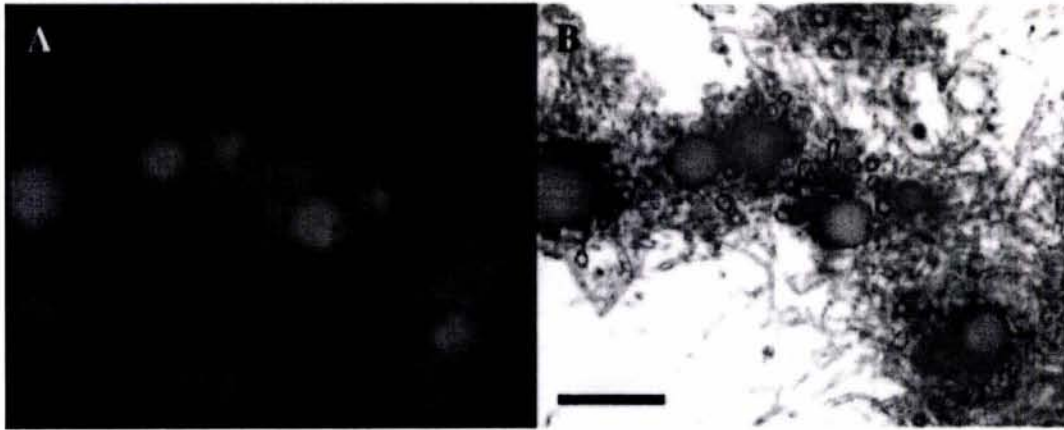
The ubiquitous presence of one and, more often, two *noxA* homologues in all filamentous fungi with available genomic sequences suggests that, as we have shown here, NADPH oxidase-generated ROS might play important roles in fungal physiology and differentiation. In fact, it has been found recently that a Nox enzyme might regulate ROS production by the plant pathogenic fungus *Claviceps purpurea* during infection (P. Tudzynski, personal communication). A few fungal species such as *S. cerevisiae*, *S. pombe*, *C. albicans* and *C. neoformans* do not contain Nox homologues. While this work was in preparation, Lalucque and Silar (2003) proposed that Nox enzymes are directly linked to multicellularity. This could imply that, like multicellularity in eukaryotes, Nox enzymes have evolved several times during evolution. Our phylogenetic analysis does not seem to support such a possibility, as all Nox proteins probably form a monophyletic group independent of their origin: animal, plant, fungi or protist. Thus, it seems more likely that the presence of *nox* genes is a eukaryotic ancestral character that has been lost during evolution in some cases. Kim *et al.* (2000) have found evidence suggesting that ROS production in the red tide unicellular organism *Chattonella marina* might be mediated by a Nox enzyme. If confirmed genetically, these results will provide additional support for the idea that the presence of *nox* genes is a eukaryotic ancestral character with an origin not related to multicellularity, and later on recruited in multicellular organisms to regulate differentiation processes.

In phagocytic cells, gp91phox activity depends on gp91phox subunit p22phox and cytosolic regulatory components Rac, p67phox, p47phox and p40phox. As Nox3, Nox1 and Nox5 group together with gp91phox, it is likely that they share the same subunit architecture. In fact, recent evidence supports this idea for Nox1 and possibly other animal Nox (Geiszt *et al.*, 2003). Protozoa, fungi and plants contain several members of the Rac GTPase family that could potentially regulate Nox activity. However, plants (Sagi and Fluhr, 2001) and analysed fungal genomes do not seem to contain p22phox p67phox, p47phox or p40phox homologues, suggesting a different regulation for plant and fungal Nox.

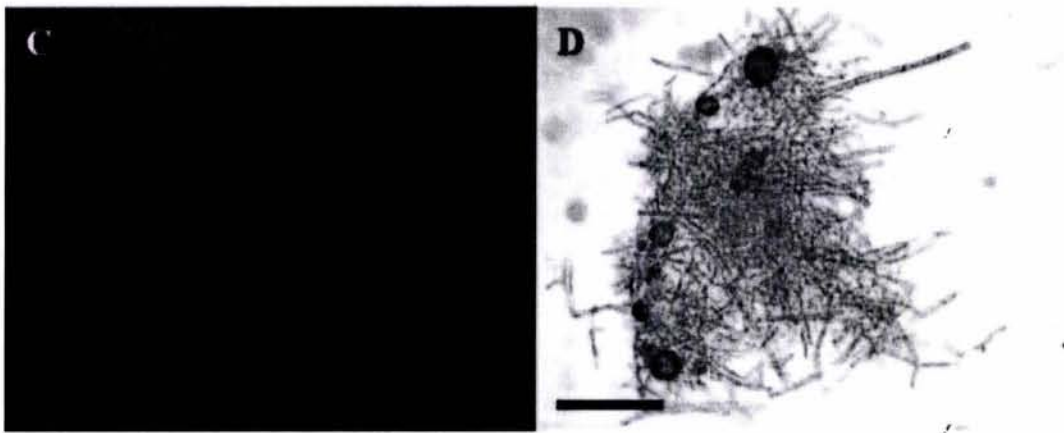
NoxA is required for cleistothecia and ascospore development

Little is known about initiation of sexual development, but the process is induced by oxygen limitation and might be triggered by fatty acid-derived hormone-like factors (Champe *et al.*, 1994). Induction of laccase II and the formation of cleistothecial initials and hülle cells are among the earliest recognized events (Hermann *et al.*, 1983; Champe *et al.*, 1994). More recently, it has been shown that SteC MAPKK is required for cell fusion steps

brlA1



brlA1 ΔnoxA



brlA1

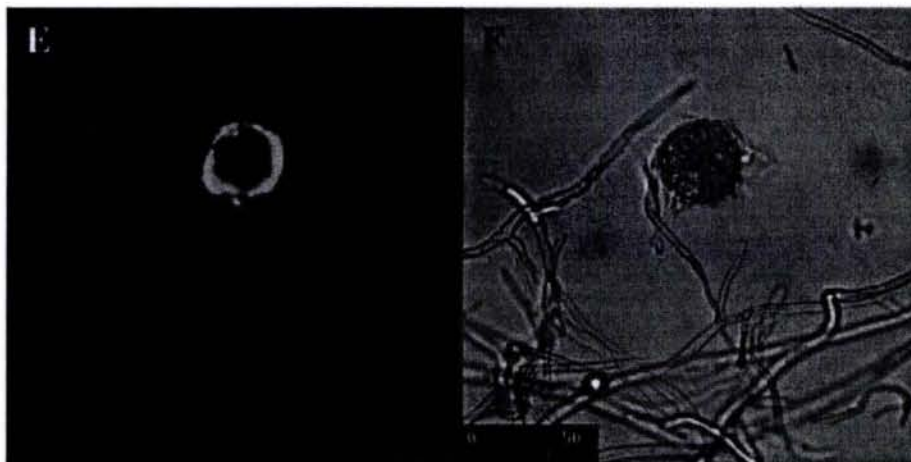


Fig. 7. Other NoxA-dependent ROS produced by young cleistothecia are localized in the external tissue. Strains CTL12 (A, B, E and F) and CTL16 (C and D) were induced for cleistothecia formation as in Fig. 6. Mycelial samples containing differentiated structures were incubated with 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (H₂DCFDA) for 20 min and examined by fluorescence (A and C) or fluorescence confocal microscopy (E). B and D. Merged images of fluorescence and Nomarski DIC fields. E and F. A single plane cross-section of a cleistothecium observed with fluorescence and phase-contrast confocal microscopy, respectively. Scale bars in B and D = 65 μ m.

(Wei *et al.*, 2003). We have shown that NoxA is essential for sexual development. In a *brlA*⁺ genetic background, Δ *noxA* mutants develop hülle cells and almost no cleistothecia primordia. In a *brlA*⁻ background, Δ *noxA* mutants develop cleistothecia primordia and virtually no hülle cells. Although we do not know the reason for this shift in hülle cells/primordia ratio, it is clear that Δ *noxA* mutants can initiate sexual development to the point of cleistothecia initials (5–30 μ m in diameter) and that further development is totally blocked.

The *noxA* gene is induced at the time at which cleistothecia initials/hülle cells are developing, and its derepression in Δ *sakA* mutants is needed for premature, abundant sexual development under appropriate conditions. However, *noxA* regulation is not affected in Δ *steA* and *stuA1* mutants, which do not form cleistothecia or hülle cells. This suggests that, in addition to transcriptional control, other factors might be required to regulate proper NoxA functional localization. Such types of controls have been reported for the *catA* gene, which encodes a catalase localized exclusively in sexual and asexual spores (Navarro and Aguirre, 1998).

NoxA-generated ROS regulate sexual development

Our results show that NoxA generates superoxide in hülle cells and cleistothecia initials (Fig. 6) as well as H₂O₂ and possibly other ROS, mainly in peridial cells (Fig. 7A–F). The lack of NoxA results in a block in cleistothecial development at the 5–30 μ m diameter stage. Shon and Yoon (2002) have reported that wild-type cleistothecia initials at the 20 μ m diameter stage consist of an ascogenous core system composed of a multinucleated single cell and a three-layer wrapping sterile tissue or peridium. Further development involves both differentiation of the core into asci and ascospores and differentiation of the peridium into several-celled layers, its regression and final death to form the mature cleistothecial cell wall. NoxA-generated ROS might be required to undergo all these developmental stages or only some of them. A proper localization and temporal regulation of ROS production might be critical for these processes, as the exogenous application of the superoxide-generating compound paraquat or H₂O₂ failed to rescue cleistothecia formation in Δ *noxA* mutants (not shown).

We propose that NoxA is located in hülle cells and outer layers from cleistothecia initials where it generates super-

oxide, which in turn will be dismutated to H₂O₂, perhaps by a peridial superoxide dismutase. H₂O₂ would then regulate diverse activities necessary for differentiation of both the ascogenous and the peridial tissues. Proving this model and determining the exact roles for ROS in this process requires further research. However, notable examples of how Nox-generated ROS regulate growth and development have been reported very recently. In *A. thaliana*, Nox enzymes showing cell type-specific localization regulate root growth (Foreman *et al.*, 2003) and abscisic acid signalling (Kwak *et al.*, 2003) through ROS-mediated regulation of Ca²⁺ mobilization. In *A. nidulans*, Ca²⁺ mobilization has been reported in response to H₂O₂ (Greene *et al.*, 2002). In *Caenorhabditis elegans*, Nox-generated ROS are required for tyrosine cross-linking of the extracellular matrix (Edens *et al.*, 2001). It is conceivable that, in peridial tissue, NoxA-generated ROS participate in oxidative reactions leading to initial cell proliferation, late cell death, perhaps through apoptosis, as well as cleistothecial cell wall cross-linking. The red pigment in mature cleistothecia cell walls has been identified as polyhydroxyanthroquinone, the polymerization of which might involve ROS. Here, it is interesting to note that other enzymes involved in ROS metabolism have been associated with specific sexual structures. Phenol oxidase laccase II activity is localized in hülle cells and peridium (Hermann *et al.*, 1983), catalase peroxidase CpeA in hülle cells (Scherer *et al.*, 2002) and catalase CatA in ascospores (Navarro and Aguirre, 1998).

It has been proposed that ROS trigger microbial cell differentiation (Hansberg and Aguirre, 1990) and that ROS detected during *N. crassa* asexual development (Hansberg *et al.*, 1993) are generated by a hyperoxidant state derived from metabolic imbalance. Our work on NoxA points to new sources of ROS and indicates that enzymes such as NADPH oxidases can regulate microbial differentiation through a regulated, self-inflicted oxidative stress.

Experimental procedures

noxA genomic/cDNA cloning and plasmid construction

The *A. thaliana* NADPH oxidase RbohAp10 (Keller *et al.*, 1998) was used to search the *A. nidulans* genomic database from Cereon Genomics LLC (Cambridge, MA, USA), and the retrieved partial DNA sequence was used to design primers *nox1* (TCAGCATGCACCAAGCGAAGAGCGAGCC) and

nox2 (ATTCTAGACCACCTTCACAATCTCCG). Using *A. nidulans* genomic DNA as template and nox1/nox2 primers, a 716 bp PCR product was amplified, cloned into pCRII (Invitrogen) and used to probe a genomic library (Brody *et al.*, 1991). Of several cosmids assigned to chromosome V, only cosmid L23F12 contained a full-length gene and was used to generate entire *noxA* sequence. A *noxA* replacement vector was constructed as follows. First, a 1884 bp PCR fragment generated using primers nox8 (GGGGCCGATCGGCTTCTAGCGTGC), nox9 (TGCGGCCGCGGACG CAGAGGAAGCCGC) and cosmid L23F12 as template was cloned into pCRII (pTLO4) and subcloned into Bluescript as an *Apal*–*NotI* fragment to generate pTLO5. Secondly, the *A. nidulans argB* gene was inserted into pTLO5 as a *XhoI*–*PstI* fragment to generate pTLO7. This removes 285 bp from the *noxA* coding region, which results in deletion of amino acids 255 (D) to 342 (Q), involved in FAD binding (Fig. 1), leaving 1018 and 578 bp at the 5' and 3' ends, respectively, for homologous recombination. Two *noxA* cDNA clones obtained using 3' RACE (Life Technologies) and nox8/nox12 (TGGGG TAGAATACAGAGG) primers, according to the manufacturer's protocol, were sequenced to determine *noxA* intron positions.

Strains, transformation and growth conditions

Strains used in this work are shown in Table 1. All strains were grown at 37°C in glucose minimal nitrate medium (Hill and Käfer, 2001). To disrupt *noxA*, strain RMS011 was transformed using standard procedures (Yelton *et al.*, 1984), and 1–2 µg of pTLO7 linearized with *NotI*. To induce sexual development in confluent plates, conidia were plated in top agar at 1×10^5 conidia per plate and incubated at 37°C for 24 h (0 h time point) and then sealed with Parafilm. To induce sexual development in point-inoculated plates, these were grown at 37°C for 48 h and then sealed with Parafilm.

Phylogenetic analysis

The DNA sequence obtained for *noxA* has been deposited in GenBank under accession number AY174088. Extensive database searches for NADPH oxidases were performed. Protein sequence data were obtained from SWISSPROT and GenBank non-redundant protein sequence database at the National Center for Biotechnology Information (NCBI). The gapped BLASTP program (Altschul *et al.*, 1997), with default gap penalties and BLOSUM62 substitution matrix, was used to search homologous *A. nidulans* NoxA sequence. Progressive multiple protein sequence alignment was calculated with the CLUSTAL_X package (Thompson *et al.*, 1997) corrected according to the results of gapped BLASTP (Altschul *et al.*, 1997). Phylogenetic analyses were performed with software MEGA2 (Kumar *et al.*, 2001), using both maximum parsimony (MP) and distance-based methods UPGMA, neighbour joining (NJ) and minimum evolution (ME), with the Poisson correction distance method, and gaps were treated by pairwise deletion. Confidence limits of branch points were estimated by 1000 bootstrap replications. The complete names of the organisms included in the phylogenetic analysis are: ANOGA, *Anopheles gambiae* (Eukaryota: Metazoa, Arthropoda); ARATH, *Ara-bidopsis thaliana* (Eukaryota: Viridiplantae, Eudicotyledons);

ASPNI, *Aspergillus nidulans* (Eukaryota: Fungi, Ascomycota); ASPFU, *Aspergillus fumigatus* (Eukaryota: Fungi, Ascomycota); BISBI, *Bison bison* (Eukaryota: Metazoa, chordata); BOVIN, *Bos taurus* (Eukaryota: Metazoa, chordata); BRARE, *Brachydanio rerio* (zebrafish) (Eukaryota: Metazoa, chordata); CAEEL, *Caenorhabditis elegans* (Eukaryota: Metazoa, Nematoda); CANFA, *Canis familiaris* (Eukaryota: Metazoa, chordata); CIOIN, *Ciona intestinalis* (Eukaryota: Metazoa, chordata, Urochordata); CLOAC, *Clostridium acetobutylicum* (Bacteria: Gram-positive); DICDI, *Dictyostelium discoideum* (slime mould) (Eukaryota: Mycetozoa, Dictyosteliida); DROME, *Drosophila melanogaster* (Eukaryota: Metazoa, Arthropoda); FUSGR, *Fusarium graminearum* (Eukaryota: Fungi, Ascomycota); HUMAN, *Homo sapiens* (Eukaryota: Metazoa, chordata); LYCES, *Lycopersicon esculentum* (tomato) (Eukaryota: Viridiplantae, Eudicotyledons); MAGGR, *Magnaporthe grisea* (Eukaryota: Fungi, Ascomycota); MOUSE, *Mus musculus* (Eukaryota: Metazoa, chordata); NEUCR, *Neurospora crassa* (Eukaryota: Fungi, Ascomycota); NICBE, *Nicotiana benthamiana* (Eukaryota: Viridiplantae, Eudicotyledons); NICTA, *Nicotiana tabacum* (Eukaryota: Viridiplantae, Eudicotyledons); ORYSA, *Oryza sativa* (rice) (Eukaryota: Viridiplantae, Liliopsida); PHACR, *Phanerochaete chrysosporium* (Eukaryota: Fungi, Basidiomycota); PIG, *Sus scrofa* (Eukaryota: Metazoa, chordata); PODAN, *Podospira anserina* (Eukaryota: Fungi, Ascomycota); PSEAE, *Pseudomonas aeruginosa* (Bacteria: Proteobacteria γ); RABIT, *Oryctolagus cuniculus* (Eukaryota: Metazoa, chordata); RAT, *Rattus norvegicus* (Eukaryota: Metazoa, chordata); SOLTU, *Solanum tuberosum* (potato) (Eukaryota: Viridiplantae, Eudicotyledons); TUTTR, *Tursiops truncatus* (Atlantic bottle-nosed dolphin) (Eukaryota: Metazoa, chordata); YEAST, *Saccharomyces cerevisiae* (Eukaryota: Fungi, Ascomycota).

ROS detection assays

For superoxide detection, small mycelial sections from strains CTL12 and CTL16 were point inoculated in plates and grown at 37°C. After 48 h, plates were sealed with Parafilm, and incubation was continued for another 48–72 h. Mycelial samples containing undifferentiated hyphae, hülle cells, cleistothecia primordia and/or mature cleistothecia were scraped from the edge of the colony and incubated immediately in a 0.3 mM nitroblue tetrazolium chloride (NBT; Sigma), 0.3 mM NADPH aqueous solution. Upon reduction, water-soluble, colourless NBT formed a coloured formazan precipitate within minutes of incubation. After 20 min with NBT, samples were photographed under the microscope. Essentially the same procedure was followed for incubation in the presence of 2.5 µg ml⁻¹ 5-(and-6)-carboxy-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (carboxy-H₂DCFDA; Molecular Probes), except that NADPH was not included. Non-specific NBT and DCF staining was observed only after prolonged incubation with NBT or H₂DCFDA. H₂DCFDA samples were observed using a Nikon E600 fluorescence microscope using 495 nm excitation and 500–550 nm emission wavelengths. Confocal images were obtained with an MCR 1024 Bio-Rad laser scanning system equipped with an Ar Kr/Ar air-cooled laser attached to an inverted Nikon TMD 300 microscope with a Nikon 20× objective. Samples were excited with a 488 nm

laser line at a low power setting (97–99% attenuation), and emitted light was bandpassed with a 522–532 nm filter. Confocal images were obtained concurrently by separate photomultiplier channels and red fluorescence subtraction to remove intrinsic red fluorescence detected in mature cleistothecia and initials. Images were viewed and processed with Todd Clark's program CONFOCAL ASSISTANT 4.2. In some cases, mycelial samples were preincubated for 20 min with NADPH oxidase inhibitor diphenylene iodinium (DPI; Sigma) at 50 μ M before incubation with NBT or H₂DCFDA.

Acknowledgements

We are grateful to Rosa Navarro (IFC-UNAM) for ROS initial experiments and help with fluorescence microscopy, Thomas Adams and Vicky Gavrias (Monsanto, Mystic, CT, USA) for access to *A. nidulans* genomic database from Cereon Genomics LLC (Cambridge, MA, USA), Olivia Sánchez (IFC-UNAM) for technical assistance, L. Ongay and IFC Molecular Biology Unit for DNA sequencing/synthesis, A. Julián-Sánchez (FM-UNAM) for help with phylogenetic analysis, L. Oropeza and IFC Microscopy Unit for confocal and electron scanning microscopy, Reinhard Fischer (Philipps-Universität, Marburg, Germany) for *cpeA* gene, L. Peraza for help with Fig. 1, and K. Alvarez for critical reading of the manuscript. We also thank Wilhelm Hansberg (IFC-UNAM) for helpful discussions throughout this work and critical reading of the manuscript. T. Lara-Ortiz was supported by a scholarship from CONACyT and DGEP-UNAM. This work was supported by grants IN214199 and IN225402 from DGAPA-UNAM (PAPIIT) and 2002-C01-40026 from CONACyT, México.

References

Adams, T.H., Wieser, J.K., and Yu, J.H. (1998) Asexual sporulation in *Aspergillus nidulans*. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**: 35–54.

Aguirre, J., Rodriguez, R., and Hansberg, W. (1989) Oxidation of *Neurospora crassa* NADP-specific glutamate dehydrogenase by activated oxygen species. *J Bacteriol* **171**: 6243–6250.

Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., and Lipman, D.J. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* **25**: 3389–3402.

Arnold, R.S., Shi, J., Murad, E., Whalen, A.M., Sun, C.Q., Polavarapu, R., et al. (2001) Hydrogen peroxide mediates the cell growth and transformation caused by the mitogenic oxidase Nox1. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**: 5550–5555.

Babior, B.M., Lambeth, J.D., and Nauseef, W. (2002) The neutrophil NADPH oxidase. *Arch Biochem Biophys* **397**: 342–344.

Banfi, B., Molnar, G., Maturana, A., Steger, K., Hegedus, B., Demarex, N., and Krause, K.H. (2001) A Ca(2+)-activated NADPH oxidase in testis, spleen, and lymph nodes. *J Biol Chem* **276**: 37594–37601.

Beckman, K.B., and Ames, B.N. (1998) The free radical theory of aging matures. *Physiol Rev* **78**: 547–581.

Brody, H., Griffith, J., Cuticchia, A.J., Arnold, J., and Timberlake, W.E. (1991) Chromosome-specific recombinant DNA

libraries from the fungus *Aspergillus nidulans*. *Nucleic Acids Res* **19**: 3105–3109.

Champe, S.P., Nagle, D.L., and Yager, L.N. (1994) Sexual sporulation. In *Aspergillus: 50 Years On*, Vol. 29. Martinelli, S.D., and Kinghorn, J.R. (eds). Amsterdam: Elsevier, pp. 429–454.

Cheng, G., Cao, Z., Xu, X., van Meir, E.G., and Lambeth, J.D. (2001) Homologs of gp91phox: cloning and tissue expression of Nox3, Nox4, and Nox5. *Gene* **269**: 131–140.

Clutterbuck, A.J. (1969) A mutational analysis of conidial development in *Aspergillus nidulans*. *Genetics* **63**: 317–327.

Dehal, P., Satou, Y., Campbell, R.K., Chapman, J., Degnan, B., De Tomaso, A., et al. (2002) The draft genome of *Ciona intestinalis*: insights into chordate and vertebrate origins. *Science* **298**: 2157–2167.

Dinauer, M.C., Orkin, S.H., Brown, R., Jesaitis, A.J., and Parkos, C.A. (1987) The glycoprotein encoded by the X-linked chronic granulomatous disease locus is a component of the neutrophil cytochrome *b* complex. *Nature* **327**: 717–720.

Dupuy, C., Ohayon, R., Valent, A., Noel-Hudson, M.S., Deme, D., and Virion, A. (1999) Purification of a novel flavoprotein involved in the thyroid NADPH oxidase. Cloning of the porcine and human cDNAs. *J Biol Chem* **274**: 37265–37269.

Dutton, J.R., Johns, S., and Miller, B.L. (1997) StuAp is a sequence-specific transcription factor that regulates developmental complexity in *Aspergillus nidulans*. *EMBO J* **16**: 5710–5721.

Edens, W.A., Sharling, L., Cheng, G., Shapira, R., Kinkade, J.M., Lee, T., et al. (2001) Tyrosine cross-linking of extracellular matrix is catalyzed by Duox, a multidomain oxidase/peroxidase with homology to the phagocyte oxidase subunit gp91phox. *J Cell Biol* **154**: 879–891.

Foreman, J., Demidchik, V., Bothwell, J.H., Mylona, P., Miedema, H., Torres, M.A., et al. (2003) Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulate plant cell growth. *Nature* **422**: 442–446.

Galagan, J.E., Calvo, S.E., Borkovich, K.A., Selker, E.U., Read, N.D., Jaffe, D., et al. (2003) The genome sequence of the filamentous fungus *Neurospora crassa*. *Nature* **422**: 859–868.

Geiszt, M., Kopp, J.B., Varnai, P., and Leto, T.L. (2000) Identification of renox, an NAD(P)H oxidase in kidney. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**: 8010–8014.

Geiszt, M., Lekstrom, K., Witta, J., and Leto, T.L. (2003) Proteins homologous to p47phox and p67phox support superoxide production by NAD(P)H oxidase 1 in colon epithelial cells. *J Biol Chem* **278**: 20006–20012.

Greene, V., Cao, H., Schanne, F.A., and Bartelt, D.C. (2002) Oxidative stress-induced calcium signalling in *Aspergillus nidulans*. *Cell Signal* **14**: 437–443.

Griendling, K.K., Sorescu, D., and Ushio-Fukai, M. (2000) NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. *Circulation Res* **86**: 494–501.

Halliwell, B., and Gutteridge, J.M.C. (1989) *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford, UK: Clarendon Press and Oxford University Press.

Han, K.H., Han, K.Y., Yu, J.H., Chae, K.S., Jahng, K.Y., and Han, D.M. (2001) The *nsdD* gene encodes a putative GATA-

- type transcription factor necessary for sexual development of *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol* **41**: 299–309.
- Hansberg, W., and 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., and Sies, H. (1993) Reactive oxygen species associated with cell differentiation in *Neurospora crassa*. *Free Radic Biol Med* **14**: 287–293.
- Hermann, T.E., Kurtz, M.B., and Champe, S.P. (1983) Laccase localized in hulle cells and cleistothecial primordia of *Aspergillus nidulans*. *J Bacteriol* **154**: 955–964.
- Hill, T.W., and Käfer, E. (2001) Improved protocols for *Aspergillus* minimal medium: trace element and minimal medium stock solution. *Fungal Genet Newslett* **48**: 20–21.
- Hoffmann, B., Wanke, C., Lapaglia, S.K., and Braus, G.H. (2000) c-Jun and RACK1 homologues regulate a control point for sexual development in *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol* **37**: 28–41.
- Irani, K., Xia, Y., Zweier, J.L., Der Sollott, S.J.C.J., Fearon, E.R., Sundaresan, M., et al. (1997) Mitogenic signaling mediated by oxidants in Ras-transformed fibroblasts. *Science* **275**: 1649–1652.
- Kawasaki, L., Sanchez, O., Shiozaki, K., and Aguirre, J. (2002) SakA MAP kinase is involved in stress signal transduction, sexual development and spore viability in *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol* **45**: 1153–1163.
- Keller, T., Damude, H.G., Werner, D., Doerner, P., Dixon, R.A., and Lamb, C. (1998) A plant homolog of the neutrophil NADPH oxidase gp91phox subunit gene encodes a plasma membrane protein with Ca²⁺ binding motifs. *Plant Cell* **10**: 255–266.
- Kim, D., Nakamura, A., Okamoto, T., Komatsu, N., Oda, T., Iida, T., et al. (2000) Mechanism of superoxide anion generation in the toxic red tide phytoplankton *Chattonella marina*: possible involvement of NAD(P)H oxidase. *Biochim Biophys Acta* **1524**: 220–227.
- Kumar, S., Tamura, K., Jakobsen, I.B., and Nei, M. (2001) MEGA2: molecular evolutionary genetics analysis software. *Bioinformatics* **17**: 1244–1245.
- Kwak, J.M., Mori, I.C., Pei, Z.-M., Leonhardt, N., Torres, M.A., Dangl, J.L., et al. (2003) NADPH oxidase AtrbohD and AtrbohF genes function in ROS-dependent ABA signaling in *Arabidopsis*. *EMBO J* **22**: 2623–2633.
- Lalucque, H., and Silar, P. (2003) NADPH oxidase: an enzyme for multicellularity? *Trends Microbiol* **11**: 9–12.
- Lambeth, J.D., Cheng, G., Arnold, R.S., and Edens, W.A. (2000) Novel homologs of gp91phox. *Trends Biochem Sci* **25**: 459–461.
- Law, D.J., and Timberlake, W.E. (1980) Developmental regulation of laccase levels in *Aspergillus nidulans*. *J Bacteriol* **144**: 509–517.
- McCord, J.M. (2000) The evolution of free radicals and oxidative stress. *Am J Med* **108**: 652–659.
- Martinelli, S.D., and Kinghorn, J.R. (eds) (1994) *Aspergillus: 50 Years On*. Amsterdam, The Netherlands: Elsevier.
- Maturana, A., Arnaudeau, S., Rysler, S., Banfi, B., Hossle, J.P., Schlegel, W., et al. (2001) Heme histidine ligands within gp91 (phox) modulate proton conduction by the phagocyte NADPH oxidase. *J Biol Chem* **276**: 30277–30284.
- Moreno, J.C., Bikker, H., Kempers, M.J., van Trotsenburg, A.S., Baas, F., de Vijlder, J.J., et al. (2002) Inactivating mutations in the gene for thyroid oxidase 2 (THOX2) and congenital hypothyroidism. *N Engl J Med* **347**: 95–102.
- Navarro, R.E., and Aguirre, J. (1998) Posttranscriptional control mediates cell type-specific localization of catalase A during *Aspergillus nidulans* development. *J Bacteriol* **180**: 5733–5738.
- Osiewacz, H.D. (2002) Mitochondrial functions and aging. *Gene* **286**: 65–71.
- Riveros-Rosas, H., Julián-Sánchez, A., Villalobos-Molina, R., Pardo, J.P., and Piña, E. (2003) Diversity, taxonomy and evolution of medium-chain dehydrogenase/reductase superfamily. *Eur J Biochem* **270**: 3309–3334.
- Sagi, M., and Fluhr, R. (2001) Superoxide production by plant homologues of the gp91 (phox) NADPH oxidase. Modulation of activity by calcium and by tobacco mosaic virus infection. *Plant Physiol* **126**: 1281–1290.
- Satou, Y., Yamada, L., Mochizuki, Y., Takatori, N., Kawashima, T., Sasaki, A., et al. (2002) A cDNA resource from the basal chordate *Ciona intestinalis*. *Genesis* **33**: 153–154.
- Scherer, M., Wei, H., Liese, R., and Fischer, R. (2002) *Aspergillus nidulans* catalase-peroxidase gene (*cpeA*) is transcriptionally induced during sexual development through the transcription factor StuA. *Eukaryot Cell* **1**: 725–735.
- Shon, K.T., and Yoon, K.S. (2002) Ultrastructural study on the cleistothecium development in *Aspergillus nidulans*. *Mycobiology* **30**: 117–127.
- Skromne, I., Sanchez, O., and Aguirre, J. (1995) Starvation stress modulates the expression of the *Aspergillus nidulans* *brlA* regulatory gene. *Microbiology* **141**: 21–28.
- Suh, Y.A., Arnold, R.S., Lassegue, B., Shi, J., Xu, X., Sorescu, D., et al. (1999) Cell transformation by the superoxide-generating oxidase Mox1. *Nature* **401**: 79–82.
- Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., and Higgins, D.G. (1997) The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res* **25**: 4876–4882.
- Timberlake, W.E., and Clutterbuck, A.J. (1994) Genetic regulation of conidiation. In *Aspergillus: 50 Years On*, Vol. 29. Martinelli, S.D., and Kinghorn, J.R. (eds). Amsterdam: Elsevier, pp. 383–427.
- Toledo, I., Noronha-Dutra, A.A., and Hansberg, W. (1991) Loss of NAD(P)-reducing power and glutathione disulfide excretion at the start of induction of aerial growth in *Neurospora crassa*. *J Bacteriol* **173**: 3243–3249.
- Toledo, I., Aguirre, J., and Hansberg, W. (1994) Enzyme inactivation related to a hyperoxidant state during conidiation of *Neurospora crassa*. *Microbiology* **140**: 2391–2397.
- Torres, M.A., Onouchi, H., Hamada, S., Machida, C., Hammond-Kosack, K.E., and Jones, J.D. (1998) Six *Arabidopsis thaliana* homologues of the human respiratory burst oxidase (gp91phox). *Plant J* **14**: 365–370.
- Torres, M.A., Dangl, J.L., and Jones, J.D. (2002) *Arabidopsis* gp91phox homologues AtrbohD and AtrbohF are required for accumulation of reactive oxygen intermediates in the plant defense response. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**: 517–522.

Vallim, M.A., Miller, K.Y., and Miller, B.L. (2000) *Aspergillus* SteA (sterile12-like) is a homeodomain-C2/H2-Zn+2 finger transcription factor required for sexual reproduction. *Mol Microbiol* **36**: 290–301.

Wei, H., Requena, N., and Fischer, R. (2003) The MAPKK kinase SteC regulates conidiophore morphology and is

essential for heterokaryon formation and sexual development in the homothallic fungus *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol* **47**: 1577–1588.

Yelton, M.M., Hamer, J.E., and Timberlake, W.E. (1984) Transformation of *Aspergillus nidulans* by using a *trpC* plasmid. *Proc Natl Acad Sci USA* **81**: 1470–1474.

Parte II

A) Una mutante que carece de la actividad de las catalasas A, B y C ($\Delta catA/B/C$) produce más cleistotecios que una cepa silvestre durante el desarrollo sexual.

Dado que las especies de oxígeno reactivas producidas por NoxA son indispensables para el desarrollo del ciclo sexual (Lara-Ortiz *et al.*, 2003), decidimos examinar el desarrollo sexual en una cepa que carece de las tres catalasas principales en *A. nidulans* (Kawasaki y Aguirre, 2001), pensando que en esta cepa podría verse incrementado el peróxido de hidrógeno endógeno durante el ciclo sexual. La cepa silvestre (CLK43) y la triple mutante $\Delta catA/B/C$ (CLK35) se incubaron en condiciones de desarrollo sexual y después de cuatro días de haber sellado las cajas de Petri con parafilm, se tomaron muestras cada 24 h para cuantificar los cleistotecios formados por cm^2 . Como se puede observar en la figura 1, los cleistotecios aparecen al mismo tiempo tanto en la cepa silvestre como en la triple mutante. Sin embargo, conforme avanza el tiempo la triple mutante $\Delta catA/B/C$ produce más cleistotecios que la cepa silvestre. Aunque la mayoría de estos cleistotecios resultaron más pequeños que los de la cepa silvestre (Fig. 2), fueron capaces de formar ascosporas con morfología normal (no se muestra). Estos datos sugieren que la carencia de las tres catalasas principales trae como consecuencia una mayor acumulación de H_2O_2 (y posiblemente otras EOR), lo cual favorece la formación de un mayor número de cleistotecios. Además, dichos cleistotecios parecen alcanzar la madurez prematuramente. Estos datos son consistentes con la idea de que los niveles de EOR regulan la diferenciación de los cuerpos fructíferos sexuales en *A. nidulans*.

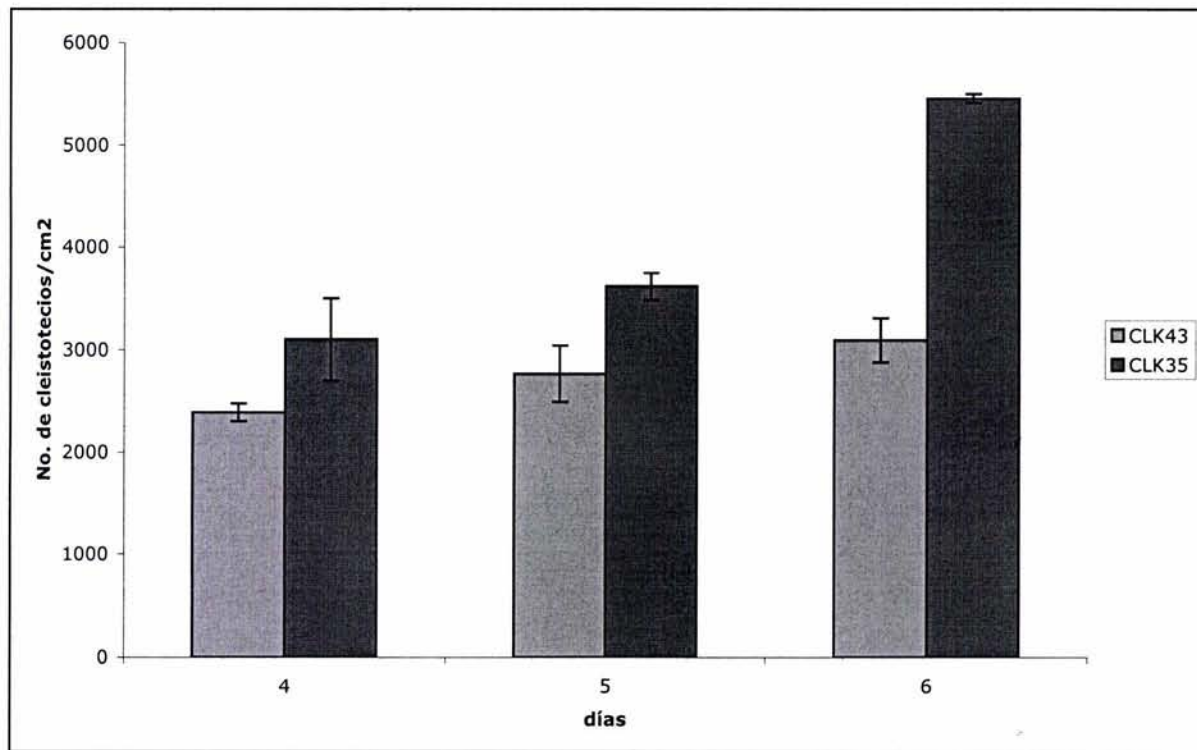
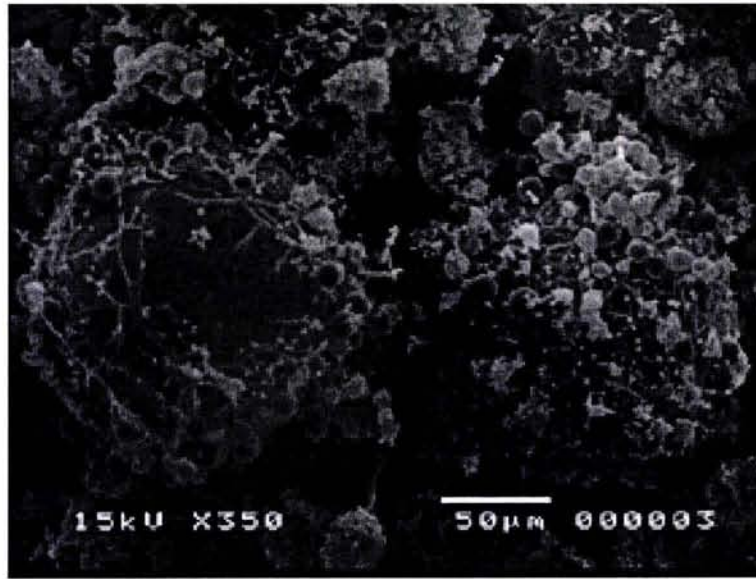
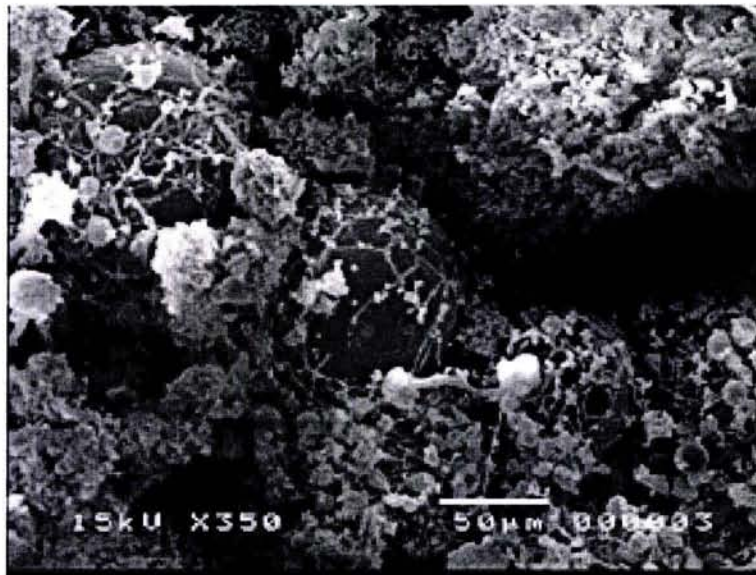


Figura 1. La mutante $\Delta catA/B/C$ (CLK35) produce más cleistotecios que una cepa silvestre (CLK43). Ambas cepas se inocularon a una densidad de 1×10^5 esp/ml en medio sólido y se incubaron a 37°C . Después de 24 h de crecimiento se sellaron las placas con parafilm para inducir el desarrollo sexual. Las muestras se tomaron en los tiempos indicados. Se contó el número total de cleistotecios por una área fija bajo el microscopio de disección y se calculó el número de cleistotecios/cm². El experimento se realizó por duplicado y los datos muestran el promedio de los valores obtenidos. La desviación estándar se muestra encada barra.



WT



ΔcatA/B/C

Figura 2. Los cleistotecios de la triple mutante *ΔcatA/B/C* son más pequeños con respecto a los de la cepa silvestre. Las cepas fueron crecidas en cultivos a confluencia e inducidas al desarrollo sexual. Al sexto día se tomaron las fotografías en el microscopio de barrido.

B) La expresión del gen *noxA* durante el desarrollo sexual no requiere de los factores transcripcionales *StuA* y *NsdD*.

Los factores de transcripción *StuA* (Clutterbuck, 1969), (Dutton *et al.*, 1997) y *NsdD* (Han *et al.*, 2001) se requieren para el desarrollo de células Hülle y de cleistotecios. Para determinar si la expresión de *noxA* depende de estos factores, se analizó la expresión de *noxA* mediante una réplica tipo Northern utilizando RNA de las mutantes nulas *stuA1* y Δ *nsdD* incubadas en condiciones de desarrollo sexual. En la figura 3 se muestra la expresión del mensajero de *noxA* en la cepa mutante Δ *stuA*. El mensajero de *noxA* se detecta desde las 0 h, aumenta su inducción casi al doble a las 48 h y a las 72 h baja su expresión al igual que en una cepa silvestre (Lara-Ortiz *et al.*, 2003), lo que sugiere que el factor de transcripción *StuA* no se requieren para la acumulación del mensajero *noxA* durante el desarrollo sexual. En la cepa mutante Δ *nsdD*, el mensajero de *noxA* también se detecta entre las 0 y las 48 h, sin embargo, en este caso la acumulación del mensajero se observa desde las 0 h y es mayor a las 24 h, disminuyendo paulatinamente a las 48 y 72 h. Estos datos sugieren que el factor de transcripción *NsdD* podría regular negativamente la expresión de *noxA*. No obstante, estos resultados muestran que la incapacidad de las mutantes *stuA1* y Δ *nsdD* para formar cleistotecios no se debe a la falta de expresión del gen *noxA*, sugiriendo que estos factores de transcripción y *NoxA* regulan aspectos distintos del desarrollo sexual en este hongo.

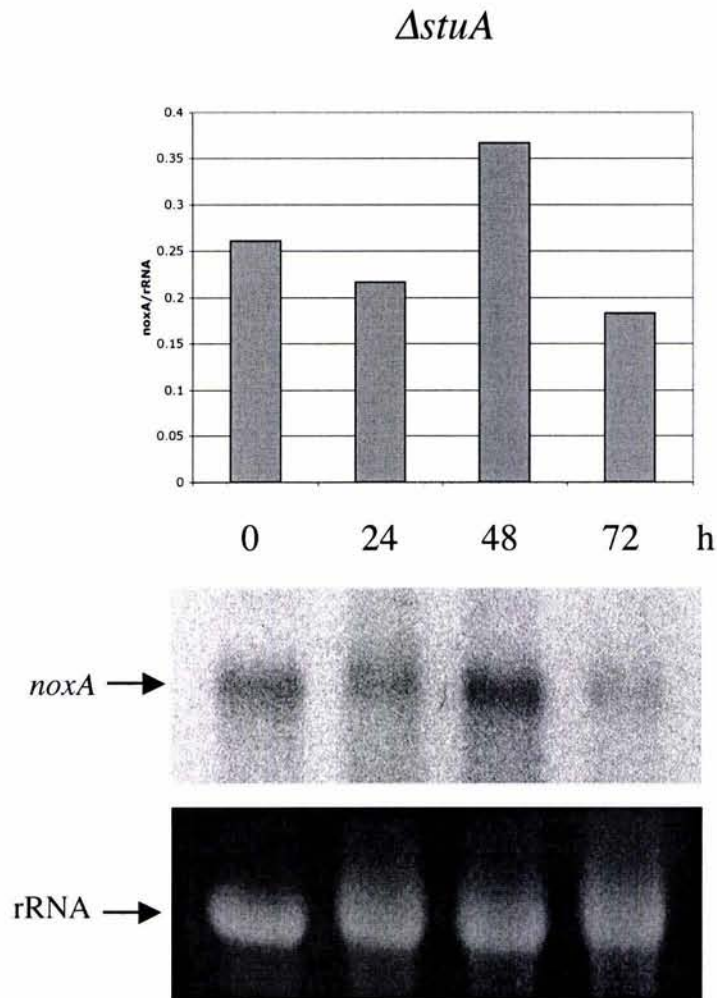


Figura 3. Expresión del mensajero de *noxA* durante el ciclo sexual en la mutante *ΔstuA*. La cepa CTL15 (*ΔstuA*) se creció por 24 h en medio sólido y después se sellaron las cajas con parafilm para inducir el desarrollo sexual. Las muestras se colectaron a los tiempos indicados y se extrajo RNA total, el cual se analizó por hibridación tipo Northern, utilizando el fragmento *ApaI* de *noxA* como sonda. La parte superior muestra los resultados del análisis de densitometría con el programa Laser Pix versión 4.0.0.13, utilizando las figuras de los paneles inferiores. El panel inferior muestra los RNA ribosomales para indicar la cantidad de RNA cargado en cada carril.

ΔnsdD

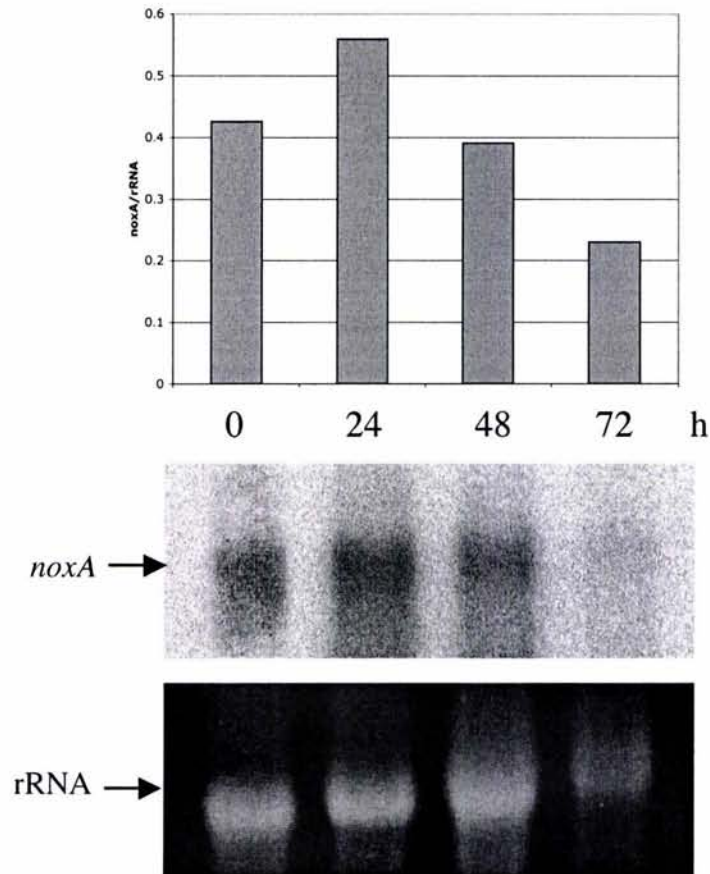


Figura 4. Expresión del mensajero de *noxA* durante el ciclo sexual en la mutante *Δnsd*. La cepa KHH52 (*Δnsd*) se creció por 24 h en medio sólido y después se sellaron las cajas con parafilm para inducir el desarrollo sexual. Las muestras se colectaron a los tiempos indicados y se extrajo RNA total, el cual se analizó por hibridación tipo Northern utilizando el fragmento *ApaI* de *noxA* como sonda. La parte superior muestra los resultados del análisis de densitometría con el programa Laser Pix versión 4.0.0.13, utilizando las figuras de los paneles inferiores. El panel inferior muestra los RNA ribosomales para indicar la cantidad de RNA cargado en cada carril.

C) La modificación de la catalasa B inducida por la sobre-expresión de Ras es independiente de la actividad de NoxA

Datos de nuestro laboratorio mostraron que la sobre-expresión de una proteína Ras mutante activa dominante (*alcA(p)::Aras^{G17V}*) causa un cambio en la movilidad electroforética de la catalasa B. Basados en el trabajo de Lledías *et al.*, (2000), el cual demostró que las catalasas de diversas fuentes se oxidan por oxígeno en singulete aumentando su movilidad electroforética, hemos interpretado este cambio como una modificación de CatB por EOR. El efecto de Ras sobre CatB se inhibió por el DPI, sugiriendo que una NADPH oxidasa podría estar involucrada en la posible producción de EOR y en la modificación de CatB (Navarro, R. y Aguirre, J., sin publicar).

Para determinar el papel de NoxA en este proceso, se interrumpió el gen *noxA* reemplazando la región codificadora de *noxA* por el marcador selectivo *argB* (Lara-Ortiz *et al.*, 2003) y se generaron, por medio de cruza sexuales, las dobles mutantes $\Delta noxA alcA(p)::Aras^{S22N}$ (Ras-GDP) y $\Delta noxA alcA(p)::Aras^{G17V}$ (Ras-GTP). El promotor del gen *alcA* [*alcA(p)*] se reprime por glucosa a través del producto del gen *creA* y se induce por etanol o treonina, a través del producto del gen *alcR*. Por lo tanto, para inducir la expresión de Ras se crecieron las cepas 18 h en medio mínimo con glucosa y después se transfirieron a medio mínimo con treonina por 3 h. En el caso de la cepa silvestre, los resultados en la figura 5A muestran la actividad de la catalasa B como una banda bien definida, un poco más intensa en la condición con treonina (Thr). En cambio, las dobles mutantes $\Delta noxA alcA(p)::Aras^{S22N}$ y $\Delta noxA alcA(p)::Aras^{G17V}$, muestran un claro barrido de la actividad de CatB en condiciones de inducción con treonina. En la figura 5B se puede observar que este barrido de CatB se inhibe en presencia de DPI, un inhibidor de flavoproteínas. Estos resultados demuestran que la modificación de la catalasa B inducida por la sobre-expresión de Ras es independiente de la actividad de NoxA y se inhibe por DPI, lo cual confirma resultados anteriores (Navarro, R. y Aguirre, J., sin publicar) y sugiere que otras flavoproteínas son capaces de generar EOR de manera dependiente de Ras.

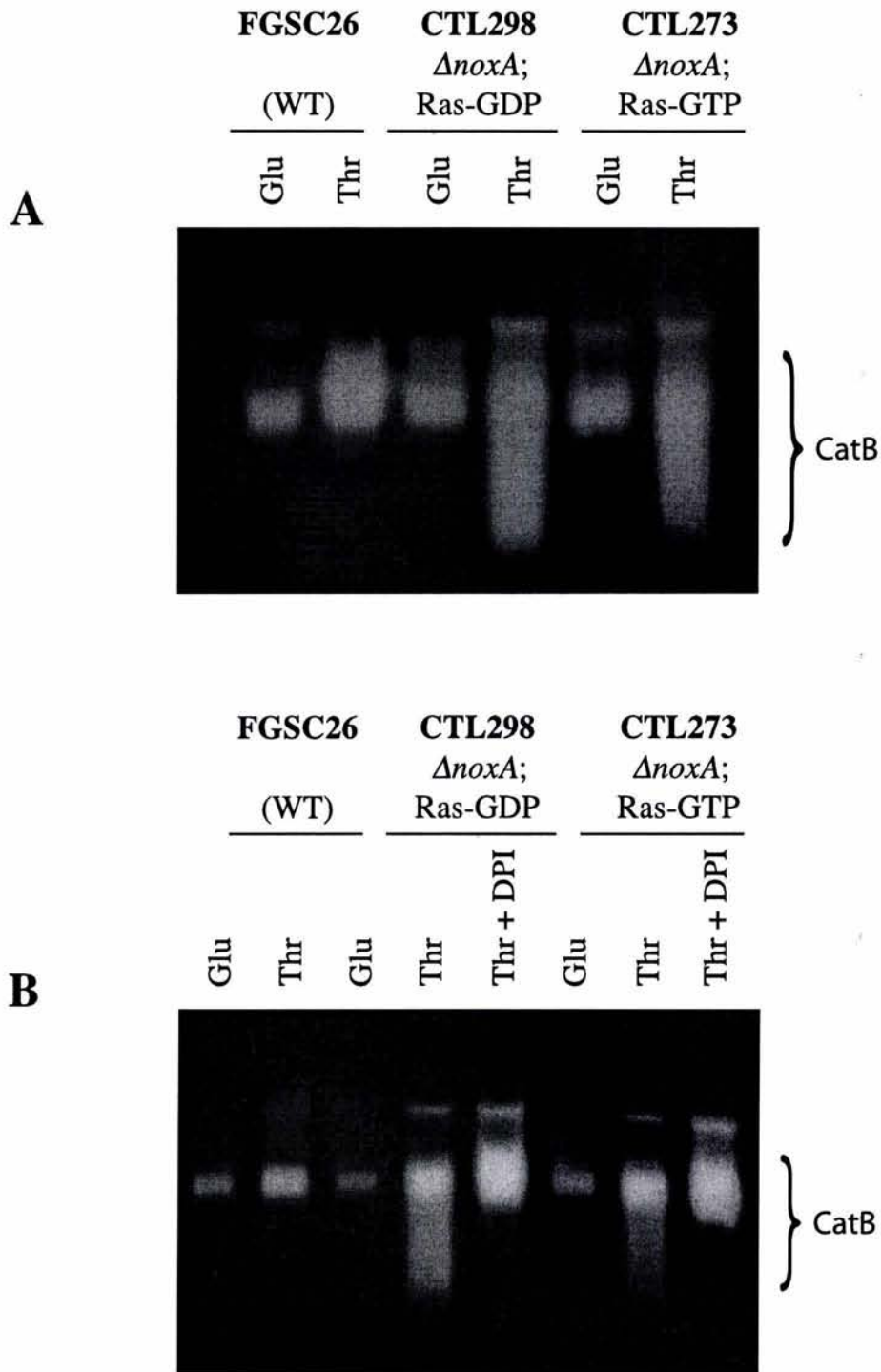


Figura 5. La sobre-expresión de Ras altera la migración de la catalasa B en un fondo genético $\Delta noxA$. Las cepas silvestre FGSC26; CTL298 ($\Delta noxA alcA(p)::Aras^{S22N}$) y CTL273 ($\Delta noxA alcA(p)::Aras^{G17V}$) se crecieron 18 h en medio mínimo con glucosa y después se transferieron a medio con treonina 50 mM por 3 h. A partir del micelio de estas cepas se obtuvieron extractos totales de proteínas, los cuales se corrieron en un gel nativo teñido para actividad de catalasa en ausencia (A) o presencia de DPI 20 μ M (B).

D) Ensayo en gel de la actividad de la NADPH oxidasa

Para determinar si NoxA genera EOR montamos un método reportado en plantas (Sagi y Fluhr, 2001), que consiste en detectar la producción de superóxido en geles de poliacrilamida. Este método se basa en la reducción del compuesto p-nitro azul de tetrazolio (NBT), el cual al reaccionar con el $O_2^{\cdot-}$ cambia de color y se precipita formando un compuesto azul oscuro llamado formazan. En estudios previos sobre la regulación de *noxA*, encontramos que en condiciones de privación de nitrógeno se acumula el mensajero *noxA*. Por esta razón, para realizar el ensayo de actividad de la NADPH oxidasa, decidimos aislar membranas de una cepa silvestre (CLK43) y una cepa mutante $\Delta noxA$ (TTL3) crecidas en cultivos líquidos sumergidos en condiciones de privación de nitrógeno. Una vez obtenida la fracción membranal, las proteínas de membrana se solubilizaron con el detergente CHAPS y se fraccionaron en un gel SDS-PAGE. Después el gel se incubó en una solución amortiguadora con FAD para regenerar la actividad de la NADPH oxidasa y posteriormente se cambió a una solución que contenía NBT y NADPH.

En la figura 6 se puede observar que en la cepa silvestre se detectaron cinco bandas de formazán, mientras que en la cepa $\Delta noxA$ sólo se detectaron tres de ellas. Sin embargo estas bandas son de bajo peso molecular y no corresponden al peso esperado para NoxA que es de ~64 kDa, por lo que se requiere de evidencia adicional para concluir que estas bandas de actividad están relacionadas con NoxA.

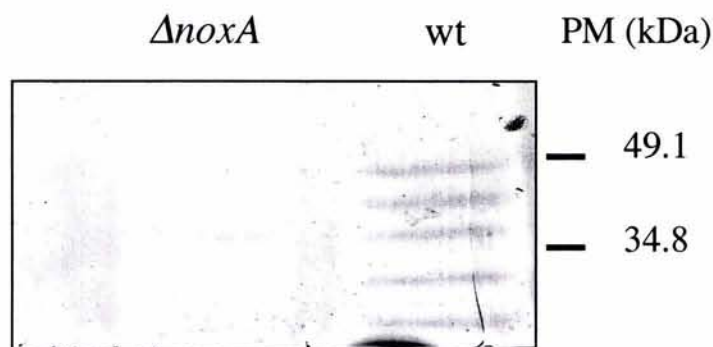


Figura 6. Los extractos membranales de la mutante *ΔnoxA* no producen dos bandas de formazán presentes en la cepa silvestre. Se purificaron extractos de membranas de las cepas silvestre (CLK43) y *ΔnoxA* (CTL3), las cuales se crecieron 18 h en MM con glucosa y después se transfirieron a un medio sin nitrógeno por 3 h. Las proteínas de membrana (100 μg/carril) se solubilizaron con 0.5% de CHAPS y después se cargaron en el gel. En la figura se muestra un gel de SDS teñido para detectar la actividad de reducción del NBT.

Para saber si las bandas de formazan observadas en la Fig. 6 provienen de la actividad de una NADPH oxidasa, examinamos un gel similar con el anticuerpo policlonal gp91-phox (C-15) que reconoce el extremo carboxilo terminal de gp91phox de humano (San Cruz Biotechnology, Inc). En la inmunoréplica se reconocen tres bandas principales con pesos aproximados de 200, 60 y 25 kDa (Fig. 7). Sin embargo, estas bandas se presentan tanto en la cepa silvestre como en la mutante *ΔnoxA*. En general, en ensayos tipo western para detectar homólogos de gp91phox de diferentes especies, se obtienen bandas entre 70 y 100 kDa, debido al distinto grado de glicosilación que presentan dichas proteínas. Sin embargo, NoxA no tiene los tres sitios de glicosilación (N132, N149 y N240) conservados en gp91phox, por lo que esperabamos sólo una banda de ~64 kDa. El hecho de que las bandas obtenidas por inmunoréplica no coinciden con las bandas generadas por actividad y además se encuentren tanto en la cepa silvestre como en la mutante, sugería que

este tipo de anticuerpo no estaba reconociendo a NoxA. Sin embargo, por un lado no contamos con los extractos celulares adecuados que sirvan como control positivo y por otro, no podemos descartar la posibilidad de que en este conjunto de bandas se encuentre enmascarada NoxA. Por ejemplo, en la figura 7 la banda de ~60 kDa se aprecia más tenúe en la mutante que en la silvestre, aunque se cargo la misma cantidad de proteína total para ambas cepas.

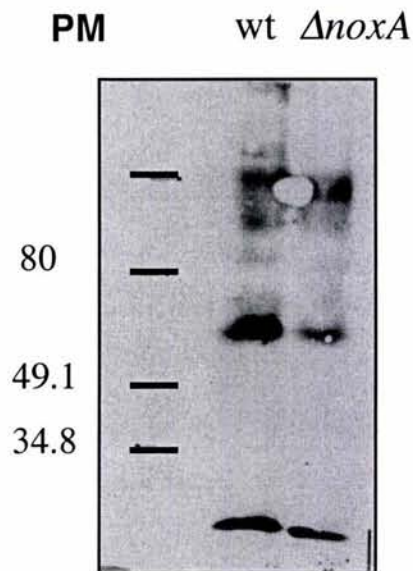


Figura 7. El anticuerpo gp91-phox de humano reconoce proteínas presentes tanto en la cepa silvestre como en una mutante $\Delta noxA$. En la figura se muestra una inmunoréplica tipo western de proteínas de membranas aisladas de las cepas silvestre (CLK43) y $\Delta noxA$ (TTL3) crecidas como se indica en la figura 6. En cada carril se cargaron 150 μg de proteína.

DISCUSION GENERAL

El gen *noxA* de *A. nidulans* codifica para una NADPH oxidasa microbiana homóloga a gp91phox

En este trabajo identificamos y caracterizamos el gen *noxA* y mostramos que codifica para una NADPH oxidasa microbiana. El gen *noxA*, primero de su clase caracterizado en microorganismos eucariotos, definió dos nuevas subfamilias de NADPH oxidasas (NoxA y NoxB) y recientemente se ha detectado una tercera familia Nox (NoxC), por ahora presente solamente en los hongos *Magnaporthe grisea* y *Fusarium graminearum* (Aguirre *et al.*, sin publicar). De esta manera, el número de genes *nox* en los hongos varía entre cero en las levaduras (e.g. *S. cerevisiae* y *Schizosaccharomyces pombe*), los hongos dimórficos *Ustilago maydis* y *Cryptococcus neoformans*, uno en *A. nidulans* y *A. fumigatus*, dos en *Podospora anserina*, *N. crassa*, *Coprinus cinereus*, y *Phanerochaete chrysosporium* y tres en *M. grisea* y *F. graminearum*.

La presencia de dos ó más genes *nox* también parece ser común en otros eucariotos. Por ejemplo, el nemátodo *C. elegans* presenta dos genes para enzimas tipo Duox (Edens *et al.*, 2001), *D. discoideum* contiene tres genes *nox* (Bloomfield y Pears, 2003), mientras que *A. thaliana* posee seis (Foreman *et al.*, 2003). Las distintas enzimas Nox presentes en animales se expresan en diversos tejidos, presentan diferencias estructurales y se regulan de manera diferente, lo cual sugiere que estas oxidasas cumplen distintas funciones. Por ejemplo, Nox5 y gp91phox generan grandes cantidades de superóxido por periodos de tiempo cortos y se encuentran reguladas, mientras que Nox1 y Nox4 parecen estar activas constitutivamente y generar niveles bajos de superóxido. Además, al parecer solo gp91phox (Nox2) y Nox1 necesitan ensamblar varias subunidades para su activación, mientras que Nox4 parece no requerir subunidades adicionales para su activación (Ago *et al.*, 2004). Por su parte, Nox5 (Banfi *et al.*, 2001) y presumiblemente las Duox (Dupuy *et al.*, 1999) se regulan por calcio.

La ubicuidad y notable diversificación de las enzimas Nox entre los eucariotes sugiere que la habilidad para utilizar a las EOR como moléculas de señalización celular apareció tempranamente en la evolución de este grupo de organismos.

NoxA es esencial en la diferenciación sexual de *A. nidulans*.

Recientemente otras proteínas de la familia Nox se han implicado en procesos de diferenciación celular. Por ejemplo, en *A. thaliana* la NADPH oxidasa AtrbohC produce EOR que regulan el desarrollo de las raíces (Foreman *et al.*, 2003). En ratones, Nox3 juega un papel importante en la formación de los otolitos en el sistema vestibular del oído interno (Paffenholz *et al.*, 2004). En *D. discoideum*, la producción de superóxido, probablemente generado por una NADPH oxidasa, es necesaria para la transición de la fase unicelular a la fase multicelular del organismo (Bloomfield y Pears, 2003).

Nuestro trabajo ha mostrado que NoxA es esencial para el desarrollo sexual en *A. nidulans*. En efecto, la ablación del gen *noxA* bloquea el desarrollo de los cuerpos fructíferos o cleistotecios, en una fase muy temprana del desarrollo (promordio) (Fig. 10), no afectando el crecimiento o la diferenciación asexual de este hongo. Por otra parte, la desrepresión del gen *noxA* observada en mutantes $\Delta sakA$ correlaciona con una formación prematura y abundante de cleistotecios. En concordancia con estos resultados, una mutante carente de las tres catalasas principales en *A. nidulans* también desarrolla un mayor número de cleistotecios que siendo mas pequeños, parecen alcanzar la madurez prematuramente.

Resulta interesante que el gen *sakA*, el cual codifica para una cinasa MAP que se activa por estrés osmótico y oxidativo (Kawasaki *et al.*, 2002), regule negativamente la expresión del gen *noxA*, al mismo tiempo que regula positivamente la expresión del gen de la catalasa B (Kawasaki y Aguirre., sin publicar). Parece congruente el regular de manera antagónica la expresión de una enzima que produce EOR (NoxA) y una que descompone EOR (CatB), en condiciones en que los niveles de EOR deberían incrementarse. Con base en estos datos, proponemos

el esquema de regulación para la diferenciación de los cleistotecios en *A. nidulans* que se muestra en la Figura 9.

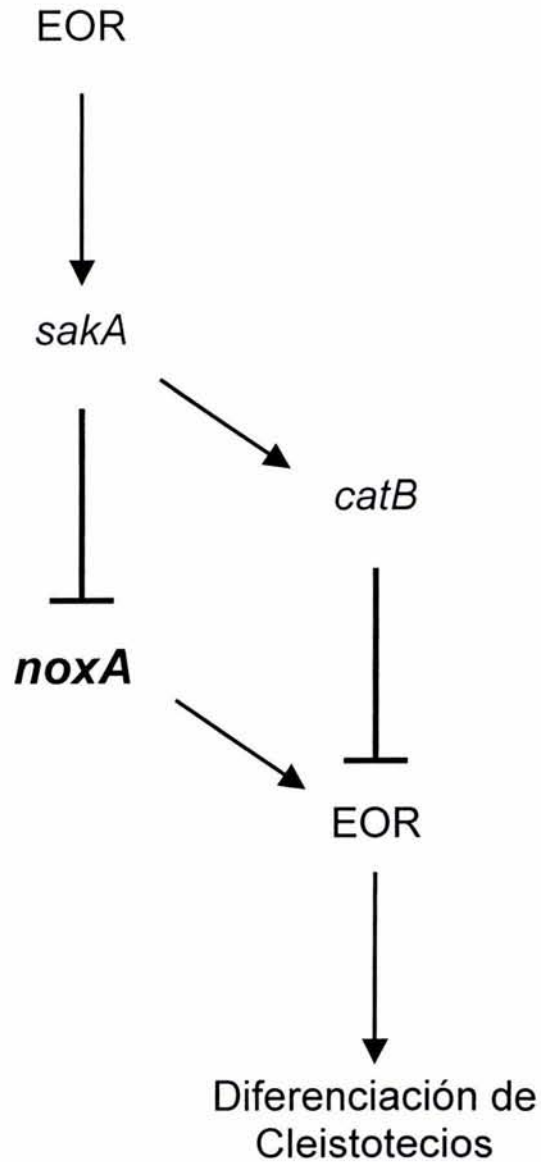


Figura 9. Posible papel de SakA y NoxA en la regulación de la diferenciación sexual. La cinasa SakA reprime el desarrollo sexual a través de la regulación inversa de la expresión de *noxA* y *catB*.

NoxA produce especies de oxígeno reactivas.

Mediante un ensayo de reducción de sales de tetrazolio (NBT) para detectar superóxido, encontramos evidencia que sugiere que las células hülle y los primordios producen $O_2^{\cdot-}$ en un proceso que se inhibe por DPI, un inhibidor de NADPH oxidasas, y se reduce marcadamente en mutantes $\Delta noxA$. Además, utilizando H_2DCFDA pudimos detectar que NoxA participa en la generación de H_2O_2 y posiblemente otras EOR en las paredes externas de los primordios. Con base en estos resultados proponemos que la enzima NoxA se localiza en las células hülle y en las capas externas de los primordios en donde produce $O_2^{\cdot-}$, el cual generaría H_2O_2 por dismutación espontánea o a través de una enzima superóxido dismutasa (Fig. 10). El H_2O_2 al difundir entre el tejido peridial y ascógeno podría actuar como una señal reguladora capaz de modular la fosforilación de proteínas y/o la expresión genética. Diversos estudios sugieren que las EOR producidas por NADPH oxidasas funcionan como segundos mensajeros en distintos procesos fisiológicos, probablemente requiriendo que el $O_2^{\cdot-}$ que producen dismute a H_2O_2 , el cual tiene mayor capacidad de difusión en los tejidos. El $O_2^{\cdot-}$ puede dismutar espontáneamente a H_2O_2 a una tasa constante de $5 \times 10^5 M^{-1}/s^{-1}$ ó a través de la superóxido dismutasa (SOD) a una tasa de $1.6 \times 10^9 M^{-1}/s^{-1}$ (Thannickal y Fanburg, 2000). Existe evidencia indirecta de que en *A. fumigatus* y en otros hongos algunas SOD podrían estar localizadas en la pared celular e incluso secretarse al medio extracelular. Estudios en suero de pacientes con aspergilosis muestran un alto título de anticuerpos contra la SOD Cu,Zn (Hamilton *et al.*, 1995); (Holdom *et al.*, 2000). Además, la actividad de SOD Cu,Zn de *A. flavus*, *A. niger*, *A. nidulans* y *A. fumigatus* se ha detectado en filtrados de cultivos (Holdom *et al.*, 1996). Por lo tanto, existe la posibilidad de que una SOD extracelular utilice como substrato el superóxido generado por NoxA.

Posibles mecanismos de acción de las EOR producidas por NoxA

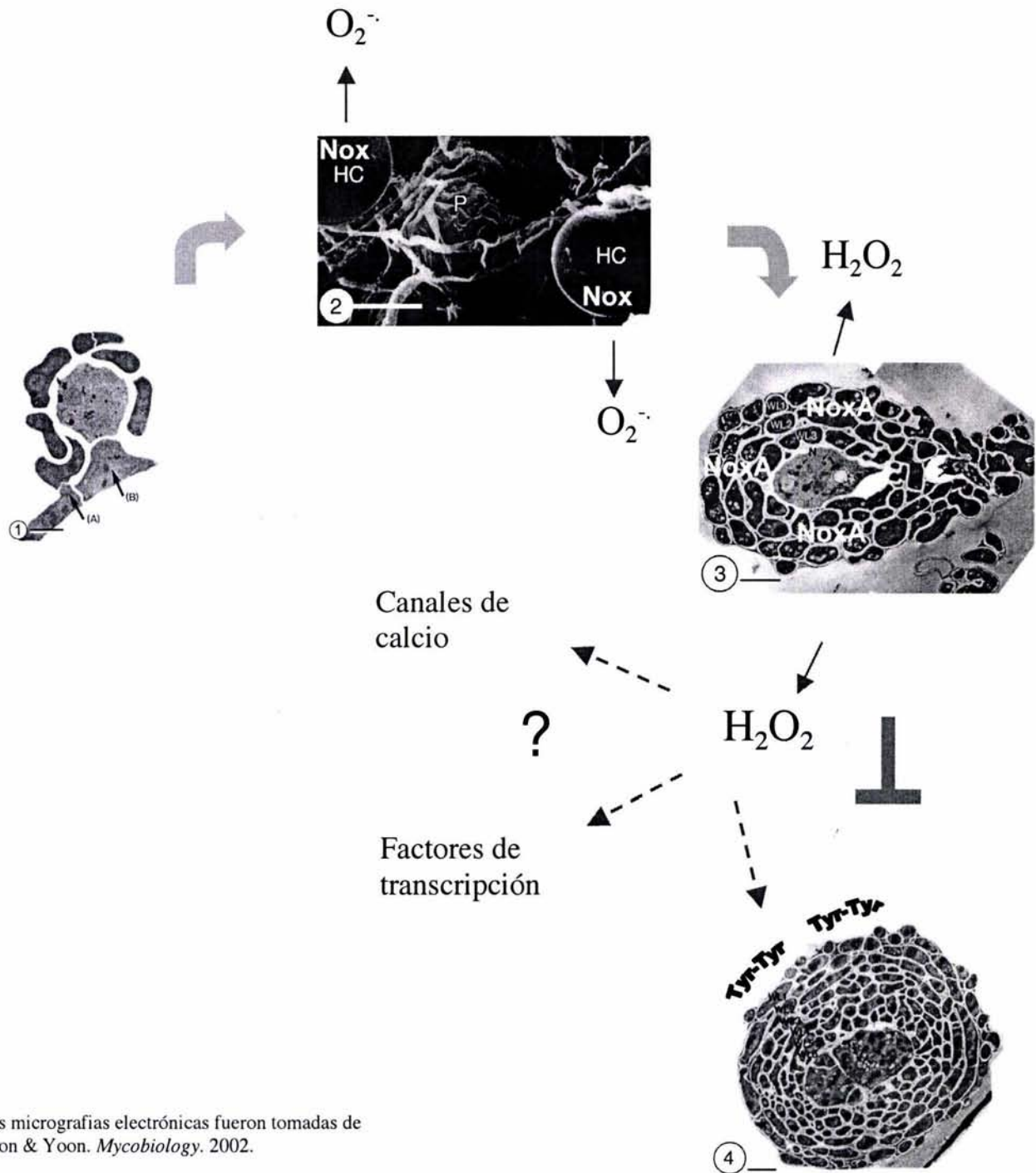
En este momento no conocemos los blancos de las EOR generadas por NoxA. Sin embargo, en otros sistemas se conocen varios blancos y posibles mecanismos de acción de las EOR (Fig. 6 de la introducción). Por ejemplo, en *A. thaliana* las EOR son esenciales para regular la expansión celular a través de la activación de canales de calcio (Demidchik *et al.*, 2002). En *A. nidulans* también se ha reportado que el H₂O₂ induce la movilización de calcio intracelular (Greene *et al.*, 2002), por lo tanto, esta podría ser una vía de señalización para la diferenciación del primordio a cleistotecio (Fig. 10).

Las EOR participan en la regulación de la transcripción del DNA, modulando la actividad de algunos factores de transcripción como OxyR y SoxR en *E. coli* (Hidalgo *et al.*, 1997) (Zheng *et al.*, 1998) y Yap-1 en *S. cerevisiae* (Delaunay *et al.*, 2000). La oxidación de residuos de cisteínas en algunos casos activan y en otros inactivan al factor de transcripción, generalmente alterando la capacidad de unión de estas proteínas al DNA. NoxA podría actuar regulando la actividad de algún factor de transcripción sensible a la oxidación, afectando así la expresión de genes importantes para el desarrollo del cleistotecio (Fig. 10).

Otra posibilidad es que las EOR sean responsables de la oxidación directa o indirecta de proteínas reguladoras como las cinasas MAP o las fosfatasas. Por ejemplo, en *S. pombe* la peroxiredoxina Tpx1 regula la activación de la cinasa Spc1 a través de la formación de un puente disulfuro entre Tpx1 y Spc1 (Veal *et al.*, 2004). Es probable que un mecanismo similar, capaz de percibir el H₂O₂, también este conservado en los hongos filamentosos.

Nuestro trabajo y el de otros autores apoya la idea de que las EOR tienen una función reguladora esencial durante el desarrollo sexual en los microorganismos eucariotes. En *A. nidulans* no podemos descartar la posibilidad de que las EOR puedan regular el desarrollo de los cuerpos fructíferos a través de la oxidación de aminoácidos presentes en proteínas estructurales, por ejemplo, mediante la

formación de enlaces di-tirosina en la pared del cleistotecio (Fig. 10). En *C. elegans* se ha reportado que las enzimas Duox están implicadas en el entrecruzamiento de residuos de tirosina de proteínas de la cutícula (Edens *et al.*, 2001), mientras que durante la fertilización de los ovocitos de erizo de mar se ha reportado el entrecruzamiento de residuos de tirosina de las proteínas de la capa externa del ovocito, en una reacción catalizada por una ovoperoxidasa y una NADPH oxidasa desconocida (Deits *et al.*, 1984).



Las micrografías electrónicas fueron tomadas de Shon & Yoon. *Mycobiology*. 2002.

Figura 10. El posible papel de NoxA en la diferenciación sexual de *A. nidulans*.

Proponemos que NoxA se localiza en la membrana celular de las células hülle (HC) y del peridio. NoxA produce $O_2^{\cdot-}$ en el espacio intercelular, el cual produce H_2O_2 por dismutación espontánea o mediante la actividad de una SOD hipotética. Al difundir entre el tejido peridial y ascógeno, el H_2O_2 funciona como una señal reguladora que permite la expresión de los productos necesarios para la diferenciación del cleistotecio. El H_2O_2 también podría participar en el entrecruzamiento de proteínas de la pared del cleistotecio, mediante la formación de enlaces di-tirosina (Tyr-Tyr).

NOX, EOR y diferenciación sexual.

Existe la posibilidad de que las Nox estén relacionadas con el desarrollo sexual en los hongos. Las levaduras carecen de genes *nox* y no forman cuerpos fructíferos; lo mismo sucede con *U. maydis* y *C. neoformans*. En cambio, los hongos que contienen genes *nox* desarrollan cuerpos fructíferos, con excepción de *A. fumigatus*, en el cual no se ha descrito diferenciación sexual, pero posee un gen *noxA* (Liu y Hall, 2004). Sin embargo, el hecho de que este hongo contenga todos los genes requeridos para la reproducción sexual sugiere que este ascomiceto podría llevar a cabo la diferenciación sexual en condiciones no reportadas aún.

Nuestro trabajo apoya la idea de que en general, las EOR podrían jugar un papel fundamental en el desarrollo sexual. Como hemos visto, en *A. nidulans* la inactivación de NoxA reduce marcadamente la producción de EOR y bloquea el desarrollo de los cuerpos fructíferos en un estado temprano. En *N. crassa*, se encontró recientemente que las mutantes $\Delta nox-1$ también son incapaces de desarrollar cuerpos fructíferos sexuales mientras que esporas sexuales de cruza homocigas $\Delta nox-2$ son incapaces de germinar (Alvarez, Cano, Hansberg y Aguirre, sin publicar). En *S. cerevisiae* la adición del factor de apareamiento alfa a las células tipo *a* causa la producción de EOR (Severin y Hyman, 2002). En el alga verde *Volvox carteri* la diferenciación sexual inducida por choque de calor, incrementa la producción de EOR en la células somáticas, mientras que la presencia de catalasa o quelantes de Fe^{2+} inhiben dicha diferenciación, así como la expresión del gen que codifica para el inductor sexual (IS) (Nedelcu *et al.*, 2004).

CONCLUSIONES

1. El gen *noxA* de *Aspergillus nidulans* codifica para una NADPH oxidasa homóloga a gp91phox, y define nuevas subfamilias de NADPH oxidasas en microorganismos eucariotos.
2. NoxA esta involucrada en la producción de EOR durante el desarrollo sexual y es esencial para el desarrollo de los cuerpos fructíferos.
3. La expresión de *noxA* durante el desarrollo sexual no requiere de los factores de transcripción SteA, StuA y NsdD, los cuales también se requieren para la formación de los cuerpos fructíferos.
4. La cinasa MAPK SakA regula el desarrollo sexual a través de la regulación negativa del gen *noxA*.
5. La sobre-expresión de Ras parece inducir la producción de EOR de manera independiente de NoxA.

PERSPECTIVAS

1. Definir la localización celular de NoxA.
2. Analizar los efectos de la sobreexpresión de NoxA y enzimas antioxidantes durante el crecimiento y la diferenciación sexual.
3. Tratar de analizar si eventos tempranos en el desarrollo sexual, tales como la acción de feromonas o factores sexuales regulan la expresión o actividad de NoxA.
4. Tratar de determinar los efectos de las EOR producidas por NoxA en cuanto a la movilización de calcio y la fosforilación de proteínas en cepas silvestres y mutantes afectadas en posibles sensores de H₂O₂ (peroxiredoxinas, tioredoxina).
5. Confirmar que Ras regula la producción de EOR y la posible participación de la mitocondria en este proceso.
6. Identificar genes cuya sobreexpresión rescate la formación de cleisitotecios en una mutante Δ noxA.
7. Comparar la expresión global (microarreglos) de genes en una cepa silvestre y una mutante Δ noxA, durante el desarrollo sexual.

REFERENCIAS

- Abate, C., Patel, L., Rauscher, F.J., 3rd, and Curran, T. (1990) Redox regulation of fos and jun DNA-binding activity in vitro. *Science* **249**: 1157-1161.
- Abe, J., Kusuvara, M., Ulevitch, R.J., Berk, B.C., and Lee, J.D. (1996) Big mitogen-activated protein kinase 1 (BMK1) is a redox-sensitive kinase. *J Biol Chem* **271**: 16586-16590.
- Abe, J., Takahashi, M., Ishida, M., Lee, J.D., and Berk, B.C. (1997) c-Src is required for oxidative stress-mediated activation of big mitogen-activated protein kinase 1. *J Biol Chem* **272**: 20389-20394.
- Abe, J., and Berk, B.C. (1999) Fyn and JAK2 mediate Ras activation by reactive oxygen species. *J Biol Chem* **274**: 21003-21010.
- Ago, T., Kitazono, T., Ooboshi, H., Iyama, T., Han, Y.H., Takada, J., Wakisaka, M., Ibayashi, S., Utsumi, H., and Iida, M. (2004) Nox4 as the major catalytic component of an endothelial NAD(P)H oxidase. *Circulation* **109**: 227-233.
- Azevedo, D., Tacnet, F., Delaunay, A., Rodrigues-Pousada, C., and Toledano, M.B. (2003) Two redox centers within Yap1 for H₂O₂ and thiol-reactive chemicals signaling. *Free Radic Biol Med* **35**: 889-900.
- Bae, Y.S., Sung, J.Y., Kim, O.S., Kim, Y.J., Hur, K.C., Kazlauskas, A., and Rhee, S.G. (2000) Platelet-derived growth factor-induced H₂O₂ production requires the activation of phosphatidylinositol 3-kinase. *J Biol Chem* **275**: 10527-10531.
- Baeuerle, P.A., and Baltimore, D. (1996) NF-kappa B: ten years after. *Cell* **87**: 13-20.
- Banfi, B., Maturana, A., Jaconi, S., Arnaudeau, S., Laforge, T., Sinha, B., Ligeti, E., Demaurex, N., and Krause, K.H. (2000) A mammalian H⁺ channel generated through alternative splicing of the NADPH oxidase homolog NOX-1. *Science* **287**: 138-142.
- Banfi, B., Molnar, G., Maturana, A., Steger, K., Hegedus, B., Demaurex, N., and Krause, K.H. (2001) A Ca²⁺-activated NADPH oxidase in testis, spleen, and lymph nodes. *J Biol Chem* **276**: 37594-37601.
- Banfi, B., Tirone, F., Durussel, I., Knisz, J., Moskwa, P., Molnar, G.Z., Krause, K.H., and Cox, J.A. (2004) Mechanism of Ca²⁺ activation of the NADPH oxidase 5 (NOX5). *J Biol Chem* **279**: 18583-18591.
- Banki, K., Hutter, E., Gonchoroff, N.J., and Perl, A. (1999) Elevation of mitochondrial transmembrane potential and reactive oxygen intermediate levels are early events and occur independently from activation of caspases in Fas signaling. *J Immunol* **162**: 1466-1479.
- Barnes, E.M., Jr. (2000) Intracellular trafficking of GABA(A) receptors. *Life Sci* **66**: 1063-1070.
- Berridge, M.J. (1993) Inositol trisphosphate and calcium signalling. *Nature* **361**: 315-325.
- Biberstine-Kinkade, K.J., DeLeo, F.R., Epstein, R.I., LeRoy, B.A., Nauseef, W.M., and Dinauer, M.C. (2001) Heme-ligating histidines in flavocytochrome b(558): identification of specific histidines in gp91(phox). *J Biol Chem* **276**: 31105-31112.
- Bladier, C., Wolvetang, E.J., Hutchinson, P., de Haan, J.B., and Kola, I. (1997) Response of a primary human fibroblast cell line to H₂O₂: senescence-like growth arrest or apoptosis? *Cell Growth Differ* **8**: 589-598.
- Bloomfield, G., and Pears, C. (2003) Superoxide signalling required for multicellular development of Dictyostelium. *J Cell Sci* **116**: 3387-3397.

- Blumberg, P.M. (1991) Complexities of the protein kinase C pathway. *Mol Carcinog* **4**: 339-344.
- Brar, S.S., Corbin, Z., Kennedy, T.P., Hemendinger, R., Thornton, L., Bommarius, B., Arnold, R.S., Whorton, A.R., Sturrock, A.B., Huecksteadt, T.P., Quinn, M.T., Krenitsky, K., Ardie, K.G., Lambeth, J.D., and Hoidal, J.R. (2003) NOX5 NAD(P)H oxidase regulates growth and apoptosis in DU 145 prostate cancer cells. *Am J Physiol Cell Physiol* **285**: C353-369.
- Buchanan, B.B., Schurmann, P., Decottignies, P., and Lozano, R.M. (1994) Thioredoxin: a multifunctional regulatory protein with a bright future in technology and medicine. *Arch Biochem Biophys* **314**: 257-260.
- Burdon, R.H., Gill, V., and Rice-Evans, C. (1989) Cell proliferation and oxidative stress. *Free Radic Res Commun* **7**: 149-159.
- Chae, H.Z., Chung, S.J., and Rhee, S.G. (1994) Thioredoxin-dependent peroxide reductase from yeast. *J Biol Chem* **269**: 27670-27678.
- Cheng, G., Cao, Z., Xu, X., Meir, E.G., and Lambeth, J.D. (2001) Homologs of gp91phox: cloning and tissue expression of Nox3, Nox4, and Nox5. *Gene* **269**: 131-140.
- Chiarugi, P., and Cirri, P. (2003) Redox regulation of protein tyrosine phosphatases during receptor tyrosine kinase signal transduction. *Trends Biochem Sci* **28**: 509-514.
- Cho, S.H., Lee, C.H., Ahn, Y., Kim, H., Ahn, C.Y., Yang, K.S., and Lee, S.R. (2004) Redox regulation of PTEN and protein tyrosine phosphatases in H₂O₂ mediated cell signaling. *FEBS Lett* **560**: 7-13.
- Clutterbuck, A.J. (1969) A mutational analysis of conidial development in *Aspergillus nidulans*. *Genetics* **63**: 317-327.
- Cohen, P.T. (1997) Novel protein serine/threonine phosphatases: variety is the spice of life. *Trends Biochem Sci* **22**: 245-251.
- Cross, A.R., Erickson, R.W., and Curnutte, J.T. (1999) The mechanism of activation of NADPH oxidase in the cell-free system: the activation process is primarily catalytic and not through the formation of a stoichiometric complex. *Biochem J* **341** (Pt 2): 251-255.
- De Deken, X., Wang, D., Many, M.C., Costagliola, S., Libert, F., Vassart, G., Dumont, J.E., and Miot, F. (2000) Cloning of two human thyroid cDNAs encoding new members of the NADPH oxidase family. *J Biol Chem* **275**: 23227-23233.
- De Deken, X., Wang, D., Dumont, J.E., and Miot, F. (2002) Characterization of ThOX proteins as components of the thyroid H₂O₂-generating system. *Exp Cell Res* **273**: 187-196.
- Deits, T., Farrance, M., Kay, E.S., Medill, L., Turner, E.E., Weidman, P.J., and Shapiro, B.M. (1984) Purification and properties of ovoperoxidase, the enzyme responsible for hardening the fertilization membrane of the sea urchin egg. *J Biol Chem* **259**: 13525-13533.
- Delaunay, A., Isnard, A.D., and Toledano, M.B. (2000) H₂O₂ sensing through oxidation of the Yap1 transcription factor. *Embo J* **19**: 5157-5166.
- Demidchik, V., Bowen, H.C., Maathuis, F.J., Shabala, S.N., Tester, M.A., White, P.J., and Davies, J.M. (2002) Arabidopsis thaliana root non-selective cation channels mediate calcium uptake and are involved in growth. *Plant J* **32**: 799-808.
- Diebold, B.A., and Bokoch, G.M. (2001) Molecular basis for Rac2 regulation of phagocyte NADPH oxidase. *Nat Immunol* **2**: 211-215.

- Diekmann, D., Abo, A., Johnston, C., Segal, A.W., and Hall, A. (1994) Interaction of Rac with p67phox and regulation of phagocytic NADPH oxidase activity. *Science* **265**: 531-533.
- Doke, N., Miura, Y., Sanchez, L.M., Park, H.J., Noritake, T., Yoshioka, H., and Kawakita, K. (1996) The oxidative burst protects plants against pathogen attack: mechanism and role as an emergency signal for plant bio-defence--a review. *Gene* **179**: 45-51.
- Droge, W. (2002) Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* **82**: 47-95.
- Dupuy, C., Ohayon, R., Valent, A., Noel-Hudson, M.S., Deme, D., and Virion, A. (1999) Purification of a novel flavoprotein involved in the thyroid NADPH oxidase. Cloning of the porcine and human cdnas. *J Biol Chem* **274**: 37265-37269.
- Dutton, J.R., Johns, S., and Miller, B.L. (1997) StuAp is a sequence-specific transcription factor that regulates developmental complexity in *Aspergillus nidulans*. *EMBO J* **16**: 5710-5721.
- Edens, W.A., Sharling, L., Cheng, G., Shapira, R., Kinkade, J.M., Lee, T., Edens, H.A., Tang, X., Sullards, C., Flaherty, D.B., Benian, G.M., and Lambeth, J.D. (2001) Tyrosine cross-linking of extracellular matrix is catalyzed by Duox, a multidomain oxidase/oxidoreductase with homology to the phagocyte oxidase subunit gp91phox. *J Cell Biol* **154**: 879-891.
- Eklund, H., Gleason, F.K., and Holmgren, A. (1991) Structural and functional relations among thioredoxins of different species. *Proteins* **11**: 13-28.
- Esteve, J.M., Mampo, J., Garcia de la Asuncion, J., Sastre, J., Asensi, M., Boix, J., Vina, J.R., Vina, J., and Pallardo, F.V. (1999) Oxidative damage to mitochondrial DNA and glutathione oxidation in apoptosis: studies in vivo and in vitro. *Faseb J* **13**: 1055-1064.
- Fialkow, L., Chan, C.K., and Downey, G.P. (1997) Inhibition of CD45 during neutrophil activation. *J Immunol* **158**: 5409-5417.
- Finkel, T. (1998) Oxygen radicals and signaling. *Curr Opin Cell Biol* **10**: 248-253.
- Finkel, T. (2001) Reactive oxygen species and signal transduction. *IUBMB Life* **52**: 3-6.
- Foreman, J., Demidchik, V., Bothwell, J.H., Mylona, P., Miedema, H., Torres, M.A., Linstead, P., Costa, S., Brownlee, C., Jones, J.D., Davies, J.M., and Dolan, L. (2003) Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulate plant cell growth. *Nature* **422**: 442-446.
- Freeman, B.A., and Crapo, J.D. (1982) Biology of disease: free radicals and tissue injury. *Lab Invest* **47**: 412-426.
- Freeman, J.L., Abo, A., and Lambeth, J.D. (1996) Rac "insert region" is a novel effector region that is implicated in the activation of NADPH oxidase, but not PAK65. *J Biol Chem* **271**: 19794-19801.
- Freeman, J.L., and Lambeth, J.D. (1996) NADPH oxidase activity is independent of p47phox in vitro. *J Biol Chem* **271**: 22578-22582.
- Galter, D., Mihm, S., and Droge, W. (1994) Distinct effects of glutathione disulphide on the nuclear transcription factor kappa B and the activator protein-1. *Eur J Biochem* **221**: 639-648.
- Garcia, L., Garcia, F., Llorens, F., Unzeta, M., Itarte, E., and Gomez, N. (2002) PP1/PP2A phosphatases inhibitors okadaic acid and calyculin A block ERK5 activation by growth factors and oxidative stress. *FEBS Lett* **523**: 90-94.

- Geiszt, M., Kopp, J.B., Varnai, P., and Leto, T.L. (2000) Identification of renox, an NAD(P)H oxidase in kidney. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 8010-8014.
- Go, Y.M., Gipp, J.J., Mulcahy, R.T., and Jones, D.P. (2004) H₂O₂-dependent activation of GCLC-ARE4 reporter occurs by mitogen-activated protein kinase pathways without oxidation of cellular glutathione or thioredoxin-1. *J Biol Chem* **279**: 5837-5845.
- Goldhaber, J.I. (1996) Free radicals enhance Na⁺/Ca²⁺ exchange in ventricular myocytes. *Am J Physiol* **271**: H823-833.
- Gopalakrishna, R., and Anderson, W.B. (1989) Ca²⁺- and phospholipid-independent activation of protein kinase C by selective oxidative modification of the regulatory domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**: 6758-6762.
- Greene, V., Cao, H., Schanne, F.A., and Bartelt, D.C. (2002) Oxidative stress-induced calcium signalling in *Aspergillus nidulans*. *Cell Signal* **14**: 437-443.
- Halliwell, B., and Gutteridge, J.M.C. (1989) *Free radicals in biology and medicine*. Oxford United Kingdom: Clarendon Press ; Oxford University Press.
- Hamilton, A.J., Holdom, M.D., and Hay, R.J. (1995) Specific recognition of purified Cu,Zn superoxide dismutase from *Aspergillus fumigatus* by immune human sera. *J Clin Microbiol* **33**: 495-496.
- Han, C.H., Freeman, J.L., Lee, T., Motalebi, S.A., and Lambeth, J.D. (1998) Regulation of the neutrophil respiratory burst oxidase. Identification of an activation domain in p67(phox). *J Biol Chem* **273**: 16663-16668.
- Han, K.H., Han, K.Y., Yu, J.H., Chae, K.S., Jahng, K.Y., and Han, D.M. (2001) The *nsdD* gene encodes a putative GATA-type transcription factor necessary for sexual development of *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol* **41**: 299-309.
- Hansberg, W., and 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., and Sies, H. (1993) Reactive oxygen species associated with cell differentiation in *Neurospora crassa*. *Free Radic Biol Med* **14**: 287-293.
- Heffetz, D., Rutter, W.J., and Zick, Y. (1992) The insulinomimetic agents H₂O₂ and vanadate stimulate tyrosine phosphorylation of potential target proteins for the insulin receptor kinase in intact cells. *Biochem J* **288** (Pt 2): 631-635.
- Henderson, L.M., and Chappel, J.B. (1996) NADPH oxidase of neutrophils. *Biochim Biophys Acta* **1273**: 87-107.
- Hidalgo, E., Ding, H., and Demple, B. (1997) Redox signal transduction: mutations shifting [2Fe-2S] centers of the SoxR sensor-regulator to the oxidized form. *Cell* **88**: 121-129.
- Hirota, K., Murata, M., Sachi, Y., Nakamura, H., Takeuchi, J., Mori, K., and Yodoi, J. (1999) Distinct roles of thioredoxin in the cytoplasm and in the nucleus. A two-step mechanism of redox regulation of transcription factor NF-kappaB. *J Biol Chem* **274**: 27891-27897.
- Hochman, A., and Shemesh, A. (1987) Purification and characterization of a catalase-peroxidase from the photosynthetic bacterium *Rhodospseudomonas capsulata*. *J Biol Chem* **262**: 6871-6876.
- Hockenbery, D.M., Oltvai, Z.N., Yin, X.M., Milliman, C.L., and Korsmeyer, S.J. (1993) Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis. *Cell* **75**: 241-251.
- Holdom, M.D., Hay, R.J., and Hamilton, A.J. (1996) The Cu,Zn superoxide dismutases of *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus nidulans*, and *Aspergillus terreus*:

- purification and biochemical comparison with the *Aspergillus fumigatus* Cu,Zn superoxide dismutase. *Infect Immun* **64**: 3326-3332.
- Holdom, M.D., Lechenne, B., Hay, R.J., Hamilton, A.J., and Monod, M. (2000) Production and characterization of recombinant *Aspergillus fumigatus* Cu,Zn superoxide dismutase and its recognition by immune human sera. *J Clin Microbiol* **38**: 558-562.
- Irani, K., Xia, Y., Zweier, J.L., Sollott, S.J., Der, C.J., Fearon, E.R., Sundaresan, M., Finkel, T., and Goldschmidt-Clermont, P.J. (1997) Mitogenic signaling mediated by oxidants in Ras-transformed fibroblasts. *Science* **275**: 1649-1652.
- Kamata, H., and Hirata, H. (1999) Redox regulation of cellular signalling. *Cell Signal* **11**: 1-14.
- Kawasaki, L., and Aguirre, J. (2001) Multiple catalase genes are differentially regulated in *Aspergillus nidulans*. *J Bacteriol* **183**: 1434-1440.
- Kawasaki, L., Sanchez, O., Shiozaki, K., and Aguirre, J. (2002) SakA MAP kinase is involved in stress signal transduction, sexual development and spore viability in *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol* **45**: 1153-1163.
- Keller, T., Damude, H.G., Werner, D., Doerner, P., Dixon, R.A., and Lamb, C. (1998) A plant homolog of the neutrophil NADPH oxidase gp91phox subunit gene encodes a plasma membrane protein with Ca²⁺ binding motifs. *Plant Cell* **10**: 255-266.
- Kim, H., Han, K., Kim, K., Han, D., Jahng, K., and Chae, K. (2002) The veA gene activates sexual development in *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genet Biol* **37**: 72-80.
- Knebel, A., Rahmsdorf, H.J., Ullrich, A., and Herrlich, P. (1996) Dephosphorylation of receptor tyrosine kinases as target of regulation by radiation, oxidants or alkylating agents. *Embo J* **15**: 5314-5325.
- Konishi, H., Tanaka, M., Takemura, Y., Matsuzaki, H., Ono, Y., Kikkawa, U., and Nishizuka, Y. (1997) Activation of protein kinase C by tyrosine phosphorylation in response to H₂O₂. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 11233-11237.
- Krejsa, C.M., and Schieven, G.L. (1998) Impact of oxidative stress on signal transduction control by phosphotyrosine phosphatases. *Environ Health Perspect* **106 Suppl 5**: 1179-1184.
- Krieger-Brauer, H.I., and Kather, H. (1992) Human fat cells possess a plasma membrane-bound H₂O₂-generating system that is activated by insulin via a mechanism bypassing the receptor kinase. *J Clin Invest* **89**: 1006-1013.
- Kwak, J.M., Mori, I.C., Pei, Z.-M., Leonhardt, N., Torres, M.A., Dangl, J.L., Bloom, R.E., Bodde, S., Jones, J.D.G., and Schroeder, J.I. (2003) NADPH oxidase AtrbohD and AtrbohF genes function in ROS-dependent ABA signaling in *Arabidopsis*. *EMBO J* **22**: 2623-2633.
- Kwong, C.H., Malech, H.L., Rotrosen, D., and Leto, T.L. (1993) Regulation of the human neutrophil NADPH oxidase by rho-related G-proteins. *Biochemistry* **32**: 5711-5717.
- Lara-Ortiz, T., Riveros-Rosas, H., and Aguirre, J. (2003) Reactive oxygen species generated by microbial NADPH oxidase NoxA regulate sexual development in *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol* **50**: 1241-1255.
- Lassegue, B., and Clempus, R.E. (2003) Vascular NAD(P)H oxidases: specific features, expression, and regulation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **285**: R277-297.
- Lee, S.R., Kwon, K.S., Kim, S.R., and Rhee, S.G. (1998) Reversible inactivation of protein-tyrosine phosphatase 1B in A431 cells stimulated with epidermal growth factor. *J Biol Chem* **273**: 15366-15372.

- Levine, A., Pennell, R.I., Alvarez, M.E., Palmer, R., and Lamb, C. (1996) Calcium-mediated apoptosis in a plant hypersensitive disease resistance response. *Curr Biol* **6**: 427-437.
- Liu, T., Castro, S., Brasier, A.R., Jamaluddin, M., Garofalo, R.P., and Casola, A. (2004) Reactive oxygen species mediate virus-induced STAT activation: role of tyrosine phosphatases. *J Biol Chem* **279**: 2461-2469.
- Liu, Y.J., and Hall, B.D. (2004) Body plan evolution of ascomycetes, as inferred from an RNA polymerase II phylogeny. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 4507-4512.
- Lledias, F., Rangel, P., and Hansberg, W. (1998) Oxidation of catalase by singlet oxygen. *J Biol Chem* **273**: 10630-10637.
- Lo, Y.Y., Wong, J.M., and Cruz, T.F. (1996) Reactive oxygen species mediate cytokine activation of c-Jun NH2-terminal kinases. *J Biol Chem* **271**: 15703-15707.
- Mahadev, K., Motoshima, H., Wu, X., Ruddy, J.M., Arnold, R.S., Cheng, G., Lambeth, J.D., and Goldstein, B.J. (2004) The NAD(P)H oxidase homolog Nox4 modulates insulin-stimulated generation of H₂O₂ and plays an integral role in insulin signal transduction. *Mol Cell Biol* **24**: 1844-1854.
- Makino, Y., Yoshikawa, N., Okamoto, K., Hirota, K., Yodoi, J., Makino, I., and Tanaka, H. (1999) Direct association with thioredoxin allows redox regulation of glucocorticoid receptor function. *J Biol Chem* **274**: 3182-3188.
- Marre, M.T., Amicucci, E., Zingarelli, L., Albergoni, F., and Marre, E. (1998) The respiratory burst and electrolyte leakage induced by sulfhydryl blockers in egeria densa leaves are associated with H₂O₂ production and are dependent on Ca²⁺ influx. *Plant Physiol* **118**: 1379-1387.
- Matsuda, S., Moriguchi, T., Koyasu, S., and Nishida, E. (1998) T lymphocyte activation signals for interleukin-2 production involve activation of MKK6-p38 and MKK7-SAPK/JNK signaling pathways sensitive to cyclosporin A. *J Biol Chem* **273**: 12378-12382.
- Meyer, M., Schreck, R., and Baeuerle, P.A. (1993) H₂O₂ and antioxidants have opposite effects on activation of NF-kappa B and AP-1 in intact cells: AP-1 as secondary antioxidant-responsive factor. *Embo J* **12**: 2005-2015.
- Missiaen, L., Taylor, C.W., and Berridge, M.J. (1991) Spontaneous calcium release from inositol trisphosphate-sensitive calcium stores. *Nature* **352**: 241-244.
- Morris, S.L., Nair, J., and Rouse, D.A. (1992) The catalase-peroxidase of Mycobacterium intracellulare: nucleotide sequence analysis and expression in Escherichia coli. *J Gen Microbiol* **138** (Pt 11): 2363-2370.
- Nedelcu, A.M., Marcu, O., and Michod, R.E. (2004) Sex as a response to oxidative stress: a twofold increase in cellular reactive oxygen species activates sex genes. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* **271**: 1591-1596.
- Nishizuka, Y. (1992) Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C. *Science* **258**: 607-614.
- Nose, K. (2000) Role of reactive oxygen species in the regulation of physiological functions. *Biol Pharm Bull* **23**: 897-903.
- Paffenholz, R., Bergstrom, R.A., Pasutto, F., Wabnitz, P., Munroe, R.J., Jagla, W., Heinzmann, U., Marquardt, A., Bareiss, A., Laufs, J., Russ, A., Stumm, G., Schimenti, J.C., and Bergstrom, D.E. (2004) Vestibular defects in head-tilt mice result from mutations in Nox3, encoding an NADPH oxidase. *Genes Dev* **18**: 486-491.

- Peraza, L., and Hansberg, W. (2002) Neurospora crassa catalases, singlet oxygen and cell differentiation. *Biol Chem* **383**: 569-575.
- Qin, S., Inazu, T., and Yamamura, H. (1995) Activation and tyrosine phosphorylation of p72syk as well as calcium mobilization after hydrogen peroxide stimulation in peripheral blood lymphocytes. *Biochem J* **308** (Pt 1): 347-352.
- Sagi, M., and Fluhr, R. (2001) Superoxide production by plant homologues of the gp91(phox) NADPH oxidase. Modulation of activity by calcium and by tobacco mosaic virus infection. *Plant Physiol* **126**: 1281-1290.
- Sauer, H., Wartenberg, M., and Hescheler, J. (2001) Reactive oxygen species as intracellular messengers during cell growth and differentiation. *Cell Physiol Biochem* **11**: 173-186.
- Schnell, N., Krems, B., and Entian, K.D. (1992) The PAR1 (YAP1/SNQ3) gene of Saccharomyces cerevisiae, a c-jun homologue, is involved in oxygen metabolism. *Curr Genet* **21**: 269-273.
- Schreck, R., Rieber, P., and Baeuerle, P.A. (1991) Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF-kappa B transcription factor and HIV-1. *Embo J* **10**: 2247-2258.
- Secrist, J.P., Burns, L.A., Karnitz, L., Koretzky, G.A., and Abraham, R.T. (1993) Stimulatory effects of the protein tyrosine phosphatase inhibitor, pervanadate, on T-cell activation events. *J Biol Chem* **268**: 5886-5893.
- Seo, J.A., Han, K.H., and Yu, J.H. (2004) The gprA and gprB genes encode putative G protein-coupled receptors required for self-fertilization in Aspergillus nidulans. *Mol Microbiol* **53**: 1611-1623.
- Severin, F.F., and Hyman, A.A. (2002) Pheromone induces programmed cell death in S. cerevisiae. *Curr Biol* **12**: R233-235.
- Shiose, A., Kuroda, J., Tsuruya, K., Hirai, M., Hirakata, H., Naito, S., Hattori, M., Sakaki, Y., and Sumimoto, H. (2001) A novel superoxide-producing NAD(P)H oxidase in kidney. *J Biol Chem* **276**: 1417-1423.
- Shon, K.T., and Yoon, K.S. (2002) Ultrastructural study on the cleistothecium development in Aspergillus nidulans. *Mycobiology* **30**: 117-127.
- Skromne, I., Sanchez, O., and Aguirre, J. (1995) Starvation stress modulates the expression of the Aspergillus nidulans brlA regulatory gene. *Microbiology* **141**: 21-28.
- Sommer, D., Fakata, K.L., Swanson, S.A., and Stemmer, P.M. (2000) Modulation of the phosphatase activity of calcineurin by oxidants and antioxidants in vitro. *Eur J Biochem* **267**: 2312-2322.
- Suh, Y.A., Arnold, R.S., Lassegue, B., Shi, J., Xu, X., Sorescu, D., Chung, A.B., Griendling, K.K., and Lambeth, J.D. (1999) Cell transformation by the superoxide-generating oxidase Mox1. *Nature* **401**: 79-82.
- Sundaresan, M., Yu, Z.X., Ferrans, V.J., Sulciner, D.J., Gutkind, J.S., Irani, K., Goldschmidt-Clermont, P.J., and Finkel, T. (1996) Regulation of reactive-oxygen-species generation in fibroblasts by Rac1. *Biochem J* **318** (Pt 2): 379-382.
- Thannickal, V.J., and Fanburg, B.L. (2000) Reactive oxygen species in cell signaling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **279**: L1005-1028.
- Toledo, I., Noronha-Dutra, A.A., and Hansberg, W. (1991) Loss of NAD(P)-reducing power and glutathione disulfide excretion at the start of induction of aerial growth in Neurospora crassa. *J Bacteriol* **173**: 3243-3249.

- Toledo, I., Rangel, P., and Hansberg, W. (1995) Redox imbalance at the start of each morphogenetic step of *Neurospora crassa* conidiation. *Arch Biochem Biophys* **319**: 519-524.
- Torres, M.A., Dangl, J.L., and Jones, J.D. (2002) *Arabidopsis* gp91phox homologues AtrbohD and AtrbohF are required for accumulation of reactive oxygen intermediates in the plant defense response. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 517-522.
- Vallim, M.A., Miller, K.Y., and Miller, B.L. (2000) *Aspergillus* SteA (sterile12-like) is a homeodomain-C2/H2-Zn²⁺ finger transcription factor required for sexual reproduction. *Mol Microbiol* **36**: 290-301.
- van Wetering, S., van Buul, J.D., Quik, S., Mul, F.P., Anthony, E.C., ten Klooster, J.P., Collard, J.G., and Hordijk, P.L. (2002) Reactive oxygen species mediate Rac-induced loss of cell-cell adhesion in primary human endothelial cells. *J Cell Sci* **115**: 1837-1846.
- Veal, E.A., Findlay, V.J., Day, A.M., Bozonet, S.M., Evans, J.M., Quinn, J., and Morgan, B.A. (2004) A 2-Cys peroxiredoxin regulates peroxide-induced oxidation and activation of a stress-activated MAP kinase. *Mol Cell* **15**: 129-139.
- Vignais, P.V. (2002) The superoxide-generating NADPH oxidase: structural aspects and activation mechanism. *Cell Mol Life Sci* **59**: 1428-1459.
- Werner, E. (2004) GTPases and reactive oxygen species: switches for killing and signaling. *J Cell Sci* **117**: 143-153.
- Whisler, R.L., Goyette, M.A., Grants, I.S., and Newhouse, Y.G. (1995) Sublethal levels of oxidant stress stimulate multiple serine/threonine kinases and suppress protein phosphatases in Jurkat T cells. *Arch Biochem Biophys* **319**: 23-35.
- Wu, J., and Miller, B.L. (1997) *Aspergillus* asexual reproduction and sexual reproduction are differentially affected by transcriptional and translational mechanisms regulating stunted gene expression. *Mol Cell Biol* **17**: 6191-6201.
- Xanthoudakis, S., and Curran, T. (1992) Identification and characterization of Ref-1, a nuclear protein that facilitates AP-1 DNA-binding activity. *Embo J* **11**: 653-665.
- Yang, Y., Shah, J., and Klessig, D.F. (1997) Signal perception and transduction in plant defense responses. *Genes Dev* **11**: 1621-1639.
- Yin, D., Kuczera, K., and Squier, T.C. (2000) The sensitivity of carboxyl-terminal methionines in calmodulin isoforms to oxidation by H₂O₂ modulates the ability to activate the plasma membrane Ca-ATPase. *Chem Res Toxicol* **13**: 103-110.
- Yoshizumi, M., Abe, J., Haendeler, J., Huang, Q., and Berk, B.C. (2000) Src and Cas mediate JNK activation but not ERK1/2 and p38 kinases by reactive oxygen species. *J Biol Chem* **275**: 11706-11712.
- Zheng, M., Aslund, F., and Storz, G. (1998) Activation of the OxyR transcription factor by reversible disulfide bond formation. *Science* **279**: 1718-1721.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA