



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**NAPA Y roGFP COMO SISTEMAS DE DETECCIÓN DE ESPECIES REACTIVAS
DEL OXÍGENO (ERO) *IN VIVO* EN *ASPERGILLUS NIDULANS***

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

PRESENTA

ARIANN ELIZABETH MENDOZA MARTÍNEZ



MÉXICO, D.F.

AÑO



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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: PROFESOR: DRA. MARÍA ELENA IBARRA RUBIO
VOCAL: PROFESOR: DRA. MARTHA PATRICIA COELLO CUTIÑO
SECRETARIO: PROFESOR: DR. JESÚS AGUIRRE LINARES
1ER. SUPLENTE: PROFESOR: M. EN B. BEATRIZ RUÍZ VILLAFAN
2º SUPLENTE: PROFESOR: DR. LUIS ÁNGEL MALDONADO MANJARREZ

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: INSTITUTO DE FISIOLOGÍA CELULAR

ASESOR DEL TEMA:

DR. JESÚS AGUIRRE LINARES

SUSTENTANTE:

ARIANN ELIZABETH MENDOZA MARTÍNEZ

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se realizó en el laboratorio 107 oriente bajo la dirección del Dr. Jesús Aguirre Linares, en el departamento de Biología Celular y Desarrollo del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Se agradece el apoyo técnico de la Biol. Alma Olivia Sánchez González durante la realización de este trabajo.

La elaboración del trabajo fue posible gracias al donativo IN209211 de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico-UNAM (PAPIIT-UNAM) y al donativo de colaboración DFG-CONACYT Alemania-México 75306.

Se agradece a la Unidad de Microscopía, a la Unidad de Biología Molecular y a la Unidad de cómputo del Instituto de Fisiología Celular; al Biol. Gabriel Orozco Hoyuela por la asesoría técnica para las observaciones en el microscopio confocal.

Agradecimientos personales...

A mi madre Rosalina Martínez por su constante apoyo en mi vida, por ser un ejemplo de perseverancia y paciencia. Por ser mi madre, padre y mejor amiga en mi vida. Gracias por tú inagotable fortaleza y ser mi ejemplo a seguir.

Al Dr. Jesús Aguirre por darme la oportunidad de trabajar en su laboratorio, por su paciencia y consejos. Gracias por su apoyo y enseñanza para el desarrollo de este proyecto.

A Daniel por existir en mi vida, por su inagotable amor, paciencia y apoyo. Por su compañía y soporte durante los mejores y peores momentos de mi vida. Gracias por todos estos años de alegría y comprensión.

A mi familia: mis hermanos Diana y Arturo. A mis tíos Cristina, Leonel, Agustín, Socorro, Micaela y Pedro. A mi prima Verónica. Por apoyarme y brindarme su ayuda cuando lo necesitaba. Gracias por su confianza y cariño.

A Nallely Cano, Jenny Arratía, Fernando Lara y Olivia Sánchez por ser mis guías en este proyecto, por compartir sus conocimientos, por sus constantes consejos, apoyo y por hacer posible esta tesis. Gracias, no sólo por brindarme sus conocimientos, sino también por su amistad y compañía.

A mis amigos de toda la vida por los momentos inolvidables que compartimos juntos. Por ser mis confidentes, por estar conmigo cuando lo necesite. Por su ayuda académica y en la vida. Gracias por todos los sueños e ilusiones que compartimos hasta ahora.

A mis compañeros de laboratorio César, Rafael, Tadeo, J. Antonio, Fabián, Vanessa, Joel, Itzel, Miguel, Sami, Teresa y Jonathan por los agradables momentos que hemos pasado, por su enseñanza, por brindarme su compañía y amistad. Gracias por estar presentes en esta parte de mi vida.

A los miembros del Jurado por su tiempo y dedicación a la revisión de este trabajo. Gracias por su aportación a la mejora de este proyecto.

A mí madre Rosalina Martínez Valencia

Contenido

INTRODUCCIÓN	1
1. Las especies reactivas del oxígeno	1
1.1 Generalidades	1
1.2 Otras fuentes endógenas de ERO	2
1.3 Mecanismos antioxidantes	3
1.4 Daños y enfermedades asociados a las ERO	4
1.5 El papel de las ERO en la diferenciación celular	5
1.6 Detección del estado redox en la célula	6
1.6.1 roGFP como sensor del estrés oxidativo <i>in vivo</i>	9
2. El factor de transcripción Yap1 como regulador de la respuesta al estrés oxidativo	11
3. <i>Aspergillus nidulans</i> como modelo de estudio	13
3.1 Reproducción asexual	14
3.2 Reproducción sexual	14
3.3 Ciclo parasexual	15
HIPÓTESIS	17
OBJETIVOS GENERALES	17
OBJETIVOS PARTICULARES	17
MATERIALES Y MÉTODOS	18
1. Cepas, medios y condiciones de crecimiento de <i>A. nidulans</i>	18
2. Obtención de cepas transformantes que contengan el plásmido pSilent	19
2.1 Plásmido pSilent	19
2.2 Obtención del plásmido pSilent	20
2.3 Obtención y cuantificación de esporas	20
2.4 Co-transformación por protoplastos	21
2.5 Prueba de resistencia a Higromicina	22
3. Técnicas de Biología Molecular	22
3.1 Extracción de ADN	22
3.2 Hibridación tipo Southern Blot	23
4. Observación de la fluorescencia en cepas con roGFP1	24
4.1 Caracterización de la proteína roGFP1 <i>in vivo</i>	25
4.1.1. Ensayos con DTT y dimedona	25
4.1.2. Ensayos con DL-Butionina (SR) sulfoximina (BSO)	25
	VI

4.2 Observación de la proteína roGFP1 en distintas etapas de diferenciación del hongo <i>Aspergillus nidulans</i>	25
5. Observación de la Fluorescencia en la cepa NapA::GFP	26
5.1 Caracterización fenotípica de la cepa NapA::GFP	26
5.2 Caracterización de la fusión <i>NapA::gfp</i> como sensor redox	26
RESULTADOS	28
Co-transformación por protoplastos	28
La prueba de resistencia a higromicina, permite seleccionar a las cepas transformantes que integran al plásmido pSilent.	29
El análisis tipo Southern blot mostró que las cepas transformantes resistentes a higromicina contienen el plásmido pSilent.	30
La proteína roGFP muestra cambios en el factor de fluorescencia relacionados con el estado redox celular	32
La proteína roGFP refleja el estado redox de la poza del glutatión celular	34
Detección de la roGFP en diversas etapas de crecimiento del hongo <i>Aspergillus nidulans</i>	35
Fluorescencia de la roGFP en esporas hinchadas	35
Detección de la roGFP en micelio en crecimiento	36
Cambios en el factor de fluorescencia de la roGFP entre las esporas y el micelio en <i>A.nidulans</i>	37
Los conidióforos jóvenes presentan un estado de menor oxidación en comparación con los conidióforos maduros y las conidias	38
Las células Hülle pueden darnos una idea del estado redox del durante la diferenciación sexual	40
<i>napA::gfp</i> como sensor del estado redox	41
La etiqueta GFP no afecta la función del factor transcripcional <i>NapA</i>	41
Las cepas NapA::GFP muestran una fluorescencia baja y sin patrón definido	42
DISCUSIÓN	44
La proteína roGFP refleja la poza del glutatión celular y de manera general el ambiente redox celular	44
La proteína roGFP indica diferencias en el estado redox celular durante las distintas etapas de diferenciación celular que ocurren en el ciclo asexual	45
RoGFP muestra un estado hiper-oxidante durante el ciclo sexual que no puede monitorearse en cleistotecios pero si en células Hülle	47
Relevancia e importancia del uso de roGFP en hongos filamentosos	49

La fusión <i>napA::gfp</i> se expresa poco y no es posible utilizar su localización nuclear como reportero del estado redox intracelular	50
CONCLUSIONES	51
PERSPECTIVAS	52
REFERENCIAS	53
ANEXO I	56
ANEXO II	57
Extracción de ADN de <i>Aspergillus nidulans</i>	57
Análisis tipo Southern Blot	58

ABREVIATURAS

ADN= Ácido desoxirribonucleico

BSO= DL-butionina (SR) sulfoximna

DTT= Ditiotreitól

ERO= Especies Reactivas del Oxígeno

FF= Factor de fluorescencia

GFP= Green Fluorescent Protein

GRXs= Glutarredoxinas

GSH= Glutati3n reducido

GSH1= Glutamato-cisteína-ligasa

GSHPX= Glutati3n peroxidasa

GSSG= Glutati3n oxidado

H₂O₂=Per3xido de hidr3geno

HO[•]= Radical hidroxilo

MM= Medio M3nimo

NADPH= Nicotinamida-Adenina-Dinucle3tido-Fosfato

O₂^{•-}= Super3xido

ORF= Marco de lectura abierto

PEG= Polietilenglicol

roGFP= Redox-sensitive GFP

SOD= Super3xido dismutasa

TrpC= Gen constitutivo del hongo *A.nidulans* que codifica para una prote3na que participa en la bios3ntesis del tript3fano.

RESUMEN

Las especies reactivas del oxígeno (ERO) se han asociado a diversas alteraciones y enfermedades en humanos. Sin embargo, se ha propuesto que en cantidades reguladas las ERO sirven como moléculas de señalización durante el crecimiento, el desarrollo y la diferenciación celular en microorganismos eucariontes. A pesar de la clara importancia de las ERO, la comprensión de su producción, eliminación y metabolismo se ve obstaculizada debido a su difícil cuantificación, ya que los métodos utilizados actualmente, presentan baja resolución espacial y temporal. Recientemente se han desarrollado métodos que permiten la medición del estado redox intracelular con alta resolución espacial y temporal, a través del diseño de variantes de la proteína verde fluorescente (GFP; Green Fluorescent Protein). Tal es el caso de la roGFP, derivada de la GFP, a la cual se le insertaron dos residuos de cisteína de modo que en presencia de H₂O₂ u otros oxidantes, se favorece la oxidación del glutatión intracelular y se promueve la formación de puentes disulfuro. Esto trae como consecuencia cambios en la fluorescencia en relación con el estado de óxido-reducción presente en la célula. En este trabajo expresamos la proteína roGFP en el hongo *Aspergillus nidulans* y durante su caracterización *in vivo* mostramos que responde ante cambios en el estado redox en presencia del agente reductor DTT o el oxidante dimedona. Ensayos con el compuesto DL-butionina (SR) sulfoximina, el cual reduce la poza celular de glutatión, mostraron cambios en la relación de intensidad de fluorescencia de la proteína fluorescente, demostrando que el estado redox del glutatión celular puede ser monitoreado a través de la roGFP. Posteriormente se analizó la intensidad de fluorescencia de la proteína durante el desarrollo asexual del hongo, en donde las esporas presentaron un estado elevado de glutatión oxidado, mientras que el micelio presentó un grado menor de oxidación. Un fenómeno similar se observó durante la formación de los conidióforos, en donde en las etapas tempranas de diferenciación se detectó un bajo estado de oxidación, el cual fue aumentando conforme se desarrollaba el conidióforo. Durante el ciclo sexual del hongo la visualización del estado redox del glutatión se vio obstaculizada por la auto-fluorescencia que se presenta en los cleistotecios ó cuerpos fructíferos, incluso en etapas tempranas de diferenciación. Sin embargo, las células Hülle (células que se encuentran comúnmente rodeando al cleistotecio) presentaron un nivel alto de glutatión oxidado, lo cual apoya la idea de que el desarrollo sexual implica un estado hiperoxidante.

Por otra parte el factor de transcripción NapA, asociado al estrés oxidativo, se fusionó con una GFP para visualizar su acumulación nuclear ante el estrés. Sin

embargo, no se logró visualizar dicho evento durante el ciclo asexual y sexual del hongo debido a la baja concentración del fluorofóro.

INTRODUCCIÓN

1. Las especies reactivas del oxígeno

1.1 Generalidades

El oxígeno (O_2) es esencial para la vida aeróbica; los organismos aerobios utilizan al oxígeno como aceptor final de electrones durante la respiración. Durante este proceso metabólico las células producen especies reactivas del oxígeno (ERO), las cuales son especies del O_2 reducidas parcialmente, (figura 1; Bowler y Crapo 2002). La adición de un electrón a la molécula de oxígeno produce el anión superóxido ($O_2^{\cdot -}$). Se estima que del 1% al 3% de los electrones que se transportan en la mitocondria podrían formar $O_2^{\cdot -}$ (Halliwell 1999; Rhee, Chang et al. 2010).

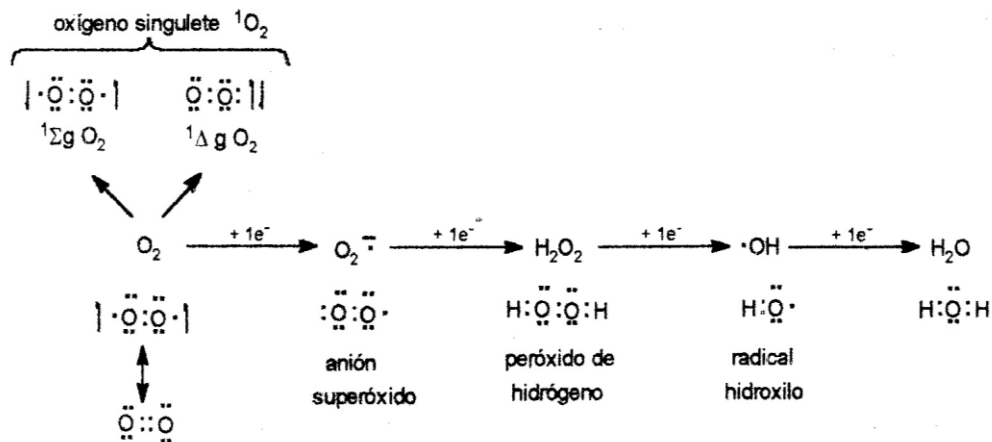


Figura 1. Generación de ERO.

Modificado de Bowler y Carpo., 2002. J Allergy Clin Inmunol, 110: 349-356.

El anión superóxido puede sufrir una segunda reducción para formar peróxido de hidrógeno (H_2O_2), mientras que la adición de un tercer electrón da lugar al radical hidroxilo ($HO\cdot$). El $HO\cdot$ Es el más reactivo de las ERO y su alta constante de velocidad de reacción ($10^9 M^{-1} s^{-1}$) sugiere que reacciona en el lugar donde se

produce y prácticamente con cualquier compuesto. La generación de este radical se ve favorecida por la presencia de metales de transición como el Fe^{2+} mediante las reacciones de Fenton y Haber-Weiss (Halliwell 1999). Estos tres productos intermedios se denominan especies reactivas del oxígeno (ERO) debido a su facilidad para reaccionar con bio-moléculas como las proteínas, los lípidos y el ADN.

El oxígeno en singulete es otra ERO que se forma por la inversión en el spin de uno de los electrones desapareados de la molécula de oxígeno. En esta especie, los electrones de spin contrarios pueden ubicarse en uno ($^1\Delta\text{gO}_2$) o ambos átomos de oxígeno ($^1\Delta\text{gO}_2$). Por último, cuando el oxígeno recibe un cuarto electrón ha sido totalmente reducido a agua y ya no reacciona con otras moléculas.

1.2 Otras fuentes endógenas de ERO

Además de la mitocondria, existen diversas fuentes de generación de ERO intracelular, tal es el caso de la cadena de transporte de electrones del retículo endoplásmico, la cual es una fuente de $\text{O}_2^{\cdot-}$ principalmente asociada al citocromo P_{450} y a la familia de enzimas b_5 , las cuales pueden oxidar a los ácidos grasos insaturados y xenobióticos, reduciendo al O_2 para producir $\text{O}_2^{\cdot-}$ (Halliwell 1999).

Los peroxisomas son otra fuente importante de producción de H_2O_2 , ya que contienen un número de enzimas que generan H_2O_2 . Entre estas se encuentran: la glicolato oxidasa, la D-amino oxidasa, la urato oxidasa y la acil-CoA oxidasa. Durante la catálisis peroxisomal se utiliza el H_2O_2 producido para oxidar una gran variedad de sustratos mediante reacciones peroxidativas (Tolbert y Essner 1981).

Las enzimas solubles como la xantina oxidasa, la aldehído oxidasa, la triptófano dioxigenasa y la flavoproteína deshidrogenasa constituyen otra fuente intracelular de ERO (Thannickal y Fanburg 2000).

Un tipo de oxidasa muy caracterizado lo constituyen las NADPH oxidasa (NOX), las cuales generan $O_2^{\cdot-}$ mediante la transferencia de electrones del NADPH al oxígeno y dado que se descubrieron inicialmente en células fagocíticas, se les confirió una función especializada en la defensa celular (Kamata y Hirata 1999).

1.3 Mecanismos antioxidantes

La principal defensa de los organismos aerobios contra las ERO son los antioxidantes, los cuales pueden subdividirse en dos categorías: enzimáticos y no enzimáticos. Entre los sistemas no enzimáticos se encuentran los compuestos antipropagadores, los cuales reaccionan directamente con los agentes oxidantes, como por ejemplo la vitamina C, la vitamina E, el β -caroteno, el ácido úrico, los fenoles, los furfurales, las furanonas y algunos pigmentos tales como los carotenoides y las melaninas varios de estos presentes en los hongos (Davies 2000).

Entre los sistemas enzimáticos encontramos a las superóxidos dismutasas (SODs), las catalasas, las peroxidasas de glutatión, las S-transferasas de glutatión, las tiorredoxinas y las peroxirredoxinas (Davies 2000).

Los mecanismos antioxidantes no actúan de forma aislada, sino al parecer lo hacen de manera cooperativa y tienden a presentarse en forma de reacciones secuenciales, tal y como muestra el ejemplo de la figura 2 (Kamata y Hirata 1999).

En los sistemas biológicos, el anión $O_2^{\cdot-}$ genera H_2O_2 de manera espontánea y mediante la intervención de la enzima SOD ($2 O_2^{\cdot-} + 2H^+ \longrightarrow H_2O_2 + O_2$). Todos los miembros de la familia SOD utilizan metales de transición en su sitio activo, por lo que existen varios tipos de SODs: las que tienen Cu^{2+} y Zn^{2+} y las que tienen Mn^{3+} o Fe^{3+} (Davies 2000; Halliwell 2006). El H_2O_2 formado, a su vez se descompone en agua mediante la intervención de las enzimas catalasa o glutatión peroxidasa.

Las catalasas son un grupo de metalo-enzimas que descomponen el H_2O_2 en O_2 y H_2O . La mayor parte de las catalasas se encuentran en los peroxisomas, con el fin de descomponer el H_2O_2 generado durante la oxidación de los ácidos grasos (Halliwell 2006). De igual forma las peroxidasas se encargan de la descomposición del H_2O_2 y de peróxidos orgánicos. Por ejemplo, la glutatión peroxidasa (GSHPX), misma que requiere selenio para poder actuar, utiliza al glutatión reducido (GSH) para oxidarlo (GSSG) durante la reacción de descomposición del H_2O_2 .

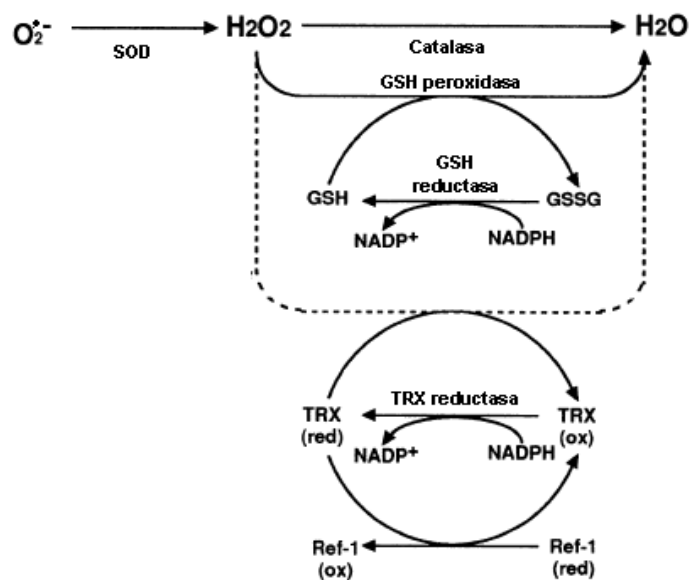


Figura 2. Sistemas enzimáticos antioxidantes

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

1.4 Daños y enfermedades asociados a las ERO

Altas concentraciones de ERO pueden causar daños a bio-moléculas, los cuales han sido asociados al desarrollo de diversas enfermedades y alteraciones fisiológicas como la diabetes, el Alzheimer, enfermedades neurodegenerativas, el cáncer y desórdenes inmunológicos (Seifried, Anderson et al. 2007). El OH^{\cdot} reacciona con todos los componentes de la molécula del ADN, dañando tanto a las

bases púricas como a las pirimídica, de igual forma al esqueleto de la desoxirribosa. Una de las lesiones más estudiadas es la formación de la oxoguanina (8-OH-G), una modificación permanente del material genético, resultado del daño oxidativo. Esta modificación representa uno de los primeros pasos relacionados con la mutagénesis, carcinogénesis y envejecimiento (Halliwell 1999).

Las ERO también pueden causar diversas modificaciones en las proteínas tales como entrecruzamientos, fragmentación y conversión de un aminoácido en otro, lo que puede alterar la estructura secundaria y terciaria de las proteínas. Algunos residuos de las proteínas, en particular la cisteína y la metionina son susceptibles a la oxidación por la acción de las ERO. La oxidación de los residuos de cisteína causa la formación de puentes disulfuro entre grupos tiol (-SH). El aumento de la concentración de grupos carbonilo, generada por diferentes mecanismos (como oxidación de residuos hacia grupos aldehído), es un excelente marcador de la oxidación de proteínas causado por las ERO (Gracy, Talent et al. 1999).

Otro daño producido por las ERO es la peroxidación de lípidos, sobre todo en los poliinsaturados (lípidos que contienen más de dos dobles enlaces covalentes carbono-carbono), en donde el radical hidroxilo rompe el doble enlace y toma un hidrogeno del carbono. El ácido graso presenta un electrón libre en el carbono afectado por el hidroxilo produciéndose una reacción en cadena al tomar un electrón de la próxima molécula (Stadtman y Berlett 1997). El producto que se genera en mayor cantidad durante la peroxidación de lípidos es el 4-hidroxi-2-nonenal (HNE), el cual es mutagénico en bacterias y, en células de mamífero, además de carcinogénico en ratas (Valko, Rhodes et al. 2006).

1.5 El papel de las ERO en la diferenciación celular

A pesar de todas las alteraciones y enfermedades con las que se les han relacionado a las ERO, cada vez hay más evidencias de que las ERO tienen un papel importante durante la diferenciación celular. Hansberg y Aguirre (1990)

propusieron que la diferenciación celular es una respuesta al estrés oxidativo. De acuerdo a esta idea, bajo condiciones normales de crecimiento los niveles de ERO son bajos y se encuentran balanceados con los compuestos antioxidantes. Durante la diferenciación ocurre un incremento transitorio en los niveles de ERO más allá de la capacidad celular para neutralizarlas. El estrés oxidativo ha sido asociado a la detención del crecimiento y a una disminución del metabolismo primario y el aumento de componentes que participan en la protección celular como los caratenoides, las melaninas la prolina y los polioles; los cuales permiten la adaptación de la célula a los cambios y la disminución de los oxidantes intracelulares. En el hongo *Neurospora crassa* al inicio de cada etapa morfogénica hay una sobreproducción de ERO por arriba de la capacidad celular para contender con ellas, lo que genera un estado hiperoxidante. Lo anterior sugiere que la diferenciación celular es una respuesta al estado hiperoxidante y que los mecanismos de diferenciación celular son mecanismos de evasión al estrés oxidativo (Aguirre, Rios-Momberg et al. 2005).

Los efectos de la carencia de enzimas antioxidantes en la diferenciación asexual de los hongos, y el reciente descubrimiento del papel esencial de las enzimas NOX en su diferenciación sexual, es consistente con el papel fundamental de las ERO en la diferenciación celular en los hongos (Lara-Ortiz, Riveros-Rosas et al. 2003; Cano-Dominguez, Alvarez-Delfin et al. 2008), y probablemente también en otros organismos.

1.6 Detección del estado redox en la célula

A pesar de la clara importancia de las ERO durante la diferenciación y la señalización celular, su estudio y comprensión se ve obstaculizado por la dificultad para detectar y cuantificar las ERO, tanto en el tiempo como en el espacio, en células vivas. Existen diversos métodos que permiten medir las concentraciones de ERO fuera de la célula, sin embargo existen pocos métodos para su detección intracelular que a su vez sean específicos.

Para medir el H_2O_2 en fluidos biológicos se han utilizado métodos basados en la peroxidasa de rábano y diversos substratos artificiales (tales como la N-acetil-3,7 dihidroxfenoxazina y la 3, 5 ,3',5'-tetrametilbenzidina), o bien mediante oxidación del hierro en presencia de naranja de xilenol. Para la medición del H_2O_2 intracelular se han utilizado métodos basados en compuestos dihidro, como la 2',7'-diclorodihidrofluoresceína, la cual fluoresce cuando está en un estado oxidado y es usada comúnmente debido a su sensibilidad y simplicidad. Sin embargo, este compuesto suele reaccionar con una gran variedad de oxidantes celulares, incluyendo al óxido nítrico, peroxinitrito, hipoclorito además del H_2O_2 (Rhee, Chang et al. 2010).

El grupo funcional tiol que se encuentra en la cisteína y en otros pocos aminoácidos juega un papel importante en la estructura, la catálisis y regulación de las proteínas. El carácter nucleofílico del grupo tiol, facilita la donación de electrones por parte de la cisteína, la formación de puentes de disulfuro y la coordinación con metales. Lo anterior trae como consecuencia que este grupo sea sensible a modificaciones por agentes oxidantes y electrófilos. La oxidación reversible de los residuos de cisteína puede ocasionar cambios estructurales y funcionales en las proteínas y se ha establecido como un medio de señalización en varias rutas metabólicas. La oxidación en las cisteínas también puede servir como un biomarcador del estrés oxidativo. A pesar del claro significado y la aparente complejidad química del grupo tiol en las células vivas, los métodos convencionales para determinar el estado redox intracelular requieren extractos de células para determinar la relación de oxidación/reducción de los componentes celulares. Este tipo de técnicas invasivas tienen una baja sensibilidad debido a que no reflejan el estado redox *in vivo* (Paulsen y Carroll 2009).

También es posible determinar el estado redox de la célula a través del glutatión, ya que las alteraciones en el equilibrio redox de la célula se ven reflejados en los cambios en la relación glutatión-glutatión disulfuro (GSH/GSSG) y la relación de tiorredoxina oxidada y reducida. El glutatión se encuentra en altas concentraciones en la célula (5-10 mM) y es considerado como el principal compuesto que mantiene el equilibrio redox celular. Las relaciones de GSH y GSSG son reportadas en un

rango de 100 a 300:1, pero su medición es un verdadero problema debido a que se requiere destrucción del tejido durante lo cual se debe tener cuidado de no permitir más oxidación de la muestra. La principal fuente de error es la determinación de la concentración de GSSG ya que su baja concentración debe ser medida sólo después de remover todo el GSH para prevenir la oxidación. La resolución espacial y temporal de estos ensayos es muy pobre (Dooley, Dore et al. 2004).

Recientemente, por medio de la ingeniería genética, se han diseñado variantes de la proteína verde fluorescente (GFP; Green Fluorescent protein), que permiten el monitoreo de diversos procesos celulares con una alta resolución espacial y temporal. La GFP de la medusa *Aequorea victoria*, es una pequeña proteína de 238 aminoácidos con un peso molecular de aproximadamente 26 KDa. Tiene una estructura casi perfecta en forma de barril, compuesta de láminas β antiparalelas, una hélice alfa y un cromóforo que se encuentra en el centro del barril beta. La estabilidad de la estructura de la proteína se requiere para una fluorescencia eficiente (Ormo, Cubitt et al. 1996).

La GFP es resistente a proteasas y es estable en varias condiciones adversas, así como a inserciones de proteínas enteras en varios sitios y a permutaciones cíclicas y/o la adición de regiones N- y C-terminales en la fusión de proteínas. Esta característica hace excepcional a la GFP para marcar *in vivo* proteínas en organismos eucariontes y procariontes (Dooley, Dore et al. 2004).

La GFP tiene dos picos máximos de excitación: el pico mayor se encuentra en 400 nm mientras que el pico menor esta a 480 nm, con una longitud de onda de emisión similar alrededor de 510 nm. La presencia de dos picos de excitación sugiere que dentro de la proteína existe un equilibrio entre dos estados distintos del cromóforo (es decir, surgen del estado de protonación del cromóforo). La forma aniónica del cromóforo tiene un máximo de excitación a 470-480 nm, mientras que su forma neutral tiene un máximo de excitación entre 370-400 nm (Chattoraj, King et al. 1996). El comportamiento dual de excitación de la GFP permite utilizarla como biosensor en varios fenómenos celulares. A través de la mutagénesis y fusiones proteicas se han desarrollado nuevas proteínas fluorescentes como indicadores que responden a una variedad de componentes y eventos biológicos.

1.6.1 roGFP como sensor del estrés oxidativo *in vivo*

Como se ha mencionado anteriormente, la excitación máxima de la proteína GFP depende del estado de protonación del cromóforo y éste a su vez depende de la estructura de la proteína. En principio, las alteraciones en la estructura que inducen los cambios en el estado de protonación fueron las bases para la creación de sensores radiométricos. Dichos sensores son particularmente deseables, ya que reducen o eliminan errores debidos a los cambios en la intensidad de iluminación, el grosor de la célula o la concentración del cromóforo.

La técnica radiométrica depende de la presencia de dos máximos de excitación (tal como la GFP) o dos máximos de emisión, los cuales son alterados ante factores externos. Lo anterior indica por un lado, que si tenemos una relación de intensidad de fluorescencia, esto puede eliminar los efectos de las variaciones en la concentración del cromóforo, la auto-fluorescencia y/o la intensidad de la luz, permitiendo así la cuantificación directa del estímulo, ya que si tenemos un indicador que responde a estímulos ambientales con solo un incremento o decremento de la fluorescencia total, éste puede estar sujeto a un considerable error de medición.

Las versiones radiométricas sensibles al estado redox de la GFP (roGFP) se desarrollaron para tomar ventaja de estos principios. Para esto se sustituyeron dos residuos de cisteína en el barril β de la GFP los cuales se localizan en dos laminas β adyacentes, en posiciones que favorecen la formación de puentes de disulfuro (Elslinger, Wachter et al. 1999). El puente disulfuro se localiza cerca de la His 148, la cual está orientada hacia el interior del barril β , cerca de un grupo fenólico localizado en el cromóforo. La transición entre la forma neutral y aniónica del cromóforo ocurre por la protonación o desprotonación de este grupo fenólico. La figura 3A (Meyer 2008) muestra la estructura de la roGFP2, en donde se indican los residuos de cisteínas sustituidos y la His148. La figura 3B presenta el espectro de excitación de la roGFP2, el cual muestra que la alteración en los puentes de disulfuro afecta la relación de la fluorescencia de excitación, es decir que la forma oxidada y la forma reducida se excitan a 405 y 488nm, respectivamente .

Existen versiones de la roGFP que difieren en las diferentes inserciones de residuos de aminoácidos. Las versiones más utilizadas son la roGFP1 (GFP con mutaciones en C48S, S147C y Q204C) y la roGFP2 (lo mismo más una sustitución adicional S65T). La sustitución S65T permite un aumento de fluorescencia en el pico de 488 nm (Dooley, Dore et al. 2004).

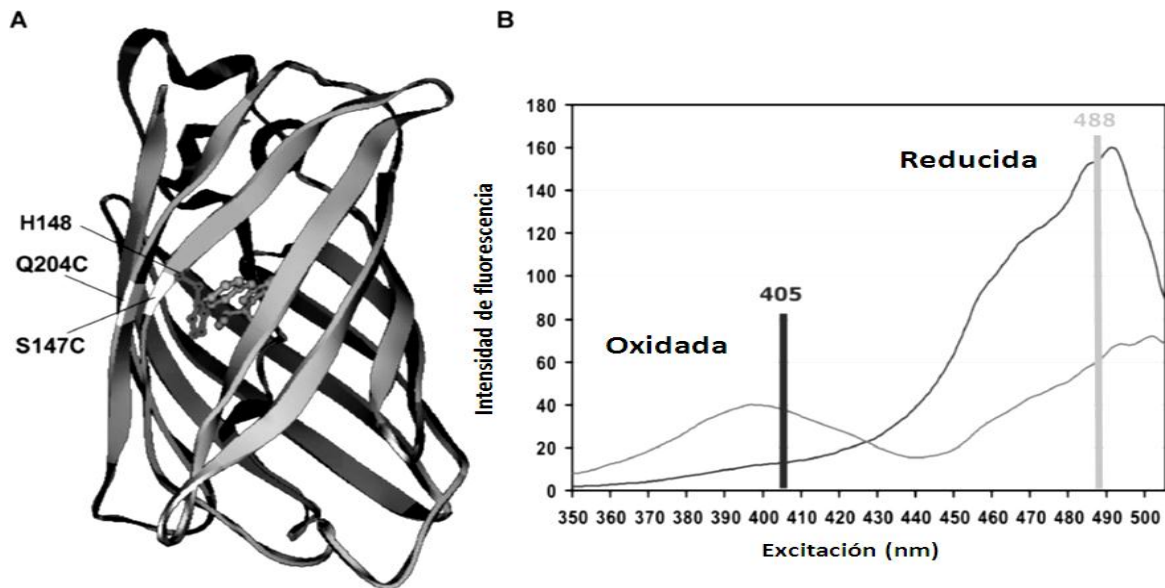


Figura3. Estructura de roGFP 2. A) La roGFP es derivada de la GFP a la cual se le sustituyeron dos residuos de cisteína que le permiten ser sensible al ambiente redox. El residuo His 148 es el intermediario entre el puente disulfuro y el estado de protonación del cromóforo. B) Alteración en el espectro de la proteína roGFP2 causado por los estados de óxido-reducción del grupo tiol.

Tomado de A.J. Meyer, 2008. Journal of Plant Physiology, 165:1390-1403.

In vitro, la roGFP es sensible a los cambios en el potencial redox del ambiente, pero estos cambios son lentos. En contraste, cuando se expresa en células de *Arabidopsis*, se presenta una respuesta más rápida, lo que sugiere que en células vivas la roGFP no es oxidada directamente por el H_2O_2 , sino por las glutarredoxinas (GRXs), enzimas involucradas en la homeostasis del glutatión, que son capaces de interactuar con la roGFP. Como se muestra en la figura 4, las GRXs transfieren electrones de manera reversible entre el glutatión y la roGFP manteniendo el equilibrio redox entre ambos (Meyer 2008). Debido a esto, la imagen de la fluorescencia permite monitorear cambios espaciales y temporales en el potencial redox de la célula.

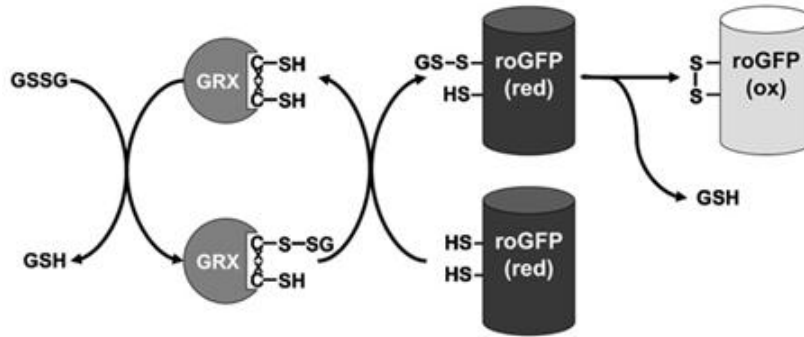


Figura 4. Posible mecanismo por el cual las GRXs catalizan la transferencia de electrones entre el glutatión y la roGFP. Las GRXs transfieren de manera reversible los electrones del glutatión y del grupo tiol de la roGFP.

Modificado de A.J. Meyer, 2008. Journal of Plant Physiology, 165:1390-1403.

2. El factor de transcripción Yap1 como regulador de la respuesta al estrés oxidativo

Las ERO se consideran productos de un estado de estrés de la célula, por tal motivo, los organismos aerobios han desarrollado mecanismos de protección contra éstas. En los últimos años se han caracterizado varias respuestas al estrés oxidativo en las bacterias *Escherichia coli* y *Salmonella typhimurium*, donde los factores de transcripción Oxy-R (Zheng, Aslund et al. 1998) y SoxR/SoxS (D'Autreaux y Toledano 2007) se han asociado a la expresión de diversos genes relacionados al metabolismo de las ERO.

En la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, el factor de transcripción Yap1 lleva a cabo parte de la regulación de la respuesta al estrés oxidativo (Stone y Yang 2006; D'Autreaux y Toledano 2007). Yap1 es un factor de transcripción tipo bZIP que contiene una secuencia de unión al ADN en su parte N-terminal así como una secuencia señal de exportación nuclear (NES) en su C-terminal (Moye-Rowley, Harshman et al. 1989). Yap1 es esencial para la sobrevivencia de la levadura bajo condiciones de estrés oxidativo, por ejemplo, la resistencia a la diamida, electrófilos y cadmio (Azevedo, Tacnet et al. 2003).

En respuesta a la presencia de H_2O_2 , Yap1 estimula la expresión de aproximadamente 100 genes, entre los cuales se encuentran el gen *TRX2* (Kuge y Jones 1994), el cual codifica a la tiorredoxina; el gen *GSH1* que codifica para la γ -glutamilcistein sintetasa, enzima involucrada en la biosíntesis del glutatión, y el gen *GLR1* (Gasch, Spellman et al. 2000) que codifica para la glutatión reductasa.

En 1997 Kuge y colegas reportaron que el estrés oxidativo causado por el tratamiento con peróxido de hidrógeno provoca la formación de un enlace disulfuro entre una de las cisteínas conservadas en Yap1 que se encuentran cerca de la NES (Kuge, Fujii et al. 1997), y una cisteína oxidada de una proteína relacionada con la glutatión peroxidasa (Gpx3/Orp1), lo cual finalmente conduce a la formación de un puente disulfuro intramolecular en Yap1, el cual resulta en un cambio conformacional que oculta la señal NES, evitando que la exportina Crm1 transporte a Yap1 hacia el citoplasma. Esto lleva a la acumulación de Yap1 en el núcleo y a la inducción de la transcripción de genes antioxidantes. Recientemente Paulsen y colegas (Paulsen y Carroll 2009) propusieron un mecanismo por el cual se lleva a cabo la activación de Yap1 y éste se resume en la figura 5. En este modelo se propone que ante la presencia de H_2O_2 , la cisteína activa de Gpx3 (Cys36) se oxida provocando la formación de ácido sulfénico que reacciona con la Cys82 de la propia Gpx3, o bien con la Cys598 de Yap1 (en una reacción de condensación), formando un puente disulfuro intra o intermolecular, respectivamente. Por último, se produce un puente disulfuro entre ambas cisteínas de Yap1 (Cys598 y Cys 303), lo que la mantiene en el núcleo. En *S. cerevisiae* se ha utilizado a Yap1 como un biomarcador de estrés oxidativo (Paulsen y Carroll 2009).

En el hongo filamentoso *Aspergillus nidulans* no se ha ensayado la posibilidad de que NapA (un factor de transcripción ortólogo de Yap1), fusionado a la proteína GFP pueda ser utilizado como sistema de detección del estado redox de la célula *in vivo*, tanto en condiciones oxidantes endógenas, como condiciones de estrés oxidativo exógeno o durante el desarrollo sexual.

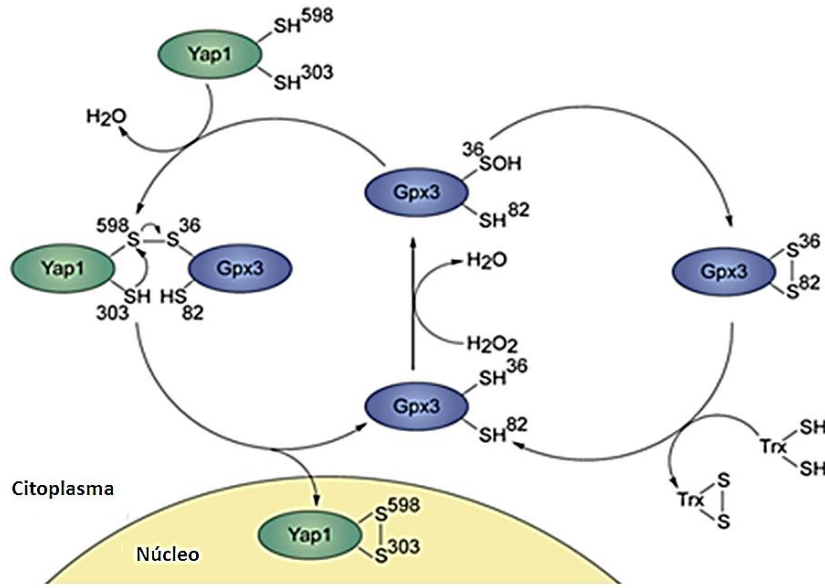


Figura 5. Mecanismo molecular propuesto para la relación Yap1-Gpx3 bajo estrés oxidativo. Gpx3 transmite señales de estrés a Yap1 a través de la oxidación de la cisteína catalítica (Cys36) a ácido sulfénico. Posteriormente la Cys36 de la Gpx3 sufre una reacción de condensación con la Cys598 de Yap1, para formar un puente disulfuro entre Yap1-Gpx3. El intercambio tiol-disulfuro con la Cys303 de Yap1 genera un puente intramolecular entre Cys303-Cys598 en Yap1. La formación de este puente disulfuro enmascara la señal de exportación nuclear y da como resultado la acumulación de Yap1 en el núcleo.

Modificado de E. Paulsen, 2009. *Chemistry & Biology* 16: 217–225.

3. *Aspergillus nidulans* como modelo de estudio

Aspergillus nidulans es un hongo filamentosos ascomiceto que debido a sus características ha sido ampliamente utilizado como modelo de estudio. Dentro de dichas características se encuentra la facilidad de manipulación. Puede ser transformado con ADN mediante recombinación heteróloga u homóloga y posee múltiples marcadores de selección, lo que lo hace un excelente modelo para estudios de genética molecular y genética clásica (Todd, Davis et al. 2007).

Otra de las ventajas, es que el genoma de *Aspergillus nidulans* está completamente secuenciado y disponible vía The Broad Institute (<http://www.broad.mit.edu/annotation/fqi/>) (Galagan, Calvo et al. 2005). En la figura 6 se presenta el ciclo de vida de *A. nidulans*, el cual tiene tres ciclos reproductivos:

asexual, sexual y parasexual (Lee, Ni et al.), lo anterior también representa ventajas experimentales, tales como las pruebas de alelismo en diploides.

3.1 Reproducción asexual

La reproducción asexual se caracteriza por la formación de esporas asexuales o conídias a través de la producción de estructuras especializadas llamadas conidióforos. La formación de conidióforos se produce en respuesta a factores ambientales como son la exposición al aire (Adams, Wieser et al. 1998), o la limitación de nutrientes (Skromne, Sanchez et al. 1995). En una interfase aérea, la conidiación comienza con la formación de una célula pie a partir de una hifa, la cual da origen al tallo del conidióforo que crece por extensión apical hacia la fase aérea. Cuando ha alcanzado cierta longitud, la punta del tallo se hincha para formar una vesícula multinucleada a partir de la cual se producen múltiples yemas uninucleadas llamadas métulas; en el extremo apical de la métula se producen otras gemaciones, para producir dos células uninucleadas conocidas como fiálides, de las cuales se producen las esporas asexuales o conidios. Las esporas asexuales, se producen por divisiones mitóticas repetidas, en este proceso uno de los núcleos formados entra en la espora en desarrollo, mientras que el otro permanece en la fiálide para dividirse nuevamente. En contraste, la espora permanece arrestada en la fase G1 del ciclo celular (Bergen y Morris 1983) (Casselton y Zolan 2002). En presencia de nutrientes las esporas germinan a través de un periodo inicial de crecimiento isodiamétrico, seguido por la formación de un tubo germinal elongado.

3.2 Reproducción sexual

El ciclo sexual se induce por condiciones de limitación de oxígeno o por ausencia de luz (Champe, Nagle et al. 1994; Hoffmann, Wanke et al. 2000) y comprende la formación de cuerpos fructíferos denominados clesitotecios. La formación de los cleistotecios involucra plasmogamia, la formación de un dicarion, la fusión de dos

núcleos y finalmente la maduración del cleistotecio. Así mismo, la formación de ascosporas en el interior del cleistotecio involucra el desarrollo coordinado de dos tipos de tejido diferentes: el primer tejido está compuesto de células ascógoneas que dan lugar a las ascas y ascosporas; el segundo es una red de hifas estériles que rodean a las ascas dentro del cleistotecio. Las numerosas células que rodean al cleistotecio son denominadas células de Hülle, su función hasta el momento es desconocida, sin embargo se ha sugerido que desempeña un papel importante durante el desarrollo y maduración del cleistotecio (Hermann, Kurtz et al. 1983; Champe, Nagle et al. 1994). *A. nidulans* es un hongo homotálico, lo que significa que puede auto-fertilizarse, pero también pueden realizarse cruces entre homocáriones con núcleos genéticamente diferentes (Casselton y Zolan 2002).

3.3 Ciclo parasexual

En el ciclo parasexual, la fusión de las hifas forman un heterodicarion (con núcleos genéticamente diferentes), seguido de la fusión nuclear para generar hifas diploides, posteriormente hay una pérdida espontánea de cromosomas (manteniendo alelos de ambas cepas parenterales), para restaurar el número de cromosomas haploides. Tanto el micelio heterocariótico como el micelio diploide pueden continuar con el desarrollo asexual y sexual (Lee, Ni et al.).

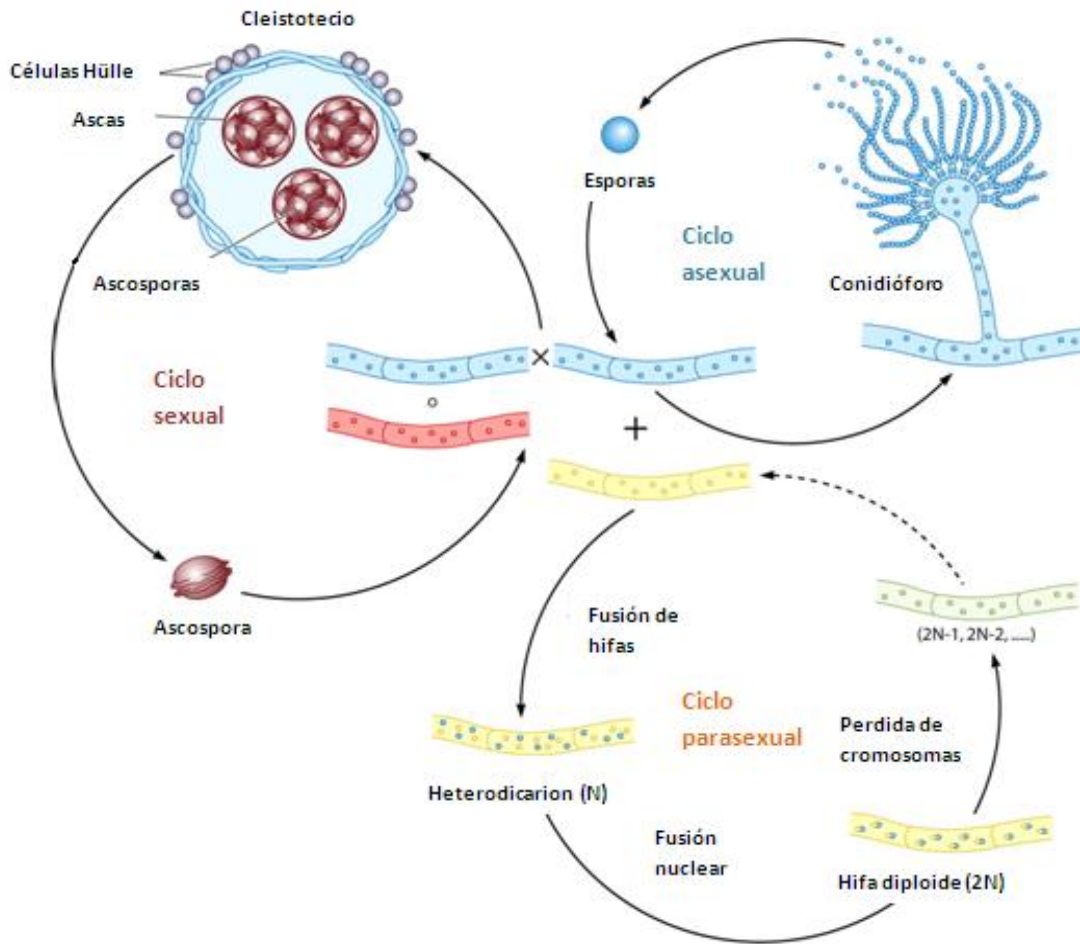


Figura 6. Ciclo de vida de *Aspergillus nidulans*. Durante el ciclo asexual se producen esporas o conidios, los cuales germinan para formar hifas, a partir de las cuales se desarrollan los conidióforos que producen más esporas. Durante el ciclo sexual homotáctico se produce un cruzamiento o autofecundación para generar los cuerpos fructíferos (cleistotecios) que producen miles de esporas sexuales o ascosporas, las cuales germinan y forman hifas y micelio. En el ciclo parasexual, se forma un heterocácton como resultado de la fusión de hifas de distintos individuos, seguido de la fusión nuclear para formar hifas diploides. La haploidia se restaura mediante la pérdida al azar de cromosomas, lo cual genera un individuo diferente a los haploides parentales.

Modificado de Lee et al, (2010). *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 74:298-340.

HIPÓTESIS

Proponemos que los cambios en la fluorescencia de la proteína roGFP1 y/o la localización nuclear de la fusión NapA::GFP permitirán monitorear cambios en el estado redox celular en distintas condiciones de estrés oxidativo y de diferenciación celular.

OBJETIVOS GENERALES

Evaluar la utilidad de las proteínas roGFP y NapA::GFP como sistemas de detección de ERO *in vivo* en el hongo *Aspergillus nidulans*.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Generar cepas que contengan la proteína roGFP en un fondo genético silvestre.
2. Determinar la fluorescencia de la proteína roGFP en condiciones de germinación, y crecimiento vegetativo y durante el desarrollo sexual.
3. Detectar diferencias en el estado oxidante celular durante las diversas etapas de diferenciación celular.
4. Caracterizar fenotípicamente las cepas que contienen la fusión *napA::gfp*, localizar a la proteína en presencia de peróxido de hidrógeno, así como en condiciones de germinación, y crecimiento vegetativo y durante el desarrollo sexual.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Cepas, medios y condiciones de crecimiento de *A. nidulans*

Las cepas de *A. nidulans* se crecieron en medio mínimo MM (Kafer 1977), con glucosa al 1% y adicionado con los requerimientos necesarios para cada cepa; los medios sólidos se prepararon con agar al 1.25%. Se utilizó una temperatura de incubación de 37° C. Todos los medios de cultivo y material empleado se esterilizaron a 121° C durante 15 minutos. Las cepas utilizadas en este trabajo se describen en la tabla 1.

Tabla 1. Cepas de <i>A. nidulans</i> empleadas		
Nombre	Genotipo	Origen
CLK43	<i>pabaA1,yA2;veA1</i>	Kawasaki et al., 2002
A26	<i>biA1, veA1</i>	FGSC
CJR01	<i>trpC801, pabaA1,biA; veA1</i>	José Luis Ramos., 2003
TAM07	<i>biA1, Paba A1, roGFP</i>	Este trabajo, se transformó la cepa CJR01 con el plásmido pSilent, el cual contiene a la roGFP1.
TFL14	<i>pyrG89; pyroA4; ΔnkuA::bar; napA::GFP::AfpyrG; veA1</i>	Fernando Lara, 2010

2. Obtención de cepas transformantes que contengan el plásmido pSilent

2.1 Plásmido pSilent

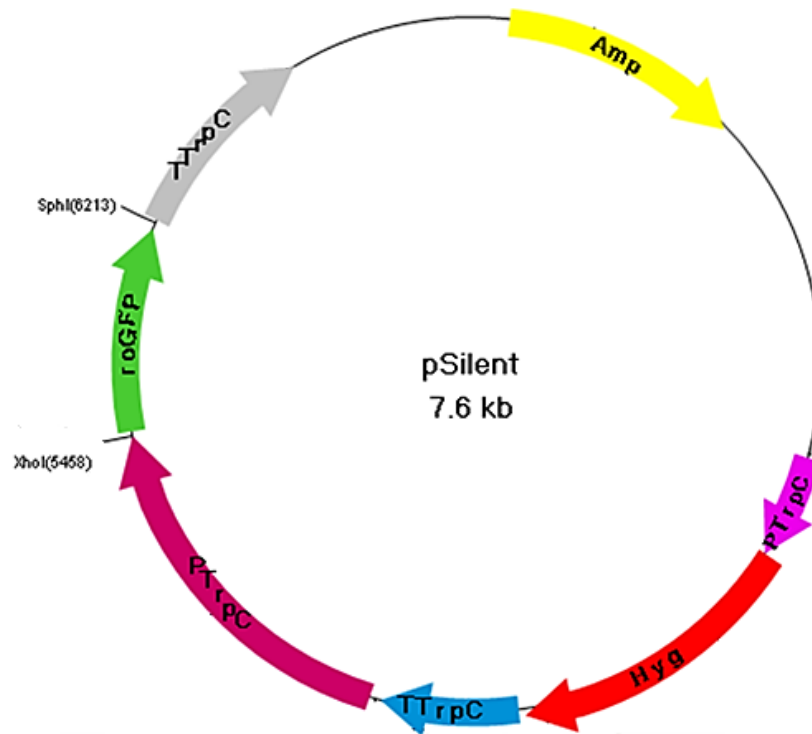


Figura 7. Plásmido pSilent. Contiene varios marcadores de selección como resistencia a Ampicilina, Higromicina, fragmentos de promotor y terminador del gen *TrpC* de *Aspergillus nidulans*.

El plásmido pSilent tiene un tamaño aproximado de 7.6 Kb. Es un plásmido artificial derivado del plásmid pBSTRP-PT (Kadotani, Nakayashiki et al. 2003). En su secuencia destacan genes que actúan como marcadores de selección como los genes de resistencia a los antibióticos ampicilina e higromicina. También contiene fragmentos del promotor y terminador del gen *TrpC* de *Aspergillus nidulans*. El gen *TrpC* es un gen constitutivo que codifica para un polipéptido que forma un complejo con el producto del gen *TrpA*, éste complejo participa en la síntesis de triptófano (Yelton, Hamer et al. 1983). La proteína roGFP1 tiene un peso molecular aproximado de 700 pb y las endonucleasas XhoI y SphI la liberan del plásmido.

2.2 Obtención del plásmido pSilent

Se transformaron células de *Escherichia coli* XL1. El plásmido pSilent (donado por Marty Dickman) fue mezclado con 100 μ M de KCM (100 mM KCl, 30 mM Ca₂Cl y 50 mM MgCl₂) y luego se agregó a 0.1 mL de células de *E.coli* competentes. Después de un periodo de incubación se colocaron en hielo por 30 min, seguido choque térmico a 42°C por 2 minutos, posteriormente se colocaron en hielo. Este tratamiento altera la membrana externa aumentando su permeabilidad, facilitando de esta forma la incorporación del ADN. Las células transformantes se inocularon en medio LB (Tryptona 1%, extracto de levadura 0.5% y NaCl 0.5%) con ampicilina durante toda la noche.

El plásmido fue extraído con el Kit Qiagen bajo las especificaciones del fabricante.

2.3 Obtención y cuantificación de esporas

Las conidias de cada una de las cepas utilizadas se inocularon a confluencia en cajas Petri con MM adicionado con los requerimientos necesarios para cada cepa. Se incubaron a 37° C durante 5 días, este tiempo de incubación asegura la producción de conidios mayoritariamente. Cada cultivo se raspó con una varilla de alambre de forma triangular y se filtró con ayuda de un papel miracloth. El raspado ocasiona el desprendimiento de las esporas de los conidióforos y la filtración permite el paso de las estructuras con menor tamaño. El total de las esporas colectadas de cada cepa se resuspendió en 10 mL de agua estéril en tubos falcón. Cada tubo se agitó vigorosamente con el vortex y se centrifugaron a 4000 rpm durante 5 minutos. El sobrenadante se descartó, se agregó agua estéril y se centrifugó de nuevo, esto se repitió al menos otras 4 veces. El proceso de centrifugación separa a las esporas de los residuos celulares que pudieron haber pasado a través del filtro. Al final los pellets de las esporas se re-suspendieron en 2 mL de agua y se cuantificó el número de esporas/ mL con la cámara de Neubauer.

2.4 Co-transformación por protoplastos

Se inocularon 10^9 esporas en MM suplementado de acuerdo a los requerimientos de la cepa CJR01. El cultivo se incubó a 30°C a 130 rpm por 12 horas. Bajo estas condiciones de incubación, el micelio se encuentra joven y presenta aún parte de la estructura de la espora.

El medio se filtró con ayuda de un papel miracloth, y el micelio obtenido se enjuagó con la solución "Micelium Wash" (0.6 M MgSO_4), posteriormente el micelio se escurrió perfectamente y se colocó en un tubo falcón previamente pesado para poder calcular la masa de micelio total. En base a la masa del micelio se pesaron las cantidades de enzimas (Albumina, glucanasa y lítica) necesarias.

Las cantidades correspondientes de cada enzima se depositaron en un tubo eppendorf de 1.5 mL y se resuspendieron en 1 mL de medio osmótico (1.2 M MgSO_4 , 10 Mm NaPB , pH final de 5.8). De igual forma el micelio se resuspendió en 5 mL de medio osmótico y se le dio vortex hasta disolver todos los grumos, posteriormente se colocó el micelio en un matraz y se le adicionó las enzimas glucanasa y lítica, se dejaron actuar por 5 minutos en hielo para después agregar la albúmina. Se incubó por 1 hora a 30°C y 80 rpm. Estas enzimas degradan totalmente la pared celular del hongo.

Pasado el tiempo de incubación, el micelio se colocó en tubos corex y se resuspendió con una pipeta Pasteur, evitando la formación de burbujas. Posteriormente se agregó poco a poco y a través de las paredes la solución "Buffer trapping", la cual contiene 0.6 M de sorbitol, 0.1 M Tris-HCl (pH=7.0), y se centrifugó a 4642 g por un tiempo de 15 minutos a 4°C . Después se tomaron los protoplastos, encontrados en la fase intermedia y se depositaron en un tubo falcón frío. Los protoplastos obtenidos se lavaron dos veces con buffer STC (1.2 M sorbitol, 10 mM CaCl_2 , 10 mM Tris-HCl , pH= 7.5) y se centrifugaron a 5524 g por 10 minutos a 4°C . Después del último lavado se decantó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en el buffer STC y se denominó "Solución de protoplastos".

Control negativo: En un tubo se colocaron aproximadamente 50 μL la solución de protoplastos y 10 μL STC. Se sembró en MM con paba-biotina.

Control antes del PEG: En un tubo se colocó una dilución 1:100 del control negativo antes del tratamiento con PEG y se inoculó en cajas con todos los suplementos necesarios para la cepa CJR01.

Control después del PEG: Después del tratamiento con PEG que se llevó a cabo en el control negativo, se realizó una dilución 1:100, la cual se inoculó en cajas con todos los suplementos necesarios para la cepa CJR01.

Transformación: En dos tubos se repartió la solución (-600 μL) de protoplastos a los cuales se les agregó 1:5 y 1:10 μL del plásmido pTA11 (estructura en el anexo) y el plásmido pSilent, respectivamente. Se sembraron en MM con paba-biotina.

Todos los controles se incubaron a 37°C por aproximadamente 72 horas.

2.5 Prueba de resistencia a Higromicina

Para determinar las cuántas cepas lograron integrar el plásmido pSilent, además del pTA11, se realizó una placa maestra de las cepas transformantes obtenidas (TrpC +) en MM más suplementos de la cepa TAM07 en presencia y ausencia de higromicina a una concentración final de 1 mM. Se incubaron a 37 °C durante 48 horas sin agitación. Posteriormente se observó el crecimiento de las cepas transformantes en ambas placas.

3. Técnicas de Biología Molecular

3.1 Extracción de ADN

Se emplearon conidias de las diferentes cepas transformantes así como de una cepa silvestre, las cuales se inocularon en aproximadamente 30 mL de MM con sus

respectivos suplementos. Se incubaron durante 12 horas a 37°C sin agitación. La película de micelio se colectó y se secó en papel absorbente, posteriormente se congeló en nitrógeno líquido. El micelio congelado se secó al vacío durante cuatro horas, para posteriormente pulverizarlo. Al ADN pulverizado se le adicionó 800 µL de Buffer de extracción (50 mM de EDTA y 0.2% SDS) para calentarlo por 30 minutos a 68° C. Posteriormente los tubos se retiraron del calentamiento y se les dio un spin en la micro-centrifuga por 5 minutos a temperatura ambiente. El sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo y se le adicionó 50 µL de acetato de potasio (KCH₃CO₂), se colocó el tubo en hielo por 5 minutos, para después darle un spin por otros 5 minutos. El sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo y se le adicionó 600µL de Isopropanol, se agitó bien y se le dio un spin por 10 minutos. El sobrenadante se descartó y el pellet se re-suspendió en 300 µL de Buffer TE (10 mM Tris, 1mM EDTA, pH= 8.0) para posteriormente calentarlo por 1 hora a 68° C. Después del calentamiento se adicionó 800µL de etanol al 95% y LiCl 10 M, se agitó bien y se colocó en hielo por 5 minutos. Por último se dio un spin por 5 minutos y se realizaron lavados con Etanol al 70%, para finalmente re-suspender el ADN en buffer TE y disolver por 1 hora a 68° C.

3.2 Hibridación tipo Southern Blot

Se digirieron aproximadamente 10µg de ADN con las enzimas de restricción requeridas y RNAasa (10µg/mL) durante toda la noche a temperatura ambiente. Se separaron mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1%. El gel se incubó en una solución de HCl 0.25N a temperatura ambiente por 15 minutos en agitación. Se realizaron tres lavados con agua y se desnaturalizó en una solución de NaCl 1.5M y NaOH 0.5M por 30 minutos a temperatura ambiente y con agitación. Nuevamente se realizaron tres lavados con agua y el gel se neutralizó en una solución Tris-HCl 0.5M (pH 7.2) y NaCl 1.5M por 30 minutos a temperatura ambiente y con agitación. El gel se transfirió durante toda la noche a una membrana de nylon Hybond-N conforme al protocolo de Sambrook y Russel (2001). El ADN se fijó a la membrana mediante exposición a luz UV. La sonda se obtuvo mediante una reacción de

restricción del plásmido pSilent con las endonucleasas XhoI y SphI de invitrogen, las cuales liberan a roGFP (2Kb) del plásmido (el gel se muestra en el anexo 1). La reacción de restricción se llevó a cabo en un volumen final de 20 μ L a 37^oC por 3 horas.

Tabla 2. Reacciones de restricción en ADN genómico y plasmídico.

	ADN Genómico	ADN de Plásmido
H₂O	6 μ L	9 μ L
Buffer (10x)	2 μ L	2 μ L
ADN	10 μ L	8 μ L
Enzima (s) (10U/μL)	1 μ L (SphI y XhoI)	1 μ L (SphI y XhoI)
RNAse (10μg/mL)	1 μ L	-----

La reacción de restricción se llevó a cabo en un volumen final de 20 μ L a 37^oC.

La membrana se prehibridó en una botella de vidrio a 65^o C durante dos horas en solución de hibridación con ADN de salmón 0.1g/mL, posteriormente se hibridó con la sonda marcada radioactivamente en solución de hibridación nueva. La sonda se marcó empleando el Kit GE Healthcare (Random Prime labelling System, UK), según las especificaciones del fabricante. La hibridación se realizó a 65^oC durante toda la noche. Posteriormente la membrana se sometió a un lavado con solución SSC 2X y SDS 0.1% durante 45 minutos; y un segundo lavado con solución SSC 0.1X y SDS 0.1% durante 45 minutos más. La membrana se expuso a un cassette de revelado, el cual se reveló mediante el uso de un escáner sensible a ondas radioactivas (Typhon).

4. Observación de la fluorescencia en cepas con roGFP1

Los cultivos en medio sólido, fueron observados en el microscopio confocal Olympus FV1000, usando alternadamente los láseres de excitación 405 y 480 nm y un mismo filtro de emisión a 510nm.

4.1 Caracterización de la proteína roGFP1 *in vivo*

4.1.1. Ensayos con DTT y dimedona

Se determinó el estado completo de reducción de la proteína roGFP en esporas con 3 horas de incubación, a las cuales se les adicionó ditioneitol (DTT) 10mM para después monitorear los cambios de fluorescencia intercalando los láseres de excitación a 405 nm y 488 nm y tomando fotos cada 20 segundos. Posteriormente se lavó la muestra y se adicionó dimedona 100 µM. Las imágenes se analizaron con el programa imageJ 1.44p (W. Rasband, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) dividiendo la intensidad de fluorescencia a 405 nm entre la intensidad de fluorescencia a 488 nm.

4.1.2. Ensayos con DL-Butionina (SR) sulfoximia (BSO)

Para el ensayo con el compuesto DL-Butionina (SR) sulfoximia (BSO) se utilizó micelio con 12h de crecimiento al cual se le añadió el compuesto a una concentración de 50µM y se dejó actuar por 1 hora a 37°C. Posteriormente se observó la muestra en el microscopio confocal bajo el láser de 405 y 488nm.

4.2 Observación de la proteína roGFP1 en distintas etapas de diferenciación del hongo *Aspergillus nidulans*

Se observó la fluorescencia de la roGFP en las diferentes estructuras del desarrollo asexual (esporas, germinulas, micelio y cuerpos fructíferos), así como del desarrollo sexual (cleistotecios) del hongo.

Las esporas se inocularon en MM más los suplementos necesarios para la cepa TAM07 y se incubaron a 37°C por tres horas. De igual forma el micelio y los cuerpos fructíferos se inocularon variando únicamente el tiempo de incubación para

cada estructura: germinulas 3 horas, micelio 12 horas y cuerpos fructíferos 48 horas.

En el caso de las estructuras del ciclo sexual, primeramente se inocularon esporas en medio agar paba-biotina y se incubaron a 37⁰C por 5 días, posteriormente se colocaron discos de medio SC (Medio comúnmente utilizado en el hongo *Neurospora crassa* que permite el desarrollo del ciclo sexual de manera limitada en el hongo *A.nidulans*, esto permite una mejor visualización de las estructuras sexuales de este hongo) los bordes de la colonia y se selló la caja durante 5 días, para inducir el ciclo sexual.

Cada estructura se observó en el microscopio confocal FV1000 alternando los láseres de 405 y 488nm, utilizando un filtro de emisión a 510 nm. Las imágenes se analizaron con el programa imageJ, dividiendo la intensidad de fluorescencia a 405nm entre la intensidad de fluorescencia a 488 nm.

5. Observación de la Fluorescencia en la cepa NapA::GFP

5.1 Caracterización fenotípica de la cepa NapA::GFP

Para la caracterización fenotípica de las cepas, se observó el crecimiento en MM más los suplementos necesarios para la cepa TFL14 añadiendo distintas concentraciones de H₂O₂ (2 y 4mM) e inoculando por picadura en el centro de la placa. Las cepas se incubaron a 37⁰C y la observación se realizó a los 4 días de crecimiento.

5.2 Caracterización de la fusión *NapA::gfp* como sensor redox

Se realizaron ensayos de germinación en medio MM líquido con los suplementos necesarios para la cepa TFL14, inoculando esporas, colectadas de una placa de cultivo de 4 días y se incubaron a 37⁰C con agitación constante a 300 rpm. Se

realizó un muestreo a las 4, 6 y 12 horas de germinación. Cada muestra se observó bajo el microscopio de epifluorescencia NIKON E600, utilizando la lámpara de luz transmitida y de luz ultravioleta. Las imágenes de fluorescencia se obtuvieron con un tiempo de exposición de 300ms bajo luz ultravioleta. Para la observación de fluorescencia en presencia de H₂O₂ exógeno, los ensayos se realizaron a concentraciones de 20 y 30 mM.

Para la observación de fluorescencia durante la diferenciación sexual, se inocularon esporas por picadura en medio mínimo sólido suplementado de acuerdo a los requerimientos de la cepa, se incubaron a 37°C durante 48 horas y posteriormente se sellaron las placas para inducir el desarrollo sexual, las placas se incubaron a 37°C por 5 días. Las estructuras sexuales se observaron en el microscopio de epifluorescencia, bajo luz transmitida y luz ultravioleta.

RESULTADOS

Co-transformación por protoplastos

La tabla 3 indica los resultados obtenidos durante la co-transformación de *Aspergillus nidulans* por el método de protoplastos. El control negativo, el cual contiene únicamente la solución de protoplastos (sin ningún vector), presentó un crecimiento nulo en MM paba- biotina, lo que nos indica que no se llevo a cabo la integración de ADN necesario para curar la auxotrofía a triptófano y por lo tanto esto nos sirve para descartar cualquier contaminación proveniente de otra cepa. En el caso del control de viabilidad antes del polietilenglicol (PEG), este indica que durante el procedimiento se obtuvieron protoplastos viables, mientras que el control después del PEG muestra que después del tratamiento con este compuesto se mantuvo parte de la viabilidad de los protoplastos. El PEG es un compuesto con alto grado de viscosidad que es necesario para mantener separados entre sí a los protoplastos y con ello asegurar la entrada de ADN al mayor número de células.

Después de comprobar que el fragmento trpC contenido en el plásmido pSilent es incapaz de curar la auxotrofía al triptofano, se decidió co-transformar a *Aspergillus nidulans* con los plásmidos pTA11 y pSilent. El plásmido pTA11 contiene todo el marco de lectura abierto (ORF) del gen trpC de *Aspergillus nidulans*, el cual codifica para una enzima que participa en la biosíntesis de triptófano. En la co-transformación se observó el crecimiento de 22 colonias en medio selectivo (MM paba- biotina), indicando que el plásmido pTA11 si es capaz de curar la auxotrofía a triptofano.

Tabla 3. Resultados de la co-transformación por protoplastos de la cepa CJR01

Tratamiento	Crecimiento		Observaciones
	Si	No	
Control negativo		✓	El control negativo no presentó crecimiento en medio selectivo (MM paba-biotina).
Transformación	✓		Se observó el crecimiento de 22 colonias repartidas en cajas de medio selectivo (MM paba-biotina).
Viabilidad antes del PEG	✓		Se observó el crecimiento de colonias en las diversas cajas de medio con todos los suplementos.
Viabilidad después del PEG	✓		Se observó el crecimiento de colonias en las diversas cajas de medio con todos los suplementos.

**Se co-transformó con los plásmidos pSilent (roGFP) y pTA11, el cual incluye el gen trpC como marcador selectivo.*

La prueba de resistencia a higromicina, permite seleccionar a las cepas transformantes que integran al plásmido pSilent.

A pesar de que *A. nidulans* muestra cierta resistencia natural a la higromicina, una prueba de resistencia a este antibiótico podría indicarnos qué cepas transformantes integraron el plásmido pSilent, además del plásmido pTA11, ya que el plásmido pSilent contiene el marcador de selección de resistencia a higromicina, mientras que el plásmido pTA11 se integra en todas las transformantes para curar la auxotrofia al triptófano de la cepa CJR01.

Como se muestra en la figura 8, las placas maestras de las cepas transformantes realizadas en MM paba-biotina y MM paba-biotina con higromicina, mostraron que 8 de las 22 cepas presentan un crecimiento normal en presencia de higromicina, es decir resistencia a este antibiótico. Para este ensayo se utilizó como control una

cepa con fondo Wt (CLK43), la cual no presentó crecimiento en medio con higromicina. La figura 8 muestra el resultado de la placa maestra en donde se ve el crecimiento de las cepas resistentes y sensibles a higromicina. En el caso de la transformante 1, esta presentó mayor crecimiento que una cepa silvestre en MM con higromicina, sin embargo el crecimiento no es normal e igual que las otras transformantes que presentan la resistencia, a pesar de esto, se analizó como posible portadora del plásmido pSilent.

Las cepas que mostraron resistencia a la higromicina se vieron en el microscopio de epifluorescencia NIKON E600, en donde se observó mayor fluorescencia de estas cepas comparadas con una cepa Wt o las transformantes sensibles a la higromicina (datos no mostrados).

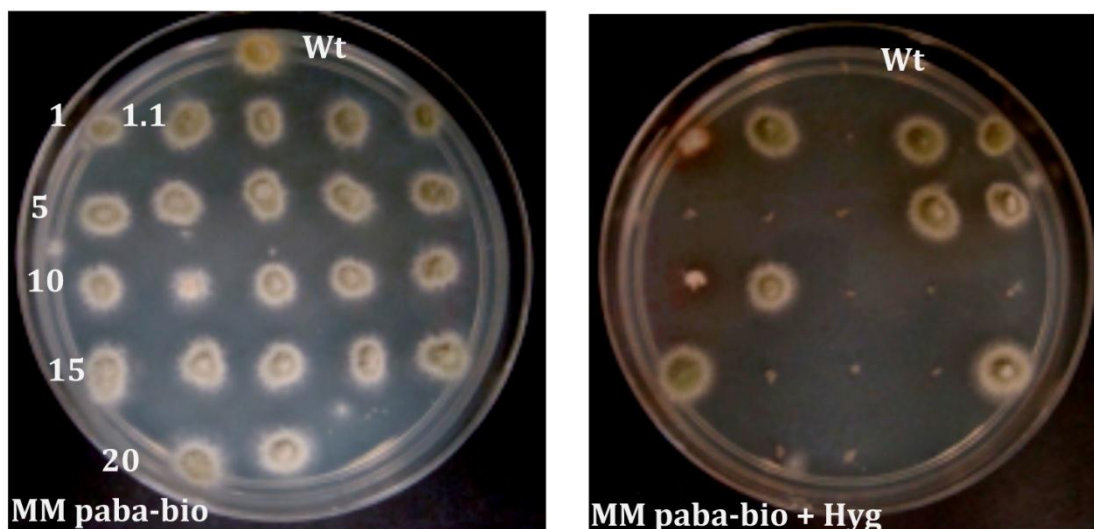


Figura 8. Placas maestras realizadas en MM más suplementos en presencia o ausencia de higromicina. La placa maestra realizada en MM paba-biotina (izquierda) y en MM paba-biotina + Higromicina, mostró que al menos 8 de las 22 colonias parecen haber integrado el plásmido pSilent (roGFP), además del plásmido pTA11 (*TrpC*).

El análisis tipo Southern blot mostró que las cepas transformantes resistentes a higromicina contienen el plásmido pSilent.

Se realizó un análisis de hibridación de ADN tipo Southern blot utilizando las transformantes que presentaron resistencia a la higromicina, así como en 4 transformantes sensibles y una cepa silvestre. El ADN de las cepas transformantes

y de la silvestre (Wt) se digirió con las enzimas XhoI y SphI y se usó para el análisis tipo Southern blot, utilizando como sonda el gen de la roGFP (con un tamaño aproximado de 2Kb). En este caso la cepa silvestre, se usó como control negativo (ya que no contiene a la roGFP) y como control positivo el plásmido pSilent digerido con las enzimas XhoI y SphI, las cuales liberan el fragmento de roGFP del plásmido.

La figura 9 muestra el Southern blot de las cepas transformantes y se observa que nueve presentan una banda de 2 Kb que indica la presencia del plásmido pSilent. La presencia de bandas con mayor señal a la altura de 2Kb podría indicar que algunas de estas cepas contienen varias copias del plásmido pSilent; por otro lado, las bandas observadas por arriba de 2 kb podrían estar relacionadas con un evento de digestión parcial del ADN. Se eligió la cepa 11 denominada TAM07 para su caracterización posterior.

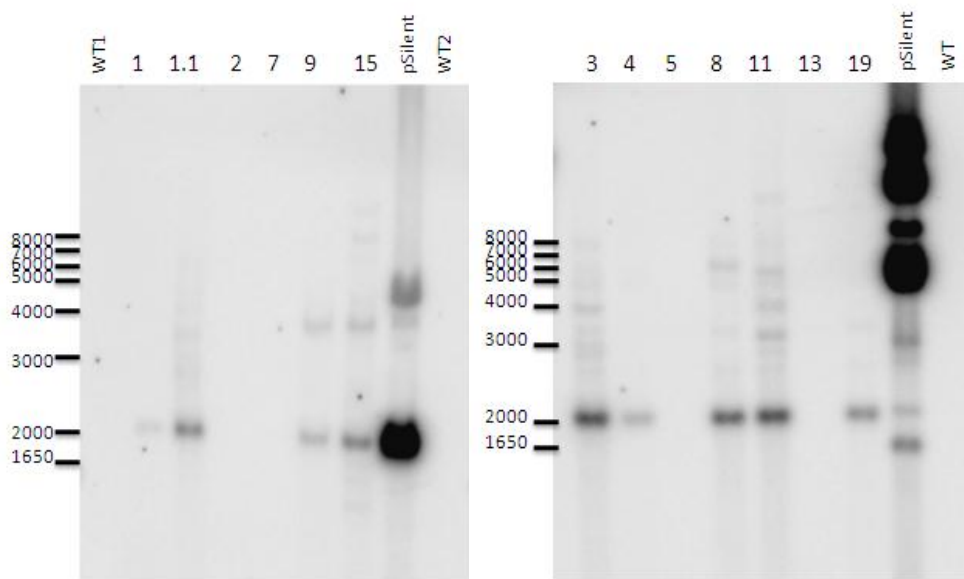


Figura 9. Análisis tipo Southern blot. El ADN de las cepas transformantes y de la cepa silvestre se digirió con las enzimas XhoI y SphI y se usó para hibridación tipo Southern con el fragmento roGFP del plásmido pSilent. El patrón de hibridación esperado corresponde a una banda de 2 Kb. Como control negativo se utilizó ADN de una cepa Wt y como control positivo el plásmido pSilent digerido con XhoI-SphI.

La proteína roGFP muestra cambios en el factor de fluorescencia relacionados con el estado redox celular

La caracterización de la proteína se llevó a cabo utilizando esporas incubadas previamente sin agitación, durante 3h a 37°C. Estas esporas se incubaron con DTT 10 mM, para reducir completamente la proteína roGFP. Una vez que la proteína alcanzó su máximo de reducción la muestra se lavó con agua estéril rápidamente y finalmente las esporas se incubaron con 0.1 mM de dimedona, para volver a oxidar la muestra. Cuando las esporas se observaron usando microscopia confocal de fluorescencia, se observó que antes de la incubación con el agente reductor (DTT) la intensidad de fluorescencia fue notablemente más alta a 405 nm (forma oxidada de la proteína), en comparación con la observada a 488 nm (forma reducida de la proteína roGFP). Como se muestra en la figura 10A la incubación con DTT causó una disminución de la fluorescencia a 405 nm y un incremento a 488 nm. En presencia de dimedona la intensidad de fluorescencia a 488 nm comenzó a disminuir, mientras que la intensidad de fluorescencia a 405 nm aumentó.

La figura 10B muestra la relación de la intensidad de fluorescencia a 405/488nm, en la cual se observa la disminución de la relación de fluorescencia al agregar DTT mientras que al agregar dimedona la relación de fluorescencia aumentó. Esto muestra claramente la relación entre el factor de fluorescencia de la roGFP y el estado redox de la célula, tal como se ha observado en Arabidopsis (Jiang, Schwarzer et al. 2006).

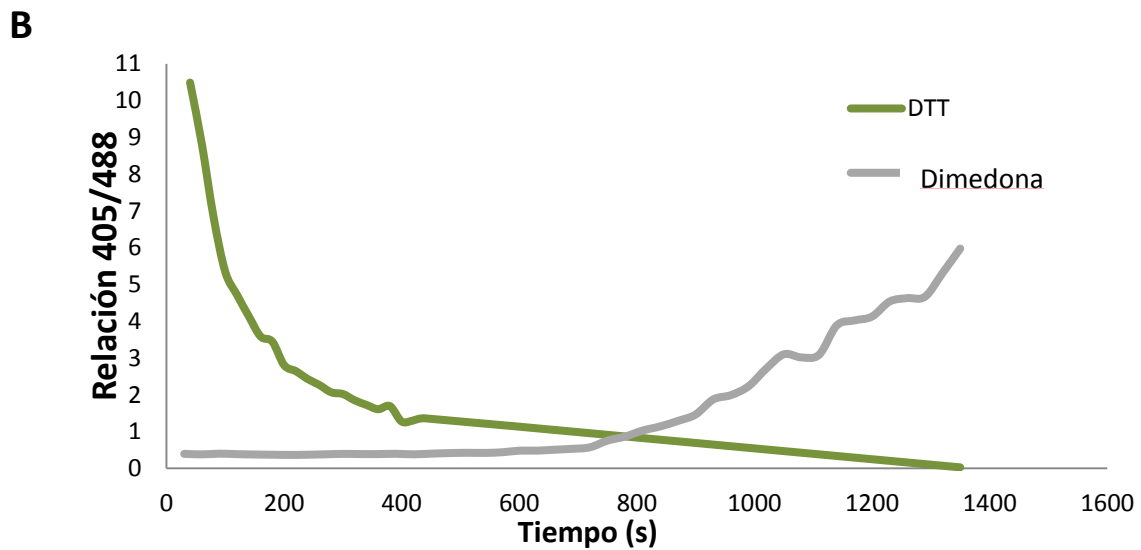
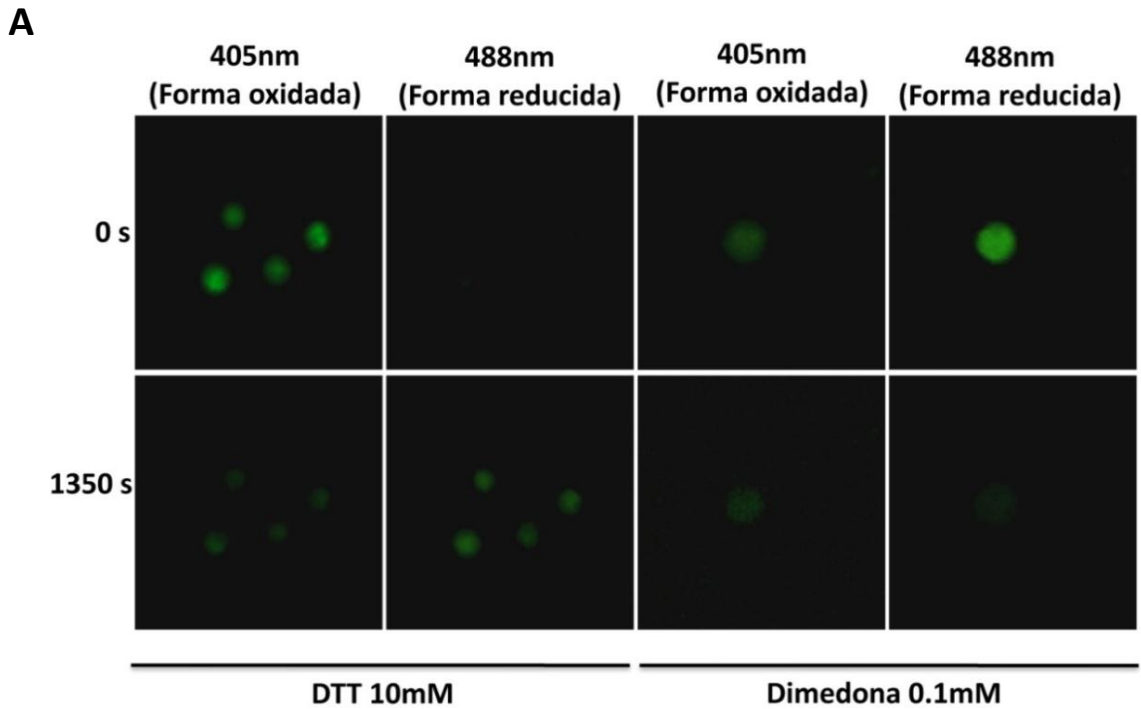


Figura 10. Caracterización de la proteína roGFP1 *in vivo*. La caracterización se llevó a cabo en esporas con 3h de incubación. A) Al agregar DTT se observó una disminución de fluorescencia a 405 nm y un incremento a 488 nm. Mientras que en presencia de dimedona la intensidad de fluorescencia en 488 nm disminuye mientras que aumenta en 405 nm. B) Relación de intensidad de fluorescencia 405/488 nm.

La proteína roGFP refleja el estado redox de la poza del glutatión celular

El compuesto BSO inhibe a la enzima glutamato-cisteína-ligasa (GSH1), la cual participa en la biosíntesis del glutatión de novo (GSH). Los ensayos de la roGFP en plantas han demostrado que esta proteína es capaz reflejar el estado redox del glutatión celular (Meyer 2008). La tabla 4 indica la diferencia que se presenta en el factor de fluorescencia en micelio de 12 h de crecimiento, incubado en presencia o ausencia de BSO (n=3). En donde se observa que el micelio en presencia de BSO presenta un factor de fluorescencia (FF) diez veces más grande que el control (micelio sin tratamiento con BSO).

Tabla 4. Micelio bajo tratamiento con DL-butionina (SR)-sulfoximina

DL-butionina (SR) sulfoximina	Factor de fluorescencia (FF)
Micelio sin tratamiento	7.4 ±3
Micelio con tratamiento	129.3 ± 25

De acuerdo con los resultados de la figura 10, un valor FF cercano a cero corresponde a un estado alto de glutatión reducido (GSH/GSSG), mientras que valores mayores que cero representan un estado alto de glutatión oxidado (GSH/GSSG). Por lo tanto, el micelio tratado con BSO, presentó un estado altamente oxidado en comparación con el micelio sin tratamiento, lo cual es de esperarse ya que se ha visto que bajo el tratamiento con el BSO los niveles de glutatión sintetizados de *novo* (GSH) disminuyen y esto a su vez afecta la poza de glutatión celular (GSH/GSSG) que es continuamente reciclado. Lo anterior se ve reflejado en el incremento en la sensibilidad de oxidación de la roGFP (Dooley, Dore et al. 2004).

Detección de la roGFP en diversas etapas de crecimiento del hongo *Aspergillus nidulans*

Fluorescencia de la roGFP en esporas hinchadas

Para observar la fluorescencia emitida por la proteína roGFP en esporas hinchadas, se colectaron esporas y se incubaron en condiciones de crecimiento durante 3 horas. En la figura 11 se observa que la cepa Wt no presenta fluorescencia alguna en ninguna de las dos longitudes de onda.

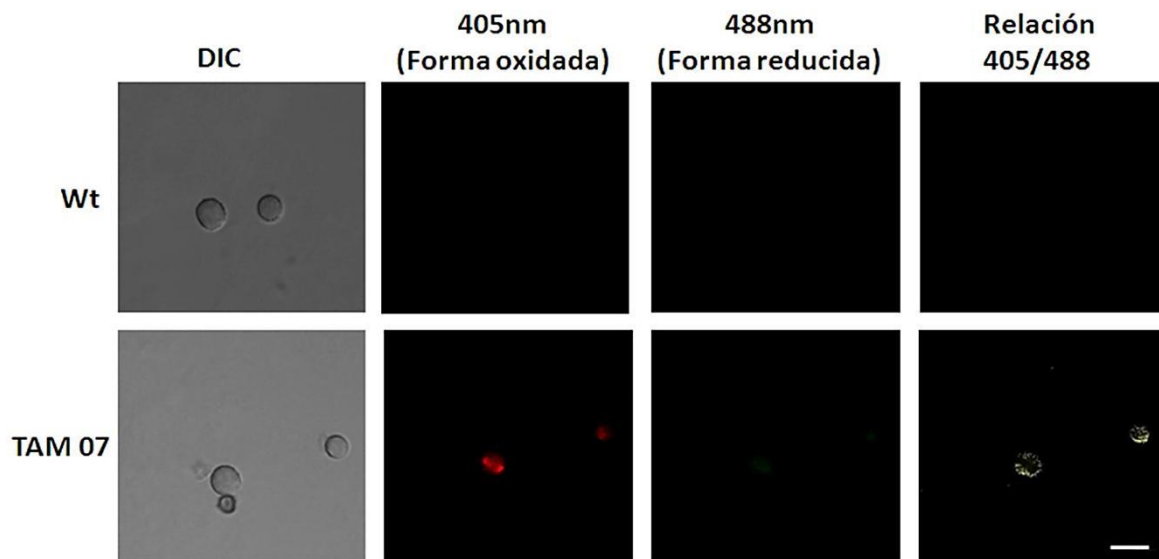


Figura 11. La proteína roGFP se encuentra en un estado de mayor oxidación en las primeras etapas de la germinación. En la parte superior se observa que la cepa WT no presenta fluorescencia en ninguna de las dos longitudes de onda. Por el contrario, la cepa TAM07 presenta mayor fluorescencia en 405 nm que en 488nm. Barra: 10 μ m. FF= 12

En cambio, en las esporas de la cepa TAM07, la cual contiene a la roGFP, se observa una fluorescencia mas intensa a 405 nm que a 488 nm. La relación de la intensidad de estas dos señales de fluorescencia sugiere que en las primeras etapas de la germinación, las esporas de *A. nidulans* muestran un estado alto de glutatión oxidado, que parece reflejarse más en el centro de la espora.

Detección de la roGFP en micelio en crecimiento

La roGFP también se observó en micelio de este hongo crecido durante 12 h. Los resultados en la Figura 12 muestran que en estas condiciones la cepa Wt tampoco presentó auto-fluorescencia. En las imágenes de la cepa TAM07 se aprecia una señal alta tanto a 405 como a 488 nm, lo cual se refleja claramente una relación 405/488 nm notablemente menor que el observado en las conidias.

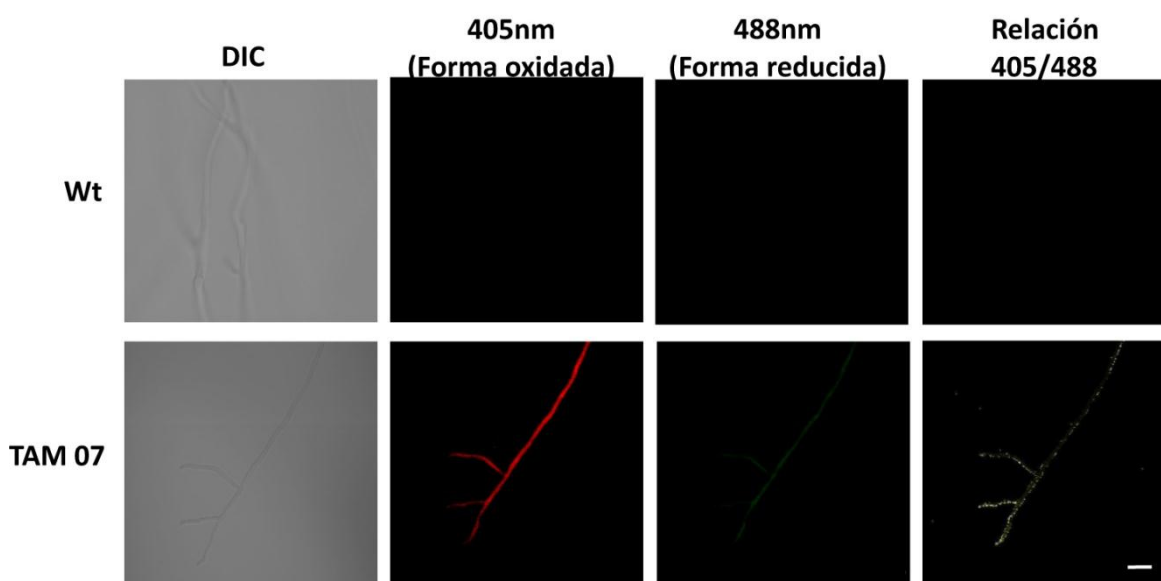


Figura 12. La proteína roGFP se localiza principalmente en las zonas de crecimiento de las hifas. Micelio de 12h de crecimiento. La cepa WT (parte superior) no mostró fluorescencia, mientras que en la cepa TAM07 se aprecia la fluorescencia en ambas longitudes de onda. La relación 405/488 sugiere que las zonas de crecimiento o puntas de las hifas poseen un estado más oxidado que el resto de la hifa. Barra = 20 μ m. FF= 6

Cambios en el factor de fluorescencia de la roGFP entre las esporas y el micelio en *A.nidulans*

Después de confirmar que la proteína roGFP es capaz de responder a los cambios redox externos tal y como muestra la figura 10 y de observar que la proteína se expresa en las distintas etapas de diferenciación del hongo, se decidió utilizar el factor de fluorescencia, como medida del estado redox del glutatión celular y de sus posibles variaciones durante el desarrollo. La Figura 13 muestra los valores obtenidos al dividir la intensidad de fluorescencia en 405 nm por la intensidad de fluorescencia a 488 nm en una población de 10 células de cada estructura. De acuerdo con los datos en la Figura 13, las esporas en un estado inicial de germinación presentan un alto estado de glutatión oxidado, mientras que el micelio presenta un estado menor de oxidación (GHS/GSSG), es decir se encuentra más reducido. Lo anterior puede explicarse ya que se considera a las esporas como un estado latente del hongo en donde no hay poder reductor, por lo tanto hay un ambiente oxidante.

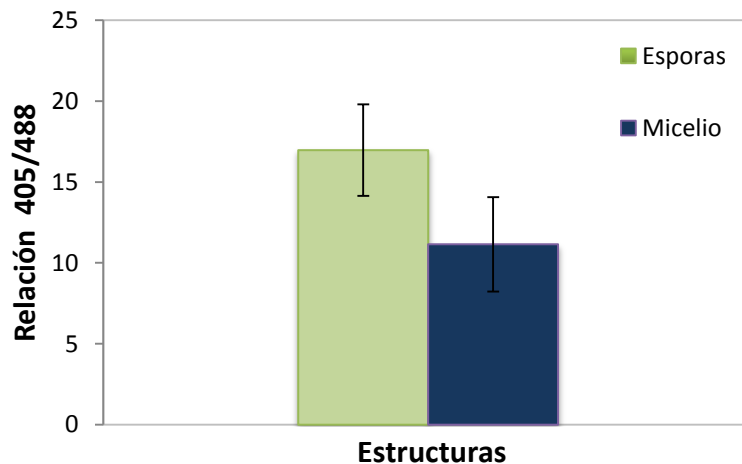


Figura 13. Las esporas y germinulas presentan un mismo estado de oxidación, mientras que el micelio un estado menor de oxidación. Se comparó el factor de fluorescencia obtenido de la división 405/488nm de cada estructura y se determinó el estado redox relativo, basándonos en la figura 10B. n=10.

En las germinulas (esporas que presentan formación de tubo germinal) empieza un estado de diferenciación del hongo, en donde hay una elevación de ERO tal y como se ha visto en *N.crassa* (Lara Ortiz et al., 2003; Cano- Dominguez et al., 2008). Por otra parte el micelio se considera una fase de crecimiento del hongo en donde toma nutrientes del medio y se biotransforman en poder reductor.

Los conidióforos jóvenes presentan un estado de menor oxidación en comparación con los conidióforos maduros y las conidias

En la figura 14 se presentan diversas etapas morfogénicas durante el desarrollo de un conidióforo. En la parte inferior de la figura se muestra un conidióforo joven, el cual presenta una vesícula en donde se observa la formación inicial de las métulas en la parte superior. La siguiente imagen hacia arriba muestra un conidióforo con vesícula y métulas completamente desarrolladas. En la siguiente imagen hacia arriba se observa un conidióforo que presenta métulas y fialides. Por último, la parte superior de la fig. 14 se presenta un conidióforo más viejo, el cual ya ha formado las métulas, las filiales y las esporas. Del lado derecho de cada figura se presentan la relación 405/488 o factor de fluorescencia (FF) correspondiente a los distintos estados de diferenciación del conidióforo. De manera general podemos apreciar una tendencia ascendente del factor de fluorescencia conforme el conidióforo se va desarrollando, es decir, un conidióforo joven presentó un factor de fluorescencia bajo, lo cual indicaría un estado de mayor relación GSH/GSSG y por lo tanto de mayor reducción celular. Por el contrario, un conidióforo maduro que ya esporuló, presentó un factor de fluorescencia alto, que indicaría un estado de mayor oxidación celular.

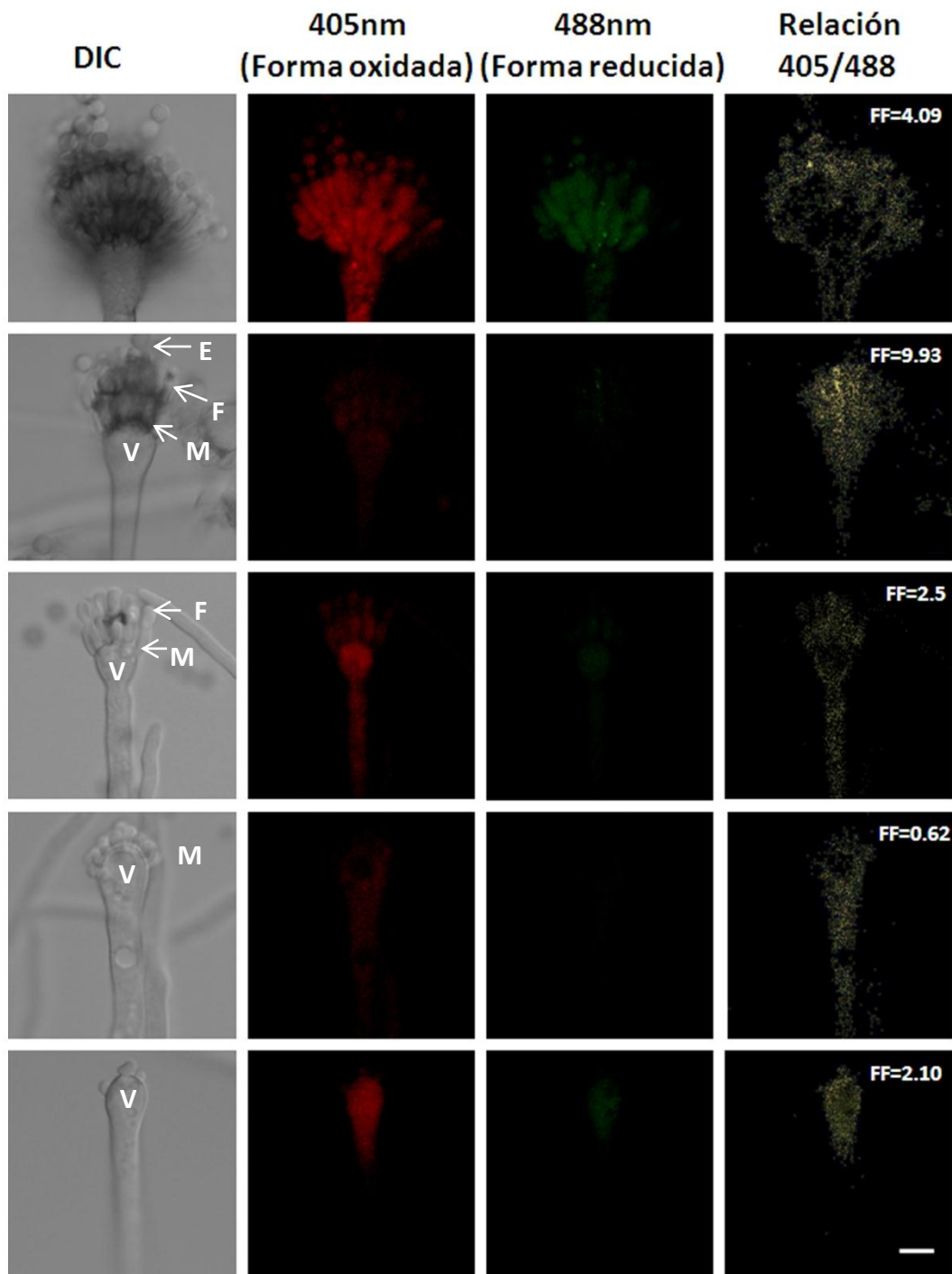


Figura 14. Los conidióforos jóvenes presentan un estado menor de oxidación en comparación con conidióforos maduros. Se presentan en orden ascendente, las distintas etapas en el desarrollo de un conidióforo así como las diversas estructuras que lo constituyen. Los factores de fluorescencia (FF) muestran de manera general una tendencia ascendente durante el desarrollo del conidióforo. Barra=20µm. V= Vesícula, M=Métula, F=Fiálide, E=Esporas.

Las células Hülle pueden darnos una idea del estado redox del durante la diferenciación sexual

Después de monitorear a la fluorescencia de la proteína roGFP durante el desarrollo asexual, se decidió observar dicha fluorescencia en las estructuras de la diferenciación sexual. Sin embargo, como se muestra la figura 15, los cuerpos fructíferos o cleistotecios maduros de una cepa Wt presentaron una auto-fluorescencia muy alta la cual se observó incluso en etapas tempranas de formación (primordio). Esto impide analizar el estado de oxido-reducción de dicha estructura, a través de la fluorescencia de roGFP.

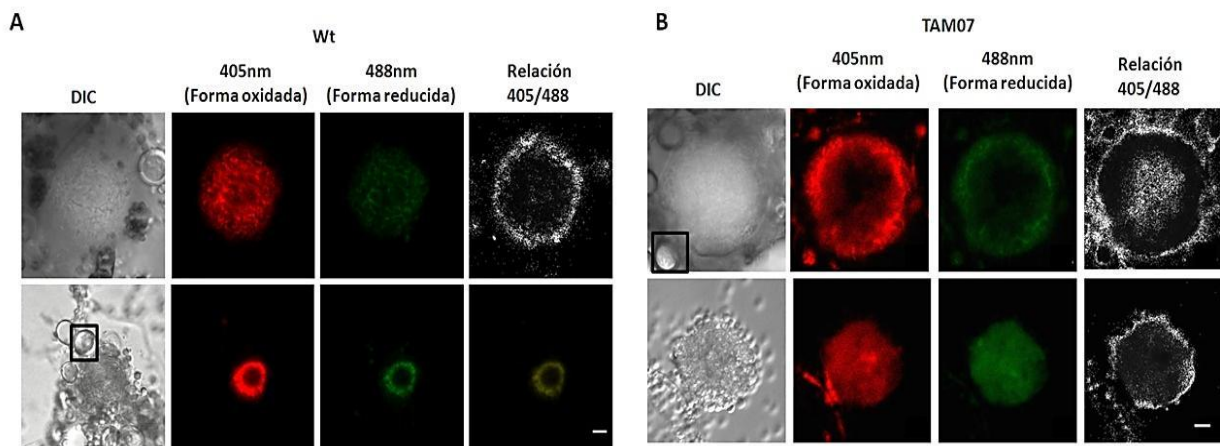


Figura 15. Los cleistotecios de la cepa Wt mostraron autofluorescencia. A) Los cleistotecios de la cepa Wt mostraron auto-fluorescencia en sus etapas jóvenes y maduras al igual que las estructuras de la cepa TAM07 B). Barra=10µm, Barra=1 µm

Al comparar imágenes de las estructuras sexuales de la cepa silvestre y TAM07, se observó que las células Hülle de la cepa Wt no presentaron auto-fluorescencia. La figura 16, muestra la auto-fluorescencia nula por parte de la Wt y por lo tanto un FF igual a cero, mientras que en la cepa TAM07 se detectó un FF igual a dieciséis. El FF alto nos indica que las células Hülle presentan un estado de glutatión oxidado alto similar al de una espora asexual. Este resultado es consistente con el hecho de que durante el desarrollo sexual se producen ERO a través de la NADPH oxidasa NoxA y que esta es esencial para la diferenciación sexual, desde las primeras etapas del desarrollo de los cuerpos fructíferos (Lara-Ortiz, Riveros-Rosas et al. 2003). Además, en las células Hülle se han localizado diversas enzimas

involucradas en el metabolismo de las ERO tales como la lacasa II (Hermann, Kurtz et al. 1983) y la catalasa peroxidasa CpeA (Scherer, Wei et al. 2002).

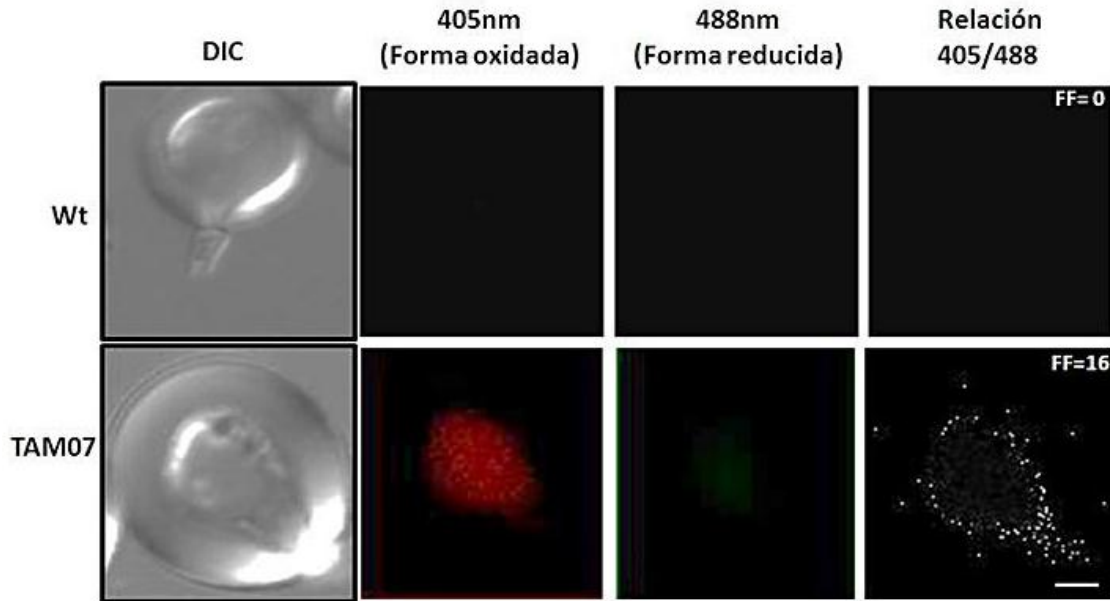


Figura 16. Las células Hülle no presentan auto-fluorescencia y su estado de oxidación es similar al de una espora o germinula. El FF de la roGFP en las células Hülle presenta un carácter de oxidación similar al observado en las esporas asexuales.

napA::gfp como sensor del estado redox

La etiqueta GFP no afecta la función del factor transcripcional *NapA*

Anteriormente se generó en el laboratorio una cepa con la fusión *napA::gfp*, en la cual *napA* se expresa desde su propio promotor (Lara-Rojas y Aguirre, sin publicar). Sin embargo, se desconocía si la presencia de la GFP en el extremo C-terminal del factor de transcripción NapA afectaría su función. Para determinar esto, se comparó el crecimiento de dicha cepa con una silvestre, en presencia y ausencia de 2 mM y 4 mM de H₂O₂, concentraciones a las cuales una cepa carente del gen *napA* no puede crecer (Lara-Rojas, Tesis 2012). En la Figura 17 se observa que en estas condiciones, la cepa con la fusión *napA::gfp* crece de manera semejante a la cepa silvestre, indicando que la proteína NapA::GFP es funcional.

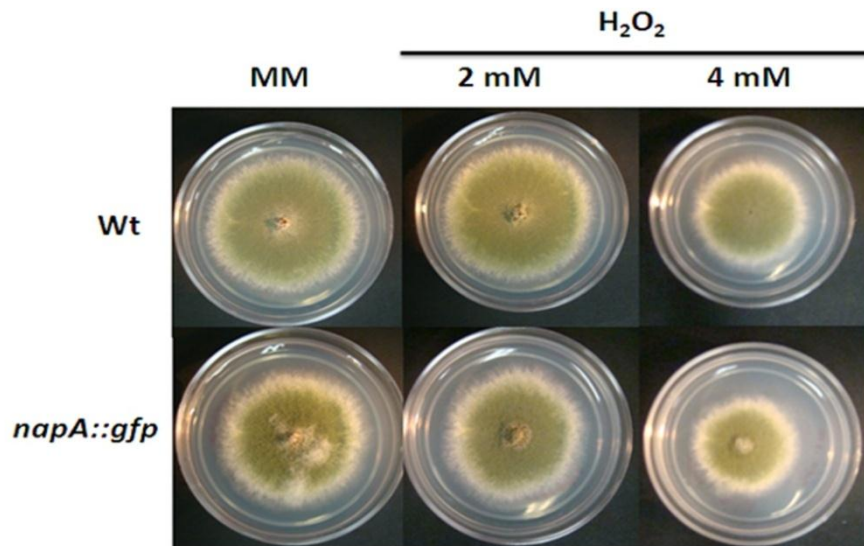


Figura 18. Una cepa con la fusión *napA::gfp* es resistente al H₂O₂. Cajas de petry con MM más suplementos necesarios y la concentración de H₂O₂ indicadas, se inocularon de las esporas por picadura de las cepas FGSC 26 (Wt) y TFL14 (*napA::gfp*). Después de 4 días de incubación a 37°C y se observó el crecimiento y esporulación.

Las cepas NapA::GFP muestran una fluorescencia baja y sin patrón definido

Anteriormente había observado que la sobre-expresión de NapA etiquetado con la proteína roja monomérica fluorescente (mRFP), desde el promotor inducible *alcA*, produce una alta señal fluorescente que es posible seguir por microscopía de epifluorescencia. La proteína NapA::mRFP se localiza en el citosol en ausencia de H₂O₂ y se acumula en el núcleo en presencia de este agente oxidante (Lara-Rojas, Tesis 2012). Sin embargo, cuando observamos la fluorescencia en diferentes estructuras de la cepa NapA::GFP, solamente se detectó una fluorescencia muy débil con una localización difusa, la cual prácticamente no cambió en presencia de H₂O₂ 20µM y 30 µM (Fig. 18).

En el caso de los cleistotecios, la autofluorescencia de estas estructuras impide ver aquella causada por NapA::GFP. Nuestros resultados sugieren que la expresión de NapA::GFP desde el promotor de *napA*, es muy baja para permitir analizar su

localización y consecuentemente, no parece apropiado como reportero del estado redox intracelular en el hongo *Aspergillus nidulans*.

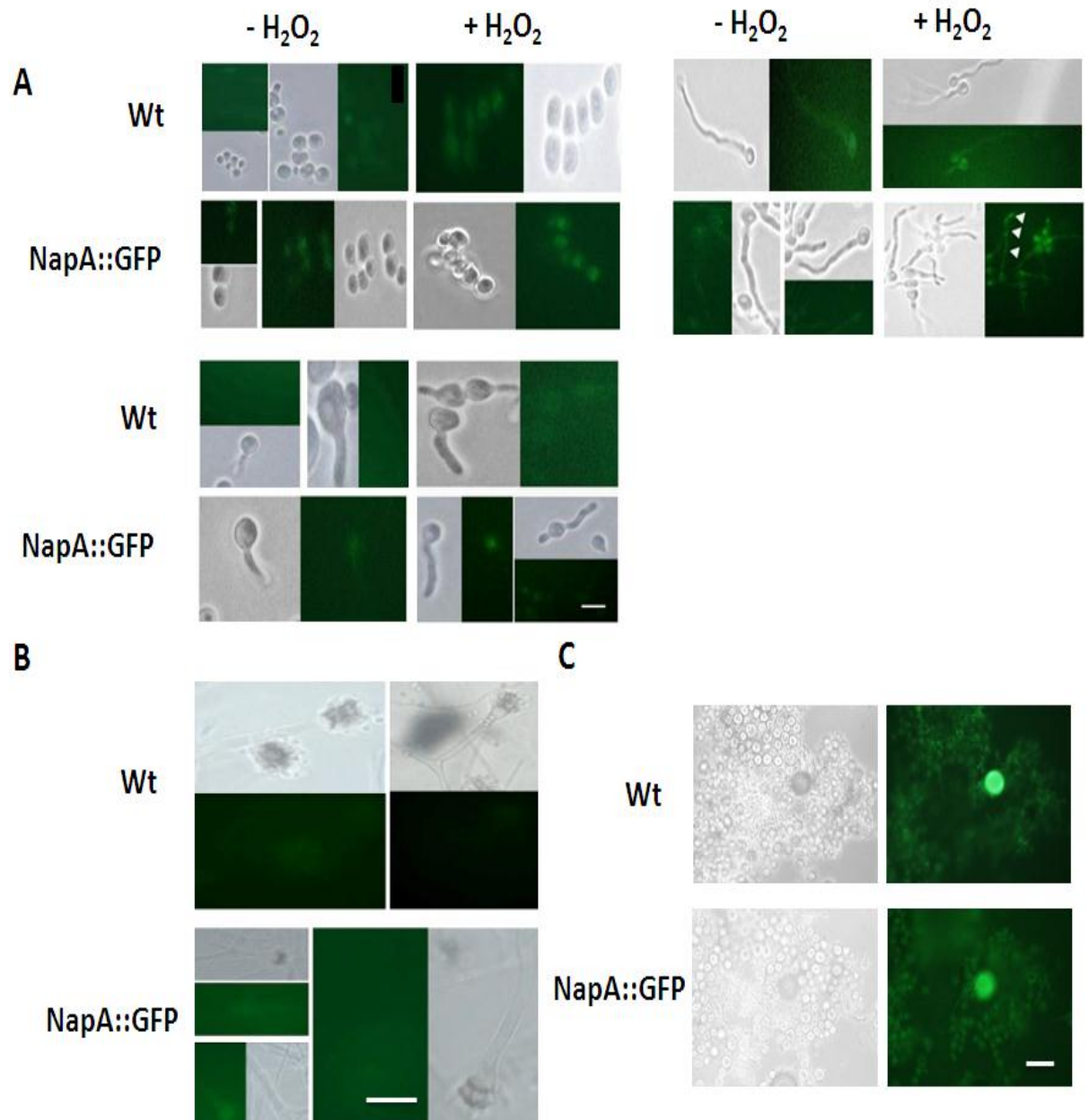


Figura 18. La cepa con la fusión *napA::gfp* presenta fluorescencia difusa y por lo tanto no se aprecia claramente su localización al adicionarle H_2O_2 20 μ M.

A) Se observan esporas hinchadas a las dos horas de crecimiento, germiulas a las cuatro horas de crecimiento y germinulas a las seis horas de crecimiento. Las flechas blancas indican una posible acumulación de la proteína B) Conidióforos a las doce horas de crecimiento. C) Cleistotecios después de cinco días de la inducción del ciclo sexual. Barra: 10 μ m y 20 μ m.

DISCUSIÓN

La proteína roGFP refleja la poza del glutati3n celular y de manera general el ambiente redox celular

Como se ha mencionado anteriormente, las ERO son un grupo de mol3culas generadas com3nmente como subproducto del metabolismo celular. Bajo niveles controlados las ERO pueden funcionar como mol3culas de se1alizacion intracelular en diversos procesos como la proliferaci3n y diferenciaci3n celular, reacciones inflamatorias y respuestas inmunes. A pesar de su clara importancia, la actividad molecular, la producci3n, la acumulaci3n, la funci3n y la degradaci3n de las ERO es poco entendida.

Frecuentemente, la perturbaci3n en los niveles de los ERO afecta el nivel global de los grupos tiol (Cortina-Puig, Munoz-Berbel et al. 2009). La relaci3n del potencial redox, el glutati3n y el estr3s celular se ha discutido en plantas afectadas en la bios3ntesis del glutati3n (Meyer 2008). Adem3s del papel del glutati3n en la detoxificaci3n de las ERO, el estado redox del glutati3n tambi3n es considerado como un elemento de se1alizacion que responde para reducir puentes disulfuro en prote3nas y afectar la glutationilaci3n de prote3nas (Dietz, Liu et al. 2008).

La roGFP es una prueba radiom3trica por excitaci3n, que refleja el estado redox del glutati3n. An3lisis cin3ticos de la prote3na purificada, as3 como experimentos *in vivo* han confirmado que la roGFP se encuentra en equilibrio con el potencial redox del glutati3n y por lo tanto, sirve como sensor para la medici3n del potencial redox del glutati3n celular (Meyer, Brach et al. 2007).

Nuestros experimentos de oxidaci3n y reducci3n *in vivo* se realizaron en esporas hinchadas (a las 3 horas de germinaci3n). La dimedona es un agente oxidante que se conjuga selectivamente con el 3cido sulf3nico de las prote3nas, al ser adicionado a las esporas se observ3 un car3cter ascendente en la relaci3n de las intensidades de fluorescencia a 405/488nm. Por el contrario, al adicionar DTT, un agente reductor fuerte que reduce los puentes disulfuro en las prote3nas, se observ3 un comportamiento descendente en la relaci3n de la intensidad de fluorescencia

405/488nm. Estos datos concuerdan con los observados en células de mamífero que contenían a la roGFP1 o a la roGFP2, las cuales fueron sometidas a distintos agentes oxidantes y reductores, observando el cambio correspondiente en las intensidades de fluorescencia (Dooley, Dore et al. 2004).

Para comprobar que la roGFP1 refleja el estado redox de del glutatión, se redujo artificialmente la poza de glutatión celular utilizando la DL-butionina (SR) sulfoximina (BSO). Los resultados mostraron que en el micelio bajo 1 hora de tratamiento con este compuesto causó un incremento en la relación de intensidad de fluorescencia (ó factor de fluorescencia) de 7.4 a 129.3, indicando la depleción del GSH y la oxidación progresiva acompañada del decremento en la relación GSH/GSSG. Resultados similares se observaron en ensayos con *Arabidopsis thaliana*, en donde el tratamiento con este compuesto logró una disminución del glutatión celular, observado a través de la roGFP2 y ocasionando un fenotipo similar al de una mutante en la síntesis de glutatión (Meyer, Brach et al. 2007).

En *Arabidopsis* se han caracterizado diversas mutantes afectadas en el metabolismo y síntesis del glutatión, y en general se ha observado que las plantas tienen un desarrollo y crecimiento normal sin embargo, bajo condiciones de estrés muestran alta sensibilidad (Meyer 2008).

La proteína roGFP indica diferencias en el estado redox celular durante las distintas etapas de diferenciación celular que ocurren en el ciclo asexual

La proteína roGFP ha sido utilizada en diversos organismos, así como en orgánulos para el continuo monitoreo del estado redox del glutatión celular, en numerosos procesos celulares. Tal es el caso de *A. thaliana* donde se utilizó a la roGFP para monitorear la raíz durante el crecimiento (Joo, Bae et al. 2001). Por otra parte, esta proteína también se expresó en neuronas para confirmar que el estrés oxidativo que se presenta durante la isquemia es debido a la disminución del glutatión celular (Vesce, Jekabsons et al. 2005).

La diferenciación celular en hongos ha sido considerada una respuesta al estrés oxidativo, ya que está asociada a la detención del crecimiento y a varios cambios metabólicos dirigidos hacia el decremento de metabolitos primarios y el incremento de componentes que participan en la protección celular, como los caratenoides, las melaninas, la prolina y los polioles, que permiten la adaptación de la célula a los cambios y la disminución de oxidantes intracelulares (Hansberg y Aguirre 1990).

La proteína roGFP se expresó en *A. nidulans* y se observó *in vivo* para evaluar su uso en la determinación del estado redox del glutatión (GSH/GSSG), durante la diferenciación celular.

Un primer dato sobre el estado redox del hongo se obtuvo en las esporas en los primeros estados de germinación (esporas hinchadas) en donde se observó que esta estructura presenta un mayor grado de glutatión oxidado, en comparación con el detectado en el micelio en crecimiento.

La espora es una estructura de resistencia a condiciones adversas, presenta un estado de latencia y de alta deshidratación en el cual no es capaz de asimilar nutrientes del medio ni intercambiar metabolitos. Durante las primeras etapas de la germinación se rompe este estado de aislamiento, mediante la hidratación, la degradación la pared celular y la activación del metabolismo celular. Durante la conidiación de *N. crassa* se ha observado la producción de especies reactivas de oxígeno, la oxidación de proteínas y la excreción de GSSG (Aguirre y Hansberg 1986; Hansberg y Aguirre 1990). Así mismo, se ha observado que en los primeros momentos de la germinación en *N. crassa* existe un incremento en la relación GSH/GSSG que posteriormente disminuye durante el crecimiento de micelio (Fahey y Brody, 1975). En nuestro caso, las conidias intactas muestran cierta autofluorescencia y son impermeables a los compuestos que deseábamos probar y por ello utilizamos conidias germinadas. Es de suponerse, que las conidias intactas tengan un grado de oxidación aún mayor que el de las conidias germinadas. Por otro, lado se ha observado que durante el inicio de la germinación se produce oxígeno en singulete (Lledias, Rangel et al. 1998), lo que podría también afectar los niveles de glutatión.

El micelio se compone de hifas individuales, se considera como una fase de crecimiento en la cual hay una interacción entre la célula y el ambiente, en donde, la célula toma nutrientes del medio y los convierte en poder reductor, lo que podría explicar el mayor estado de reducción de la poza del glutati6n. La reciente expresi6n de la roGFP2 en el hongo *Botrytis cinerea* y su caracterizaci6n en micelio, es consistente con nuestros resultados, al encontrar un estado altamente (FF=0.45) reducido en esta estructura (Heller, Meyer et al.).

Estudios en *Arabidopsis* muestran que en la zona de elongaci6n de la raiz se presenta un estado redox m1s oxidado en comparaci6n con las zonas de la capa y el meristemo de esta estructura. Estas diferencias en el estado redox se relacionan con el hecho de que el desarrollo y la elongaci6n de la raiz involucran la producci6n de ERO (Jiang, Schwarzer et al. 2006). De igual manera, se logr6 observar una localizaci6n de la prote6na roGFP principalmente en micelio que se encontraba en crecimiento.

En el caso de los conidi6foros, las tendencias de incremento o decremento del factor de fluorescencia es relativo, ya que no se est1 observando una misma estructura durante todo su desarrollo, sino diferentes conidi6foros que est1n en estados de desarrollo distintos. Se tiene que tomar muchos factores en cuenta para poder hacer un an1lisis estad6stico que nos permita concluir si existen diferentes niveles de oxidaci6n/reducci6n durante el desarrollo de un conidi6foro.

RoGFP muestra un estado hiper-oxidante durante el ciclo sexual que no puede monitorearse en cleistotecios pero si en c6lulas H1lle

El ciclo sexual de *Aspergillus nidulans* es considerado como una de las ventajas que presenta este modelo de estudio, ya que permite la observaci6n de diversos fen6menos, como la diferenciaci6n y especializaci6n celular para la formaci6n de tejidos.

En ensayos anteriores se ha observado que los cleistotecios maduros presentan un pigmento identificado como polihidroxiantraquinona, el cual confiere a esta estructura autofluorescencia, por lo cual se decidió detectar roGFP en clesitotecios jóvenes (primordios) que aún no presentaran dicho pigmento. Sin embargo, los primordios también presentaron autofluorescencia en la cepa Wt (Fig. 15). Lo anterior puede estar relacionado con la presencia de lacasa II (fenol oxidasa), enzima que cataliza la oxidación por O₂ de compuestos fenólicos y que está asociada a la producción de melanina y otros pigmentos; durante estas reacciones se pueden producir ERO (Martinelli 1994). Se ha encontrado que esta enzima está presente aún en etapas muy tempranas de formación de primordios, así como en células Hülle (Hermann, Kurtz et al. 1983).

Las células Hülle presentan una estructura globular y se encuentran comúnmente rodeando al cleistotecio. La proteína roGFP1 pudo detectarse en esta estructura, debido a que estas células no presentan pigmentos y por lo tanto autofluorescencia en la cepa silvestre (fig.16); presentan una fuerte actividad lacasa II que está asociada con la pigmentación de los cleistotecios (Hermann, Kurtz et al. 1983). Como se mencionó anteriormente, la oxidación de compuestos fenólicos da lugar a la formación de ERO, lo que explica que se haya encontrado un mayor grado de glutatión oxidado, similar al que se presenta en esporas en germinación. Las células Hülle son centros de una serie de actividades enzimáticas necesarias para la degradación de componentes de la pared celular. El material de la pared celular presumiblemente sirve como fuente de energía para el clesitotecio en desarrollo y las células Hülle ayudan a movilizar esta energía al funcionar como unidades de almacenamiento (Bayram y Braus).

Relevancia e importancia del uso de roGFP en hongos filamentosos

Recientemente Heller y Meyer (2012) reportaron la caracterización de la roGFP2 en el hongo *Botrytis cinerea*.

B. cinerea es un hongo patógeno de plantas que causa la enfermedad del moho gris, la cual ocasiona grandes pérdidas de cosechas al año. Durante la infección, la planta lleva a cabo un proceso de defensa no específico denominado estallido oxidativo, el cual involucra una gran producción de ERO alrededor del sitio de infección (Heller y Tudzynski, 2011); *B. cinerea* parece incrementar este proceso mediante la producción de sus propias ERO durante la invasión al tejido de la planta (Tenberg et al., 2002). A partir de lo anterior surge la pregunta del papel de las ERO durante la infección, así como su generación por parte del patógeno y hospedero.

La expresión de la roGFP2 en el hongo *B. cinerea* bajo el control del promotor y terminador del gen constitutivo *bcglnA* (gen de la glutamina sintetasa), permitió el continuo monitoreo del estado redox del hongo durante el proceso de infección. Primeramente se analizó el estado redox del micelio en condiciones normales de crecimiento, en donde se encontró que esta estructura presenta un estado altamente reducido, lo cual coincide con lo obtenido en este trabajo para el micelio de *A.nidulans*. Posteriormente durante el proceso de penetración al tejido de la planta, se observó un incremento en el glutatión oxidado específicamente en la hifa invasora y las estructuras apresoras.

Este trabajo y nuestros resultados muestran que el uso de las proteínas sensibles al estado redox, es sin, duda una herramienta poderosa para determinar el papel de las ERO durante la diferenciación celular en hongos.

La fusión *napA::gfp* se expresa poco y no es posible utilizar su localización nuclear como reportero del estado redox intracelular

Durante los ensayos con la fusión *napA:gfp*, la observación de la proteína se vió obstaculizada por su baja expresión y por la autofluorescencia que presentan las estructuras bajo el microscopio de epifluorescencia. La posibilidad de observar esta proteína bajo el microscopio confocal se anula, debido a la poca señal de fluorescencia que se observa en el microscopio de epifluotrescencia.

CONCLUSIONES

- ✓ La proteína roGFP logró expresarse en *A. nidulans*, y durante su caracterización respondió al tratamiento con compuestos oxidantes y reductores.
- ✓ La proteína roGFP es un reportero útil en este hongo del estado redox de la glutatión celular (GSH/GSSG) *in vivo*.
- ✓ Las esporas hinchadas y las germinulas mostraron el mayor nivel de oxidación, seguido por los conidióforos y finalmente el micelio en crecimiento.
- ✓ Se observó una tendencia creciente del factor de fluorescencia durante las distintas etapas de formación del conidióforo, sin embargo, se necesita de más ensayos para poder concluir sobre el estado de oxidación/reducción durante la formación de esta estructura.
- ✓ Las células Hülle presentan un estado de glutatión oxidado similar al de las esporas.
- ✓ La expresión de la fusión *napA::gfp*, bajo el control de su propio promotor resultó muy baja para determinar su localización nuclear en todas las condiciones probadas.

PERSPECTIVAS

- ✓ Realizar experimentos de intensidad de fluorescencia en protoplastos bajo tratamientos semejantes a los probados en este trabajo.
- ✓ Introducir la fusión roGFP en fondos mutantes carentes de AtfA, SrrA y NapA, los cuales están afectados en la respuesta antioxidante, así como en mutantes con diferenciación asexual bloqueada tales como las mutantes algodonosas, brlA, abaA, stuA y abaA.
- ✓ Comparar la fluorescencia de la roGFP con la de la proteína Hyper, sensor radiométrico sensible a H₂O₂, dentro de una misma cepa.
- ✓ Expresar *napA::gfp* desde el promotor *trpC* y evaluar su localización nuclear en las distintas fases del ciclo de vida de *A. nidulans*.

REFERENCIAS

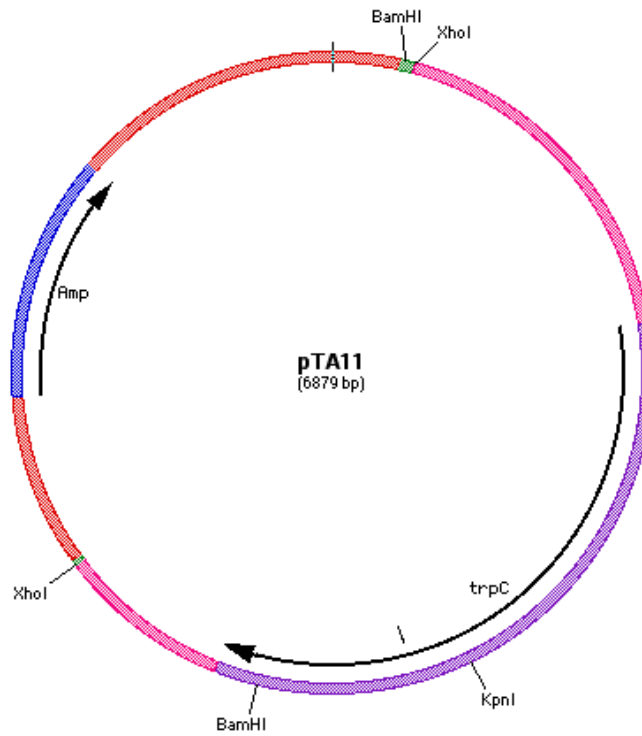
- Adams, T. H., J. K. Wieser, et al. (1998). "Asexual sporulation in *Aspergillus nidulans*." Microbiol Mol Biol Rev **62**(1): 35-54.
- Aguirre, J. and W. Hansberg (1986). "Oxidation of *Neurospora crassa* glutamine synthetase." J Bacteriol **166**(3): 1040-5.
- Aguirre, J., M. Rios-Momberg, et al. (2005). "Reactive oxygen species and development in microbial eukaryotes." Trends Microbiol **13**(3): 111-8.
- Azevedo, D., F. Tacnet, et al. (2003). "Two redox centers within Yap1 for H₂O₂ and thiol-reactive chemicals signaling." Free Radic Biol Med **35**(8): 889-900.
- Bayram, O. and G. H. Braus "Coordination of secondary metabolism and development in fungi: the velvet family of regulatory proteins." FEMS Microbiol Rev **36**(1): 1-24.
- Bergen, L. G. and N. R. Morris (1983). "Kinetics of the nuclear division cycle of *Aspergillus nidulans*." J Bacteriol **156**(1): 155-60.
- Bowler, R. P. and J. D. Crapo (2002). "Oxidative stress in allergic respiratory diseases." J Allergy Clin Immunol **110**(3): 349-56.
- Cano-Dominguez, N., K. Alvarez-Delfin, et al. (2008). "NADPH oxidases NOX-1 and NOX-2 require the regulatory subunit NOR-1 to control cell differentiation and growth in *Neurospora crassa*." Eukaryot Cell **7**(8): 1352-61.
- Casselton, L. and M. Zolan (2002). "The art and design of genetic screens: filamentous fungi." Nat Rev Genet **3**(9): 683-97.
- Cortina-Puig, M., X. Munoz-Berbel, et al. (2009). "Electrochemical characterization of a superoxide biosensor based on the co-immobilization of cytochrome c and XOD on SAM-modified gold electrodes and application to garlic samples." Talanta **79**(2): 289-94.
- Champe, S. P., D. L. Nagle, et al. (1994). "Sexual sporulation." Prog Ind Microbiol **29**: 429-54.
- Chattoraj, M., B. A. King, et al. (1996). "Ultra-fast excited state dynamics in green fluorescent protein: multiple states and proton transfer." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(16): 8362-7.
- D'Autreaux, B. and M. B. Toledano (2007). "ROS as signalling molecules: mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis." Nat Rev Mol Cell Biol **8**(10): 813-24.
- Davies, K. J. (2000). "An overview of oxidative stress." IUBMB Life **50**(4-5): 241-4.
- Davies, K. J. (2000). "Oxidative stress, antioxidant defenses, and damage removal, repair, and replacement systems." IUBMB Life **50**(4-5): 279-89.
- Dietz, B. M., D. Liu, et al. (2008). "Angelica sinensis and its alkylphthalides induce the detoxification enzyme NAD(P)H: quinone oxidoreductase 1 by alkylating Keap1." Chem Res Toxicol **21**(10): 1939-48.
- Dooley, C. T., T. M. Dore, et al. (2004). "Imaging dynamic redox changes in mammalian cells with green fluorescent protein indicators." J Biol Chem **279**(21): 22284-93.
- Elslinger, M. A., R. M. Wachter, et al. (1999). "Structural and spectral response of green fluorescent protein variants to changes in pH." Biochemistry **38**(17): 5296-301.
- Galagan, J. E., S. E. Calvo, et al. (2005). "Sequencing of *Aspergillus nidulans* and comparative analysis with *A. fumigatus* and *A. oryzae*." Nature **438**(7071): 1105-15.

- Gasch, A. P., P. T. Spellman, et al. (2000). "Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes." Mol Biol Cell **11**(12): 4241-57.
- Gracy, R. W., J. M. Talent, et al. (1999). "Reactive oxygen species: the unavoidable environmental insult?" Mutat Res **428**(1-2): 17-22.
- Halliwell, B. (1999). "Antioxidant defence mechanisms: from the beginning to the end (of the beginning)." Free Radic Res **31**(4): 261-72.
- Halliwell, B. (2006). "Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now?" J Neurochem **97**(6): 1634-58.
- Hansberg, W. and J. Aguirre (1990). "Hyperoxidant states cause microbial cell differentiation by cell isolation from dioxygen." J Theor Biol **142**(2): 201-21.
- Heller, J., A. J. Meyer, et al. "Redox-sensitive GFP2: use of the genetically encoded biosensor of the redox status in the filamentous fungus *Botrytis cinerea*." Mol Plant Pathol.
- Heller, J. and P. Tudzynski "Reactive oxygen species in phytopathogenic fungi: signaling, development, and disease." Annu Rev Phytopathol **49**: 369-90.
- Hermann, T. E., M. B. Kurtz, et al. (1983). "Laccase localized in hulle cells and cleistothecial primordia of *Aspergillus nidulans*." J Bacteriol **154**(2): 955-64.
- Hoffmann, B., C. Wanke, et al. (2000). "c-Jun and RACK1 homologues regulate a control point for sexual development in *Aspergillus nidulans*." Mol Microbiol **37**(1): 28-41.
- Jiang, K., C. Schwarzer, et al. (2006). "Expression and characterization of a redox-sensing green fluorescent protein (reduction-oxidation-sensitive green fluorescent protein) in *Arabidopsis*." Plant Physiol **141**(2): 397-403.
- Joo, J. H., Y. S. Bae, et al. (2001). "Role of auxin-induced reactive oxygen species in root gravitropism." Plant Physiol **126**(3): 1055-60.
- Kadotani, N., H. Nakayashiki, et al. (2003). "RNA silencing in the phytopathogenic fungus *Magnaporthe oryzae*." Mol Plant Microbe Interact **16**(9): 769-76.
- Kafer, E. (1977). "The anthranilate synthetase enzyme complex and the trifunctional *trpC* gene of *Aspergillus*." Can J Genet Cytol **19**(4): 723-38.
- Kamata, H. and H. Hirata (1999). "Redox regulation of cellular signalling." Cell Signal **11**(1): 1-14.
- Kuge, M., Y. Fujii, et al. (1997). "Use of a fusion protein to obtain crystals suitable for X-ray analysis: crystallization of a GST-fused protein containing the DNA-binding domain of DNA replication-related element-binding factor, DREF." Protein Sci **6**(8): 1783-6.
- Kuge, S. and N. Jones (1994). "YAP1 dependent activation of TRX2 is essential for the response of *Saccharomyces cerevisiae* to oxidative stress by hydroperoxides." EMBO J **13**(3): 655-64.
- Lara-Ortiz, T., H. Riveros-Rosas, et al. (2003). "Reactive oxygen species generated by microbial NADPH oxidase NoxA regulate sexual development in *Aspergillus nidulans*." Mol Microbiol **50**(4): 1241-55.
- Lara-Rojas, (2012). "El papel de las cinasas MAP Saka y MpkC y los factores transcripcionales AtfA y NapA en la diferenciación celular y la respuesta al estrés oxidativo en el hongo *Aspergillus nidulans*".
- Lee, S. C., M. Ni, et al. "The evolution of sex: a perspective from the fungal kingdom." Microbiol Mol Biol Rev **74**(2): 298-340.

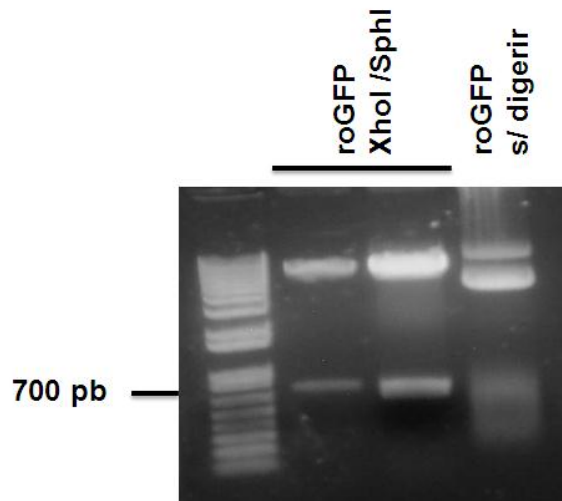
- Lledias, F., P. Rangel, et al. (1998). "Oxidation of catalase by singlet oxygen." J Biol Chem **273**(17): 10630-7.
- Martinelli, S. D. (1994). "Aspergillus nidulans as an experimental organism." Prog Ind Microbiol **29**: 33-58.
- Meyer, A. J. (2008). "The integration of glutathione homeostasis and redox signaling." J Plant Physiol **165**(13): 1390-403.
- Meyer, A. J., T. Brach, et al. (2007). "Redox-sensitive GFP in Arabidopsis thaliana is a quantitative biosensor for the redox potential of the cellular glutathione redox buffer." Plant J **52**(5): 973-86.
- Moye-Rowley, W. S., K. D. Harshman, et al. (1989). "Yeast YAP1 encodes a novel form of the jun family of transcriptional activator proteins." Genes Dev **3**(3): 283-92.
- Ormo, M., A. B. Cubitt, et al. (1996). "Crystal structure of the Aequorea victoria green fluorescent protein." Science **273**(5280): 1392-5.
- Paulsen, C. E. and K. S. Carroll (2009). "Chemical dissection of an essential redox switch in yeast." Chem Biol **16**(2): 217-25.
- Rhee, S. G., T. S. Chang, et al. (2010). "Methods for detection and measurement of hydrogen peroxide inside and outside of cells." Mol Cells **29**(6): 539-49.
- Scherer, M., H. Wei, et al. (2002). "Aspergillus nidulans catalase-peroxidase gene (cpeA) is transcriptionally induced during sexual development through the transcription factor StuA." Eukaryot Cell **1**(5): 725-35.
- Seifried, H. E., D. E. Anderson, et al. (2007). "A review of the interaction among dietary antioxidants and reactive oxygen species." J Nutr Biochem **18**(9): 567-79.
- Skromne, I., O. Sanchez, et al. (1995). "Starvation stress modulates the expression of the Aspergillus nidulans brlA regulatory gene." Microbiology **141** (Pt 1): 21-8.
- Stadtman, E. R. and B. S. Berlett (1997). "Reactive oxygen-mediated protein oxidation in aging and disease." Chem Res Toxicol **10**(5): 485-94.
- Stone, J. R. and S. Yang (2006). "Hydrogen peroxide: a signaling messenger." Antioxid Redox Signal **8**(3-4): 243-70.
- Thannickal, V. J. and B. L. Fanburg (2000). "Reactive oxygen species in cell signaling." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **279**(6): L1005-28.
- Todd, R. B., M. A. Davis, et al. (2007). "Genetic manipulation of Aspergillus nidulans: meiotic progeny for genetic analysis and strain construction." Nat Protoc **2**(4): 811-21.
- Tolbert, N. E. and E. Essner (1981). "Microbodies: peroxisomes and glyoxysomes." J Cell Biol **91**(3 Pt 2): 271s-283s.
- Valko, M., C. J. Rhodes, et al. (2006). "Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer." Chem Biol Interact **160**(1): 1-40.
- Vesce, S., M. B. Jekabsons, et al. (2005). "Acute glutathione depletion restricts mitochondrial ATP export in cerebellar granule neurons." J Biol Chem **280**(46): 38720-8.
- Yelton, M. M., J. E. Hamer, et al. (1983). "Developmental regulation of the Aspergillus nidulans trpC gene." Proc Natl Acad Sci U S A **80**(24): 7576-80.
- Zheng, M., F. Aslund, et al. (1998). "Activation of the OxyR transcription factor by reversible disulfide bond formation." Science **279**(5357): 1718-21.

ANEXO I

Plásmido pTA11



Restricción del plásmido pSilent



Restricción del plásmido roGFP1 con las enzimas XhoI y SphI. La digestión del plásmido con las respectivas enzimas permite la liberación de la roGFP1, la cual se utiliza como sonda.

ANEXO II

Extracción de ADN de *Aspergillus nidulans*

1. Se obtiene la película de micelio cultivado aproximadamente por 12 horas, se seca con papel absorbente y se introduce en un tubo eppendorf de 1.5 μL y se sumerge en nitrógeno líquido, por último se liofiliza por 4 horas.
2. El micelio liofilizado se pulveriza con ayuda de una espátula.
3. Adicionar 800 μL de buffer de extracción.
4. Calentar los tubos a 68°C por 30 minutos.
5. Remover los tubos del calentamiento y darles un spin en la micro-centrifuga a temperatura ambiente por 5 minutos.
6. Transferir el sobrenadante a un tubo nuevo.
7. Adicionar 50 μL de acetato de potasio (KCH_3CO_2)
8. Agitar y colocar en hielo por 8 minutos
9. Dar un spin por 5 minutos para precipitar el KCH_3CO_2 .
10. Transferir el sobrenadante a un tubo nuevo
11. Adicionar 600 μL de isopropanol. Agitar bien.
12. Dar un spin por 10 minutos.
13. Resuspender el pellet en 300 μL de buffer TE.
14. Calentar por 1 hora a 68°C ó a 4°C toda la noche.
15. Después del calentamiento, dar un spin a las muestras por 5 minutos.
16. Transferir el sobrenadante a un tubo nuevo.
17. Adicionar 800 μL de Etanol al 95% y 15 μL de cloruro de litio 10M. Disolver bien y poner en hielo por 5 minutos.
18. Dar un spin por 5 minutos. Descartar el sobrenadante.
19. Adicionar 800 μL de Etanol al 70%, resuspender el pellet y dar un spin por 5 minutos.
20. Resuspender el ADN en 100 μL de buffer TE y calentar las muestras a 68°C por 1 hora.

Soluciones utilizadas

- ❖ Buffer de extracción:

50Mm de EDTA

0.2% SDS

- ❖ KCH_3CO_2 , 3M, pH= 5.2.
- ❖ Isopropanol puro
- ❖ Buffer TE

- ❖ Etanol al 95%
- ❖ Etanol al 70%
- ❖ Cloruro de litio (LiCl)

Análisis tipo Southern Blot

Transferencia

1. Tomar una buena foto del gel
2. Marcar los pesos moleculares con un pipeta Pasteur.
3. Incubar el gel en una solución (fresca) de HCl 0.25N, durante 15 minutos a temperatura ambiente con agitación constante.
4. Enjuagar 3 veces con agua destilada
5. Incubar en solución desnaturalizante durante 30 minutos, a temperatura ambiente con agitación constante.
6. Enjuagar 3 veces con agua destilada.
7. Incubar en una solución neutralizante 30 minutos a temperatura ambiente.
8. Cortar una membrana de Hybond N del tamaño exacto del gel. Cortar dos piezas largas de papel Watman de 11cm de ancho. Cortar 4 piezas de papel Watman de 11x14 cm.
9. Poner en un refractario-pyrex un poco de buffer SSC 20X (300 mL).
10. Colocar de manera horizontal un vidrio más largo que el refractario. Mojar los dos filtros largos en el SSC 20X y colocarlos a manera de puente a lo ancho del vidrio.
11. Eliminar con ayuda de una pipeta las burbujas que queden entre el vidrio y el papel.
12. Poner el gel invertido (con los pozos hacia abajo), sobre el papel, con cuidado de no formar burbujas. Esto se hace para que la membrana sea una imagen exacta de lo que se ve en el gel.
13. Poner la membrana encima del gel (manejar siempre con guantes) y marcar alguno de los dos extremos superiores del gel y de la membrana para identificar la orientación.
14. Rodear las 4 orillas del gel con agapack.
15. Poner dos piezas de papel Watman mojado con SSC 20X sobre la membrana, evitando las burbujas.
16. Después poner las otras dos piezas de papel Watman secas.
17. Poner una pila de papel absorbente con una altura aproximada de 10 cm.
18. Colocar un virio en la parte superior y sobre este un matraz de 500 mL con la mitad de agua.
19. Transferir mínimo 12 horas.
20. Al día siguiente remover cuidadosamente la membrana y el gel. Invertir y marcar con un lápiz los pesos moleculares y las posiciones de los pozos.
21. Dejar secar la membrana al aire.
22. Fijar con luz U.V. en el stratalinker.

Soluciones utilizadas

- ❖ HCl 0.25 N
10.5 mL de HCl, aforar a 500mL.
- ❖ Solución desnaturalizante

- 1.5 M NaCl
- 0.5 M NaOH
- ❖ Solución neutralizante
 - 1.5 NaCl
 - 0.5 M Tris-HCl pH 7.2
- ❖ Buffer SSC
 - NaCl 3M
 - Ac. Cítrico 0.3M
 - Aforar a 3L y ajustar pH a 7 con HCl

Hibridación

Tomar todo con guantes

1. Antes de prehibridar remojar la membrana en una solución de SSC 2X.
2. Poner a prehibridar la membrana en una solución de hibridación que contenga ADN de esperma de salmón 100 µg/mL (previamente hervido por 5 minutos y transferido a hielo inmediatamente).
3. La prehibridación se realiza a 65° C por un mínimo de dos horas.
4. Marcaje de la sonda
 - A) Tomar aproximadamente 5 µL de la sonda y llevarla a un volumen final de 45 µL con TE. Calentar por 5 minutos y posteriormente colocar en hielo por otros 5 minutos. Agregar aproximadamente 1 µL de marca radiactiva y dejar actuar por 30 minutos a temperatura ambiente.
 - B) Calentar por 5 minutos y transferir a hielo por otros 5 minutos.
5. Pasado el tiempo de prehibridación, descartar la solución y sustituirla por nueva solución de hibridación a la cual se le añade ADN de esperma de salmón 100 µg/mL mezclado con la sonda marcada.
6. Dejar hibridando toda la noche a 65° C.

Soluciones utilizadas

- ❖ Solución de hibridación
 - Solución de Denharts 5X
 - SSC 20X
 - Buffer de fosfato de sodio 2M, pH 6.5
 - SDS10%

Lavados

1. Retirar la solución de hibridación y adicionar el buffer de lavado A (calentado previamente a 65°C). Lavar mínimo 45 minutos.
2. Realizar un segundo lavado a 65 °C por al menos 45 minutos con el buffer B (precalentado).
3. Poner a exponer la membrana con un film sensible a radiación.

Soluciones utilizadas

- ❖ Buffer de lavado A
SSC 2X
SDS 0.1%
- ❖ Buffer de lavado B
SSC 0.1X
SDS 0.1%

Soluciones transformación por protoplastos

- ❖ Mycelium wash:
0.6 M MgSO₄, esterilizar y guardar a 4°C
- ❖ Medio Osmótico
1.2 M MgSO₄
10 mM NaPB
Ajustar pH a 5.8 con 1 M Na₂HPO₄
Filtrar para esterilizar y guardar a 4°C
- ❖ Trapping Buffer
0.6 M Sorbitol
0.1M Tris-HCl, pH 7.0
Esterilizar y guardar a 4°C
- ❖ Buffer STC
1.2 M Sorbitol
10mM CaCl₂
10mM Tris-HCl, pH 7.5
Esterilizar y guardar a 4°C
- ❖ Polietilenglicol (PEG)
60% PEG 4000 (BDH) ó 350 (Sigma)
10 mM CaCl₂
Esterilizar y guardar a temperatura ambiente.

Soluciones utilizadas durante la observación de roGFP

DTT 10 mM: Se pesa la cantidad necesaria de DTT y se solubiliza en Buffer de fosfatos (KH₂PO₄/K₂HPO₄) 0.1M, pH 7.0.

Dimedona 0.1mM: Se pesa la cantidad necesaria de dimedona y se disuelve en etanol al 50%.

DL-Butionina-Sulfoximina: Se pesa la cantidad necesaria de DL-Butionina-Sulfoximina y se solubiliza en Buffer de fosfatos (KH₂PO₄/K₂HPO₄) 0.1M, pH 7.0.