



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

La función e interacción de los factores transcripcionales NapA y SrrA en la respuesta antioxidante y la diferenciación celular en el hongo *Aspergillus nidulans*

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:

QFB. Ariann Elizabeth Mendoza Martínez

TUTOR PRINCIPAL

Jesús Aguirre Linares, Instituto de Fisiología Celular

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. Marina Macías Silva, Instituto de Fisiología Celular

Dr. Luis Servín González, Instituto de Investigaciones Biomédicas

MÉXICO, D. F. Noviembre, 2014



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.

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 IN207913 de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico-UNAM (PAPIIT-UNAM) y al donativo de colaboración DFG-CONACYT Alemania-México 1011019310 y CONACYT 153256.

Se agradece a la Unidad de Microscopía, a la Unidad de Biología Molecular y a la Unidad de cómputo del Instituto de Fisiología Celular.

Contenido

INTRODUCCIÓN	1
1. Las especies reactivas del oxígeno	1
1.1 Generalidades	1
1.2 La generación y eliminación de ERO.....	2
2. Las patologías relacionadas con las ERO	4
3. El papel de las ERO en la señalización celular	6
3.1 Sistemas de fosforrelevo que responden al estrés oxidativo	7
3.2 Los factores de transcripción tipo AP-1.....	12
4. <i>Aspergillus nidulans</i> como modelo de estudio.....	17
4.1 Reproducción asexual	17
4.2 Reproducción sexual	18
4.3 Ciclo parasexual	19
5. Respuesta celular al estrés oxidativo en <i>Aspergillus nidulans</i>	20
HIPÓTESIS	22
OBJETIVO GENERAL	22
OBJETIVO PARTICULARES	22
RESULTADOS.....	23
1. El fenotipo de conidiación $\Delta srrA$ predominó en las mutantes dobles y triples con este fondo genético	23
2. Los factores transcripcionales NapA, SrrA y AtfA juegan diferentes papeles en la respuesta antioxidante y el desarrollo en <i>Aspergillus nidulans</i>	25
3. La activación de NapA no está mediada por GpxA ni TpxA	27
4. El factor transcripcional NapA está involucrado en la asimilación de arabinosa y fructosa como fuentes de carbono.....	29
5. La proteína SrrA se localiza en el núcleo	32
6. Los FT NapA y SrrA interaccionan en el núcleo en presencia de H ₂ O ₂	33
7. El transcriptoma de las esporas de la mutante $\Delta napA$ indica que NapA está involucrada en algunos procesos de detoxificación celular, la respuesta antioxidante y el catabolismo de fuentes alternativas de carbono.....	36
DISCUSIÓN	44
1. Los factores transcripcionales NapA, SrrA y AtfA juegan un papel diferencial en la respuesta al estrés oxidativo	44

2. SrrA participa en la regulación del metabolismo secundario	45
3. NapA y SrrA interactúan físicamente en respuesta al H ₂ O ₂	45
4. GpxA y TpxA no se requieren para la función de NapA	46
5. NapA regula la utilización de diversas fuentes de carbono alternativas.....	46
CONCLUSIONES.....	49
PERSPECTIVAS.....	50
MATERIALES Y MÉTODOS	51
Cepas, medios y condiciones de crecimiento de <i>A. nidulans</i>	51
Generación de dobles y triples mutantes mediante cruza sexuales.....	51
Eliminación de los genes mediante la técnica de “double joint PCR” y transformación de <i>A. nidulans</i>	53
Eliminación de los genes <i>gpxA</i> y <i>tpxA</i>	53
Generación de la fusión <i>SrrA::GFP</i>	54
Extracción de ADN	54
Microscopía	54
Cuantificación del número de esporas/cm ²	55
Complementación de fluorescencia bimolecular (BiFC).....	56
Transcriptómica en mutantes <i>ΔnapA</i>	57
Extracción de RNA.....	57
Cuantificación y calidad del RNA.....	57
REFERENCIAS	65

Resumen

La habilidad de los organismos para responder a los cambios ambientales y hacer frente a los diferentes tipos de estrés es vital para crecer y sobrevivir. La percepción y regulación de los niveles de especies reactivas del oxígeno (ERO) es fundamental para mantener la homeostasis celular. Las ERO son derivados más reactivos que el oxígeno en su estado basal y tradicionalmente se consideran como sub-productos dañinos para las células. Sin embargo, cada vez hay más evidencia que muestra que las ERO juegan un papel central en la señalización celular. En la levadura *Sacharomyces cerevisiae*, los factores transcripcionales (FT) Skn7 y Yap1 se activan en presencia de estrés oxidativo (H_2O_2) e inducen la expresión de genes involucrados en la respuesta antioxidante y la homeostasis redox. Skn7 y Yap1 inducen genes en común en presencia de H_2O_2 formando un heterodímero y lo mismo ocurre con los FT Prr1 y Pap1 en *Schizosaccharomyces pombe*. En el hongo filamentoso *Aspergillus nidulans* los FT SrrA (ortólogo de Skn7), NapA (ortólogo de Yap1) y AtfA también son esenciales para la respuesta al estrés oxidante, ya que las mutantes carentes de estas proteínas son sensibles al H_2O_2 . En este trabajo hemos generado y caracterizado mutantes que carecen de uno, dos y tres de estos FT. Nuestros resultados muestran que NapA, SrrA y AtfA juegan papeles diferentes en la respuesta al estrés oxidante. Mientras que NapA es primordial para la respuesta al estrés en las esporas, SrrA es más importante en el micelio. Utilizando la técnica de complementación de bifluorescencia molecular determinamos que NapA y SrrA tienen una interacción en el núcleo en presencia de H_2O_2 . Sin embargo, es claro que cada FT posee funciones específicas tanto en la respuesta antioxidante como en la utilización de fuentes de carbono alternativas. NapA se requiere para la asimilación de la arabinosa y la fructosa, mientras que SrrA se requiere para la asimilación del glicerol. A partir del análisis transcriptómico de esporas asexuales de una cepa mutante $\Delta napA$, en comparación con esporas de silvestres, encontramos que NapA se requiere para la acumulación de los transcritos de los genes *alcA* y *aldA*, los cuales codifican para las enzimas alcohol deshidrogenasa y aldehído deshidrogenasa, respectivamente. Estas enzimas son esenciales para la utilización de etanol en *A. nidulans*. Consistente con esto, la mutante $\Delta napA$ es incapaz de crecer en etanol como única fuente de carbono y muestra cierta desrepresión catabólica en medio con glucosa y alcohol alílico, sugiriendo que NapA también regula procesos de represión por catabolito. El estudio transcriptómico también indica que durante la conidiación NapA regula la inducción de al menos 202 genes y la represión de al menos 13 genes. Un alto porcentaje de los transcritos que requieren a NapA para su acumulación corresponden a genes relacionados con actividades de oxidoreductasas, homeostasis redox, transporte y desintoxicación celular.

INTRODUCCIÓN

1. Las especies reactivas del oxígeno

1.1 Generalidades

El oxígeno molecular (O_2) es esencial para la vida, ya que los organismos aerobios lo utilizan como aceptor final de electrones durante la oxidación de la glucosa y otros sustratos. La reducción incompleta del O_2 a agua durante la respiración da lugar a la formación de compuestos intermediarios conocidos como especies reactivas del oxígeno (ERO). Las células del cuerpo humano metabolizan durante la respiración aproximadamente 10^{12} moléculas de oxígeno por día, en donde cerca del 1% del O_2 metabolizado se transforma en ERO (Jackson and Loeb 2001).

Las ERO son más reactivas que el oxígeno en su estado basal. Algunas ERO como el anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) se producen por la reducción parcial del oxígeno, mientras que otras como el oxígeno en singulete (1O_2) y el ozono (O_3) se forman por excitación del mismo. En los eucariontes, las ERO se generan principalmente durante la cadena de transporte de electrones mitocondrial, así como por diversas enzimas entre las cuales están las lipooxigenasas, la hipoxantina/xantina oxidasa (Finkel 2011) y las NADPH oxidasas (Kamata and Hirata 1999). De igual manera, también se producen ERO por reacciones en las que participan algunos metales pesados y agentes genotóxicos, la luz UV, agentes alcalinos y algunas drogas. Las ERO perturban el estado redox de la célula y cuando se encuentran en altos niveles pueden inducir daño tóxico a los lípidos, las proteínas y el DNA, causando finalmente muerte celular. Por ello, tradicionalmente las ERO se han considerado como sub-productos dañinos del metabolismo celular asociados con numerosos procesos patológicos, incluyendo mutaciones, cáncer, diabetes, problemas vasculares y las enfermedades de Parkinson y Alzheimer. Sin embargo, durante la última década, diversos estudios han llevado a la conclusión de que las ERO actúan como señales fisiológicas que regulan diversos procesos celulares.

1.2 La generación y eliminación de ERO

Existen tres grandes fuentes intracelulares de ERO, una de ellas proviene de las enzimas de la familia de las NADPH oxisadas (NOX), las cuales generan $O_2^{\bullet-}$ mediante la transferencia de electrones del NADPH al oxígeno (Aguirre and Lambeth 2010). Esta familia de enzimas comúnmente conocida como enzimas NOX fue descrita por primera vez en neutrófilos, un tipo de células especializadas que participan en procesos de inflamación y respuesta inmune. En particular, estas células pueden introducir microorganismos por fagocitosis y posteriormente inactivarlos con ayuda de las ERO y enzimas hidrolíticas que se encuentran dentro de un compartimento especializado llamado fagosoma (Hampton, Kettle et al. 1998).

La mitocondria es otra fuente que produce grandes cantidades de $O_2^{\bullet-}$, principalmente en el complejo I y III de la cadena respiratoria. El complejo I es la principal fuente de $O_2^{\bullet-}$ debido al flujo reverso de electrones desde el complejo II en condiciones de bajo ADP. Se sabe muy poco de la regulación *in vivo* de la producción de ERO en la mitocondria; sin embargo se ha propuesto que existen varios factores, como el potencial de membrana, que influyen en su generación. En general, un incremento en la fuerza protón-motriz es asociado con el incremento en la producción de ERO, mientras que un decremento en la fuerza protón-motriz resulta en una disminución de la generación de ERO (Mailloux and Harper 2012).

Los peroxisomas son otra fuente importante de producción de H_2O_2 , ya que contienen 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 and Essner 1981). Las ERO también pueden ser producidas en la célula por diversas reacciones que involucran a las enzimas xantina oxidasa, las ciclooxigenasas, lipooxigenasas, mieloperoxidasas, aldehído oxidasas y enzimas del tipo citocromo P-450 (Finkel 2011).

La ubicuidad de las ERO ha permitido el desarrollo de múltiples mecanismos antioxidantes, los cuales previenen el daño celular. Los sistemas antioxidantes se dividen principalmente en dos categorías: sistemas enzimáticos y no enzimáticos.

Entre los sistemas no enzimáticos se encuentran los compuestos antipropagadores, los cuales reaccionan directamente con los agentes oxidantes, tales como la vitamina C, la vitamina E, el β -caroteno, el ácido úrico, el glutatión, los fenoles, los furfurales, las furanonas y algunos pigmentos como los carotenoides y las melaninas, muchos de estos presentes en los hongos (Davies 2000).

Entre los sistemas enzimáticos encontramos a las superóxidos dismutasas (SODs), las catalasas (CAT), las peroxidasas de glutatión (Gpx), las S-transferasas de glutatión (GST), las tioredoxinas (Trx) y las peroxirredoxinas (Prx) (Davies 2000).

El $O_2^{\bullet-}$ puede dismutar espontáneamente o con ayuda de la SOD. Esta última cataliza la reacción: $O_2^{\bullet-} + O_2^{\bullet-} + 2H^+ \longrightarrow H_2O_2 + O_2$. Todos los miembros de la familia SOD utilizan metales de transición en su sitio activo para llevar a cabo la desintoxicación de ERO, por lo que existen varios tipos de SODs: las que contienen Cu^{2+} y Zn^{2+} y, las que poseen Mn^{3+} o Fe^{3+} . Los organismos procariontes típicamente tienen tanto Fe-SOD como Mn-SOD, mientras que las células eucariontes suelen poseer una Mn-SOD mitocondrial y una Cu/Zn-SOD citosólica (Halliwell 1999, Kamata and Hirata 1999).

El H_2O_2 generado por la SOD o cualquier otro medio se descompone en agua y oxígeno mediante la intervención de las enzimas CAT y Gpx. Las catalasas dismutan dos moléculas de H_2O_2 para generar agua a expensas de la oxidación/reducción reversible del hierro en su grupo hemo (Halliwell 2006). Las peroxidasas son enzimas que descomponen el H_2O_2 a agua, algunas lo llevan a cabo con la concomitante oxidación de dos residuos de cisteína, lo cual da lugar a la formación de puentes disulfuro. Dependiendo del donador de electrones existen dos clases de peroxidasas: las glutatión peroxidasas (GPX) utilizan al glutatión como agente reductor y las tioredoxina peroxidasas (TPX) que utilizan a la tioredoxina como agente reductor (Brigelius-Flohe 2006).

A pesar de que el $O_2^{\bullet-}$ y el H_2O_2 juegan un importante papel fisiológico a bajas concentraciones, su toxicidad reside en su facilidad para reaccionar con metales de transición y formar el radical hidroxilo (HO^{\bullet}). El HO^{\bullet} es la más reactiva 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. En la Fig. 1 se puede resumir las distintas fuentes intracelulares de ERO así como su eliminación.

La homeostasis redox se refiere a un equilibrio entre las concentraciones de ERO y la capacidad antioxidante. Cuando se produce un incremento en la concentración intracelular de ERO ocasionada por la disminución de la capacidad antioxidante o por un aumento en su generación, se produce un estado llamado estrés oxidante.

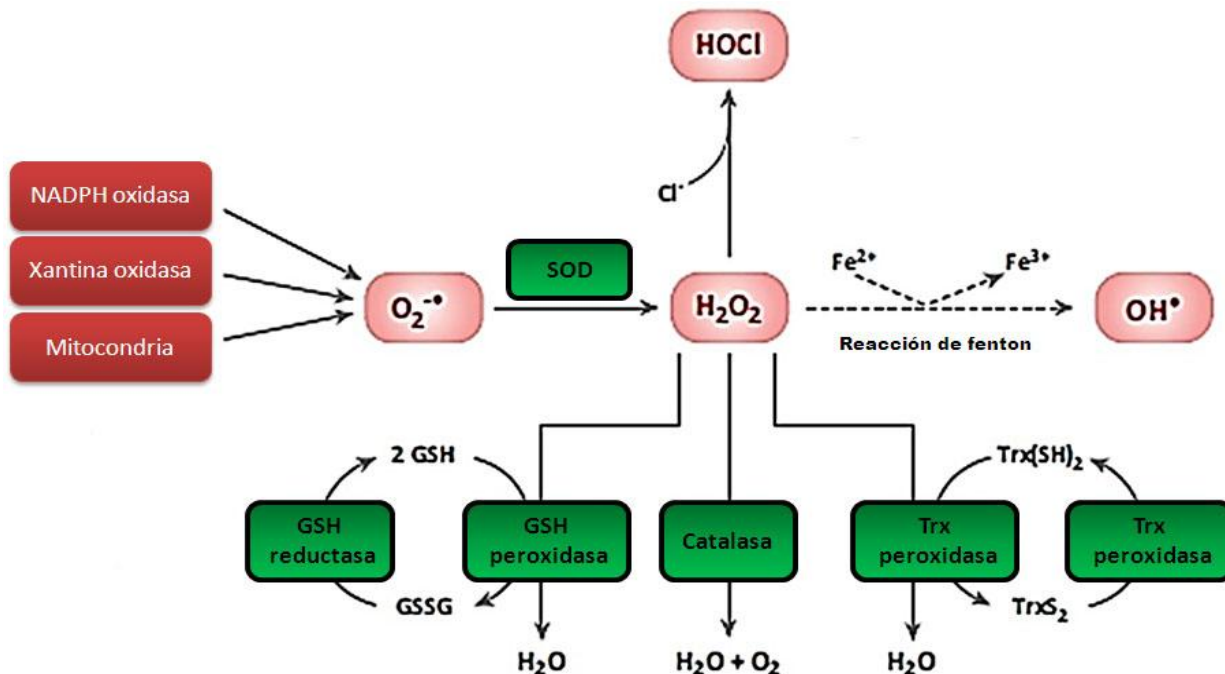


Figura 1. La formación y la detoxificación de las ERO. El anión superóxido puede producirse tanto por enzimas como la xantina oxidasa y las NADPH oxidasas, como por fugas de electrones en la cadena respiratoria mitocondrial. El $O_2^{\cdot-}$ puede dismutar de manera espontánea o por acción de la enzima superóxido dismutasa (SOD), dando lugar a la formación de peróxido de hidrógeno (H_2O_2). El H_2O_2 se descompone en H_2O y O_2 mediante la acción de las enzimas catalasa (CAT) ó las peroxidasa de glutatión y/o tiorredoxinas. La toxicidad del H_2O_2 reside en su capacidad para reaccionar con metales de transición para así generar radicales hidroxilo (OH^\bullet). El OH^\bullet es la más reactiva de las ERO, ya que es capaz de reaccionar en el sitio donde se forma. (Modificado de (Li, Horke et al. 2013).

2. Las patologías relacionadas con las ERO

Por muchos años las ERO se han considerado como sub-productos dañinos para la célula, esto debido a su incidencia en varias condiciones patológicas como: enfermedades cardiovasculares, cáncer, desórdenes neurológicos, isquemia/reperfusión y envejecimiento, además de muchas otras.

2.1 El cáncer y las ERO

Una de las primeras relaciones de las ERO en procesos carcinogénicos es el desequilibrio redox que existe en células cancerígenas en comparación con células normales, (Valko, Rhodes et al. 2006) además en varios tipos de tumores se han identificado más de 100 tipos de productos de oxidación del DNA que son considerados como marcadores de procesos carcinogénicos (Marnett 2000). Por otro lado, las células tumorales expresan una isoforma específica de la enzima piruvato cinasa (piruvato cinasa M2, PKM2) (Christofk, Vander Heiden et al. 2008) cuya oxidación en un

residuo específico de cisteína hace que la ruta se desvíe de la producción de glucólisis hacia la vía de las pentosas fosfato, generando un desbalance de la producción de NADPH y del glutatión en su forma reducida (GSH) (Anastasiou, Pouligiannis et al. 2011). La senescencia celular es otro proceso que liga a las ERO con el cáncer, la evidencia indica que este proceso inducido por los oncogenes RAS (Lee, Fenster et al. 1999) y p53 (Vigneron and Vousden 2010) está asociada con alteraciones en las concentraciones de ERO. Mutaciones en estos oncogenes incrementan los mecanismos de defensa antioxidante y este proceso está relacionado con el crecimiento tumoral. Lo anterior podría explicar el hecho de que los antioxidantes en ciertos casos incrementan el riesgo de cáncer, posiblemente permitiendo que las células que acumulan mutaciones eviten el proceso de senescencia mediado por ERO (DeNicola, Karreth et al. 2011).

2.2 Las ERO y enfermedades cardiovasculares

Existe evidencia de que el estrés oxidativo juega un papel en varias enfermedades cardiovasculares como la aterosclerosis, la hipertensión, diversas cardiopatías e hipertrofia cardíaca (Kukreja and Hess 1992). En pacientes con hipertensión existe un aumento de $O_2^{\cdot-}$ y H_2O_2 , acompañado de una reducción en los niveles antioxidantes tales como la vitamina E, el glutatión y la SOD (Romero and Reckelhoff 1999). La sobreproducción de angiotensina II es un paso crítico en la hipertensión y estudios han demostrado que esta hormona incrementa la formación de ERO a través de las células vasculares del músculo liso (Laursen, Rajagopalan et al. 1997). Por otra parte, la aterosclerosis se ha visto asociada con altos niveles de LDL (low density lipoproteins) oxidada (LDL_{ox}) que participa en el incremento de la formación de $O_2^{\cdot-}$, lo cual conlleva a la apoptosis de las células en la pared vascular umbilical. La LDL_{ox} también genera otras ERO asociadas a la formación de la placa de ateroma (Podrez, Abu-Soud et al. 2000).

2.3 Las ERO y el envejecimiento

La asociación entre el envejecimiento y las ERO se propuso hace ya más de 50 años con los estudios de Denham Harman (Harman 1956), en donde se propone que el deterioro que ocasionan las ERO que se producen durante el metabolismo aerobio causa daño al DNA, a los lípidos y a las proteínas que se van acumulando a través del tiempo. Sin embargo, con el paso de los años este tema ha sido muy controversial; ya que, así como existen datos que apoyan esta teoría existen otros más que llegan a diferentes conclusiones. Un estudio que utilizó un ratón que tiene una reducción en la expresión de la SOD2, reportó un incremento en los niveles de ERO, pero no mostró envejecimiento acelerado (Van Remmen, Ikeno et al. 2003). Estos mismos resultados también se observaron en experimentos similares con gusanos, en donde incluso se observó un aumento en el tiempo de vida (Yang, Li et al. 2007). La relación entre las ERO y el

envejecimiento recientemente ha tomado otro giro, en el cual se propone que las ERO podrían tener un papel benéfico en la regulación del tiempo de vida. Esta evidencia está relacionada con el fenómeno de hormé시스, el cual se refiere a que una pequeña cantidad de estrés protege a la célula u organismo de un subsecuente estrés prolongado. En este contexto, las ERO de la mitocondria encienden vías de señalización que conllevan a un programa cito-protector que extiende el tiempo de vida de un organismo. Dicho fenómeno se ha observado en gusanos (Schulz, Zarse et al. 2007) y levaduras (Pan, Schroeder et al. 2011).

3. El papel de las ERO en la señalización celular

La naturaleza reactiva de las diferentes ERO las hace tóxicas para la célula. Como consecuencia, si las ERO no son neutralizadas por compuestos o enzimas antioxidantes, éstas podrían causar daños irreversibles a nivel de proteínas, lípidos y DNA. Sin embargo, en el particular caso de las ERO que reaccionan con proteínas, existe pequeñas y controladas fluctuaciones de concentración de ERO que pueden jugar un papel en la señalización celular (Hansberg, de Groot et al. 1993).

Cada vez existe mayor evidencia del papel de las ERO como segundos mensajeros en la regulación de una variedad de procesos biológicos. En células de humano se ha encontrado que niveles bajos de H_2O_2 y $O_2^{\bullet-}$ estimulan la proliferación de células del músculo liso (Mesquita, Dyer et al. , Rao and Berk 1992), macrófagos (Arana, Gangoiti et al. 2012) y células del endotelio vascular (Iruthayanathan, O'Leary et al. 2011). La influencia de las ERO en los procesos fisiológicos está basada en su habilidad para modificar la actividad de proteínas sensibles a condiciones redox. En presencia de ERO el dominio sensible se oxida de manera reversible. La consecuencia del cambio oxidante es la iniciación de eventos acoplados a la modificación de la actividad de proteínas río abajo y/o factores transcripcionales. Los organismos contienen varias estructuras sensibles a la modificación óxido/reducción, por ejemplo los residuos de cisteína, metionina, triptófano y tirosina. El H_2O_2 por sus características (difusión a través de las membranas, baja reactividad y alta estabilidad) es capaz de funcionar como molécula señalizadora a través de la oxidación directa de residuos desprotonados de cisteína induciendo la formación de ácido sulfénico y puentes disulfuro, así como también glutationilación o la sulfoxidación de residuos de cisteína (Giorgio, Trinei et al. 2007). La oxidación reversible de los residuos de cisteína dependiente de H_2O_2 involucra a una gran variedad de proteínas, incluyendo a las tirosin-fosfatasa, a las cinasas y a algunos factores de transcripción (Veal, Day et al. 2007). Recientemente se encontró que la polimerización de actina (Hung, Spaeth et al. 2013) y la cinasa dependiente de calcio/calmodulina (CAMKII) (Erickson, Joiner et al. 2008) son reguladas por la

oxidación específica en residuos de metionina de manera reversible. En el epitelio del intestino, la NOX1 y la DUOX2 se expresan abundantemente, las bacterias comensales estimulan el incremento de ERO mediado por estas enzimas (Kumar, Wu et al. 2007), proceso que a su vez conlleva a la proliferación de células intestinales manteniendo la homeostasis celular (Jones, Luo et al. 2013). Recientemente se encontró que las ERO producidas en la mitocondria (mERO) participan en la función de la células T. En un ratón, en cuyas células T el complejo III de la cadena de transporte de electrones se inactivó condicionalmente se observó un decremento en la producción de mERO acompañado de un defecto en la activación de células T y la expansión clonal (Jones, Luo et al. 2013). En hongos, la oxidación de cisteínas específicas en factores transcripcionales tipo AP-1, se lleva a cabo específicamente por H₂O₂ y trae como consecuencia la producción de enzimas antioxidantes y de reparación (Veal, Day et al. 2007).

En el hongo *Neurospora crassa*, al inicio de cada etapa morfogénica hay una sobreproducción de ERO que supera la capacidad celular para contener con ellas, lo que genera un estado hiperoxidante (Hansberg, de Groot et al. 1993). Éstas y otras evidencias llevaron a proponer que la diferenciación celular es una respuesta al estado hiperoxidante y que los mecanismos de diferenciación celular son mecanismos de evasión al estrés oxidante (Hansberg and Aguirre 1990, Aguirre, Rios-Momberg et al. 2005).

3.1 Sistemas de fosforrelievo que responden al estrés oxidativo

La habilidad de los organismos para responder a los cambios ambientales y hacer frente a los diferentes tipos de estrés es vital para crecer y sobrevivir. En algunos organismos, la percepción y respuesta a condiciones de estrés ambiental está mediada por un grupo de receptores ligados directamente a diversas vías de señalización que actúan río abajo.

En bacterias, este proceso depende en su mayoría de los sistemas de dos componentes, los cuales consisten en una cinasa sensora (HK) que tiene un dominio sensor no conservado y un dominio transmisor con un residuo de histidina (His) altamente conservado (Hess, Bourret et al. 1988). El segundo componente, llamado regulador de la respuesta (RR), tiene un dominio efector no conservado y un dominio receptor con un residuo conservado de aspartato. El RR cataliza la transferencia de un grupo fosfato de la HK al aspartato conservado en su dominio receptor. La fosforilación de este residuo causa un cambio conformacional en el RR lo que le permite unirse a diversas moléculas y responder así al estímulo. Entre las moléculas de unión del RR se encuentran el DNA, el RNA y algunas proteínas (Galperin 2010). A diferencia de los procariontes, en los organismos eucariotes, como las levaduras (Chauhan, Latge et al. 2006) y los hongos

filamentosos (Chauhan and Calderone 2008), se requiere una proteína intermediaria de fosfortransferencia (Hpt), la cual transfiere el grupo fosfato de la HK hacia el RR. En los hongos el sistema de fosforrelevo incluye una HK híbrida, la cual se autofosforila en el dominio de cinasa de histidina transfiriendo posteriormente el grupo fosfato a un dominio receptor interno. El grupo fosfato es trasladado después hacia la Hpt y finalmente al RR (Chauhan, Latge et al. 2006, Chauhan and Calderone 2008).

3.1.1 El sistema de fosforrelevo en *Saccharomyces cerevisiae*

El sistema de dos componentes mejor caracterizado en los hongos es el sistema de respuesta al estrés osmótico en la levadura *S. cerevisiae*. Este organismo presenta una HK (Sln1), una Hpt (Ypd1) y dos RR (Ssk1 y Skn7).

Sln1 es una proteína transmembranal que se localiza en la membrana plasmática y es una HK híbrida que tiene un dominio receptor variable y un dominio transmisor, el cual contiene un residuo de histidina (His) altamente conservado (Ota and Varshavsky 1993). En condiciones de baja osmolaridad, Sln1 se encuentra activa auto-fosforilandose en el residuo de His. Posteriormente, el grupo fosfato se transfiere al residuo de Asp presente en el dominio receptor de Sln1 y de ahí se transfiere al residuo de His que está en la proteína Ypd1 (Posas, Wurgler-Murphy et al. 1996). Finalmente, el grupo fosfato se transfiere de Ypd1 al dominio receptor del RR, Ssk1 (Li, Ault et al. 1998). Cuando la levadura se encuentra en condiciones de alta osmolaridad, se inhibe la actividad de Sln1 y esto hace que se acumule la forma no fosforilada de Ssk1, la cual activa directamente la vía de la MAP cinasa (MAPK) Hog1 (Posas and Saito 1997), Fig. 2.

El otro RR, Skn7, contiene en el extremo N-terminal un dominio de unión a DNA, similar al del factor de choque térmico (HSF1) y un dominio receptor altamente conservado entre los hongos. En este dominio se encuentra el residuo de aspartato (D427) que participa en la vía de fosforrelevo (Fig. 3). El proceso de fosfortransferencia desde Sln1 (Li, Ault et al. 1998) hasta Skn7 a través del intermediario Ypd1 (Ault, Fassler et al. 2002) se ha comprobado en ensayos *in vitro*. A pesar de que Skn7 se encuentra exclusivamente localizado en el núcleo y Ssk1 se encuentra mayoritariamente en el citoplasma, Ypd1 se encuentra tanto en el núcleo como en el citoplasma, por lo cual puede transferir el fosfato a ambos RR (Lu, Deschenes et al. 2003). El fosforrelevo Sln1-Ypd1-Skn7 regula una respuesta complementaria al fosforrelevo Sln1-Ypd1-Ssk1; mientras que Ssk1 se activa bajo condiciones hiper-osmóticas, Skn7 está activado bajo condiciones hiposmóticas. Skn7 también regula la respuesta al estrés oxidativo, mutantes *skn7Δ* son hipersensibles al estrés oxidativo provocado por H₂O₂ (Krems, Charizanis et al. 1996). Este RR se

asocia con la inducción de genes involucrados en la respuesta al estrés oxidante, como la SOD1 (Birmingham-McDonogh, Gralla et al. 1988), la tioredoxina (Chae, Chung et al. 1994), la TPX (Chae, Kim et al. 1993) y la alquil-hidroperóxido reductasa (Lee, Spector et al. 1999). Sin embargo, la respuesta al estrés oxidativo mediada por Skn7 es independiente de la vía de Sn1y de la fosforilación de su D427 (Morgan, Banks et al. 1997). En contraste, la inducción de genes de respuesta a baja osmolaridad, tales como *OCH1*, es dependiente de la vía Sn1 y requiere la fosforilación del D427 de Skn7 (Li, Dean et al. 2002). El gen *OCH1* codifica para una manosiltransferasa del aparato de Golgi que participan en la N-glucosilación de proteínas de membrana, lo que es necesario para el mantenimiento de la pared celular. Dado que las mutantes *skn7Δ* no son osmosensibles, pero la sobre-expresión de *SKN7* suprime la sensibilidad hipo-osmótica de una mutante *pkc1Δ*, se sugiere que *SKN7* y la vía de PKC1 coordinan la integridad de la pared celular, necesaria bajo condiciones de baja osmolaridad (Brown, Bussey et al. 1994).

Snk7 también tiene que ver con la respuesta al estrés por temperatura debido a su interacción con Hsf1 (Raitt, Johnson et al. 2000) y se le ha relacionado con el metabolismo secundario en el hongo *Cryptococcus neoformans*. Mutantes que carecen de *snk7* tienen incrementada la producción de melanina, lo que sugiere que esta proteína tiene un papel negativo en la regulación de genes involucrados en algunas rutas biosintéticas (Bahn, Kojima et al. 2006). Por otro lado, Skn7 es capaz de interactuar con Yap1, un factor transcripcional relacionado con la respuesta antioxidante (Lee, Godon et al. 1999). Dicha interacción es dependiente de la fosforilación de residuos de serina y treonina en el dominio receptor de Skn7. Las mutaciones en este dominio afectan la respuesta al estrés oxidativo de Skn7 y su interacción con Yap1 (He, Mulford et al. 2009). Mog1 es otra proteína que interactúa con Skn7, específicamente en condiciones de estrés osmótico. Mutantes carentes de *mog1* presentan una reducción en la expresión del gen *OCH1* (Lu, Deschenes et al. 2004), lo que sugiere la participación de ambos FT en el mantenimiento de la pared celular.

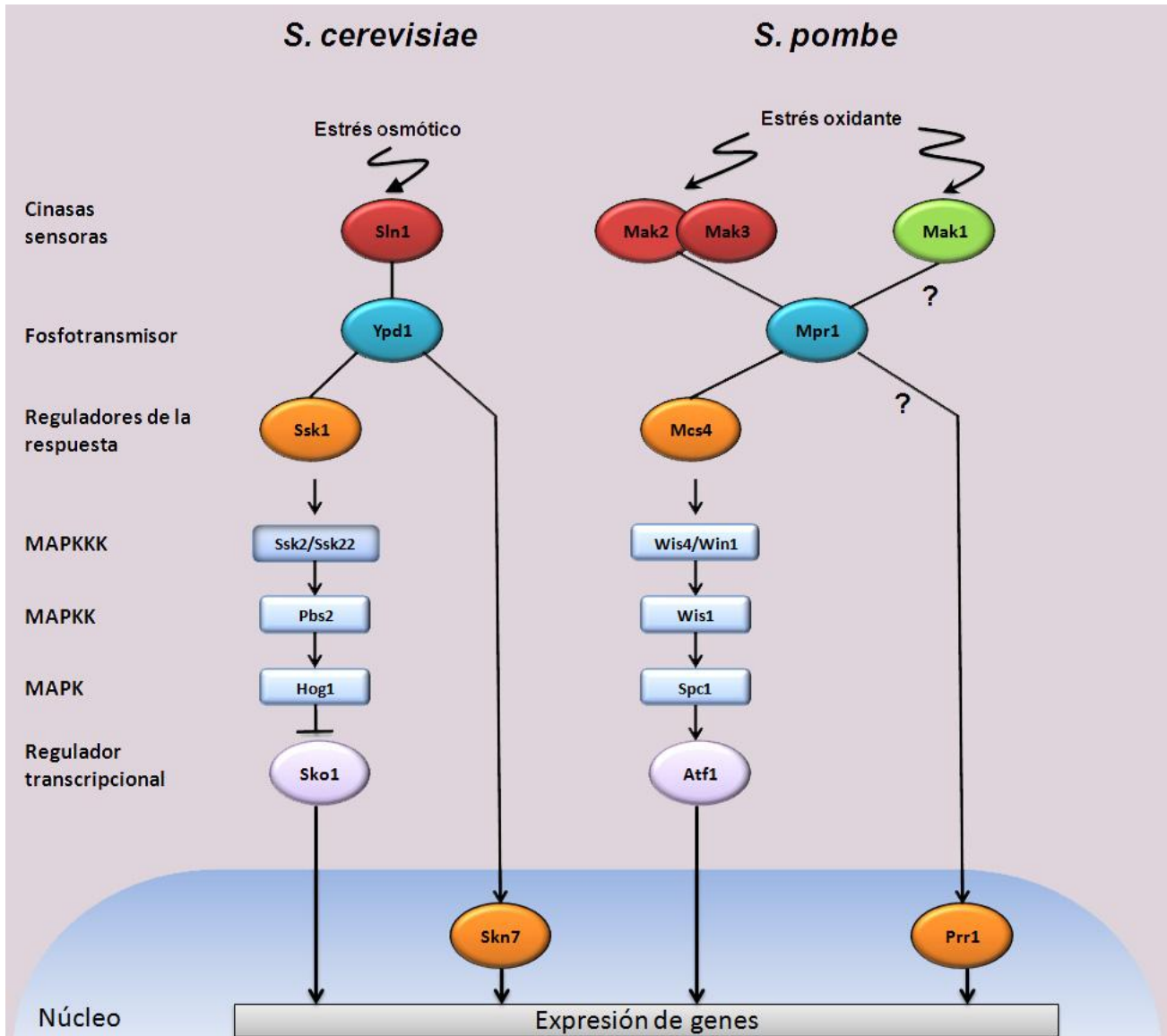


Figura 2. Sistemas de fosforrelevo en las levaduras *S.cerevisiae* y *S.pombe*. En *S. cerevisiae* la proteína Sln1 es la única HK que transfiere la señal de estrés osmótico hacia la proteína Hpt Ypd1, y ésta finalmente transfiere el grupo fosfato a Ssk1; únicamente Ssk1 activa la vía de MAPK Hog1. Mientras que Skn7 se activa en presencia de estrés oxidante de manera independiente de la vía de Sln1. *S. pombe* posee tres HK de las cuales Mak 2 y 3 tienen que ver con la respuesta al estrés oxidante transfiriendo la señal a través de Mpr1 y Mcs4, en donde este regulador de la respuesta es capaz de iniciar la señalización de la vía ortóloga de Hog1. En el caso de Prr1, éste posiblemente se active a través de la HK Mak 1-Mpr1 llevando a cabo la activación de la respuesta al estrés de forma independiente a la vía de Spc1/Sty1.

3.1.2 El sistema de fosforrelevo en *Schizosaccharomyces pombe*

En la levadura *S. pombe* se han descrito tres HKs: Mak1, Mak2 y Mak3 (Buck, Quinn et al. 2001); una proteína Hpt, Mpr1 y dos RR, Mcs4 y Prr1 (Cottarel 1997, Ohmiya, Kato et al. 1999). Las proteínas HK de *S. pombe* no tienen dominios transmembranales, pero presentan otros dominios

llamados PAS, los cuales se encuentran asociados con proteínas que responden a la luz y a cambios redox. Mak2 y Mak3 contienen además un dominio GAF, el cual está presente en factores transcripcionales que responden a condiciones redox en la célula (Cottarel 1997, Ohmiya, Kato et al. 1999). Mediante un mecanismo desconocido aún, la señal de estrés oxidante modula la fosforilación de las cinasas Mak2 y Mak3, quienes transmiten la señal de estrés al RR Mcs4 a través de Mpr1, para posteriormente activar la vía Spc1/Sty1 (homóloga a la MAPK Hog1). La vía Spc1/Sty1 responde a múltiples tipos de estrés, incluyendo H₂O₂, paraquat (Buck, Quinn et al. 2001), irradiación UV (Degols and Russell 1997), agentes alquilantes, arsenito, privación de nutrientes, estrés osmótico (Kato, Okazaki et al. 1996), y también participa en el control del crecimiento y la diferenciación sexual (Shiozaki and Russell 1995).

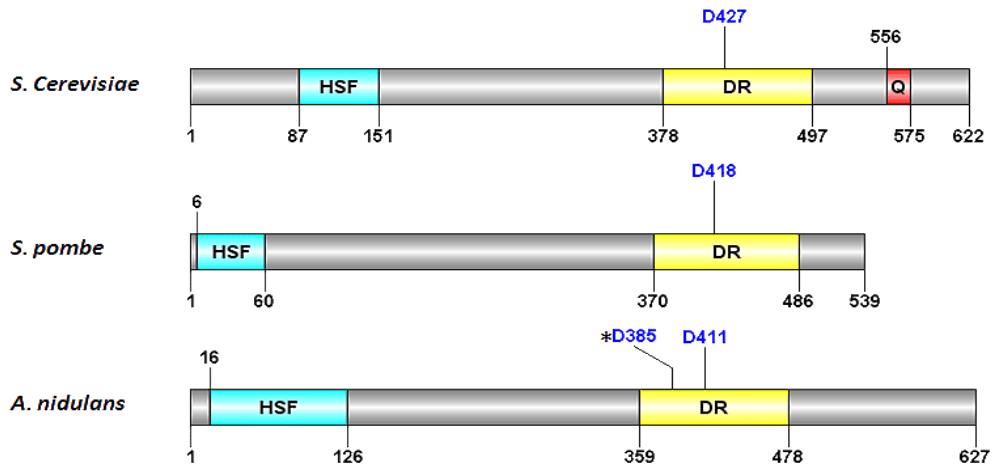


Figura 3. Dominios de las proteínas Skn7 de *S. cerevisiae*, Prr1 de *S.pombe* y SrrA de *A.nidulans*. En azul se encuentra el dominio de unión a DNA tipo HSF (heat shock factor) y en amarillo el dominio receptor altamente conservado. El residuo de Aspartato (D) que participa en el fosforrelievo se indica en azul. Con asterisco se indica el residuo de D385 que ha sido estudiado en *A.nidulans*.

A diferencia de la Mak2 y la Mak3, la Mak1 no se requiere para la activación de la cascada Spc1/Sty1. Sin embargo, mutantes *mak1*⁻ están parcialmente afectadas en la inducción del gen de la catalasa en presencia de H₂O₂, por lo que se ha sugerido que Mak1 regula al otro RR Prr1 (Buck, Quinn et al. 2001), indicando que este RR regula la expresión de genes inducidos por estrés oxidante de forma independiente de la vía Spc1/Sty1 (Buck, Quinn et al. 2001). Al igual que su ortólogo Skn7 en *S. cerevisiae*, Prr1 tiene un dominio de unión al DNA en la parte N-terminal que es similar al del factor de choque térmico HSF1 (Brown, North et al. 1993) y un dominio receptor altamente conservado en el dominio C-terminal (Ohmiya, Kato et al. 1999), (Fig. 3). El Aspartato 418 (D418) en el dominio receptor de Prr1 es el residuo que acepta el fosfato de las HK.

Un alelo con una mutación de D418 por asparagina (D418N) complementa la sensibilidad de una mutante $\Delta prr1$ al terbutil-hidroperóxido, indicando que la respuesta a este compuesto es independiente de la fosforilación del D418 (Ohmiya, Yamada et al. 2000). Las mutantes carentes de *prr1* (Buck, Quinn et al. 2001) son sensibles al H_2O_2 , al cadmio y presentan niveles bajos de expresión de genes que codifican para enzimas antioxidantes como: la catalasa citosólica (*cct*) y la tiorredoxina reductasa (*trr1*). Por otro lado, al igual que Snk7, la eliminación de Prr1 no afecta la actividad de la MAPK Spc1 (Nguyen, Lee et al. 2000) y, por lo tanto Prr1, regula la respuesta al estrés oxidativo independientemente de la vía Spc1-Atf1. Lo anterior se corroboró cuando se observó que una doble mutante *prr1⁻ atf1⁻* presentaba un fenotipo más sensible al H_2O_2 que las correspondientes mutantes sencillas (Buck, Quinn et al. 2001).

Prr1 también participa en el desarrollo sexual ya que se requiere para la expresión de los genes *ste11*, *mam2* y *mei2*, los cuales son necesarios para el inicio de la meiosis. Las mutantes que carecen de *prr1* y *mcs4* no llevan a cabo la reproducción sexual y son estériles (Nakamichi, Yanada et al. 2003).

3.2 Los factores de transcripción tipo AP-1

Los factores de transcripción de la familia AP-1 (Activating Protein-1) se unen al sitio AP-1 (TGACTCA; también conocido como elemento de respuesta TPA) ó a secuencias de DNA parecidas. En los mamíferos, los factores de transcripción AP-1 incluyen proteínas de la familia Jun, Fos y ATF, los cuales forman homodímeros y heterodímeros para regular diversos procesos celulares. Mientras que en los hongos, las proteínas homólogas de los factores AP-1, Yap1 en *S. cerevisiae* (Moye-Rowley, Harshman et al. 1989) y Pap1 en *S. pombe* se han relacionado con la respuesta al estrés oxidante, de manera independiente de las vías SAPK y de fosforrelevo.

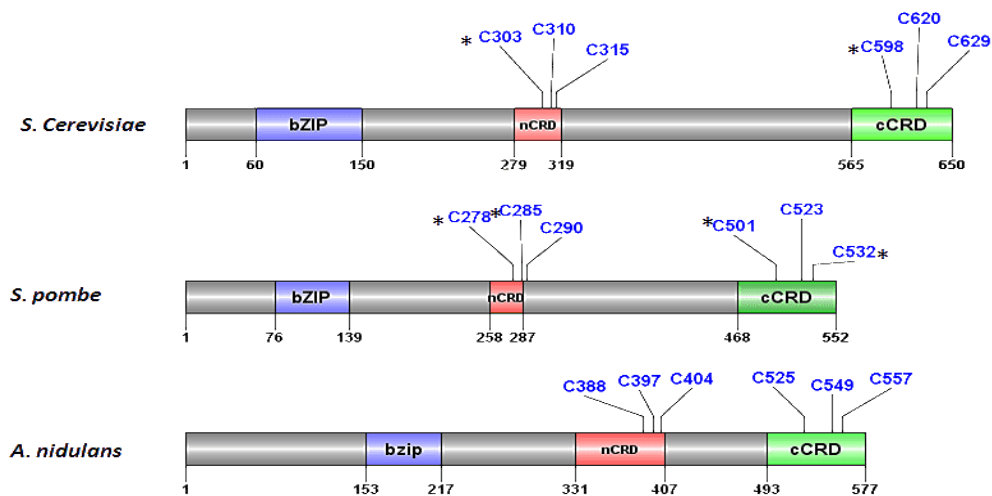


Figura 4. Dominios de las proteínas Yap1 de *S. cerevisiae*, Pap1 de *S. pombe* y NapA de *A. nidulans*. En azul se encuentra el dominio de unión a DNA tipo b-ZIP, rojo el dominio rico en cisteínas en la parte distal del N-terminal (nCRD) y en verde el dominio rico en cisteínas en la parte C-terminal (cCRD). Los asteriscos indican los residuos de cisteína que participan en la formación de puentes disulfuro, en presencia de H₂O₂. En *S. pombe* estas forman dos puentes disulfuro uno, entre las C278-C501 y otro entre las C285 y C532.

3.2.1 El factor de transcripción Yap1 en *S. cerevisiae*

Yap1 es una proteína de 650 aminoácidos que tiene tres dominios: Una secuencia de unión al DNA y una señal de localización nuclear (NLS, Nuclear Localization Signal) en su parte N-terminal, así como una secuencia señal de exportación nuclear (NES, Nuclear Export Signal) en su C-terminal (Moye-Rowley, Harshman et al. 1989); y dominios ricos en cisteínas, cada uno con tres cisteínas en la parte central y C-terminal (nCDR y cCDR, respectivamente)(Fig. 4).

Yap1 es esencial para la sobrevivencia de la levadura en condiciones de estrés oxidativo, por ejemplo, en presencia diamida, electrófilos y cadmio (Azevedo, Tacnet et al. 2003).

En respuesta al H₂O₂, la Cys-598 de Yap1, la cual se encuentra en el dominio cCDR, forma un puente disulfuro con la cisteína oxidada Cys-36 de la proteína Gpx3/Ybp1 (Delaunay, Pflieger et al. 2002). El puente disulfuro intermolecular entre Gpx3-Yap1 se convierte inmediatamente en un puente disulfuro intramolecular entre las Cys-598 y Cys303 dentro de la proteína Yap1. Esto trae como consecuencia un cambio conformacional en la proteína ocultando la NES y por lo tanto la interacción con la exportina Cmr1 (Delaunay, Isnard et al. 2000)(Fig.5). Estos eventos de oxidación de cisteínas se traducen en la acumulación de Yap1 en el núcleo y en la activación de varios genes relacionados con la respuesta antioxidante. Aunque aún se desconoce la función de la proteína Ybp1, se ha sugerido que ésta actúa como una molécula adaptadora necesaria para la interacción entre Gpx3 (Veal, Ross et al. 2003) y Yap1, o para evitar la degradación de Yap1 (Patterson, McKenzie et al. 2003). Después de cierto periodo de acumulación de Yap1 en el

núcleo, ésta finalmente se reduce por las tiorredoxinas Trx1 y Trx2 y retoma su localización citoplasmática.

Yap1 se activa bajo diferentes agentes oxidantes, tales como peróxidos o compuestos modificadores del grupo tiol, como la diamida. Sin embargo, los mecanismos de activación de Yap1 son diferentes dependiendo del agente oxidante (Kuge, Jones et al. 1997). La formación del puente disulfuro que oculta la NES se da en presencia de H_2O_2 en un rango de concentración desde 0.1 hasta 0.8 mM y su localización nuclear se observa en pocos minutos después del tratamiento (Delaunay, Isnard et al. 2000).

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 and Jones 1994), el cual codifica a la tiorredoxina; el gen *GSH1* que codifica para la γ -glutamylcistein sintetasa, enzima involucrada en la biosíntesis del glutatión, y el gen *GLR1* (Gasch, Spellman et al. 2000) que codifica para la glutatión reductasa.

Existe evidencia de que Yap1 coopera con el regulador de la respuesta Skn7 en la expresión de genes bajo condiciones de estrés oxidante. Dado que el fenotipo en H_2O_2 de una mutante doble *skn7 yap1* no es más severo que el de las mutantes sencillas, se sugiere que Yap1 y Skn7 se encuentran en la misma vía (Krems, Charizanis et al. 1996). De igual forma, un estudio reveló que se necesita de Yap1 y Skn7 para la inducción de TRX2 y TRR (reductasa de tiorredoxina). Sin embargo, el análisis del promotor de TRX2 indicó que Yap1 y Skn7 se unen a diferentes secuencias de DNA de manera independiente el uno del otro (Morgan, Banks et al. 1997). Por otra parte, un enfoque proteómico mostró que además de TRX2 y TRR1 existen otras 15 proteínas que se inducen en presencia de H_2O_2 y para dicha inducción es necesaria la presencia de ambos factores transcripcionales, controlando la expresión, no solo de los genes relacionados con el metabolismo antioxidante, sino también con genes relacionados con vías metabólicas que regeneran el glutatión y el NADPH (Lee, Godon et al. 1999).

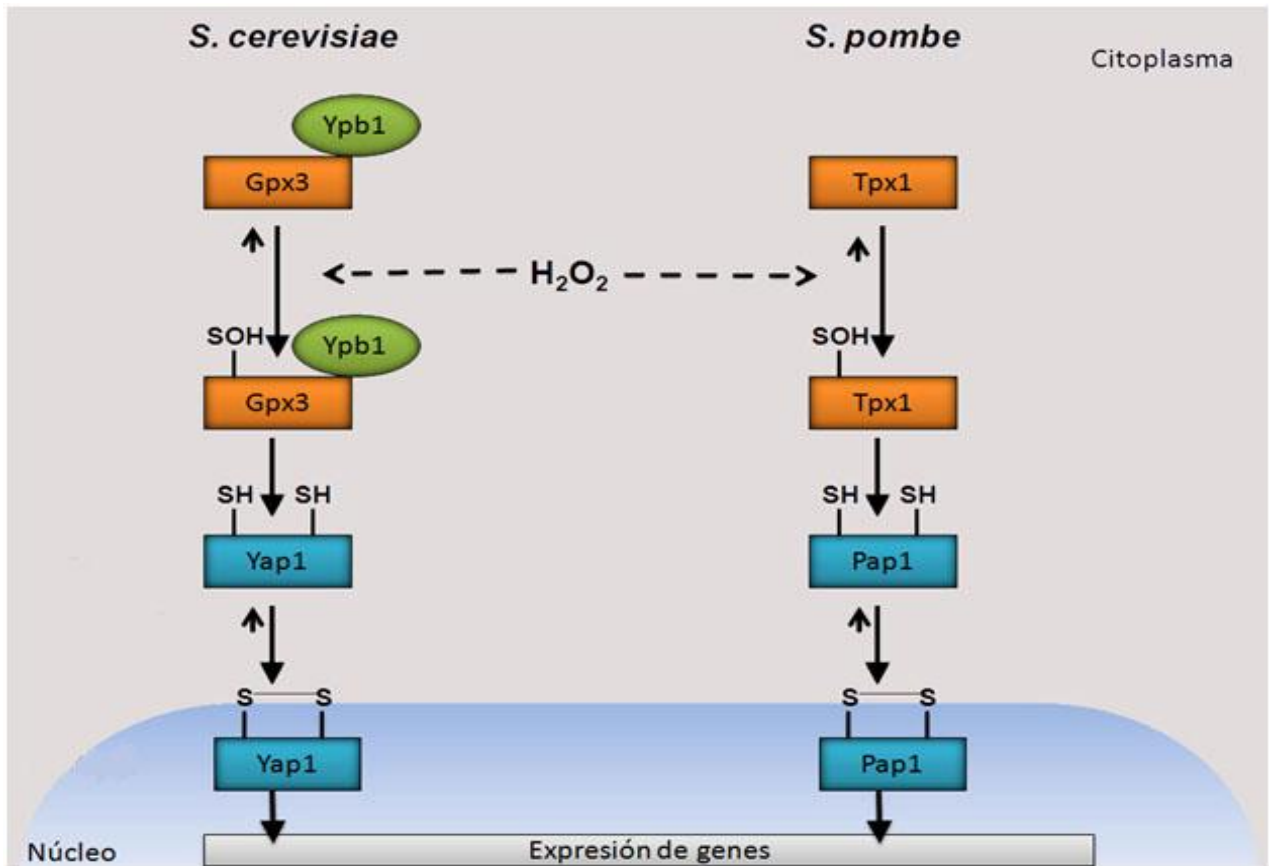


Figura 5. Activación de Yap1 y Pap1 bajo estrés por H_2O_2 . Los factores transcripcionales Yap1 y Pap1 requieren de proteínas río arriba para poder oxidarse en presencia de H_2O_2 : La glutatión peroxidasa Gpx3 y Tpx1, respectivamente.

3.2.2 El factor de transcripción Pap1 en *S. pombe*

El factor de transcripción tipo b-ZIP Pap1 de *S. pombe*, homólogo de c-Jun en mamíferos, funciona como un regulador central que responde a bajas concentraciones de H_2O_2 externo (Quinn, Findlay et al. 2002) y es esencial para la supervivencia bajo condiciones de estrés oxidativo (Krems, Charizanis et al. 1995). Dicho factor de transcripción presenta tanto una señal NLS como una señal NES, que son reconocidas por la importina- α Imp1 (Umeda, Izaddoost et al. 2005) y la exportina Crm1 (Kudo, Taoka et al. 1999), respectivamente. Al igual que su ortólogo Yap1, en respuesta al H_2O_2 Pap1 presenta la formación de un puente disulfuro intra-molecular que oculta su señal de exportación NES, lo que ocasiona su acumulación nuclear (Vivancos, Castillo et al. 2004, Vivancos, Verri et al. 2004) y la consecuente inducción de aproximadamente 50 genes (Chen, Wilkinson et al. 2008), Fig. 5. Entre éstos se encuentran los relacionados con algunas actividades antioxidantes (Kuge, Jones et al. 1997), como la catalasa (Nakagawa, Yamada et al.

2000), las peroxirredoxinas, la sulforredoxinas (Vivancos, Castillo et al. 2005), la SOD (Lee, Jung et al. 2002), las tiorredoxinas, las reductasas de tiorredoxinas y glutarredoxinas (Song and Roe 2008). Sin embargo, también se han encontrado genes relacionados con la desintoxicación celular, los cuales codifican para bombas de eflujo, deshidrogenasas y genes de proteínas relacionados con la resistencia a múltiples drogas (Calvo, Gabrielli et al. 2009).

Pap1 no se oxida a través de una Gpx, como ocurre con Yap1, sino lo hace a través de la tiorredoxina peróxidasa (Tpx1) (Vivancos and Moreno 2005). Bajo condiciones de estrés oxidante Tpx1 no es capaz de reducir a la proteína Trx1 y por lo tanto Pap1 se comporta como un donador alternativo de electrones para Tpx1. La Tpx1 tiene un papel similar a la peroxidasa de glutatión Gpx3 en *S. cerevisiae*, en donde en presencia de H₂O₂ una cisteína conservada en Tpx1 se oxida a ácido sulfénico. Posteriormente la Cis-SOH se condensa con otra cisteína que se encuentra en la region C-terminal de Pap1 para formar un puente disulfuro intermolecular. El puente intermolecular que se forma lo resuelve otro residuo de cisteína en Pap1, generando un puente disulfuro intramolecular que afecta la estructura de la proteína y trae como consecuencia su acumulación nuclear y la expresión de genes relacionados con la respuesta antioxidante (Vivancos, Castillo et al. 2005). Recientemente, un estudio proteómico del estado redox de Pap1 *in vivo*, reveló que cuatro de las seis cisteínas presentan una oxidación reversible después un tratamiento con H₂O₂: C278, C285, C501 y C532 (Calvo, Ayte et al. 2013). Mutaciones en las C278 y C501 presentan un atraso en la acumulación nuclear de Pap1 (Castillo, Ayte et al. 2002), mientras que las C278, C285 y C532 son esenciales para llevar a cabo los cambios conformacionales, la acumulación nuclear y la tolerancia a peróxidos (Calvo, Ayte et al. 2013).

A pesar de que Yap1 y Pap1 son ortólogos, existen algunas diferencias entre sus mecanismos de activación y su relación con otras vías de respuesta antioxidante. Por un lado, si se muta una de las cisteínas catalíticas de GpxA, ésta es aún capaz de activar a Yap1 (Delaunay, Pflieger et al. 2002). Mientras que la mutación Tpx1C169S, impide por completo la oxidación de Pap1 (Vivancos, Castillo et al. 2005).

Otra diferencia es que en *S. pombe* la vía Pap1 se interrelciona con la vía de Spc1-Atf1. En altas concentraciones de H₂O₂, la C169 de la Tpx1 se oxida hasta ácido sulfínico lo que inhibe temporalmente su actividad para activar a Pap1. Lo anterior conlleva a una mayor acumulación de H₂O₂, evento que activa la vía Spc1-Atf1 y la expresión de los genes dependientes de esta ruta. Entre estos genes se encuentra el gen *SRX1* que codifica para la sulfirredoxina necesaria para activar a la Tpx1 mediante la reducción de cisteína desde ácido sulfínico hasta grupo tiol (Bozonet, Findlay et al. 2005, Vivancos and Moreno 2005).

Recientemente se encontró que Pap1 necesita estar oxidada para poder formar un heterodímero con Prr1, ya que su unión a Prr1 incrementa su afinidad por los promotores de genes antioxidantes. Este mismo estudio reveló que Pap1 en su forma reducida también es capaz de unirse a promotores de genes relacionados con la desintoxicación celular y que en este caso la unión a Prr1 no es necesaria (Calvo, Garcia et al. 2012).

Por otro lado, Pap1 también se ha relacionado con la vía de Spc1-Atf1, en donde la transcripción de algunos genes como el de la catalasa (*CTT1*) parece depender de ambos factores transcripcionales. Sin embargo, el análisis de un promotor trunco del gen *ctt1* demostró que Pap1 y Atf1 se unen a distintas secuencias del promotor (Nakagawa, Yamada et al. 2000).

A pesar de que se sabe que estos tres factores transcripcionales tienen que ver con la respuesta al estrés oxidante y que regulan genes en común bajo estas condiciones, falta por entender el mecanismo por el cual estos factores transcripcionales regulan y coordinan la respuesta al estrés oxidante.

4. *Aspergillus nidulans* como modelo de estudio

Aspergillus nidulans es un hongo filamentoso ascomiceto que se encuentra muy relacionado con otras especies de *Aspergillus* de importancia médica e industrial y que por sus características, es un buen modelo experimental. Dentro de estas características se encuentra la facilidad de manipulación. Puede transformarse con DNA mediante recombinación heteróloga u homóloga y posee múltiples marcadores de selección, lo que lo hace un excelente modelo para estudios de genética clásica y molecular (Todd, Davis et al. 2007). Otra ventaja, es que el genoma de *A. nidulans* está completamente secuenciado y disponible vía The Broad Institute (<http://www.broad.mit.edu/annotation/fqi/>) (Galagan, Calvo et al. 2005). En la Fig.6 se presenta el ciclo de vida de *A. nidulans*, el cual presenta tres estrategias de reproducción: asexual, sexual y parasexual (Lee, Ni et al. 2010), esta última representa ventajas experimentales, al permitir pruebas de alelismo y dominancia.

4.1 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 talo del conidióforo que crece por extensión apical hacia la fase aérea. Cuando ha alcanzado cierta longitud, la punta del talo 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 conidias. 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 en la fase G1 del ciclo celular (Bergen and Morris 1983). En presencia de nutrientes las esporas germinan a través de un periodo inicial de crecimiento isodiamétrico, seguido por la formación de un tubo germinal alargado.

4.2 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 culmina con la formación de cuerpos fructíferos denominados cleistotecios, que son estructuras multicelulares, pigmentadas y redondas. La formación de éstos cuerpos fructíferos 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 tejido central, compuesto de células ascógoneas que dan lugar a las ascas y ascosporas y un tejido externo que consiste en una red de hifas estériles que rodean a las ascas dentro del cleistotecio. *A. nidulans*, a diferencia de otros miembros del género de *Aspergillus* no posee anteridios y ascogonias definidos, sin embargo, una célula equivalente funcional a una hifa ascógena se fusiona con una célula equivalente a un anteridio. De esta fusión se formarán las esporas sexuales. El resultado es una hifa dicarionte en la cual los dos núcleos se dividen sincrónicamente, formándose miles de células dicárioticas dentro del cleistotecio. La fusión nuclear ocurre en la hifa dicáriotica dando lugar a un asca. El asca contiene cuatro núcleos meióticos, cada uno de estos se divide mitóticamente para dar origen a cuatro pares de ascosporas uninucleadas. El núcleo dentro de cada ascospora realiza una sola división mitótica, esto da como resultado ocho ascosporas maduras binucleadas (Martinelli 1994).

Numerosas células redondas rodean al cleistotecio, denominadas células de Hülle. Su función hasta el momento se desconoce, pero se ha sugerido que desempeña un papel importante durante el desarrollo y la 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 homocariones con núcleos genéticamente diferentes (Casselton and Zolan 2002).

4.3 Ciclo parasexual

En el ciclo parasexual, la fusión de hifas con distinto fondo genético produce un heterodicarion (con núcleos genéticamente diferentes), seguido de la fusión nuclear para generar hifas diploides. Posteriormente mediante una pérdida espontánea de cromosomas (manteniendo alelos de ambas cepas parenterales) se puede restaurar el número de cromosomas haploide. Tanto el micelio heterocariótico como el micelio diploide pueden completar el desarrollo asexual y sexual (Martinelli 1994).

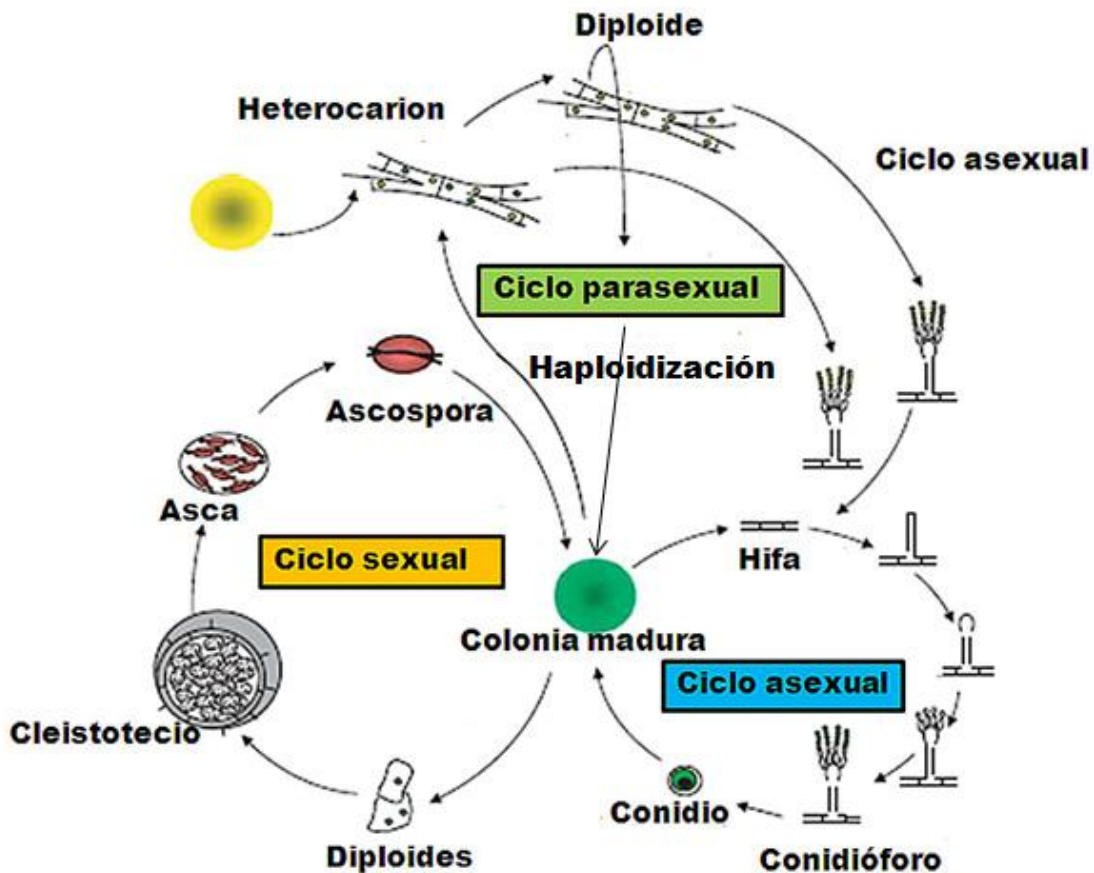


Figura 6. Ciclo de vida de *Aspergillus nidulans*. Durante el ciclo asexual se producen esporas o conidios, los cuales germinan para formar hifas, a partir de las cuales se desarrollan los conidióforos que producen más esporas. Durante el ciclo sexual homotálico se produce un cruzamiento o autofecundación 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 heterocarión como resultado de la fusión de hifas de distintos individuos, seguido de la fusión nuclear para formar hifas diploides. La haploidía se restaura mediante la pérdida al azar de cromosomas, lo cual genera un individuo diferente a los haploides parentales, modificado de Scazzocchio, 2009.

5. Respuesta celular al estrés oxidativo en *Aspergillus nidulans*

Al igual que en *S. pombe* y *S. cerevisiae*, el hongo *A. nidulans* tiene una amplia gama de respuestas al estrés oxidante. Posee homólogos de los factores transcripcionales Atf1, Pap1 y de Prr1. Dado que *A. nidulans*, posee el doble de genes que *S. pombe* y *S. cerevisiae*, así como procesos de diferenciación celular y desarrollo más complejos es posible estudiar la relación entre las ERO y la diferenciación celular.

A. nidulans tiene con una amplia gama de sistemas antioxidantes, entre ellos están las catalasas. Este hongo filamentoso cuenta con cuatro catalasas. El gen *catA* codifica a la catalasa A (CatA) y su RNAm se acumula durante la esporulación así como bajo múltiples tipos de estrés y su traducción se relaciona con la formación de esporas asexuales por lo que estas estructuras presenta una alta actividad de CatA (Navarro and Aguirre 1998). El gen *catB* codifica a la catalasa B (CatB) y se induce durante el crecimiento y desarrollo de la hifa (Kawasaki, Wysong et al. 1997). Por otra parte, el gen *catC* codifica a la catalasa C (CatC), cuyo RNAm se detecta en hifas jóvenes con 12 h de crecimiento y su nivel es relativamente constante hasta las 48 h de crecimiento. Dichos niveles de expresión constantes no se modifican por diversas condiciones nutricionales y de estrés (Kawasaki and Aguirre 2001). Por último, la catalasa D (CatD) cuya actividad se incrementa durante la fase estacionaria tardía, la limitación de glucosa, las altas temperaturas y los tratamientos con H₂O₂ (Kawasaki and Aguirre 2001). La expresión diferencial de las distintas catalasas en cada una de las estructuras y estadios de crecimiento del hongo bajo ciertas condiciones y tipos de estrés es un ejemplo de la complejidad de la respuesta al estrés oxidante y así mismo del papel de este en la diferenciación celular. La siguiente pregunta que surgió es ¿Cómo es que la célula regula la expresión específica de cada una de estas catalasas y qué componentes se encuentran río arriba de su expresión?.

El sistema de relevo de fosfatos de *A. nidulans* contiene aproximadamente quince HKs (Galagan, Calvo et al. 2005), dos RR (SrrA y SskA) y una Hpt (YpdA) (Furukawa, Hoshi et al. 2005). La Hk NikA, se relaciona con la respuesta al estrés generado por el fungicida fluidioxonil a través de la vía SskA-SakA y también por medio del RR SrrA. Por otra parte, la eliminación de la Hpt, YpdA, es letal (Vargas-Perez, Sanchez et al. 2007). En el caso de los RR SrrA y SskA, estos están involucrados en la vía de transducción de señales del estrés osmótico, SskA acoplada a la vía de SakA (ortóloga de Spc1/Sty) (Furukawa, Hoshi et al. 2005); mientras que, SrrA presenta una menor participación en esta respuesta en comparación con SskA; sin embargo, SrrA podría suplir la actividad de SskA en su ausencia. En lo que respecta a la función del sistema de relevo de fosfatos en la respuesta al estrés oxidativo, se encontró que SrrA se requiere para la resistencia al

H₂O₂, muy probablemente a través de la inducción de la catalasa CatB, ya que mutantes $\Delta srrA$ no presentan inducción de actividad de catalasa B en presencia de H₂O₂ (Vargas-Perez, Sanchez et al. 2007). SrrA se considera un ortólogo de Skn7 y de Prr1; como se observa en la Fig. 3, esta proteína contiene un dominio de unión a DNA tipo HSF y un dominio receptor altamente conservado en donde se encuentra el residuo de aspartato que participa en el sistema de fosforrelevo.

SskA está ligada a la respuesta al estrés oxidativo acoplada a la vía de SakA, (Furukawa, Hoshi et al. 2005), quien activa al factor de transcripción AtfA (ortólogo de Atf1) (Lara-Rojas, Sanchez et al. 2011). Se ha visto que mutantes carentes de AtfA ($\Delta atfA$) presentan una sensibilidad al estrés oxidativo causado por H₂O₂ y terbutilhidroperóxido (*t*-BOOH), que está relacionada con la ausencia de la expresión de la catalasa CatA en conidias (Hagiwara, Asano et al. 2008). Las mutantes $\Delta atfA$ presentan una producción elevada de cleistotecios, indicando que este factor transcripcional regula procesos de represión del ciclo sexual del hongo. La pérdida de AtfA en conidias evita la acumulación de SakA en conidias y esto conduce a la pérdida de viabilidad de las esporas asexuales (Lara-Rojas, Sanchez et al. 2011).

NapA, el homólogo de Pap1 en *A. nidulans*, posee un dominio bZIP y regiones terminales amino (cNRD) y carboxilo ricas (cCRD) en residuos de cisteína (Fig.4). Al igual que su ortólogo en levaduras, NapA presenta una localización nuclear en presencia de estrés oxidativo causado por H₂O₂ a bajas concentraciones. Las mutantes $\Delta napA$ presentan alta sensibilidad al estrés oxidativo causado por H₂O₂ y menadiona. Además, al igual que las mutantes $\Delta srrA$, no presentan inducción de la actividad de catalasa B en presencia de H₂O₂ (Lara-Rojas, Mendoza-Martínez y Aguirre, sin publicar). Tanto las mutantes $\Delta napA$ como las $\Delta srrA$ muestran sensibilidad al H₂O₂ y a otros compuestos que generan estrés oxidativo como el *t*-BOOH y el paraquat. Sin embargo, el grado de sensibilidad es diferente, como también lo es la morfología de las mutantes. Mientras que las mutantes en *srrA* muestran una esporulación asexual muy deficiente y producen pigmentos de identidad desconocida, las mutantes en *napA* poseen una esporulación y un crecimiento aparentemente normales, pero muestran una diferenciación sexual incrementada. Esto sugiere que SrrA y NapA tienen tanto funciones en común como por separado. Sin embargo, hasta ahora no se ha explorado la posible interacción física entre SrrA y NapA, ni se han definido los genes regulados por cada una de estas proteínas o por ambos factores transcripcionales. Tampoco se ha explorado su posible interacción con otras proteínas como AtfA, un FT involucrado en la respuesta antioxidante.

HIPÓTESIS

Proponemos que bajo estrés oxidante los factores transcripcionales NapA y SrrA son capaces de interactuar y de regular la inducción de genes de la respuesta antioxidante, tanto de manera conjunta como individualmente.

OBJETIVO GENERAL

Determinar la interacción y la localización celular de los factores transcripcionales SrrA y NapA en condiciones de estrés oxidativo y durante el desarrollo sexual y asexual del hongo, así como determinar el transcriptoma dependiente de SrrA y NapA.

OBJETIVO PARTICULARES

- Determinar la contribución de SrrA, NapA y AtfA en la respuesta al estrés oxidativo a través de mutantes dobles y triples en los genes correspondientes.
- Construir una fusión *srrA::gfp* para determinar la localización de SrrA durante el desarrollo sexual y asexual del hongo, mediante microscopía de fluorescencia.
- Etiquetar las proteínas SrrA y NapA y determinar su posible interacción *in vivo*, mediante técnicas de bi-fluorescencia molecular y/o co-inmunoprecipitación.
- Determinar genes cuya expresión depende de NapA y de ambos, mediante un análisis transcriptómico.

RESULTADOS

1. El fenotipo de conidiación $\Delta srrA$ predominó en las mutantes dobles y triples con este fondo genético

Para determinar la contribución de las proteínas SrrA, NapA y AtfA en la respuesta al estrés oxidativo, se generaron mutantes dobles ($\Delta srrA \Delta napA$ y $\Delta srrA \Delta atfA$) y triples ($\Delta srrA \Delta napA \Delta atfA$) mediante cruza sexual a partir de las mutantes sencillas generadas previamente en el laboratorio (ver tabla 5 para los genotipos completos).

Las mutantes dobles y triples se obtuvieron a partir de cruza y posteriormente se sembraron en diversos medios de cultivo para seleccionar cepas isógenicas con fondo amarillo (yAy) y auxotrofia para ácido para-aminobenzóico (pabaA1), como marcadores genéticos. La presencia de la mutación $\Delta srrA$ se confirmó por su fenotipo, mientras que la deleción de $\Delta napA$ y $\Delta atfA$ se confirmó mediante PCR, amplificando los marcadores selectivos *AfpyrG* (Fig. S1) (marcador para $\Delta napA$) y *AfriboB* (marcador para $\Delta atfA$) (Fig. S2). En todas las cepas se confirmó la presencia del gen *nkuA* silvestre, ya que la carencia del mismo podría afectar procesos de reparación del DNA (Nayak, Szewczyk et al. 2006).

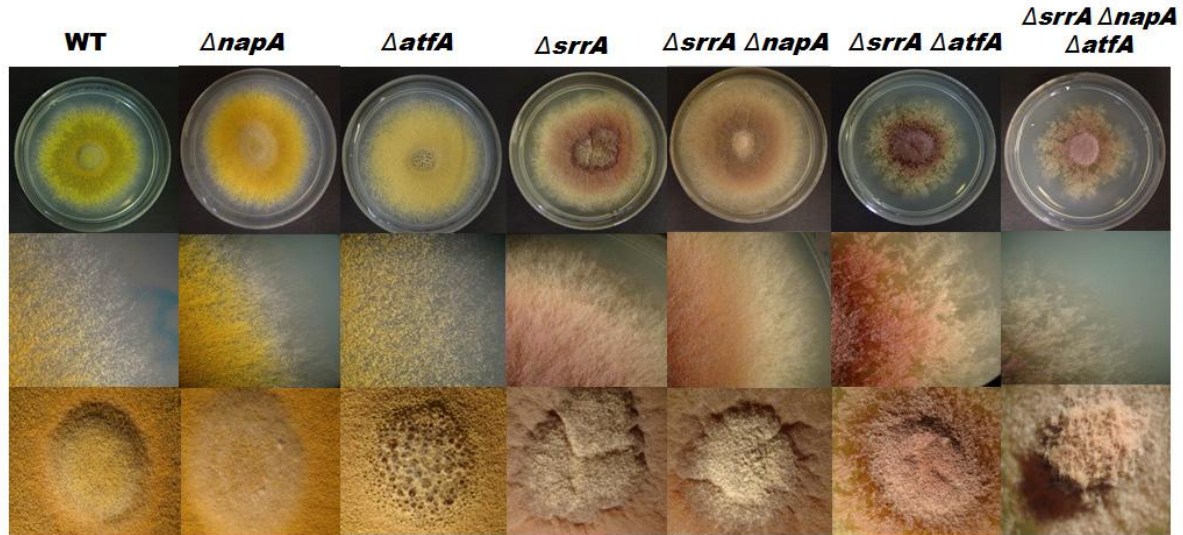
Dado que se ha observado que NapA, SrrA y AtfA están involucradas con procesos relacionados con crecimiento y esporulación, es importante analizar la morfología de las mutantes sencillas, dobles y triples en ausencia de estrés oxidativo (MM). Como se aprecia en la Fig. 7 la mutante $\Delta napA$ produce colonias muy similares a la cepa silvestre, mientras que la cepa $\Delta srrA$ presenta la acumulación de un pigmento rojizo de naturaleza desconocida en las colonias, así como una disminución drástica en la producción de esporas asexuales.

En las mutantes dobles y triples se puede observar que el fenotipo de $\Delta srrA$ predomina, aunque las colonias de la mutante $\Delta srrA \Delta napA$ parecen presentar menos acumulación del pigmento. Por el contrario, las mutantes dobles $\Delta srrA \Delta atfA$ y la triple $\Delta srrA \Delta napA \Delta atfA$ presentan una acumulación del pigmento mayor que el de la cepa $\Delta srrA$ y un menor tamaño de colonia, en comparación con las otras mutantes y con la cepa silvestre (WT) Fig. 7.

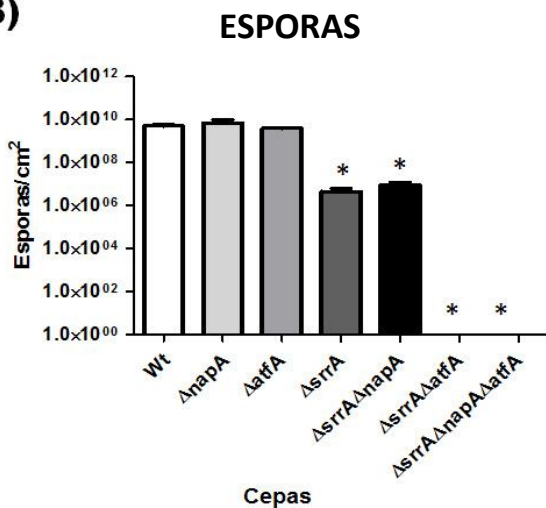
Otro cambio notable es la morfología: se observó que las mutantes $\Delta srrA \Delta atfA$ y $\Delta srrA \Delta napA \Delta atfA$, forman colonias que crecen de manera muy irregular en los bordes, lo que produce sectores con diferentes grados de crecimiento. Aunque este fenotipo relacionado con una hiper-ramificación de las hifas y la acumulación de pigmento está presente en las mutantes sencillas

$\Delta srrA$ (Vargas-Perez, Sanchez et al. 2007) se agravó por la presencia de la mutación $\Delta atfA$ (Fig. 7A).

A)



B)



C)

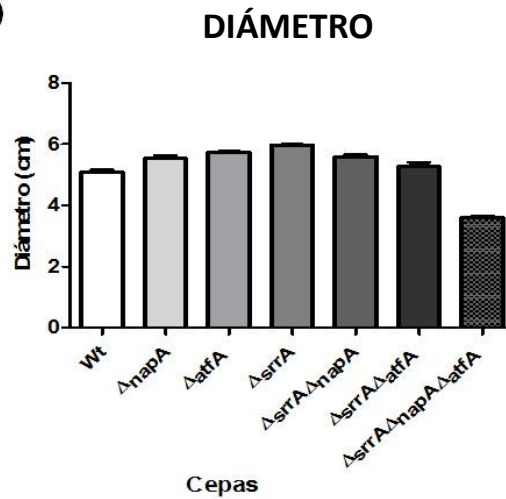


Figura 7. La morfología y la esporulación de la mutante $\Delta srrA$ es predominante en las mutantes dobles y triples. A) Esporas asexuales (1×10^4) de cada una de las cepas se sembraron en cajas con MM. Las fotografías se tomaron en el borde y centro de la colonia a los 5 días de incubación a 37°C. B) Cuantificación del número total de esporas en las mutantes sencillas, dobles y triples. C) Diámetro de las colonias a partir de las cuales se realizó la cuantificación de las esporas en B. $p < 0.05$. La cepa CLK43 se utilizó como WT.

Este tipo de crecimiento sectorizado de las colonias es común en cepas heterocariontes que muestran irregularidad en la distribución de núcleos y podría reflejar una función de SrrA y AtfA en la mitosis, el ciclo celular y/o la distribución nuclear en las hifas. Aunque las mutantes $\Delta atfA$

presentaron el mismo número de esporas asexuales que la cepa silvestre CLK43, el defecto en la conidiación causado por la mutación de $\Delta srrA$ se vio agravada por la mutación $\Delta atfA$ (Fig. 7B).

2. Los factores transcripcionales NapA, SrrA y AtfA juegan diferentes papeles en la respuesta antioxidante y el desarrollo en *Aspergillus nidulans*.

Una vez que se tuvo el set de mutantes requeridas para este estudio, se procedió a analizar su sensibilidad al estrés oxidativo, particularmente al H_2O_2 y a la menadiona (Md), utilizando conidias (Fig. 8) o micelio (Fig. 9). En conidias, la mutante sencilla $\Delta napA$ es la más sensible (no crece a 0.5 mM); la mutante $\Delta srrA$ también es muy sensible, aunque no tanto como la mutante $\Delta napA$, pues deja de crecer a una concentración de 1 mM. La mutante $\Delta atfA$ también es sensible al H_2O_2 , pero a concentraciones mayores (4 mM). Estos datos son similares a lo reportado anteriormente para las mutantes $\Delta napA$ (Asano, Hagiwara et al. 2007) $\Delta srrA$ (Vargas-Perez, Sanchez et al. 2007) y $\Delta atfA$ (Kawasaki, Sanchez et al. 2002, Lara-Rojas, Sanchez et al. 2011). También se observó que la mutante $\Delta napA$ fue la única sensible a la menadiona (Md).

En conidias de las mutantes dobles y triples se observó que en general las mutantes que contienen la delección $napA$ presentan una sensibilidad semejante a la mutante sencilla $\Delta napA$, excepto en el caso de la mutante doble $\Delta srrA \Delta napA$ que presenta una sensibilidad parecida a la de la mutante $\Delta srrA$ (Fig. 8).

También se determinó la sensibilidad del micelio de estas mutantes al estrés oxidativo. La Fig. 9 muestra que en este caso la mutante $\Delta srrA$ es más sensible al estrés oxidativo causado por H_2O_2 (no crece en 3 mM), mientras que la mutante $\Delta napA$ crece muy poco en 3 mM. Por el contrario la mutante $\Delta atfA$ no mostró sensibilidad en las concentraciones probadas (0.5, 1- 5 mM). Todas las mutantes que carecen de $srrA$ presentan sensibilidad semejante a la de la mutante sencilla, aunque la doble $\Delta srrA \Delta atfA$ y la triple mutante parecen ser más sensibles que la sencilla. Estas diferencias en la sensibilidad al H_2O_2 en esporas y en micelio, indican un papel diferencial de estos FT durante el desarrollo, siendo NapA más importante para la resistencia al H_2O_2 de las esporas y SrrA más importante para la resistencia del micelio.

De igual forma, en el micelio se observó que solo las mutantes que carecen de $napA$ presentan sensibilidad a la menadiona, indicando que NapA es necesaria para la respuesta ante el estrés causado por menadiona tanto en las esporas como en el micelio.

También estudiamos la respuesta antioxidante de las mutantes ante otros compuestos oxidantes como el *t*-BOOH y el metilglioxal (MG) (Fig. S5). Encontramos que las mutantes sencillas dobles y triples son sensibles a *t*-BOOH (1 mM). Mientras que ninguna de las mutantes fue sensible al MG. Estos datos concuerdan con los reportados anteriormente para las mutantes sencillas $\Delta napA$ (Asano, Hagiwara et al. 2007), $\Delta srrA$ (Vargas-Perez, Sanchez et al. 2007) y $\Delta atfA$ (Lara-Rojas, Sanchez et al. 2011).

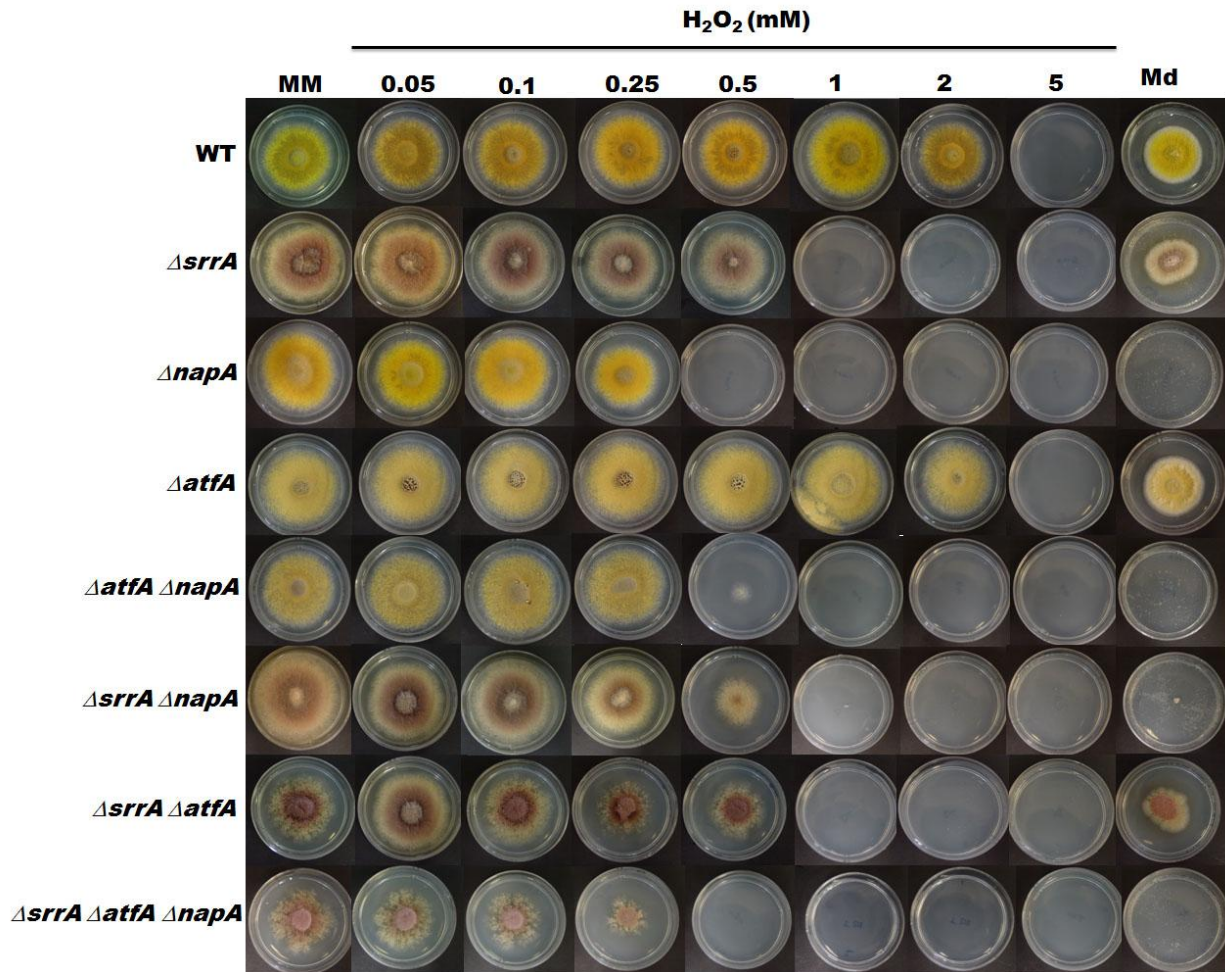


Figura 8. Conidias de las mutantes carentes de los FT SrrA, NapA o AtfA, presentan diferentes grados de sensibilidad al estrés oxidativo. Esporas asexuales (1×10^4) de cada una de las cepas se sembraron en cajas de MM con H₂O₂ y menadiona (Md) a las concentraciones indicadas. Las fotografías se tomaron después de 4 días de incubación a 37°C. La cepa CLK43 se utilizó como WT.

Por otro lado, las mutantes sencillas, dobles y triples no presentan sensibilidad al estrés osmótico, sin embargo, como ya se ha descrito anteriormente, la esporulación de las mutantes con fondo $\Delta srrA$ se ve favorecida bajo estas condiciones, Fig. S6 (Vargas-Perez, Sanchez et al. 2007).

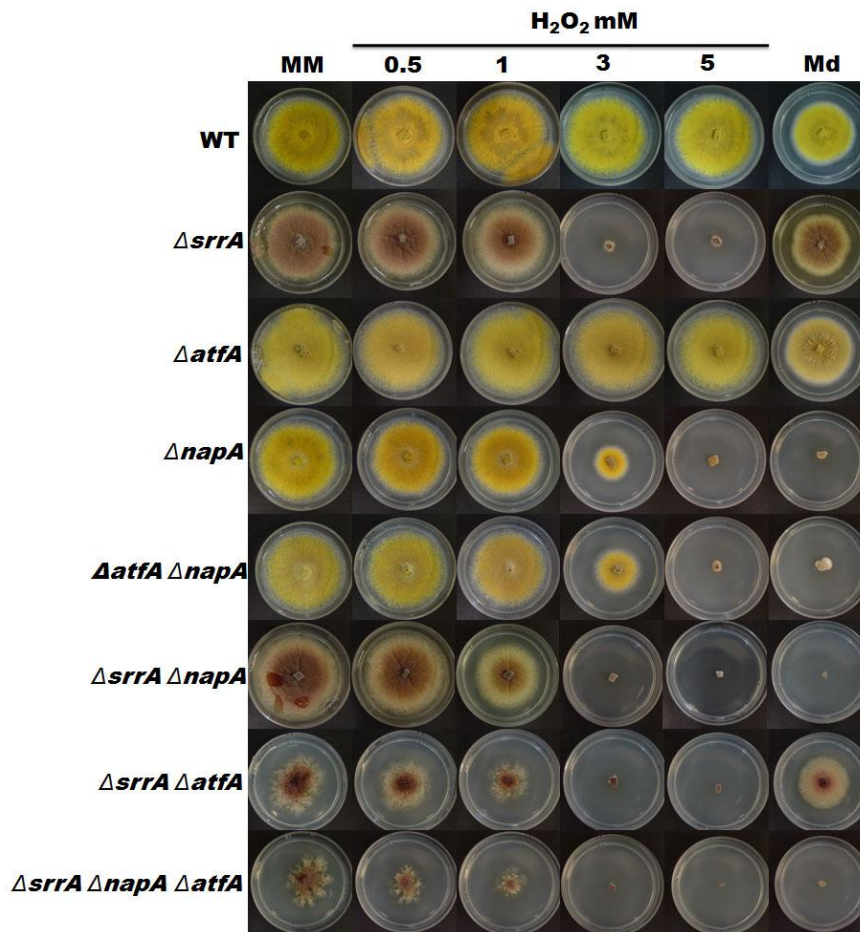


Figura 9. El micelio de las mutantes carentes de los FT SrrA, NapA y AtfA, presentan diferentes grados de sensibilidad al estrés oxidativo. Discos de micelio obtenidos del borde de colonias de cinco días de crecimiento en cajas con MM con H₂O₂ y menadiona (Md) a las concentraciones indicadas. La cepa CLK43 se utilizó como WT.

3. La activación de NapA no está mediada por GpxA ni TpxA

Varias peroxirredoxinas se han relacionado con la oxidación/activación de componentes río abajo de las cascadas de la respuesta antioxidante. Tal es el caso de la glutatión peróxidasa tipo Gpx3/Orp1 de *S. cerevisiae*, la cual inicia la cascada de Yap1 en respuesta al H₂O₂ (Delaunay, Pflieger et al. 2002). Se propone que en respuesta al H₂O₂, el grupo activo tiol de Gpx3 se oxida a SOH, el cual después reacciona con residuos de cisteína del FT Yap1. El disulfuro intermolecular que se forma lo resuelve otro residuo de cisteína en Yap1, generando un puente disulfuro intramolecular que afecta la estructura de la proteína y como consecuencia su acumulación nuclear y la expresión de genes relacionados con la respuesta antioxidante. Algo muy similar

sucede en la levadura *S. pombe*, en donde la peroxirredoxina Tpx1 es esencial para la transducción de la señal desde el H₂O₂ hasta Pap1. En las células carentes de Tpx1, no se observa la oxidación ni la acumulación de Pap1 en el núcleo (Bozonet, Findlay et al. 2005, Vivancos, Castillo et al. 2005).

Para identificar los posibles ortólogos de las proteínas Gpx3 y Tpx1 en *A. nidulans*, se realizó una búsqueda en la base de datos de su genoma utilizando las secuencias de Gpx3 de *S. cerevisiae* y Tpx1 de *S. pombe*. La proteína codificada por el gen AN2846 (GpxA) de *A. nidulans* presenta una identidad del 58% con la Gpx3 de *S. cerevisiae* misma que se conserva en varias especies de hongos (Fig. S8). Por otra parte, la proteína AN10223 (TpxA) de *A. nidulans* codifica para una Tpx con una sola cisteína catalítica, a diferencia de la Tpx1 de *S. pombe* que se caracteriza por tener dos cisteínas catalíticas. Este patrón de Tpx1 con una cisteína se conserva entre los hongos filamentosos y se ha sugerido la ausencia de Tpx con dos cisteínas en estos organismos (Fig.S9) (Cartwright and Scott 2013).

El gen *riboB* se utilizó como marcador selectivo para eliminar al gen *gpxA*. Se obtuvieron 20 transformantes en las cuales el reemplazo del gen por el marcador *riboB* se confirmó por PCR. De las tres cepas confirmadas, se seleccionó la número 18, la cual se nombró TAM16 para utilizarla en experimentos posteriores (Fig. S3A). Para la delección del gen AN10223 se utilizó como marcador selectivo al gen *AfpYrG*. De las 15 transformantes obtenidas 4 se confirmaron por PCR y se eligió a la número 6 (TAM17) para experimentos posteriores (Fig. S3B).

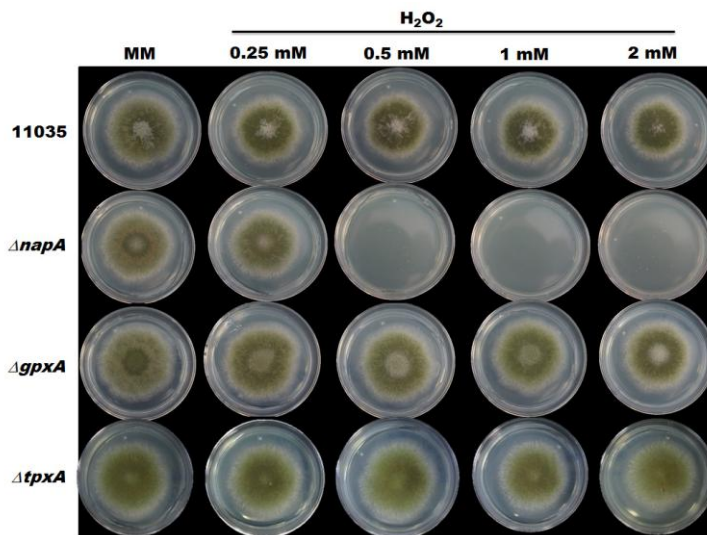


Figura 10. Las mutantes $\Delta gpxA$ y $\Delta tpxA$ no presentan sensibilidad al H₂O₂. Esporas asexuales (1×10^4) de las cepas se sembraron en cajas de MM adicionadas con las diferentes concentraciones de H₂O₂. Las fotografías se tomaron a los 4 días de incubación a 37°C. CFL7 ($\Delta napA$), TAM16 ($\Delta gpxA$), TAM17 ($\Delta tpxA$) y la cepa 11035 se utilizó como WT.

Se ha reportado, que las mutantes carentes de las peroxirredoxinas que llevan a cabo la activación de Yap1 o Pap1 presentan sensibilidad al H₂O₂. Por ello, realizamos pruebas de sensibilidad al H₂O₂ en medio sólido y como se observa en la Fig. 10, las mutantes $\Delta gpxA$ y $\Delta tpxA$ no resultaron sensibles al estrés oxidativo causado por H₂O₂, lo cual sugiere que GpxA y TpxA no participan en la activación NapA en presencia de H₂O₂.

4. El factor transcripcional NapA está involucrado en la asimilación de arabinosa y fructosa como fuentes de carbono

Previamente se había estudiado la relación entre el estrés oxidativo y la privación de glucosa. En la levadura *S. pombe* Pap1 se acumula en el núcleo en presencia de glicerol y de sorbitol como única fuente de carbono. Dicha acumulación es dependiente del estado redox de la célula y conlleva a la transcripción de genes relacionados con la respuesta antioxidante. Se ha propuesto que bajo condiciones de privación de glucosa la célula entra en un estado hiper-oxidante en donde la acción de Pap1 y Atf1 son necesarias para contender contra las ERO generadas en estas condiciones (Madrid, Soto et al. 2004). Sin embargo, en este estudio no se determinó si Pap1 se requiere para crecer en estas fuentes de carbono.

Dado este antecedente, decidimos evaluar si SrrA, NapA o AtfA juegan algún papel en la asimilación de fuentes alternativas de carbono. La Fig. 11 muestra el crecimiento de esporas de las mutantes sencillas, dobles y triples en medios con distintas fuentes de carbono. La cepa WT es capaz de crecer en todas las fuentes de carbono probadas y, como se ha reportado antes, la esporulación se disminuye en galactosa y treonina. La mutante carente de *srrA* crece muy mal en acetato y prácticamente no crece en glicerol, en donde muestra un aumento en la acumulación del pigmento rojizo.

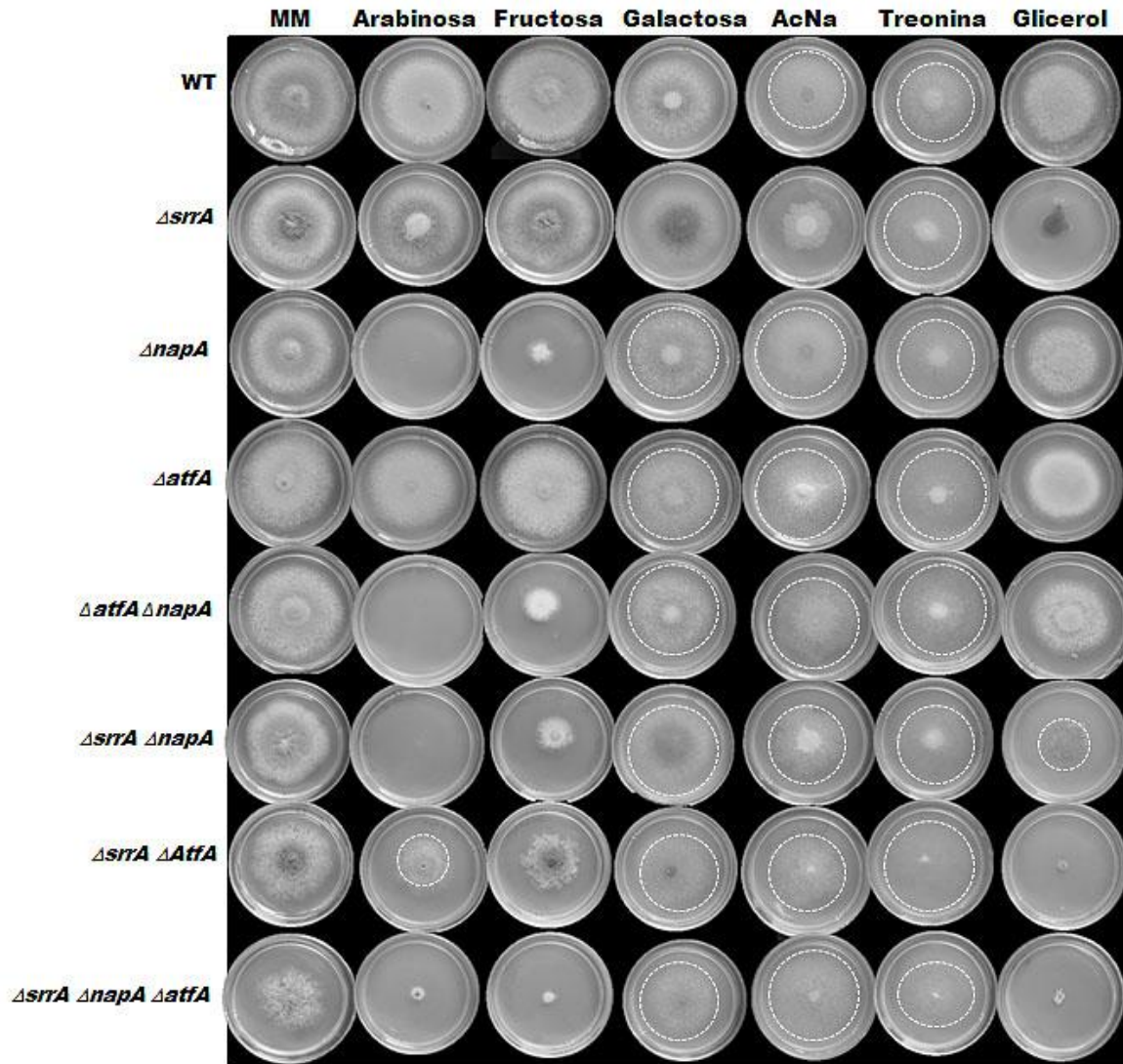


Figura 11. En esporas, NapA se requiere para utilizar a la Arabinosa como fuente alternativa de carbono, mientras que SrrA se requiere para la utilización de Glicerol. Esporas asexuales (1×10^4) de cada una de las cepas se sembraron en cajas de MM adicionadas con las diferentes fuentes alternativas de carbono. Las fotografías se tomaron a los 4 días de incubación a 37°C . La cepa CLK43 se utilizó como Wt. AcNa: Acetato de sodio.

Notablemente, la mutante carente de *napA* no crece en arabinosa y crece muy poco en fructosa, mientras que la mutante $\Delta atfA$ crece bien en todas las fuentes de carbono probadas. Las dobles y triples mutantes que presentan el fondo $\Delta napA$ ($\Delta srrA \Delta napA$, $\Delta napA \Delta atfA$ y $\Delta srrA \Delta napA \Delta atfA$) presentan un comportamiento similar al de la mutante sencilla, es decir, no existe crecimiento en presencia de arabinosa y poco crecimiento en presencia de fructosa. Al igual que las mutantes sencillas $\Delta srrA$, las mutantes dobles y triples con fondo $\Delta srrA$ no crecen en glicerol.

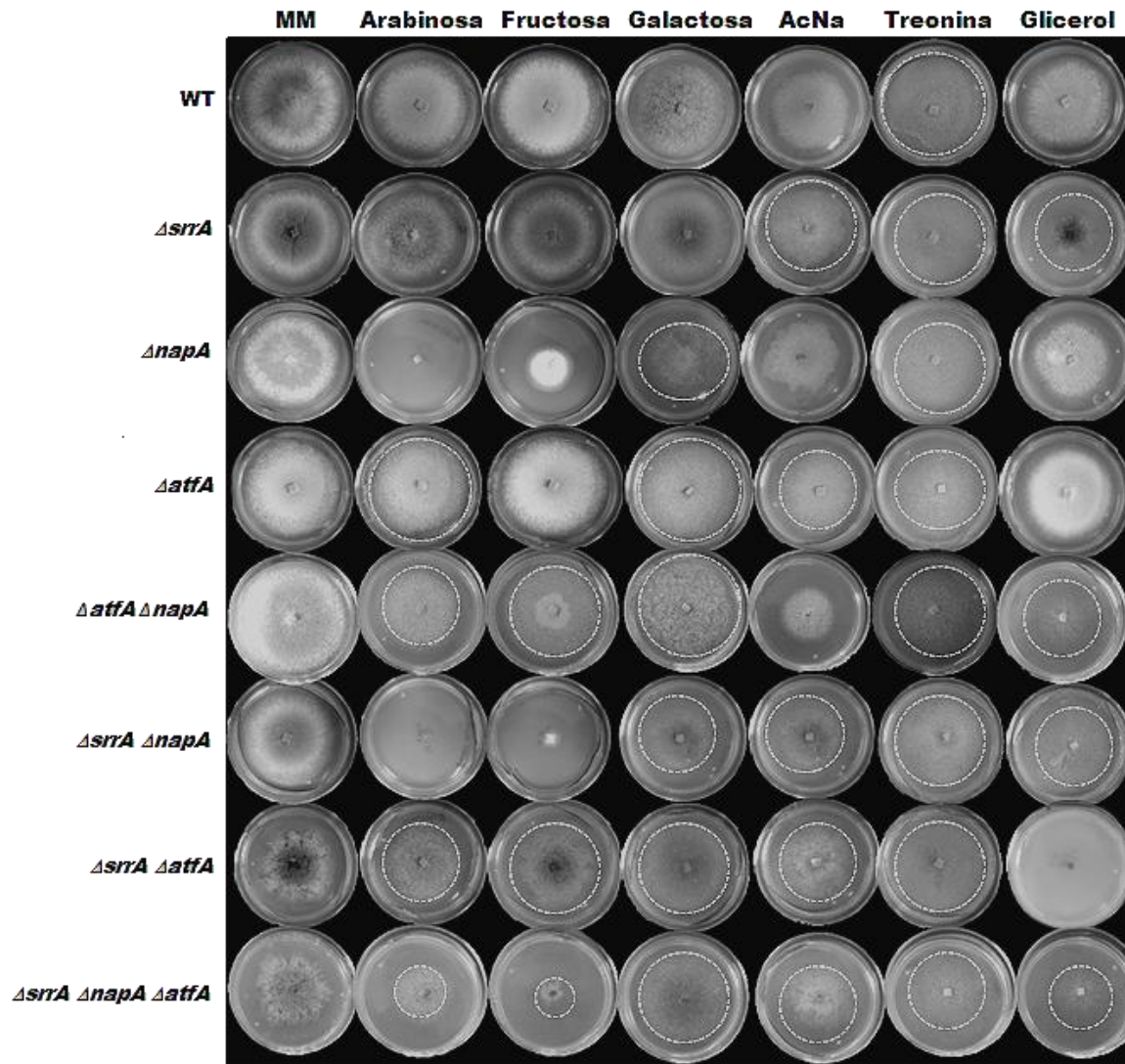


Figura 12. En micelio, NapA también se requiere para utilizar la arabinosa como fuente alternativa de glucosa. Discos de micelio obtenidos del borde de colonias de cinco días de crecimiento en cajas con adicionadas con las diferentes fuentes alternativas de glucosa. Las fotografías se tomaron a los 5 días de incubación a 37°C. La cepa CLK43 se utilizó como WT.

El crecimiento de las mutantes sencillas, dobles y triples en distintas fuentes de carbono también se estudió en el micelio. Como se observa en la Fig. 12, la cepa WT es capaz de crecer en distintas fuentes de carbono; sin embargo, su esporulación también se disminuye en treonina y en acetato como fuentes de carbono. El micelio de la mutante $\Delta napA$ tampoco es capaz de crecer en arabinosa y presenta poco crecimiento en fructosa. La mutante doble $\Delta napA \Delta atfA$ puede crecer en arabinosa y en fructosa, por lo que a diferencia de lo que ocurre en esporas, en micelio la mutación $\Delta atfA$ revierte la incapacidad de la mutante $\Delta napA$ para crecer en estas fuentes de carbono. Por el contrario, el fondo $\Delta srrA$ agrava el defecto de crecimiento una mutante $\Delta napA$ en

fructosa. El crecimiento intermedio de las triples mutantes en arabinosa y fructosa es consistente con el papel de AtfA y SrrA en la asimilación de estas fuentes de carbono. El micelio de la mutante $\Delta srrA$, a diferencia de lo que ocurre en esporas, si crece en glicerol, mientras que la mutante doble $\Delta srrA \Delta atfA$ no crece en glicerol y la mutante triple muestra un crecimiento intermedio.

Estos resultados muestran, por primera vez, que los factores transcripcionales NapA, AtfA y SrrA interactúan de disitintas maneras para regular la utilización de fuentes alternativas de carbono en *A. nidulans*. Sin embargo, no está claro aún de qué manera se relacionan estas funciones con su papel en la respuesta antioxidante.

5. La proteína SrrA se localiza en el núcleo

Para determinar la localización subcelular de SrrA en las distintas estructuras (esporas y micelio) del ciclo asexual de *A. nidulans*, se obtuvo una cepa con el reemplazo del alelo *srrA* silvestre por la construcción *srrA::gfp*. La sustitución del gen se confirmó por PCR (Fig. S4) y se seleccionó la transformante número ocho para los siguientes ensayos, a la cual se le denominó TAM14.

Para saber si el marcaje de la proteína SrrA con GFP en el extremo carboxilo altera la función de SrrA en la respuesta antioxidante, se realizó una prueba de sensibilidad al H_2O_2 . Como muestra la Fig. 13A, la cepa *srrA::gfp* presenta una resistencia al H_2O_2 semejante al de la cepa silvestre 11035, mientras que una mutante carente de *srrA* es sensible a una concentración de 1 mM, indicando que la fusión *srrA::gfp* es funcional.

El resultado en la Fig. 13B panel de arriba, muestra que la proteína SrrA::GFP se detecta en puntos discretos cercanos uno al otro, consistente con núcleos después de una mitosis. Posteriormente la tinción con DAPI confirma la localización nuclear de SrrA (Fig. 13B, panel inferior). Una localización semejante se observa en las diferentes etapas del ciclo asexual. Esto concuerda con los datos encontrados en las levaduras *S. cerevisiae* (Brown, Bussey et al. 1994) y *S. pombe* (Toone, Kuge et al. 1998, Castillo, Ayte et al. 2002), indicando que la localización nuclear constitutiva de SrrA y sus ortólogos se encuentra conservada.

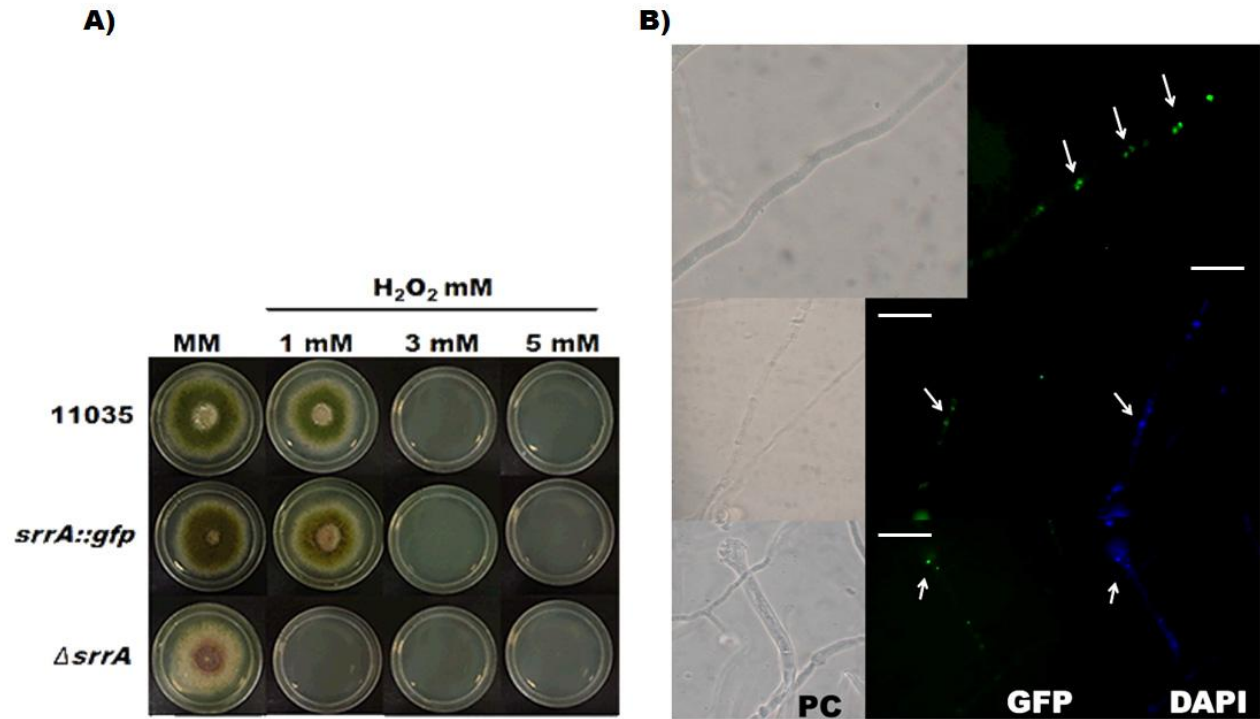


Figura 13. SrrA se encuentra constitutivamente en el núcleo. A) El marcaje de la proteína SrrA con GFP no afecta su función. Esporas asexuales (1×10^4) de cada una de las cepas se sembraron en cajas de MM adicionadas con diferentes concentraciones de H₂O₂. Las fotografías se tomaron a los 5 días de incubación a 37°C. La cepa 11035 se utilizó como Wt. B) La proteína SrrA se encuentra de manera constitutiva en el núcleo. Las flechas indican la localización de SrrA::GFP en el núcleo. Barra 20 μ m.

6. Los FT NapA y SrrA interaccionan en el núcleo en presencia de H₂O₂

Como se ha mencionado antes, en la levadura *S. cerevisiae*, los FT Yap1 y Skn7 están involucrados en la respuesta al estrés oxidativo; mutantes carentes de alguno de estos FT son sensibles a H₂O₂. Yap1 controla la expresión de más de 50 genes relacionados con la respuesta antioxidante (Kuge, Jones et al. 1997). Sin embargo, Morgan y colaboradores, mostraron que la inducción de la tiorredoxina 2 (TRX2) y la tiorredoxina reductasa (TRR1) requieren una cooperación entre Yap1 y Skn7 (Morgan, Banks et al. 1997). Posteriormente se encontró que tanto Yap1 como Skn7 se requieren para la inducción de aproximadamente quince proteínas en presencia de H₂O₂. Estas proteínas se subdividen en dos grandes grupos; por un lado están las enzimas antioxidantes, y por otro lado, aquellas que participan en vías metabólicas involucradas en la regeneración de poder reductor (glutatión y NADPH), y en procesos biológicos que tienen que ver con la homeostasis redox (Lee, Godon et al. 1999).

En *A. nidulans* se ha observado que mutantes sencillas carentes de *napA* o *srrA* son incapaces de inducir la catalasa B en presencia de H_2O_2 (Datos no publicados), lo cual nos lleva a pensar que al igual que en levaduras, estos dos FT son necesarios para la expresión de algunos genes de la respuesta antioxidante bajo condiciones de estrés oxidativo.

La posible interacción entre los factores transcripcionales NapA y SrrA se abordó mediante la técnica de complementación de fluorescencia bimolecular, en la cual la mitad N-terminal y C-terminal de la proteína amarilla fluorescente (YFP) se fusionan a cada una de las proteínas que se proponen que interactúan. La interacción entre estas dos proteínas facilita la asociación entre los fragmentos para reconstituir el complejo fluorescente. El plásmido PNZI39, el cual contiene la mitad N-terminal de la YFP se digirió con las enzimas *Ascl* y *Pacl* y en estos mismos sitios se introdujo el ORF (Open Reading frame, marco abierto de lectura) de la proteína SrrA, generando el plásmido pAM-01. Así mismo, el plásmido PNZI40 el cual contiene la mitad C-terminal de la YFP, se digirió con las enzimas *Ascl* y *Pacl* y en estos mismos sitios se clonó el ORF que codifica para la proteína NapA, generando el plásmido pAM-02. La expresión de cada una de las mitades de la YFP se encuentra bajo el promotor inducible *alcA*, el cual se induce en presencia de etanol o treonina como únicas fuentes de carbono. Los plásmidos pAM-01 pAM-02 se confirmaron mediante análisis de restricción (Fig. 19).

Los plásmidos pAM-01 y pAM-02 se utilizaron para co-transformar por protoplastos la cepa 11035 de *A. nidulans*. Se obtuvieron catorce transformantes, de las cuales se eligió a una para ensayos posteriores y se denominó TAM18.

En la Fig.14A se observa que la cepa TAM18 crecida por 15 h en MM líquido con glucosa (el promotor *alcA* no se induce) y posteriormente transferida a MM con treonina por 5 h (inducción del promotor *alcA*) no presenta fluorescencia. Por otro lado, en la Fig. 14B, la cepa TAM 18 se creció por 15 h en MM con glucosa, más 5 h con treonina y posteriormente se le añadió 25 mM de H_2O_2 y se incubó una hora más. Como se observa en la Fig.14C, solo en presencia del H_2O_2 se detectó fluorescencia, la cual se localiza en puntos discretos de las hifas. El patrón de fluorescencia de la YFP y la tinción con DAPI indican que la fluorescencia corresponde a núcleos en división mitótica. Estos datos indican que en presencia de H_2O_2 NapA y SrrA muestran una interacción física en el núcleo.

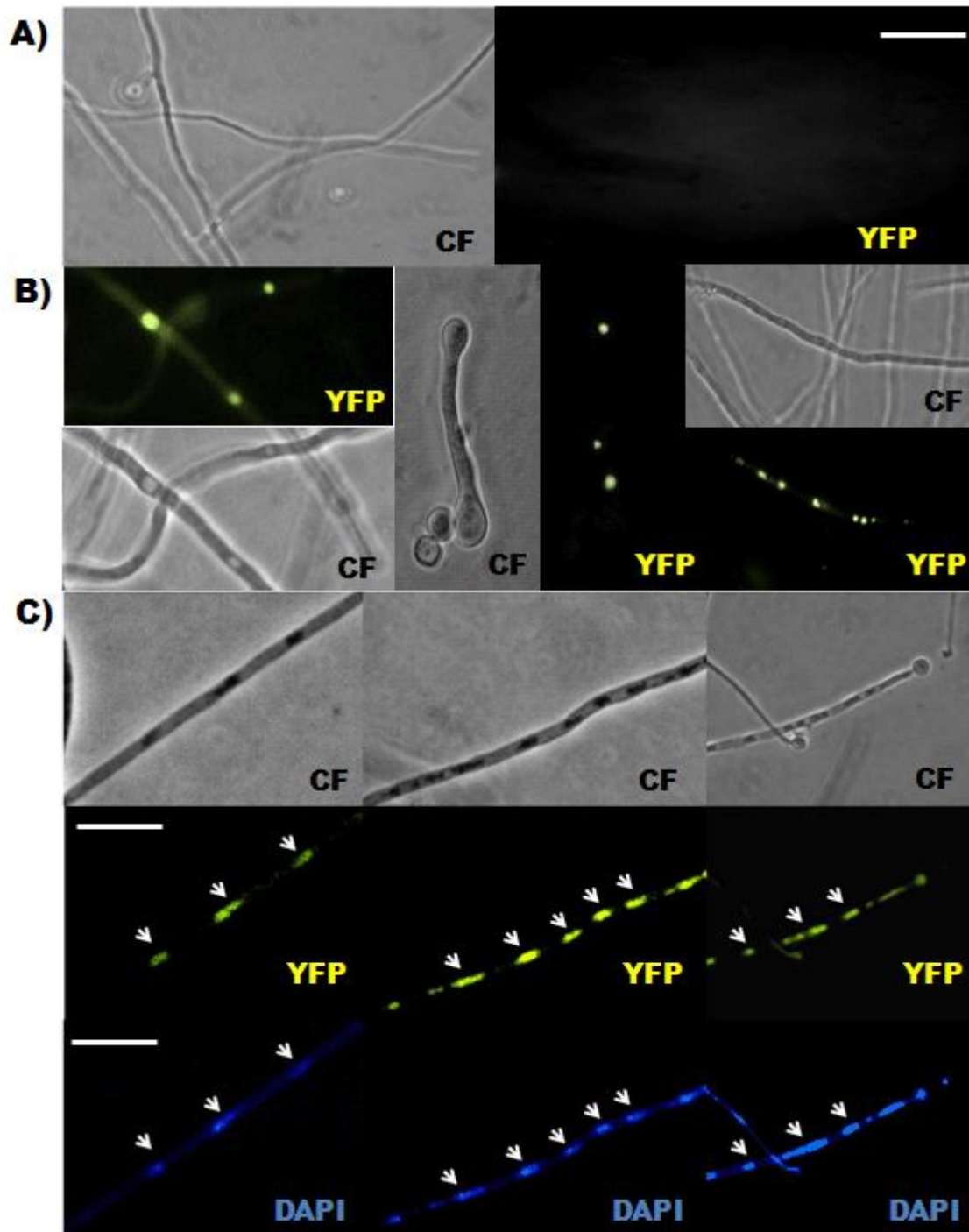


Figura 14. SrrA y NapA interaccionan en el núcleo solo en presencia de H₂O₂. La cepa TAM18 que expresa YFP-N::SrrA y YFP-C::NapA fue crecida en A) MM por 15h más otras 5h en treonina (inducción del promotor *AlcA*) en ausencia de H₂O₂. B) y C) Micelio crecido por 15 h más 5 h en treonina adicionado con H₂O₂ 25 mM por 1h. Las flechas indican la localización de la interacción entre las proteínas SrrA y NapA. Las fotos fueron tomadas en el microscopio de epifluorescencia NIKON E600. Barra 20 μ m.

7. El transcriptoma de las esporas de la mutante *ΔnapA* indica que NapA está involucrada en algunos procesos de detoxificación celular, la respuesta antioxidante y el catabolismo de fuentes alternativas de carbono.

Como se mencionó antes, las esporas de la mutante *ΔnapA* mostraron alta sensibilidad al H₂O₂ y la menadiona. Sin embargo, esta sensibilidad no se debe a la falta de actividad de la catalasa A, específica de las esporas (Datos sin publicar). Para tratar de indagar la causa de esta hipersensibilidad, específicamente en esporas y al mismo tiempo saber más acerca de los genes regulados por NapA, decidimos llevar a cabo un análisis transcriptómico de las esporas de una mutante *ΔnapA*, en comparación con una cepa silvestre.

Para esto, llevamos a cabo una extracción de RNA de esporas utilizando tres muestras independientes, tanto para la cepa WT como para la mutante *ΔnapA* y las dos mejores muestras (basados en calidad y cantidad de RNA) se enviaron a la unidad universitaria de secuenciación masiva de DNA del Instituto Biotecnología-UNA. Las bibliotecas de mRNA fueron generadas a partir de RNA total, usando el kit TruSeqV2 de illumina, con un tamaño de inserto entre 200 y 400 pb, estos fragmentos se utilizaron para sintetizar cDNA. La secuenciación se realizó en la plataforma *Genome Analyzer GAIIx* de la compañía Illumina para obtener lecturas pareadas de 2x72. Los mapeos se realizaron con smalt sobre el genoma de referencia y los conteos crudos se calcularon a partir de los bam files y la anotación del genoma. La secuenciación tuvo una cobertura del 96.3% del genoma de *A. nidulans* y con los conteos se realizó el análisis de expresión diferencial con el programa EdgeR.

Los niveles de transcrito de algunos de los genes de *napA* presentaron valores diferenciales en comparación a los de la WT. También se observó que las dos réplicas de la mutante *ΔnapA* tienen una mayor reproducibilidad entre ellas en comparación con las réplicas de la WT. En la Fig. 15A se ve que a pesar de que existe dispersión entre las muestras, se puede observar una clara separación entre las condiciones (WT y las mutantes).

El análisis global arrojó que más de 8 mil, de los aproximadamente 10, 500 genes de *A. nidulans* mostraron cambios en su expresión. Sin embargo, se eligieron solo aquellos transcritos que se encontraban diferencialmente expresados en al menos 2 magnitudes (relación de cambio) hacia arriba o hacia abajo tomando como valor de significancia $p \leq 0,05$ utilizando las pruebas de FDR. En un total de 215 genes que se encuentran diferencialmente expresados 202 (93.9%) genes mostraron una disminución y 13 genes (6.1%) un aumento en el número de transcritos acumulados en las conidias de la mutante *ΔnapA*, en comparación con la cepa WT (Fig.15B). Por

claridad en la descripción de los resultados y su discusión, se asumirá que los cambios en el nivel de transcritos en las conidias se deben a cambios en la expresión de los genes correspondientes, durante la formación de las conidias.

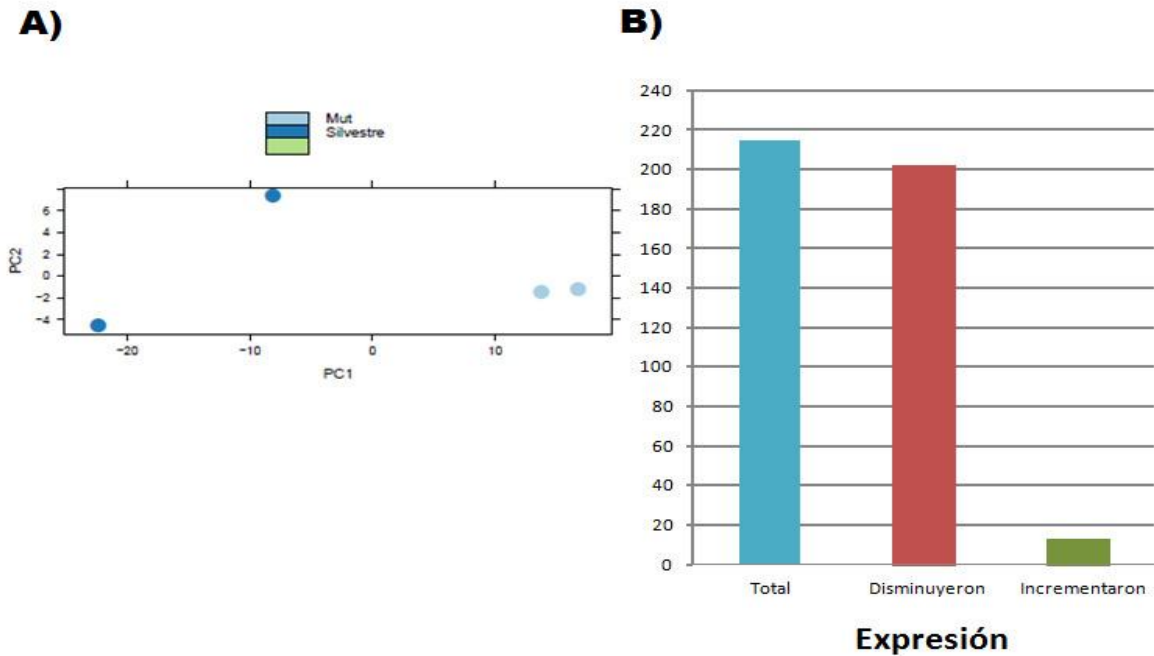


Figura 15. El análisis de expresión mostró patrones de expresión diferencial entre la mutante *ΔnapA* y la silvestre. A) La cepa WT y la mutante *ΔnapA* presentan un patrón de expresión diferencial entre ellas. B) De 215 genes que se encuentran diferencialmente expresados 202 genes disminuyeron y 13 genes aumentaron su expresión.

En las Tablas I y II se muestran los 13 genes que más aumentaron y disminuyeron su expresión, respectivamente, basados en el fold change (LogFC), el cual nos da una idea de la magnitud del cambio de expresión. De acuerdo con la Tabla I, se observó un aumento en la expresión de 7 genes que codifican para proteínas hipotéticas conservadas de función desconocida, 4 genes para proteínas membranales tipo MSF (Major Facilitator Transporter), relacionadas con la importación o exportación de distintos metabolitos. También se detectó la sobreexpresión de un gen que codifica para una proteína rica en cisteínas y de la nitrato reductasa. En estos casos el FT NapA podría estar actuando como represor transcripcional de dichos genes, ya sea directa o indirectamente.

Tabla I. Los 13 genes que incrementaron su número de transcritos en conidias de la mutante $\Delta napA$

Gen	LogFC	Descripción	Dominios
ANID_03557	-2.0	Proteína hipotética conservada	No encontrados
ANID_07796	-2.0	Proteína hipotética conservada	MFS
ANID_08329	-2.0	Aril-alcohol deshidrogenasa	GMC óxidoreductasa
ANID_05323	-2.1	Transportador de azúcar MFS	SP: MFS transportador
ANID_08449	-2.1	Nitrato reductasa	Dominio de unión óxidoreductasa molibdopterina, Mo-co oxidoreductasa, Citocromo b5 tipo Hemo/dominio de unión a esteroides
ANID_00020	-2.3	Proteína hipotética conservada	No encontrados
ANID_02475	-2.4	Transporte de monosacáridos MFS	SP: MFS transportador
ANID_03384	-2.4	Proteína hipotética conservada	Transferasa
ANID_02838	-2.6	Proteína hipotética conservada	Dienelactona hidrolasa, alfa/beta hidrolasa
ANID_09027	-2.7	Proteína hipotética conservada	Súper-familia Metalo-beta-lactamasa
ANID_07839	-7.9	Proteína hipotética conservada	Transporte membranal tipo ABC
ANID_07836	-9.4	Proteína rica en cisteínas	No encontrados
ANID_07834	-10.1	Proteína hipotética conservada	Proteína de incompatibilidad de heterocarión

Tabla II. Los 13 genes que disminuyeron más su número de transcritos en conidias de la mutante $\Delta napA$

Gen	LogFC	Descripción	Dominios
ANID_07418	5.5	FAD monooxigenasa	Fenol hidroxilasa, dominio de dimerización C-terminal , dominio de unión a FAD
ANID_02676	4.9	Proteína hipotética conservada	No encontrados
ANID_09000	4.4	MFS transportador	Familia MFS
ANID_10346	3.8	Cutinasa	Cutinasa, fosfolipasa/Carboxil esterasa
ANID_05422	3.8	Beta-lactamasa	Beta-lactamasa
ANID_08981	3.6	Proteína hipotética conservada	Familia GPR1/FUN34/yaaH
ANID_08426	3.6	Proteína hipotética conservada	Factor transcripcional específico de hongos Zn(2)-Cys(6)
ANID_08980	3.4	Proteína hipotética conservada	No encontrados
ANID_10099	3.2	Piridoxamina fosfato oxidasa	Piridoxamina 5'-fosfato oxidasa
ANID_10086	3.1	función desconocida	DUF1446
ANID_03769	3.0	Factor transcripcional tipo C6	Factor transcripcional específico de hongos
*ANID_08979	2.8	Alcohol deshidrogenasa I	Alcohol deshidrogenasa, dominio tipo GroES, deshidrogenasa con unión a Zinc

Por otro lado, en la Tabla II se observa una disminución en los transcritos de 4 genes de proteínas hipotéticas conservadas de función desconocida, 1 transportador tipo MFS, 2 factores transcripcionales, 2 oxidasas y 3 proteínas del catabolismo de carbohidratos, incluyendo el gene *alcA* (AN08979), el cual codifica para la alcohol deshidrogenasa I, indispensable para utilizar el etanol como fuente de carbono.

La alteración de la expresión de genes que codifican para proteínas relacionados con procesos de transporte es consistente con que, en *S. pombe*, Pap1 está relacionado con la expresión de varias proteínas involucradas en la desintoxicación celular, mediante el uso de bombas de eflujo que permiten la salida de compuestos tóxicos (Calvo, Garcia et al. 2012). Posteriormente, para analizar y clasificar por función a los 215 genes que mostraron una expresión diferencial, se realizó un análisis GO, disponible en la página del genoma de *A. nidulans*.

Como se observa en la Fig. 16A, la mayor parte de los genes con expresión disminuida tienen no se conoce su función, pero le siguen los genes que tienen que ver con actividades de oxidoreductasa, lo cual indica la importancia del FT NapA en la homeostasis redox de la célula en condiciones normales de diferenciación celular y no solo durante la respuesta al estrés oxidativo. En la Fig. 16B se observa que los genes cuya expresión aumenta, dejando fuera los de actividad desconocida, son los relacionados con actividades de transporte.

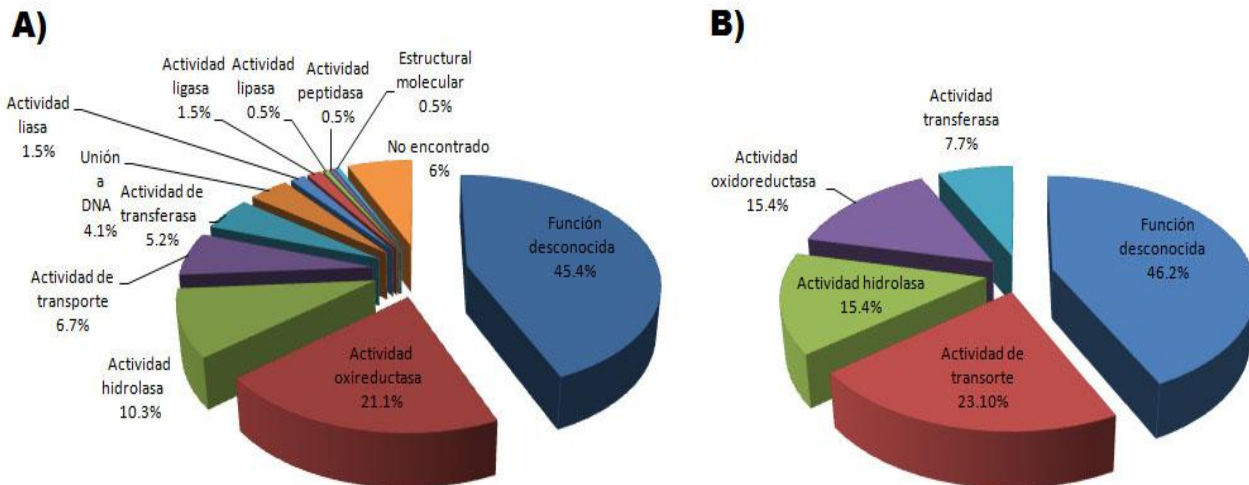


Figura 16. El análisis GO mostró diversas actividades en las que está involucrada NapA. A) Distribución funcional de los genes cuya expresión se ve disminuida. B) Distribución funcional de los genes sobre-expresados.

Tabla III. Genes de oxidoreductasas según análisis Go con un número de transcritos disminuido en la mutante *ΔnapA*

Gen	LogFC	Descripción	Dominios
ANID_07418	5.5	Monooxigenasa FAD	Fenol hidrolasa, dominio de dimerización C-terminal , dominio de unión a FAD
ANID_07981	3.8	Ferri-quelato reductasa	Dominio de unión a FAD
ANID_10388	3.6	Proteína hipotética conservada	Berberina y tipo berberina, DominioFAD
ANID_06096	3.4	Proteína hipotética conservada	Familia Aldo/keto reductasa
ANID_08349	3.3	Salicilato hidroxilasa	Piridina nucleótido-disulfuro oxidoreductasa, dominio de unión a FAD
ANID_00330	3.2	Flavin oxidoreductasa dependiente de NADH	NADH: flavin oxidoreductasa / familia NADH oxidase
ANID_10099	3.2	Piridoxamina fosfato oxidasa	Piridoxamina 5'-fosfato oxidasa
ANID_02504	3.1	Proteína hipotética conservada	óxidoreductasa dependiente de FAD
ANID_00618	3.1	Óxidoreductasa	Dominio KR , deshidrogenasa de cadena corta
ANID_10005	3.0	Deshidrogenasa de cadena corta/reductasa SDR	Deshidrogenasa de cadena corta
*ANID_08979	2.8	Alcohol deshidrogenasa I	Alcohol deshidrogenasa, dominio tipo GroES, deshidrogenasa con unión a Zinc
ANID_04643	2.8	Proteína hipotética conservada	Citocromo P450
ANID_02704	2.8	Proteína hipotética conservada	GMC oxidoreductasa
ANID_10296	2.8	Oxidoreductasa dependiente de FAD	Dominio de unión a FAD , flavocitocromo C, oxidoreductasa dependiente de FAD, Flavín oxidoreductasa
ANID_06414	2.8	Proteína hipotética conservada	Citocromo P450
ANID_02682	2.8	12-oxophytodienoate reductasa	NADH: flavín oxidoreductasa/ familia NADH oxidasa
ANID_10667	2.7	Alcohol deshidrogenasa	Alcohol deshidrogenasa, dominio tipo GroES, deshidrogenasa con unión a Zinc
ANID_02723	2.7	Histidinol deshidrogenasa	Histidinol deshidrogenasa
*ANID_07388	2.6	Catalasa-peroxidasa	Peroxidasa, catalasa/peroxidasa HPI
ANID_05287	2.6	Familia Acil-CoA deshidrogenasa miembro 11	Acil-CoA deshidrogenasa
ANID_03400	2.5	Deshidrogenasa tipo cadena corta	Dominio KR , deshidrogenasa de cadena corta
ANID_03206	2.5	Glucosa-metanol-colina oxidoreductasa	GMC oxidoreductasa
ANID_07415	2.5	Proteína hipotética conservada	Dominio de unión a FAD
*ANID_00554	2.4	Aldehído deshidrogenasa ALDH	Familia Aldehído deshidrogenasa
ANID_05854	2.4	Oxidoreductasa	2-nitropropano dioxigenasa, deshidrogenasa dependiente de FMN, región conservada en glutamato sintetasa
ANID_08547	2.3	GMC oxidoreductase	GMC oxidoreductasa
ANID_02389	2.3	ketopantoato reductasa	Ketopantoato reductasa PanE/ApbA, apbA_panE: 2-deshidropantotato 2-reductasa, Ketopantotato reductasa PanE/ApbA
ANID_01825	2.3	Sulfido: quinona oxidoreductasa	Piridina nucleótido-disulfuro oxidoreductasa
ANID_11096	2.3	Proteína hipotética conservada	Deshidrogenasa de cadena corta
ANID_05360	2.3	Proteína hipotética conservada	Citocromo P450
ANID_05373	2.3	3-oxoacyl-reductasa	Deshidrogenasa de cadena corta, 23BDH: acetoina reductasas
ANID_08250	2.3	Proteína hipotética conservada	Citocromo P450
ANID_04126	2.3	Aldehído deshidrogenasa	Familia de Aldehído deshidrogenasa
ANID_02396	2.3	Proteína hipotética conservada	Epimerasa dependiente de NAD /Familia deshidrogenasa
*ANID_02666	2.2	sorbitol/xilitol deshidrogenasa	Deshidrogenasa con unión a Zinc, bchC: vía de síntesis de Clorofila , bchC, dominio tipo GroES
ANID_09315	2.2	Proteína hipotética conservada	Piridina nucleotido-disulfuro oxidoreductasa
ANID_02335	2.2	3-hidroxisobutirato deshidrogenasa	Dominio de unión de NAD 6-fosfogluconato
ANID_04829	2.1	Alcohol deshidrogenasa	Familia Aldo/keto reductasa
ANID_03399	2.0	Proteína con dominio de unión a FAD	Dominio de unión a FAD
ANID_05550	2.0	Proteína hipotética conservada	Dominio de unión a FAD
*ANID_08978	2.0	Alc R, FT involucrado en la regulación del metabolismo del etanol.	Dominio KR , deshidrogenasa de cadena corta, epimerasa/deshidratasa dependiente de NAD

Sin embargo, dado el alto número de genes y variedad de funciones que se asociaron a ellos, en la Tabla III únicamente se presentan los 41 genes que codifican actividades de óxido-reductasas, los cuales incluyen cuatro genes de proteínas hipotéticas con dominios de citocromo P450. Esta familia de proteínas se encuentra conservada en los seres vivos y está relacionada con el catabolismo de compuestos tóxicos exógenos y endógenos, lo cual indica el papel de NapA en la desintoxicación celular.

En una búsqueda de genes relacionados con la respuesta a la menadiona, basada en un estudio transcriptómico realizado en *N. crassa* (Zhu, Yu et al. 2013), se encontró que de los 130 genes que modifican su expresión en presencia de este compuesto, únicamente las mutantes en cuatro de estos genes mostraron sensibilidad a la menadiona. La primera mutante carece del factor transcripcional llamado SER-1 (NCU07728) y las otras tres mutantes están afectadas en algunos genes asociados con mecanismos de detoxificación, como la catalasa (NCU00355), la citocromo C peroxidasa ccp-1 (NCU03297) y la chaperona de cobre asociada a la superóxido dismutasa ccs-1 (NCU07851).

En la búsqueda de los ortólogos de estos genes en *A. nidulans*, que además se presentaran en la lista de nuestros datos de transcriptómica, solo se encontró uno que presenta un 25% de identidad con la proteína CCP1, que es el gen de la CpeA que codifica para la catalasa-peroxidasa CatD. La mutante *N. crassa* carente de este gen, fue la única que presentó alta sensibilidad tanto a la menadiona como al H₂O₂. Sin embargo, en *A. nidulans* la actividad de catalasa D se induce muy poco en presencia de H₂O₂ (Kawasaki and Aguirre 2001) y se desconoce si las mutantes son sensibles a estos compuestos. Hasta el momento se puede proponer que la alta sensibilidad de la mutante $\Delta napA$ al H₂O₂ y la menadiona puede deberse a la falta de varias proteínas relacionadas con la homeostasis redox (tabla III).

Otros genes cuya expresión se reduce en el fondo $\Delta napA$ corresponden al gen *alcA* que codifica para la enzima alcohol deshidrogenasa I (ADHI), el gen *aldA* que codifica para la aldehído deshidrogenasa (ALDH) y el gen *alcR*, el cual codifica para el regulador de la expresión de *alcA* y *aldA*. El etanol puede ser utilizado como fuente de carbono mediante la conversión de éste a acetaldehído (por la ADHI) y a acetato (por la ALDH) y este último entra en el metabolismo general de la célula como acetil-CoA. Los genes *alcA* y *aldA* están sujetos a represión por catabolitos de carbono mediada por el represor CreA y a una vía de inducción específica mediada por el activador AlcR en presencia de un co-inductor externo (etanol, treonina, etc.).

Decidimos probar experimentalmente los efectos de la posible reducción o carencia de ADHI y ALDH en las esporas sembrando conidias $\Delta napA$ en medio con etanol como única fuente de

carbono. Como se observa en la Fig. 17A, las mutantes $\Delta napA$ son incapaces de crecer en etanol. Para confirmar este resultado se inocularon las esporas de la mutante $\Delta napA$ en medio con glucosa más alcohol alílico (AA), utilizando como control a la mutante *CreA*, la cual presenta desrepresión catabólica y expresa el gen *alcA* aún en presencia de glucosa. La ADHI convierte al AA en acroleína, un compuesto altamente tóxico para la célula (Rando 1974). La incapacidad de las conidias de la mutante $\Delta napA$ para crecer en presencia de AA indica que estas conidias podrían tener suficiente ADHI o sobreexpresar otra alcohol deshidrogenasa para transformar el AA en acroleína aún en presencia de glucosa, lo cual sugiere una desrepresión catabólica. Esto es contradictorio con la incapacidad de la mutante $\Delta napA$ para crecer en etanol. Estas mismas pruebas también se realizaron en micelio, en donde, como se ve en la Fig. 17B, el micelio de la mutante $\Delta napA$ crece muy poco en etanol. Sin embargo, al igual que en esporas, la mutante no puede crecer en medio con glucosa y AA. Estos resultados sugieren que la mutante $\Delta napA$ podrían expresar otra actividad de alcohol deshidrogenasa capaz de transformar el AA en acroleína, pero incapaz o ineficiente para utilizar el etanol como sustrato.

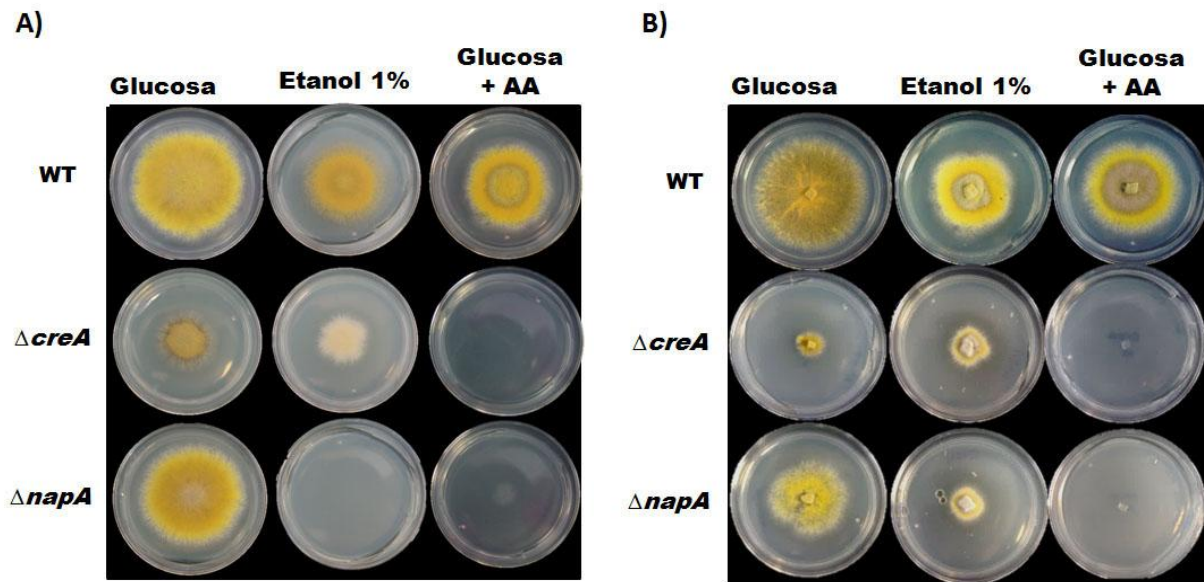


Figura 17. NapA se requiere para la utilización del etanol y posiblemente para la represión por carbono. A) Esporas asexuales (1×10^3) de cada una de las cepas se sembraron en cajas de MM adicionadas con etanol 1% como fuente de carbono y en MM adicionado con Alcohol Alílico 5mM. Las fotografías se tomaron a los 4 días de incubación a 37°C. B) Discos de micelio obtenidos del borde de colonias de cinco días de crecimiento de cada cepa se usaron para inocular cajas de MM con 1% etanol como fuente de carbono o en MM con glucosa y alcohol Alílico 5mM. Las fotografías se tomaron a los 4 días de incubación a 37°C. La cepa CLK43 se utilizó como WT.

Dado que NapA regula el nivel de los transcritos de las enzimas ADH y ALDH y el regulador transcripcional AlcR, quisimos saber si los factores transcripcionales AtfA y SrrA también participan en este proceso. En la Fig.18 se observa que tanto las esporas como el micelio de las

mutantes $\Delta srrA$ y $\Delta atfA$ pueden crecer en etanol y en medio con glucosa y alcohol alílico, indicando que, a diferencia de NapA, estos factores transcripcionales no participan en la regulación de la utilización del etanol.

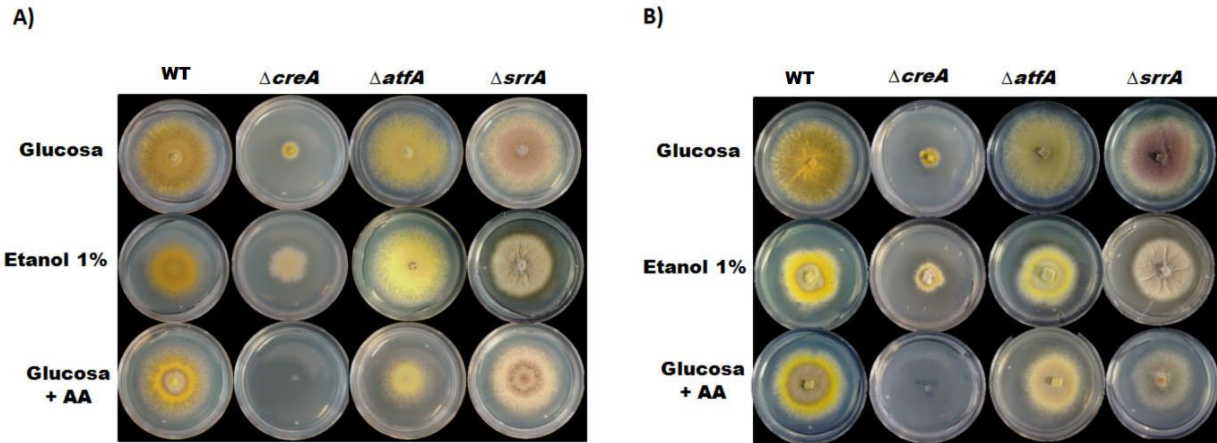


Figura 18. Los factores transcripcionales SrrA y AtfA no participan en la utilización de etanol. A) Esporas asexuales (1×10^3) de cada una de las cepas se sembraron en cajas de MM adicionadas con etanol 1% como fuente de carbono y en MM adicionado con Alcohol Alílico 5mM. Las fotografías se tomaron a los 4 días de incubación a 37°C. B) Discos de micelio obtenidos del borde de colonias de cinco días de crecimiento; cada una de las cepas se sembraron en cajas de MM adicionadas con etanol 1% como fuente de carbono y en MM adicionado con Alcohol Alílico 5mM. Las fotografías se tomaron a los 4 días de incubación a 37°C. La cepa CLK43 se utilizó como WT.

DISCUSIÓN

1. Los factores transcripcionales NapA, SrrA y AtfA juegan un papel diferencial en la respuesta al estrés oxidativo

Nuestros resultados muestran que mutantes sencillas carentes de los factores transcripcionales SrrA, NapA o AtfA tienen un grado diferente de sensibilidad al H₂O₂. También encontramos que las mutantes dobles y triples no son más sensibles al H₂O₂ que la mutante $\Delta napA$, que es la más sensible a este oxidante. Estos resultados son consistentes con lo encontrado en *S. pombe*, en donde se ha propuesto que Pap1 está involucrado en la respuesta a concentraciones bajas de H₂O₂, dependiente de la oxidación de la peroxirredoxina Tpx1 (Vivancos, Castillo et al. 2005), que Prr1 participa en la respuesta a concentraciones intermedias de H₂O₂ (Quinn, Malakasi et al.) y Atf1 está involucrada en la respuesta a altas concentraciones de H₂O₂ (Quinn, Findlay et al. 2002).

Además, nuestros resultados muestran que la importancia que los factores transcripcionales SrrA, NapA y AtfA tienen en la respuesta antioxidante varía según el estado de desarrollo en que se encuentra *A. nidulans*. Así, a concentraciones intermedias y altas de H₂O₂, NapA es primordial para la respuesta en esporas y SrrA es más importante en el micelio, mientras que AtfA es importante en esporas y juega un papel menor en el micelio. Esta distinta sensibilidad a los mismos compuestos oxidantes mostrada por las esporas asexuales, en comparación con el micelio, parece relacionada con la distinta capacidad antioxidante en distintas etapas del desarrollo del hongo. Por ejemplo, la actividad de la catalasa CatA se encuentra exclusivamente en las esporas (Navarro et al. 1996), mientras que CatB se encuentra en el micelio en crecimiento y en la fase estacionaria de crecimiento, junto con CatD (Kawasaki et al. 1997). La variación en la expresión de las distintas catalasas y posiblemente otras enzimas antioxidantes podría deberse a una contribución diferencial de los FT SrrA, NapA y AtfA en la regulación de estos genes.

Las mutantes $\Delta srrA$ al igual que las mutantes nulas en Prr1 son sensibles al estrés causado por peróxidos como el H₂O₂ y el terbutil-hidroperóxido. Sin embargo, estas mutantes no son sensibles a la menadiona (Ohmiya, Yamada et al. 2000). Por el contrario, tanto las esporas como el micelio de la mutante $\Delta napA$ mostraron sensibilidad a la menadiona, al igual que en el hongo *C. glabrata*, en donde el FT Yap1 está relacionado con la expresión de la enzima SOD, necesaria para contrarrestar el estrés causado por la menadiona (Roetzer, Klopff et al. 2011) y esto mismo se observó en *S. cerevisiae* (Lee, Godon et al. 1999). Recientemente se encontró en el hongo *Ashbya gossypii* que la expresión de Yap1 y de otros genes relacionados con la respuesta

antioxidante (la CAT y la SOD) se incrementan en presencia de menadiona (Kavitha and Chandra 2014), indicando la participación de este factor transcripcional en la respuesta al estrés oxidativo ocasionado por menadiona.

2. SrrA participa en la regulación del metabolismo secundario

Debido a que el fenotipo $\Delta srrA$ predomina en las dobles y triples mutantes, es de considerar que SrrA juega un papel importante como regulador del metabolismo secundario, este último probablemente relacionado con la acumulación del pigmento en mutantes con este fondo. Un papel regulador negativo del metabolismo secundario se propuso en *C. neoformans*, donde mutantes que carecen de *snk7* tienen más producción de melanina (Bahn, Kojima et al. 2006), al igual que en *Magnaporthe oryzae* en donde el incremento de melanina en mutantes *snk7* se debe a la inducción temprana del gen *PIG1*, cuyo producto se requiere para la melanización de la hifa (Motoyama, Ochiai et al. 2008). Por otra parte Snk7 fosforilado regula genes involucrados en la síntesis de la pared celular, como el gen *OCH1*, el cual codifica para la α -1,6-manosiltransferasa (Li, Dean et al. 2002) y el gen *NCA3*, cuya proteína se localiza en la pared celular y participa en la formación de los septos.

Por otro lado, NapA parece no estar involucrada en el desarrollo asexual del hongo *A. nidulans*; ya que, cepas carentes de NapA presentan colonias similares a las de una cepa silvestre. Pero se ha visto que NapA participa como inhibidor en el desarrollo sexual, ya que cepas que carecen de esta proteína presentan un aumento en el número de cleistotecios (Lara-Rojas, 2012).

3. NapA y SrrA interactúan físicamente en respuesta al H₂O₂

La interacción bajo estrés oxidativo de los factores transcripcionales Prr1 y Pap1 en *S. pombe* (Calvo, Garcia et al.) es necesaria para la transcripción de genes relacionados con la respuesta antioxidante, dicha interacción se ha comprobado mediante el uso de técnicas de co-inmunoprecipitación. Recientemente se encontró que en la levadura *S. pombe* se necesita la interacción de los factores transcripcionales Pap1 y Prr1 para la inducción de los genes *trr1* (tioredoxina reductasa), *srx1* (sulforredoxina) y *ctf* (catalasa) así como de genes relacionados con la desintoxicación celular. Cuando Pap1 está oxidada puede formar un heterodímero con Prr1 e inducir la expresión de genes de la respuesta antioxidante y de desintoxicación celular. Sin embargo, cuando Pap1 se encuentra reducido únicamente puede inducir la expresión de genes de desintoxicación, lo cual indica que es necesaria la interacción entre estos dos FT para inducir los genes de respuesta al estrés oxidativo (Calvo, Garcia et al. 2012).

Nuestros resultados muestran que SrrA y NapA interactúan en el núcleo solo en presencia de H₂O₂. Dado que tanto SrrA (Vargas-Perez, Sanchez et al. 2007) como NapA (Lara-Rojas, 2012) se requieren para la inducción de CatB por H₂O₂, es claro que la interacción de ambos FT es esencial para inducir ciertos genes. Sin embargo, los distintos fenotipos de las mutantes $\Delta srrA$ y $\Delta napA$, tanto en los patrones de sensibilidad al estrés oxidativo como de utilización de fuentes de carbono y diferenciación celular, claramente indican que cada FT regula su propio grupo de genes de manera individual.

4. GpxA y TpxA no se requieren para la función de NapA

En las levaduras la activación de los FTs tipo AP-1 se lleva a cabo por peroxirredoxinas; Gpx3 en el caso de *S. cerevisiae* y Tpx1 en el caso de *S. pombe*. Recientemente se eliminaron las proteínas GpxC y la TpxA en el hongo filamentoso *Epichloë festucae* para identificar a la proteína que activa al FT YapA (Cartwright and Scott 2013). Sin embargo, las mutantes $\Delta gpxC$, $\Delta tpxA$ y $\Delta gpxC \Delta tpxA$ no mostraron sensibilidad a compuestos oxidantes. También se encontró que la localización de YapA en presencia H₂O₂ no se altera en estas mutantes. Estos datos y nuestros resultados con las mutantes carentes de GpxA y TpxA sugieren que la activación de los FT tipo AP-1 en hongos filamentosos no se lleva a cabo por ningún tipo de peroxirredoxina y que posiblemente el H₂O₂ oxide a NapA directamente, como sucede con el FT OxyR en *Escherichia coli* (Aslund, Zheng et al. 1999). Sin embargo, aún queda por comprobar si una mutante doble $\Delta gpxA \Delta tpxA$ es sensible al H₂O₂.

5. NapA regula la utilización de diversas fuentes de carbono alternativas

A. nidulans es capaz de ajustar su catabolismo dependiendo de los sustratos disponibles. Cuando crece en un medio con sustratos complejos que contiene tanto fuentes de carbono favorables (como la glucosa) y otras menos favorables (como el etanol). *A. nidulans* es capaz de reprimir los genes involucrados en la utilización de la fuente de carbono menos favorable. Esta represión se conoce como represión por catabolito. Una proteína importante que controla la represión por catabolitos en *A. nidulans* es CreA (Arst and MacDonald 1973) y es quizá una de las proteínas más estudiadas. Las fuentes de carbono se han dividido en represores fuertes (la D-glucosa, la D-xilosa, la sacarosa y el acetato), represores intermedios (la D-manosa, la maltosa, la D-fructosa, la D-manitol y la D-galactosa) y los no-represores (el glicerol, la melobiosa, la lactosa, la L-arabinosa y el etanol). En *S. cerevisiae* la participación de Yap1 en el metabolismo de carbohidratos se

sugirió hace tiempo por Toledano y colaboradores (Lee, Godon et al. 1999), debido a que en un análisis de proteómica se encontró que varias proteínas del metabolismo de azúcares como la trans-aldolasa, la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, la fosfoglucomutasa y la trealosa-6-sintetasa se acumulan de manera dependiente de Yap1 en presencia de H₂O₂. Sin embargo, no se ha demostrado que Yap1 u otro homólogo se requieran para la represión por catabolito o la utilización de arabinosa, fructosa o etanol, tal como nuestros resultados muestran.

Los resultados de transcriptómica parecen explicar la incapacidad de la mutante *ΔnapA* para crecer en arabinosa. Se sabe que las enzimas L-arabinosa reductasa, L-arabitol deshidrogenasa, L-xilulosa reductasa y xilitol llevan a cabo el catabolismo de la arabinosa (Ruijter, Vanhanen et al. 1997). En *A. nidulans* esta última enzima se encuentra codificada por el gen ANID_02666, el cual se encuentra dentro de los genes cuya expresión disminuyó en la mutante *ΔnapA* (Tabla III). Por lo tanto, el defecto de crecimiento de la mutante en esta fuente de carbono podría deberse a que el catabolismo completo de la L-arabinosa no se lleva a cabo por una limitación de la enzima xilitol deshidrogenasa. Debido a que la utilización de arabinosa consume poder reductor (NADPH) y que algunos de los genes que Yap1 regula en *S. cerevisiae* están relacionados con la re-generación del poder reductor intracelular, existe la posibilidad de que la mutante *ΔnapA* no genere suficiente poder reductor para crecer en arabinosa.

Dado que en una mutante *ΔcreA* no existe represión catabólica, las enzimas ADHI y ALDH se expresan de manera constitutiva y por lo tanto puede crecer en etanol, mientras que en un medio con glucosa y AA, la mutante *ΔcreA* no crece, debido a que convierte el AA en acroleína que es altamente tóxica.

En las esporas de la mutante *ΔnapA* presentan muy baja expresión del gen de la ADHI y son incapaces de crecer en etanol, era de esperarse que pudiera crecer en presencia de AA, sin embargo, esto no sucedió. Es posible que en *A. nidulans* exista otra enzima, además de la ADHI, capaz de descomponer al AA tal y como se ha sugerido en la levadura *Pichia pastoris*, en donde la enzima alcohol oxidasa convierte el AA en acroleína (Johnson, Waterham et al. 1999). Dado que la expresión de los genes *alcB* (ADHII) y *alcC* (ADHIII), que codifican para enzimas con actividad de alcohol deshidrogenasa, no se altera en la mutante *ΔnapA* se podría sugerir que alguna de estas enzimas se expresa en glucosa y AA. También hay que considerar que la degradación de AA a acroleína requiere únicamente la acción de una alcohol deshidrogenasa, mientras que la degradación de etanol implica tanto la actividad de la ADHI como la de ALDH, sin embargo, la expresión de ambos genes y del gen que los regula, está notablemente reducida en

las conidias (y presumiblemente también en el micelio) de las mutantes $\Delta napA$. A pesar de que nuestros datos de transcriptómica indican la presencia de dos proteínas con actividad de aldehído deshidrogenasa, únicamente se ha caracterizado a la ALDHI como la proteína principal implicada en el metabolismo de etanol. Proponemos que NapA regula la expresión de estas enzimas uniéndose al promotor del gen regulador *alcR* y/o los promotores de *alcA* y *aldA* durante la conidiación para asegurar su presencia en las esporas y la posibilidad de germinar en etanol u otras fuentes de carbono.

CONCLUSIONES

- ✓ Los factores transcripcionales SrrA, NapA y AtfA tienen papeles diferenciales en la respuesta al estrés oxidativo. A concentraciones bajas y/o intermedias de H₂O₂ NapA (en esporas) y SrrA (en micelio) son esenciales para la respuesta antioxidante, mientras que AtfA es importante para la respuesta a altas concentraciones de este compuesto oxidante. Los fenotipos de las mutantes sencillas, dobles y triples bajo diferentes tipos de estrés y fuentes de carbono indican que estos FT regulan genes por separado y en conjunto.
- ✓ El fenotipo de sobreproducción de un pigmento oscuro, tipo melanina, presente en las mutantes $\Delta srrA$ sugiere que SrrA es un regulador negativo del metabolismo secundario.
- ✓ SrrA se encuentra de manera en el núcleo.
- ✓ SrrA y NapA interactúan en el núcleo en presencia de H₂O₂.
- ✓ La activación de NapA no requiere de la GpxA o TpxA, sugiriendo un proceso de señalización río arriba diferente que en levaduras.
- ✓ El análisis transcriptómico en la mutante $\Delta napA$ reveló una posible participación de NapA dentro de la represión por catabolito. En donde la expresión de las enzimas ADH, ALDH y Xilitol deshidrogenasa disminuyen en ausencia de NapA, y como consecuencia, el etanol y la arabinosa no pueden ser metabolizados en un fondo genético carente de este factor transcripcional. La participación de NapA en la regulación transcripcional del circuito alcR – alcA – AldA podría ser independiente del regulador maestro de la represión catabólica CreA.

PERSPECTIVAS

- ❖ Validar los datos de transcriptómica, realizando qRT-PCR.
- ❖ Determinar la posible unión de NapA a los promotores de las enzimas ADHI, ALDH y xilitol-deshidrogenasa, mediante un análisis bio-informático.
- ❖ Determinar los genes que dependen de NapA y SrrA en condiciones de estrés oxidativo mediante transcriptómica y/o Chip-seq.
- ❖ Evaluar la sensibilidad al H₂O₂ de una doble mutante $\Delta gpxA \Delta tpxA$, así como determinar la localización de NapA en este fondo.

MATERIALES Y MÉTODOS

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

Se cultivó a *Aspergillus nidulans* en medio mínimo (Zhang, Lamm et al.) (Hill 2001), con 1% de glucosa más los suplementos necesarios para cada cepa. Los medios sólidos se prepararon con 1.25% de agar y se incubaron a 37° C, mientras que los cultivos líquidos se crecieron a la misma temperatura y 300 rpm de agitación. Los medios de cultivo y el material utilizado se esterilizaron por autoclave a 121° C por 15 min. Las cepas se inocularon por punto o con un número conocido de conidiosporas. Las cepas utilizadas en este trabajo se enlistan en la tabla 1.

Las pruebas de sensibilidad a los diferentes tipos de estrés, se realizaron inoculando 1×10^3 esporas o un fragmento de micelio cortado del borde de una colonia de 5 días de crecimiento. Las sales para las pruebas de estrés osmótico y las diferentes fuentes de glucosa se añadieron antes de esterilizar los medios. Para las pruebas de estrés oxidativo, la menadiona, el paraquat y el metilglioxal se esterilizaron por filtración, al igual que el t-BOOH y el H₂O₂ que se añadieron al medio antes de que solidificara ($\approx 50^\circ$ C). Las cajas con H₂O₂ se prepararon y sembraron el mismo día o 24 h después como máximo. Debido a que el H₂O₂ puede reaccionar con componentes presentes en el medio, la concentración en las cajas no se puede estimar con exactitud. Para asegurar la reproducibilidad del experimento el mismo medio con H₂O₂ se uso para comparar las diferentes cepas.

Generación de dobles y triples mutantes mediante cruza sexuales

Para construir las mutantes dobles $\Delta srrA \Delta napA$, $\Delta srrA \Delta atfA$ y la triple mutante $\Delta srrA \Delta atfA \Delta napA$ se realizaron cruza sexuales entre cada una de las mutantes sencillas generadas previamente en el laboratorio (CFL7, *TsrrA*, TFL $\Delta atfA$ -02 y $\Delta napA$). Para ello ambos padres se inocularon aproximadamente 5 mm uno frente a otro en medio mínimo con todos los suplementos necesarios para cada cepa y se incubaron por 2 días a 37°C. Pasado el tiempo de incubación se cortaron los pedazos en donde existe unión entre las hifas de ambos padres y se colocaron en MM para después ser incubadas por 2 días a 37°C. Posteriormente se cerraron perfectamente las cajas con cinta y se incubaron otros 5 días a 37°C. Después de la incubación los cuerpos fructíferos o cleistotecios se aislaron y se limpiaron. Posteriormente se transfirieron a un tubo con 1mL de agua estéril en donde se fragmentaron para dejar salir las ascosporas (esporas sexuales) y generar así una suspensión de ascosporas. Esta suspensión se plaqueó en medio mínimo-paba con el fin de obtener cepas en un fondo genético similar al de la cepa silvestre CLK43 (auxótrofas

a ácido p-aminobenzóico y con esporas color amarillo). Las placas se incubaron a 37°C por tres días para después seleccionar los cleistotecios híbridos.

El fondo $\Delta srrA$ se identificó a simple vista debido a su fenotipo peculiar (bordes irregulares, defecto en la conidiación y acumulación de pigmento rojizo). Mientras que, mediante una PCR diagnóstica con los oligos 5Dig-nkuA y 3Dig-nkuA se identificó a las cepas que contenían el gen silvestre *nkuA* (*nkuA*⁺). La mutación en el gen *nkuA* (*nkuA*⁻) elimina la recombinación no-homóloga (Nayak, Szewczyk et al. 2006), algo deseado en la transformación. Sin embargo, la proteína nKuA ha sido asociada a procesos de reparación del ADN (Lima, Malavazi et al. 2008), remodelación de histonas y metilación del ADN (Palmer, Mallareddy et al.), por lo cual no es deseable mantener el fondo nKuA⁻ en las mutantes en estudio.

Primeramente se generó la doble mutante $\Delta srrA \Delta napA$ mediante la cruce TsrrA ($\Delta srrA$) x CFL07 ($\Delta napA$) y se confirmó por PCR la mutación $\Delta napA$, amplificando el marcador de delección *AfpyrG* de *A. fumigatus*, así como el fondo *nkuA*⁺ (Fig.S1). La cepa No.17 fue seleccionada y nombrada CAM06 para utilizarla en experimentos posteriores.

Después se obtuvieron las mutantes $\Delta srrA \Delta atfA$ y $\Delta srrA \Delta napA \Delta atfA$ a partir de la cruce CAM06 ($\Delta srrA \Delta napA$) x TFL04 ($\Delta atfA$), las cuales se confirmaron por PCR amplificando los marcadores selectivos *AfriboB* (marcador para $\Delta atfA$) y *AfpyrG* (marcador para $\Delta napA$), así como también la presencia del gen *nkuA*. Como se observa en la Fig. 2S, primeramente se analizó el fondo *nkuA*⁺, utilizando los oligos 3Dig-nkuA y 5Dig-nkuA. Las cepas que presentaron el gen silvestre *nkuA* (asterisco) se seleccionaron para la PCR diagnóstica del fondo $\Delta napA$ y $\Delta atfA$, Fig. S2A. La Fig. S2C muestra que tres de las cepas (6, 9 y 26) no amplificaron la banda esperada para *AfpyrG* pero en la Fig. S2B si amplifican el marcador para *AfriboB* (asteriscos), por lo tanto estas cepas corresponden a mutantes dobles $\Delta srrA \Delta atfA$ o $\Delta napA \Delta atfA$, dependiendo de su fenotipo (asteriscos); mientras que las otras cuatro cepas (5, 8, 29 y 36) presentaron amplificación para *AfriboB* y *AfpyrG*, por lo tanto corresponden a mutantes triples $\Delta srrA \Delta napA \Delta atfA$ (cruces). Se escogieron para trabajar a las cepas 6 ($\Delta napA \Delta atfA$), 26 ($\Delta srrA \Delta atfA$) y 29 ($\Delta srrA \Delta napA \Delta atfA$), las cuales se nombraron CAM 07, CAM08 y CAM09, respectivamente.

Eliminación de los genes mediante la técnica de “double joint PCR” y transformación de *A. nidulans*

Las construcciones generadas para la eliminación de los genes se realizaron utilizando la técnica de “double joint PCR” (Yu, Hamari et al. 2004). En reacciones de PCR (Polymerase Chain Reaction) separadas, usando ADN genómico como templado, se amplificaron fragmentos de aproximadamente 1.5 Kb río arriba y río abajo del ORF a eliminar. Así también se amplificó la secuencia codificante de los marcadores selectivos *AfpyrG*, *AfriboB* o *AfpyroA* de *Aspergillus fumigatus*, según el caso. Las secuencias amplificadas se purificaron en columnas QIAquick® PCR Purification Kit y posteriormente se fusionaron en una cuarta PCR. Las construcciones generadas se purificaron por columnas QIAquick® PCR Purification antes de utilizarlas para transformar las cepa 11035 de *A. nidulans*. Se espera que las construcciones con el marcador de selección reemplacen al gen de interés mediante un evento de doble recombinación homóloga. La transformación se realizó mediante las técnicas de fusión de protoplastos o electroporación de conidias electrocompetentes (Sanchez y Aguirre 1996, Sanchez, Navarro et al. 1998). Las transformantes obtenidas se analizaron por PCR diagnóstica. En la tabla 2 se enlistan los oligonucleótidos utilizados en este trabajo. La eliminación de los genes *affA* y *sakA* se describió previamente (Lara-Rojas, Sanchez et al. 2011).

Eliminación de los genes *gpxA* y *tpxA*

Utilizando DNA genómico como templado se amplificaron en reacciones de PCR separadas, el fragmento 5' *gpxA* con los oligos 5'For-*gpxA* y 5'Rev-*gpxA* (tabla 2). Para generar el fragmento 3' *gpxA* se utilizaron los oligos 3'For-*gpxA* y 3'Rev-*gpxA*. Además de gene *AfriboB* de *A. fumigatus* como marcador selectivo. Los productos se fusionaron en una cuarta PCR utilizando los oligos 5'Nest-*gpxA* y 3Nest-*gpxA* para obtener un producto final *gpxA-AfriboB-gpxA* de 5 kb que se utilizó para transformar por electroporación la cepa 11035. La cepa 11035 que presenta un alelo mutante del gen *nkuA*, lo cual elimina la recombinación no-homóloga, aumentando la eficiencia en la selección de eventos de recombinación homóloga en la integración del ADN (Nayak, Szewczyk et al. 2006).

Se obtuvieron 6 transformantes en las cuales el reemplazó del gen *gpxA* por el marcador *AfriboB* se confirmó mediante PCR. De las 20 cepas transformantes se seleccionó a la cepa No.18, se denominó TAM16 para utilizarla en experimentos posteriores. Para la delección del gen AN10223

se utilizó como marcador el gen de *AfpyrG*, de las 15 transformantes obtenidas se confirmó por PCR y se eligió a la número 6 (TAM17), para experimentos posteriores (Fig. S3B).

Generación de la fusión *SrrA::GFP*

Para fusionar la proteína verde fluorescente (GFP) la región C-terminal de la proteína *SrrA*, se generaron por separado tres productos de PCR de acuerdo a lo reportado anteriormente (Yang, Ukil et al. 2004). Primero se amplificó un fragmento de la región 5' río arriba del codón de término de la traducción (Oligos: *SrrAGSP1* y *SrrAGSP2*). Segundo, se amplificó un fragmento de la región 3' de aproximadamente 2 Kb inmediatamente río abajo del codón de término (Oligos: *SrrAGSP3* y *SrrAGSP4*). Tercero, la secuencia codificante de la GFP y el marcador selectivo *AfpyrG* (Oligos: *SrrAGFP1* y *SrrAGFP2*) se amplificaron usando como templado el plásmido *PFNO3* (Nayak, Szewczyk et al. 2006). Los fragmentos se purificaron y se fusionaron por PCR, lo que permitió generar la construcción que se utilizó para transformar por electroporación (Sanchez, Navarro et al. 1998) la cepa 11035. La doble recombinación resulta en el reemplazo del gen silvestre *srrA* por la construcción. Se obtuvieron doce transformantes, las cuales se analizaron por PCR diagnóstico, se eligió a la transformante No. 8 a la cual se denominó TAM14 y se utilizó en experimentos posteriores.

Extracción de ADN

Se utilizaron las conidias de las diferentes cepas seleccionadas para inocular aproximadamente 30 mL de MM líquido en caja Petri y se incubaron durante 12 horas sin agitación a 37°C. 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 4 horas y se pulverizó con ayuda de una espátula. El ADN se obtuvo de acuerdo al protocolo (Timberlake 1980).

Microscopía

Las muestras de esporas o micelio se fijaron utilizando 2 soluciones: la primera consistió en una solución de 3.7% de formaldehído, 50 mM de NaHPO₄ (pH 7.0) y 0.2% de tween 80 durante 30 min, mientras que, la segunda fue una solución de Metanol/Etanol en una proporción 1 a 1 durante 5 min. Las muestras se lavaron con agua destilada para eliminar la solución fijadora, posteriormente se incubaron durante 5 min en oscuridad y a temperatura ambiente con una

solución de 0.1 µg/ml de 4,6-diamidino-2-fenilindol (DAPI-SIGMA) para detectar ácidos nucleicos. Las preparaciones se lavaron con agua destilada y examinaron en un microscopio de epifluorescencia NIKON Eclipse E600 para detectar DAPI y GFP. Las fotografías se tomaron con los objetivos de 40X y 100X.

Para realizar la detección in vivo de la fluorescencia en condiciones de estrés, en las cepas NapA::GFP, se utilizaron 2 estrategias, cuyos resultados fueron reproducibles: en la primera, se germinaron esporas de las cepas sobre cubreobjetos en medio de cultivo líquido, con los suplementos necesarios de 12 a 15 h a 37° C. Después, los cubreobjetos se transfirieron a MM con H₂O₂ durante 30 min. La segunda estrategia, consistió de inocular por punto en cajas Petri esporas e incubarlas a 37° C por 12 h. Posteriormente, se les agregó MM líquido conteniendo o no H₂O₂ durante 30 min y se incubaron a temperatura ambiente. Después, se retiró el MM líquido y se cortó un fragmento de agar al tamaño del cubreobjetos y se montó en un portaobjetos. En el caso de los ensayos de BiFC, en donde los genes de interés están bajo el promotor *alcA*, las esporas se germinaron en medio de cultivo líquido con los suplementos necesarios 15 h a 37° C. Una vez cumplido el tiempo, las muestras se transfirieron a MM + 100 mM treonina como única fuente de carbono durante 5 h a 37° C, para la inducción del promotor de *alcA*. Después de este tiempo, los cubreobjetos se transfirieron a MM conteniendo o no 30 mM de H₂O₂ durante 60 min, pasado este tiempo a los cubreobjetos se les retiró el exceso de medio, se montaron en portaobjetos y se observaron en el microscopio NIKON Eclipse E600, para detectar la fluorescencia.

Cuantificación del número de esporas/cm²

Las conidias (1x10⁴) de las distintas cepas se inocularon en medio mínimo y se incubaron a 37°C durante cinco días y al término de este tiempo se determinó el diámetro y área de cada colonia. Posteriormente cada caja se raspó con una varilla en forma triangular y con una solución estéril de Tween al 0.1%. El total de las esporas recolectadas de cada colonia se resuspendió en 10 mL de solución de Tween en tubos Falcón de 50 mL. Se agitó vigorosamente en vortex y se centrifugaron durante 10 minutos a 5000 rpm. Los pellets de las esporas se resuspendieron en 2 mL de agua estéril y se cuantificó el número de esporas/mL. Con el dato del área se realizó el cálculo del número de esporas/cm².

Complementación de fluorescencia bimolecular (BiFC)

Para el ensayo de complementación de fluorescencia (BiFC), se fusionaron los ORF SrrA y NapA con las mitades N-terminal y C-terminal de la proteína amarilla fluorescente respectivamente, según lo reportado anteriormente (Takeshita et al 2008), con algunas modificaciones. Se diseñaron oligonucleótidos que introducen un sitio de restricción *AscI* antes del ATG y un sitio de restricción *PacI* 1.5 Kb después del codón de paro (ver tabla 6). Para fusionar la mitad N-YFP a SrrA, se amplificó mediante PCR un producto de aproximadamente 3300pb con los oligos SrrA upper *AscI/PacI* y SrrA lower *AscI/PacI*. Para fusionar la mitad C-YFP a NapA, se utilizaron los oligos NapA upper *AscI/PacI* y NapA lower *AscI/PacI*, para producir mediante una reacción de PCR un producto aproximado de 3500 pb. Una vez que se obtuvieron los productos de PCR, se realizó una restricción doble con las enzimas *AscI* y *PacI*, para posteriormente reemplazar el gen *uncA* de los plásmidos PNZ-S139 y Pnz-s140, con los genes SrrA y NapA, respectivamente, generando así el plásmido pAM-01, el cual contiene la fusión *YFP-N::srrA* bajo el control del promotor *alcA* y el marcador genético *pyroA* de *A. fumigatus*. Por otro lado, el plásmido pAM-02 contiene la fusión *napA::YFP-C* bajo el control del promotor *alcA* y el marcador genético *pyr4* de *A. fumigatus*.

Los plásmidos pAM-01 y pAM-02 se utilizaron para co-trasformar la cepa 11035 mediante la técnica de fusión de protoplastos, de la cual se obtuvieron 14 transformantes.

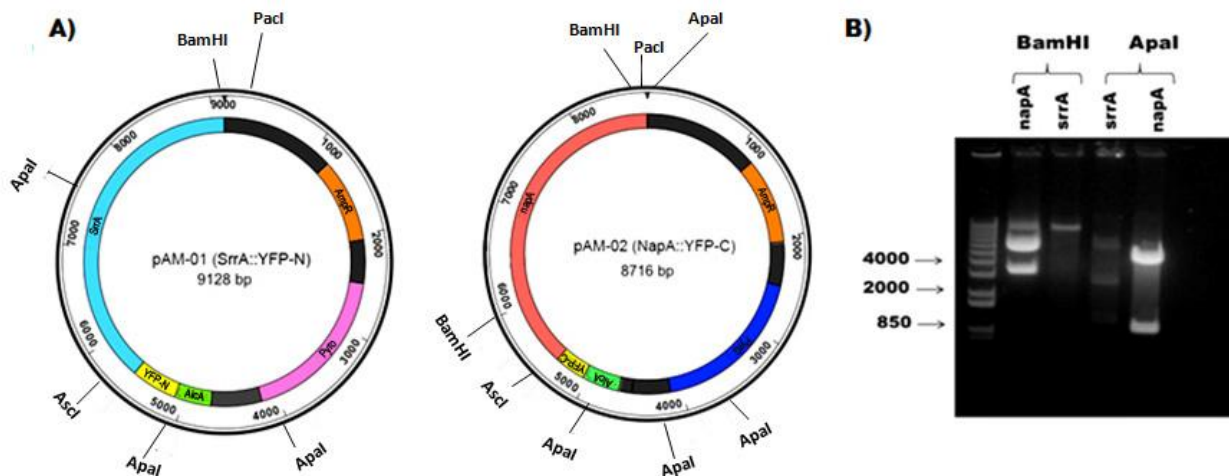


Figura 19. Técnica de complementación de Bifluorescencia, para el estudio de la interacción de NapA y SrrA. A) Plásmidos generados a partir de la ligación de los productos de PCR SrrA y NapA, los cuales fueron ligados en los correspondientes vectores para generar pAM-01 y pAM-02. B) Patrón de restricción de los plásmidos pAM-01 y pAM-02 utilizando las enzimas Apal y BamHI.

Transcriptómica en mutantes *ΔnapA*

Extracción de RNA

Se sembraron a confluencia tres cajas de las cepas WT y *ΔnapA* las cuales se incubaron a 37°C por 6 días. Las esporas se rasparon y se realizaron 3 lavados con 10mL de agua fría por centrifugación para en el último lavado concentrar las esporas, desechando el sobrenadante y quedándonos únicamente con el pellet de esporas. Las esporas se resuspendieron en buffer RLC adicionado con β-mercaptoetanol. Se colocaron 1.5 uL de la suspensión de esporas en tubos de 2 mL, los cuales contenían un volumen aproximado de 500uL de perlas de vidrio de 750 um, para posteriormente colocarlos en el Tissue Lyser LT Hand book por un ciclo de 50 Hz por 10 minutos. Finalmente el lisado se transfirió a una columna del Kit RNeasy Mini Handbook de QIAGEN para llevar a cabo la extracción del RNA siguiendo las especificaciones del fabricante.

Cuantificación y calidad del RNA

La cuantificación y la medición del RIN (Índice de Integridad del RNA) del RNA se llevó a cabo en el Tape Station de Agilent technologies, para lo cual se requirió una dilución previa del RNA (1uL de RNA más 9uL de H₂O libre de RNAasas. Finalmente se cargaron únicamente 3 uL de la dilución en una placa R6K Screen Tape y se corrió en el analizador. Dos de las tres muestras de cada cepa se enviaron a la unidad universitaria de secuenciación masiva de DNA del Instituto Biotecnología-UNAM, en donde fueron generadas las bibliotecas de cDNA las cuales se secuenciaron con el Sistema *Genome Analyzer GAIIx* de la compañía Illumina y en donde también se analizaron y depuraron los datos.

Tabla 5. Cepas de *A. nidulans* empleadas

Nombre	Genotipo	Origen
CLK43	<i>pabaA1, yA2; veA1</i>	Kawasaki et al., 2002
A11035	<i>pyrG89; pyroA4; riboB2 ;ΔnkuA::argB; veA1</i>	FGSC
CFL7 ΔnapA	<i>pabaA1, yA2; ΔnapA::pyrG, veA1</i>	Lara-Rojas, 2012
TFL ΔAatfA-04	<i>pyrG89, ΔatfA::AfriboB, pyroA4; ΔnkuA::argB riboB2, veA1</i>	Lara-Rojas, 2012
TSrrA ΔsrrA	<i>pyrG89, ΔsrrA::AfpryG, pyroA4; ΔnkuA::argB riboB2, veA1</i>	Vargas-Pérez et al., 2007
TAM12 srrA::gfp	<i>pyrG89; pyroA4; riboB2; srrA::GFP::AfpyrG; ΔnkuA::argB; veA1</i>	Este trabajo, la cepa 11035 fue transformada con el producto de PCR SrrA-GFP-AfpyrG
TAM13 srrA::gfp	<i>pyrG89; pyroA4; riboB2; srrA::GFP::AfpyrG; ΔnkuA::argB; veA1</i>	Este trabajo, la cepa 11035 fue transformada con el producto de PCR SrrA-GFP-AfpyrG
TAM14 srrA::gfp	<i>pyrG89; pyroA4; riboB2; srrA::GFP::AfpyrG; ΔnkuA::argB; veA1</i>	Este trabajo, la cepa 11035 fue transformada con el producto de PCR SrrA-GFP-AfpyrG
TAM15 srrA::gfp	<i>pyrG89; pyroA4; riboB2; srrA::GFP::AfpyrG; ΔnkuA::argB; veA1</i>	Este trabajo, la cepa 11035 fue transformada con el producto de PCR SrrA-GFP-AfpyrG
TAM16 ΔgpxA	<i>pyrG89, ΔgpxA:: AfriboB , pyroA4; ΔnkuA::argB riboB2, veA1</i>	Este trabajo, la cepa 11035 fue transformada con el producto de PCR GpxA-RiboB-GpxA
TAM17 ΔtpxA	<i>pyrG89, ΔtpxA: AfpryG; pyroA4; ΔnkuA::argB riboB2, veA1</i>	Este trabajo, la cepa 11035 fue transformada con el producto de PCR TpxA-AfpyrG-TpxA
TAM18 (YFP-N::SrrA, YFP-C::NapA)	<i>pyrG89; pyroA4; riboB2; alcA::YFP-C::napA::pyr4; alcA::YFP-N::srrA::pyroA; ΔnkuA::argB; veA1</i>	En este trabajo, la cepa 11035 fue transformada con los plásmidos pAM-01 y pAM-02
CAM6 ΔsrrA ΔnapA	<i>pabaA1, yA2; ΔnapA::AfpryG; ΔsrrA::AfpryG ; veA1</i>	Este trabajo, progenie de CFL7 X TSrrA
CAM7 ΔatfA ΔnapA	<i>pabaA1, yA2; ΔnapA::AfpryG; ΔatfA::AfriboB; veA1</i>	Este trabajo, progenie de TFL ΔAatfA-04 X CAM6
CAM8 ΔsrrA ΔatfA	<i>pabaA1, yA2; ΔsrrA::AfpryG; ΔatfA::AfriboB; veA1</i>	Este trabajo, progenie de TFL ΔAatfA-04 X CAM6
CAM9 ΔsrrA ΔnapA ΔatfA	<i>pabaA1, yA2; ΔsrrA::AfpryG; ΔnapA::AfpryG; ΔatfA::AfriboB; veA1</i>	Este trabajo, progenie de TFL ΔAatfA-04 X CAM6

Tabla 6. Oligonucleotidos de ADN

Oligos	Secuencia (5'-3')
5' For-napA	CGATGTGAGAAAGGCACG
5Dig-nkuA	GATGCTGCCTTTTTGCC
3Dig-nkuA	TACCCAGAGCGCGATAC
3' pyrG	GTCTGAGAGGAGGCACTGATGC
GSP1srrA	CCTGGTCGCCGCTTTTTCCCTTGATTCCGC
GSP2srrA	ATTCAGAGATGTGCCGACGTGGCTGCGGTC
GSP3srrA	GCAACGGAAACGATAACCCCAACCTTGCGA
GSP4srrA	GCTCAGCGTCAATAGTCAGGCGAGAAGATT
GFP1srrA	GACCGCAGCCACGTCCGACATCTCTGAATGGAGCTGGTGCAGGCGCTGGAGCCGGTGCC
GFP2srrA	TCGCAAGGTTGGGGTTATCGTTTCCGTTGCGTCTGAGAGGAGGCACTGATGC
Atf-For	ATACCGCTACGAATCCAGACCC
Ribo-rev	GCGCTGCAGAACCGTTACATG
SrrA upper Ascl/Pacl	CCACGGGCGCGCCCGGCATGCTGGAGGACCCGT
SrrA lower Ascl/Pacl	TCCTTAATTAACCTACTACTTCCATTTACTGCCC
NapA upper Ascl/Pacl	CCACGGGCGCGCCCGGCATGGCCGACTACAATTCT
NapA lower Ascl/Pacl	TCCTTAATTAACCTAGGTTACCAGAGTGGAGGGG
5' For-gpxA	CCATAAAAACCGTGGTAG CTCAGGA
5' Rev-gpxA	CGAGCCAGACTCCTGAACGGCCTCTTAGGTCTGAGATGAGGTTGTTGACGTT
3' For-gpxA	AACGGTTCTGCAGCGCAAACGTTCTTTTTTACATTGTTATTTCAAGGATTA
3' Rev-gpxA	CGGAACCGGTAACAACAATAAGTTG
5' For-nested gpxA	CGGAAGCCGATCTCCCCT
3' For-nested gpxA	GCAGTGTATGTTATCTCTGACCCAAGG

Figuras suplementarias

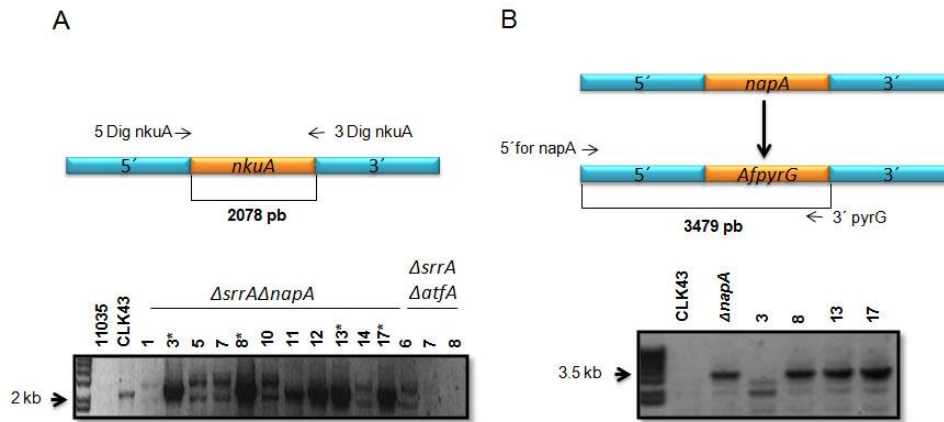


Figura S1. PCRs diagnósticas para comprobar la presencia del gen *nkuA* y las mutaciones $\Delta srrA$ $\Delta napA$. A) PCR para identificar el gen silvestre *nkuA*, utilizando los oligos 5Dig-nkuA y 3Dig-nkuA que amplifican un fragmento de 2078 pb. B) PCR diagnóstica utilizando los oligos 5'For-napA y 3'pyrG para confirmar la mutación $\Delta napA$ en las cepas obtenidas de la cruce CAM06 ($\Delta srrA$ $\Delta napA$) x TFL04 ($\Delta atfA$). Se utilizó como control negativo ADN de la cepa silvestre (CLK43) y como control positivo ADN de la cepa $\Delta napA$. Los asteriscos en A indican las cepas que se utilizaron en B.

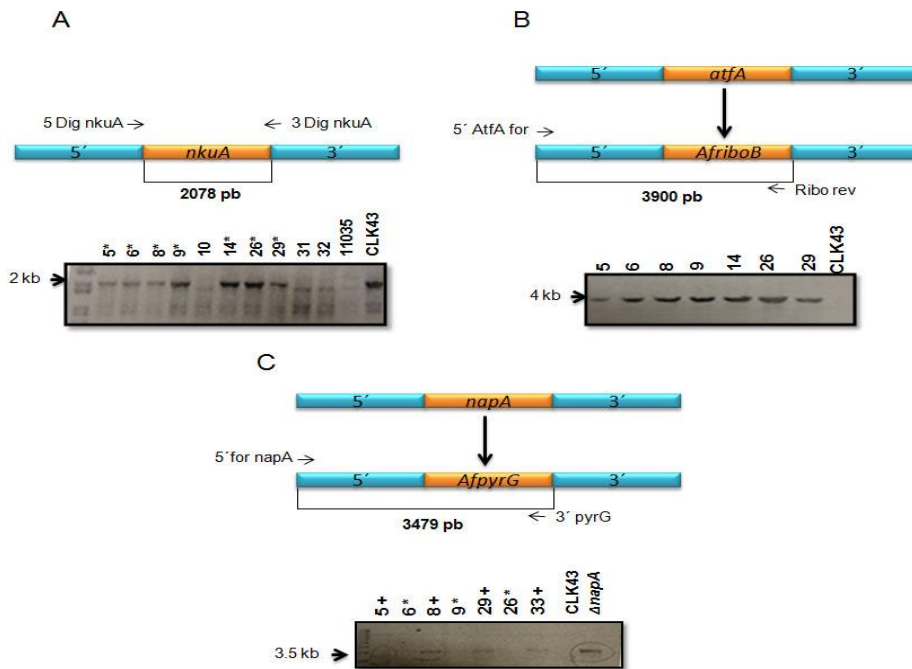


Figura S2. PCRs diagnósticas para comprobar la presencia del gen *nkuA* y las mutaciones $\Delta srrA$ $\Delta atfA$ y $\Delta srrA$ $\Delta napA$ $\Delta atfA$. A) PCR para identificar mutantes obtenidas de la cruce CAM06 ($\Delta srrA$ $\Delta napA$) x TFL04 ($\Delta atfA$) para identificar el gen silvestre *nkuA*, utilizando los oligos 5Dig-nkuA y 3Dig-nkuA que amplifican un fragmento de 2078 pb. B) PCR utilizando los oligos 5'Atf-For y Ribo rev para confirmar la mutación $\Delta atfA$ en las cepas obtenidas de la cruce CAM06 ($\Delta srrA$ $\Delta napA$) x TFL04 ($\Delta atfA$). PCR diagnóstica utilizando los oligos 5'For-napA y 3'pyrG para confirmar la mutación $\Delta napA$ en las cepas obtenidas de la cruce CAM06 ($\Delta srrA$ $\Delta napA$) x TFL04 ($\Delta atfA$). Se utilizó como control negativo ADN de la cepa silvestre (CLK43) y como control positivo ADN de la cepa $\Delta napA$. Los asteriscos en A indican cepas con fondo silvestre *nkuA*. Los asteriscos en C indican dobles mutantes $\Delta napA$ $\Delta atfA$. Las cruces indican triples mutantes $\Delta srrA$ $\Delta napA$ $\Delta atfA$.

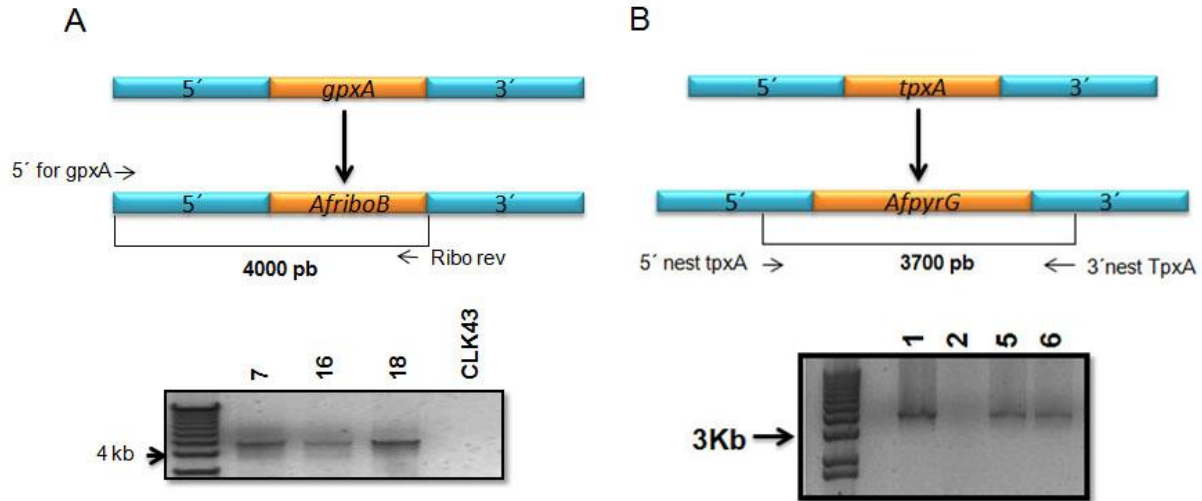


Figura S3. PCR diagn3stica para la deleción de los genes *gpxA* y *tpxA*. A) Para comprobar la deleción del gen *gpxA* se utilizaron los oligos 5'For-*gpxA* y Ribo rev para amplificar el marcador de deleción *AfriboB* y un fragmento 5' del gen *gpxA*. Una banda de aproximadamente 4 Kb confirma la deleción del gen *gpxA*, la cual se observa en tres de las seis cepas transformantes, pero no así para la silvestre (CLK43). B) Los oligos 5'nest *tpxA* y 3'nest *tpxA* se utilizaron para amplificar el marcador de deleción *AfpyrG* y fragmentos 5' y 3' del gen *tpxA*, un producto de 3.7 Kb confirma la deleción del gen *tpxA*.

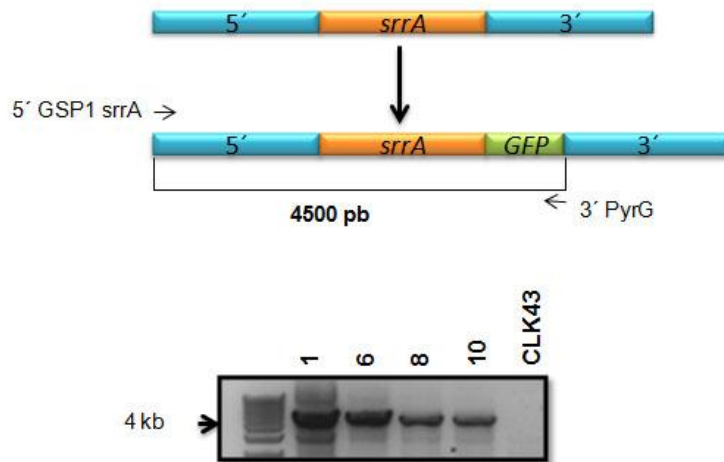


Figura S4. PCR diagn3stica para *srrA::gfp*. A) Se utilizaron los oligos 5'GSP1 *srrA* y 3'pyrG para amplificar el ORF de *srrA* fusionado a la GFP así como el marcador de deleción *AfpyrG*. Una banda de aproximadamente 4.5 Kb confirma la fusi3n de la GFP a *SrrA*, la cual se observa en cuatro de las cepas transformantes, pero no en la silvestre (CLK43).

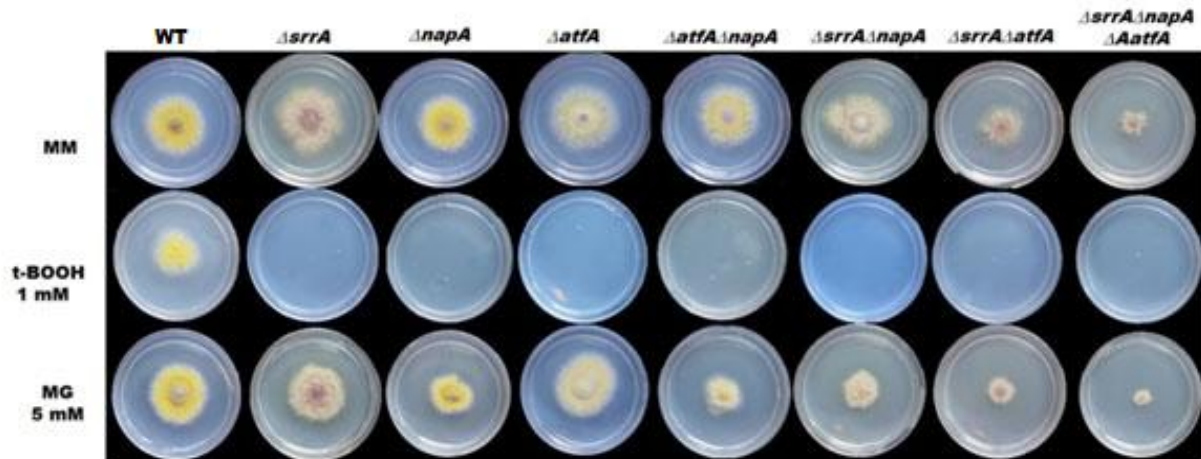


Figura S5. Las mutantes sencillas, dobles y triples son sensibles al terbutil-hidroperóxido y no al metilgloxal A) Esporas asexuales (1×10^4) de cada una de las cepas se sembraron en cajas de MM adicionadas con terbutil-hidroperóxido 1 mM y metilgloxal 5 mM. Las fotografías se tomaron a los 4 días de incubación a 37°C.

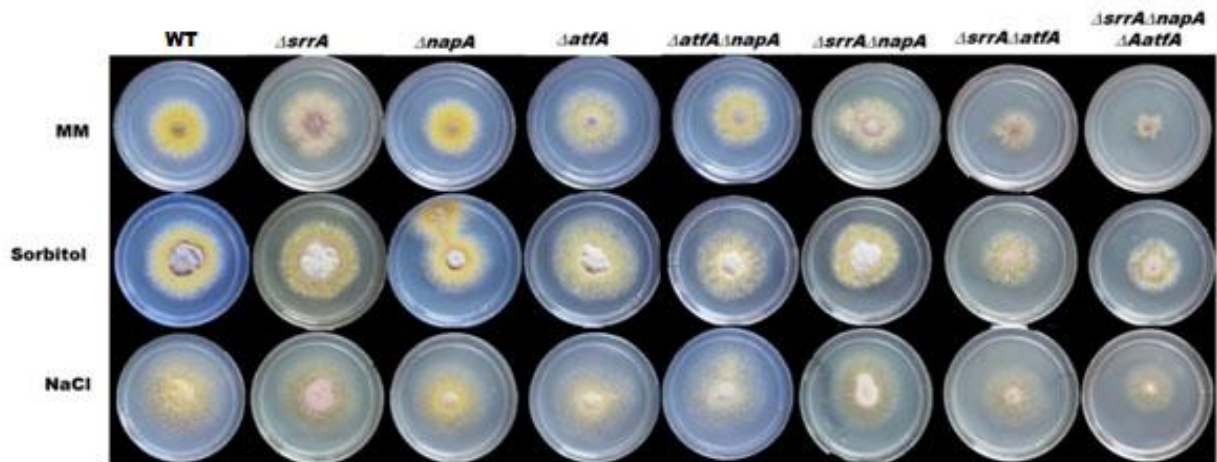


Figura S6. Las mutantes sencillas dobles y triples no presentan sensibilidad al estrés osmótico, sin embargo la esporulación de las mutantes con fondo $\Delta srrA$ se ve favorecida bajo estas condiciones. Esporas asexuales (1×10^4) de cada una de las cepas se sembraron en cajas de MM adicionadas con sorbitol 1.2 M y NaCl 0.6 M. Las fotografías se tomaron a los 4 días de incubación a 37°C. La cepa CLK43 se utilizó como WT.

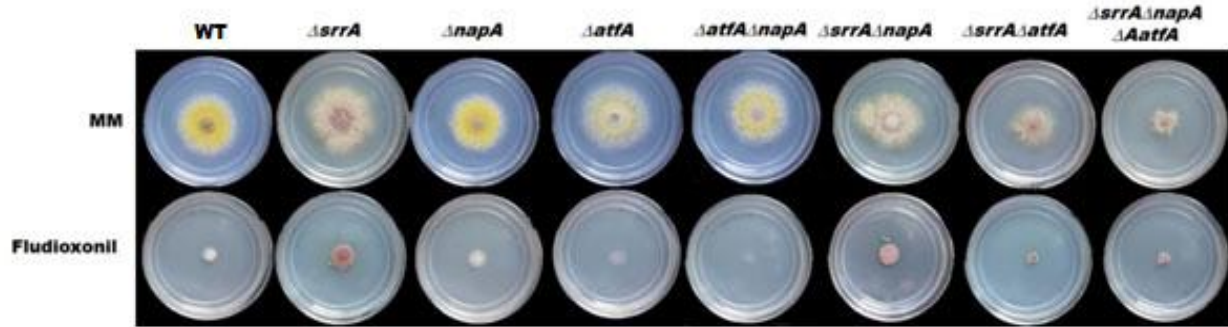


Figura S7. Las mutantes sencillas dobles y triples presentan sensibilidad al fludioxonil. Esporas asexuales (1×10^4) de cada una de las cepas se sembraron en cajas de MM adicionadas con fludioxonil 2ug/mL. Las fotografías se tomaron a los 4 días de incubación a 37°C

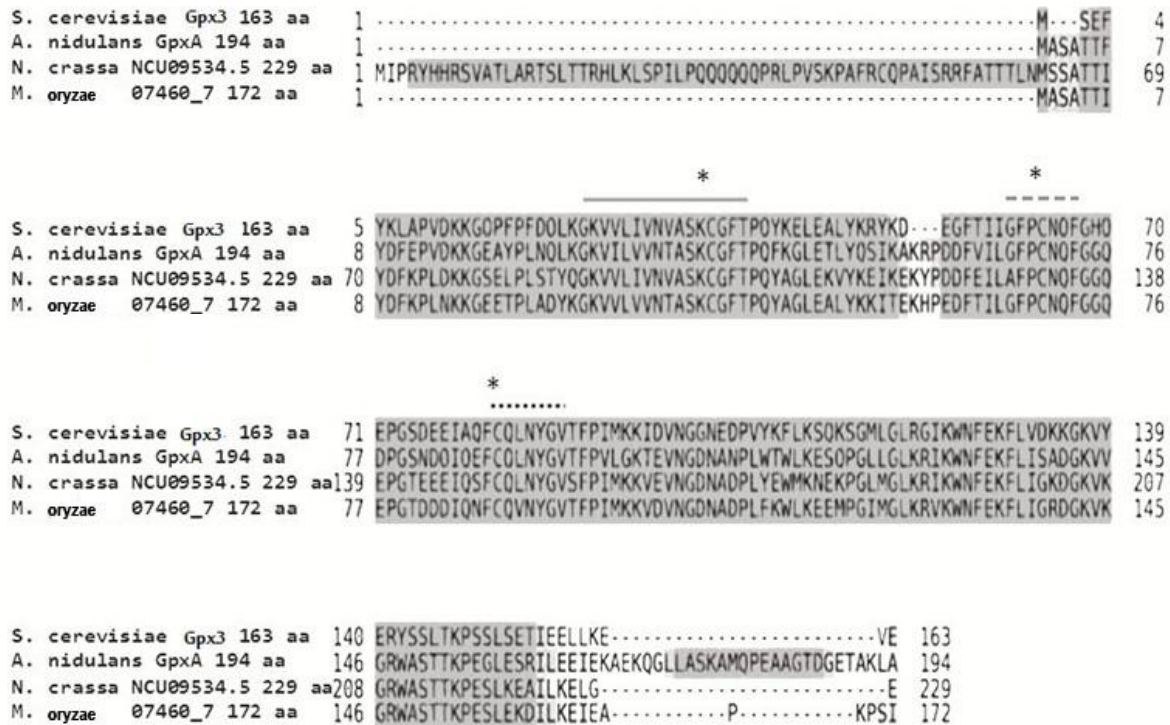


Figura S8. Las GPX de diversas especies presentan alta similitud. La línea azul indica el sitio activo de estas peroxirredoxinas, la línea sólida señala un motivo altamente conservado de la familia de GPXs, mientras que las líneas punteadas indican las regiones que contiene a las cisteínas catalíticas. Los asteriscos señalan las cisteínas altamente conservadas. Las proteínas tipo GPX3 (*S. pombe*) de distintas especies fueron alineadas con la proteína AN2846 (GpxA) de *Aspergillus nidulans*. Y1R037W, *Sacharomyces cerevisiae*; NCU09534.5, *Neurospora crassa*; MGG_07460_7, *Magnaporthe oryzae*.

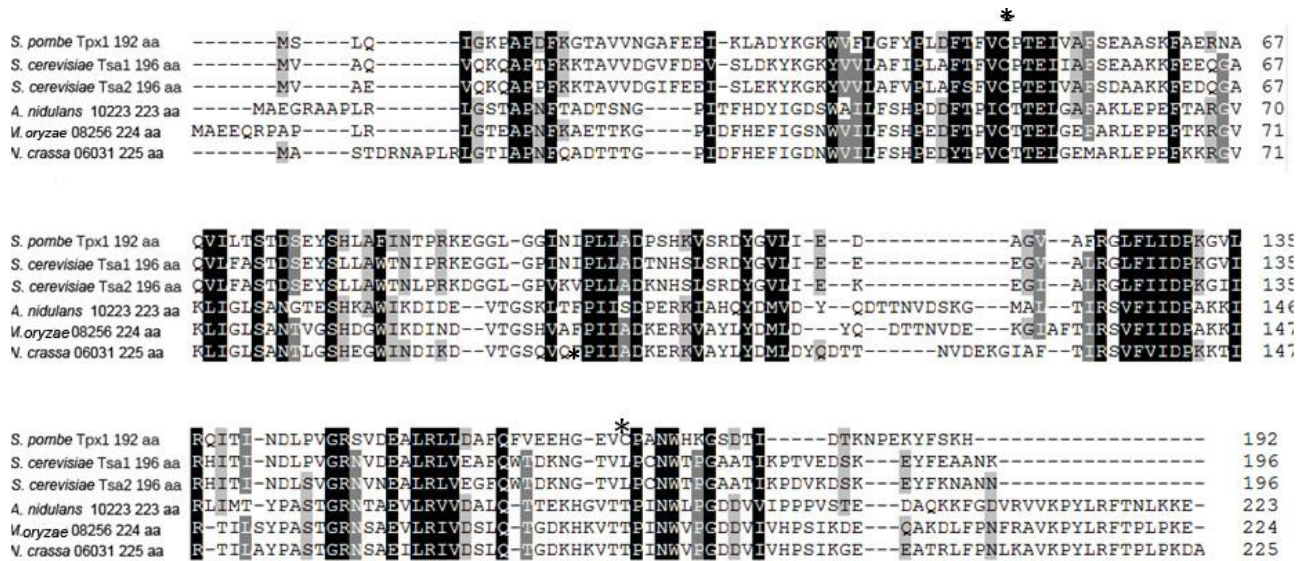


Figura S9. Las Tpx en hongos filamentosos presentan únicamente una cisteína catalítica. La secuencia de aminoácidos de NapA de *A. nidulans*, se alineó con Tpx1 de *S. pombe* (SPCC576.03c), Tsa 1 (YML028W) y Tsa2 (YDR453C) de *S. cerevisiae*, M_G_G 08256 de *M. oryzae* y *N. crassa* (NCU06031.5). Las secuencias se identifican por el nombre de la especie, nombre y tamaño de las proteínas. El alineamiento se realizó con el programa T-COFFEE (<http://tcoffee.vital-it.ch>). En asteriscos se indican las cisteínas conservadas.

REFERENCIAS

- Adams, T. H., J. K. Wieser and J. H. Yu (1998). "Asexual sporulation in *Aspergillus nidulans*." *Microbiol Mol Biol Rev* **62**(1): 35-54.
- Aguirre, J. and J. D. Lambeth (2010). "Nox enzymes from fungus to fly to fish and what they tell us about Nox function in mammals." *Free Radic Biol Med* **49**(9): 1342-1353.
- Aguirre, J., M. Rios-Momberg, D. Hewitt and W. Hansberg (2005). "Reactive oxygen species and development in microbial eukaryotes." *Trends Microbiol* **13**(3): 111-118.
- Anastasiou, D., G. Pouligiannis, J. M. Asara, M. B. Boxer, J. K. Jiang, M. Shen, G. Bellinger, A. T. Sasaki, J. W. Locasale, D. S. Auld, C. J. Thomas, M. G. Vander Heiden and L. C. Cantley (2011). "Inhibition of pyruvate kinase M2 by reactive oxygen species contributes to cellular antioxidant responses." *Science* **334**(6060): 1278-1283.
- Arana, L., P. Gangoiti, A. Ouro, I. G. Rivera, M. Ordonez, M. Trueba, R. S. Lankalapalli, R. Bittman and A. Gomez-Munoz (2012). "Generation of reactive oxygen species (ROS) is a key factor for stimulation of macrophage proliferation by ceramide 1-phosphate." *Exp Cell Res* **318**(4): 350-360.
- Arst, H. N., Jr. and D. W. MacDonald (1973). "A mutant of *Aspergillus nidulans* lacking NADP-linked glutamate dehydrogenase." *Mol Gen Genet* **122**(3): 261-265.
- Asano, Y., D. Hagiwara, T. Yamashino and T. Mizuno (2007). "Characterization of the bZip-type transcription factor NapA with reference to oxidative stress response in *Aspergillus nidulans*." *Biosci Biotechnol Biochem* **71**(7): 1800-1803.
- Aslund, F., M. Zheng, J. Beckwith and G. Storz (1999). "Regulation of the OxyR transcription factor by hydrogen peroxide and the cellular thiol-disulfide status." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(11): 6161-6165.
- Ault, A. D., J. S. Fassler and R. J. Deschenes (2002). "Altered phosphotransfer in an activated mutant of the *Saccharomyces cerevisiae* two-component osmosensor Sln1p." *Eukaryot Cell* **1**(2): 174-180.
- Azevedo, D., F. Tacnet, A. Delaunay, C. Rodrigues-Pousada and M. B. Toledano (2003). "Two redox centers within Yap1 for H₂O₂ and thiol-reactive chemicals signaling." *Free Radic Biol Med* **35**(8): 889-900.
- Bahn, Y. S., K. Kojima, G. M. Cox and J. Heitman (2006). "A unique fungal two-component system regulates stress responses, drug sensitivity, sexual development, and virulence of *Cryptococcus neoformans*." *Mol Biol Cell* **17**(7): 3122-3135.
- Bergen, L. G. and N. R. Morris (1983). "Kinetics of the nuclear division cycle of *Aspergillus nidulans*." *J Bacteriol* **156**(1): 155-160.
- Birmingham-McDonogh, O., E. B. Gralla and J. S. Valentine (1988). "The copper, zinc-superoxide dismutase gene of *Saccharomyces cerevisiae*: cloning, sequencing, and biological activity." *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**(13): 4789-4793.
- Bozonet, S. M., V. J. Findlay, A. M. Day, J. Cameron, E. A. Veal and B. A. Morgan (2005). "Oxidation of a eukaryotic 2-Cys peroxiredoxin is a molecular switch controlling the transcriptional response to increasing levels of hydrogen peroxide." *J Biol Chem* **280**(24): 23319-23327.
- Brigelius-Flohe, R. (2006). "Glutathione peroxidases and redox-regulated transcription factors." *Biol Chem* **387**(10-11): 1329-1335.
- Brown, J. L., H. Bussey and R. C. Stewart (1994). "Yeast Skn7p functions in a eukaryotic two-component regulatory pathway." *EMBO J* **13**(21): 5186-5194.
- Brown, J. L., S. North and H. Bussey (1993). "SKN7, a yeast multicopy suppressor of a mutation affecting cell wall beta-glucan assembly, encodes a product with domains homologous to prokaryotic two-component regulators and to heat shock transcription factors." *J Bacteriol* **175**(21): 6908-6915.
- Buck, V., J. Quinn, T. Soto Pino, H. Martin, J. Saldanha, K. Makino, B. A. Morgan and J. B. Millar (2001). "Peroxide sensors for the fission yeast stress-activated mitogen-activated protein kinase pathway." *Mol Biol Cell* **12**(2): 407-419.

Calvo, I. A., J. Ayte and E. Hidalgo (2013). "Reversible thiol oxidation in the H₂O₂-dependent activation of the transcription factor Pap1." *J Cell Sci* **126**(Pt 10): 2279-2284.

Calvo, I. A., N. Gabrielli, I. Iglesias-Baena, S. Garcia-Santamarina, K. L. Hoe, D. U. Kim, M. Sanso, A. Zuin, P. Perez, J. Ayte and E. Hidalgo (2009). "Genome-wide screen of genes required for caffeine tolerance in fission yeast." *PLoS One* **4**(8): e6619.

Calvo, I. A., P. Garcia, J. Ayte and E. Hidalgo "The transcription factors Pap1 and Prr1 collaborate to activate antioxidant, but not drug tolerance, genes in response to H₂O₂." *Nucleic Acids Res* **40**(11): 4816-4824.

Calvo, I. A., P. Garcia, J. Ayte and E. Hidalgo (2012). "The transcription factors Pap1 and Prr1 collaborate to activate antioxidant, but not drug tolerance, genes in response to H₂O₂." *Nucleic Acids Res* **40**(11): 4816-4824.

Cartwright, G. M. and B. Scott (2013). "Redox regulation of an AP-1-like transcription factor, YapA, in the fungal symbiont *Epichloe festucae*." *Eukaryot Cell* **12**(10): 1335-1348.

Casseltan, L. and M. Zolan (2002). "The art and design of genetic screens: filamentous fungi." *Nat Rev Genet* **3**(9): 683-697.

Castillo, E. A., J. Ayte, C. Chiva, A. Moldon, M. Carrascal, J. Abian, N. Jones and E. Hidalgo (2002). "Diethylmaleate activates the transcription factor Pap1 by covalent modification of critical cysteine residues." *Mol Microbiol* **45**(1): 243-254.

Cottarel, G. (1997). "Mcs4, a two-component system response regulator homologue, regulates the *Schizosaccharomyces pombe* cell cycle control." *Genetics* **147**(3): 1043-1051.

Chae, H. Z., S. J. Chung and S. G. Rhee (1994). "Thioredoxin-dependent peroxide reductase from yeast." *J Biol Chem* **269**(44): 27670-27678.

Chae, H. Z., I. H. Kim, K. Kim and S. G. Rhee (1993). "Cloning, sequencing, and mutation of thiol-specific antioxidant gene of *Saccharomyces cerevisiae*." *J Biol Chem* **268**(22): 16815-16821.

Champe, S. P., D. L. Nagle and L. N. Yager (1994). "Sexual sporulation." *Prog Ind Microbiol* **29**: 429-454.

Chauhan, N. and R. Calderone (2008). "Two-component signal transduction proteins as potential drug targets in medically important fungi." *Infect Immun* **76**(11): 4795-4803.

Chauhan, N., J. P. Latge and R. Calderone (2006). "Signalling and oxidant adaptation in *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus*." *Nat Rev Microbiol* **4**(6): 435-444.

Chen, D., C. R. Wilkinson, S. Watt, C. J. Penkett, W. M. Toone, N. Jones and J. Bahler (2008). "Multiple pathways differentially regulate global oxidative stress responses in fission yeast." *Mol Biol Cell* **19**(1): 308-317.

Christofk, H. R., M. G. Vander Heiden, M. H. Harris, A. Ramanathan, R. E. Gerszten, R. Wei, M. D. Fleming, S. L. Schreiber and L. C. Cantley (2008). "The M2 splice isoform of pyruvate kinase is important for cancer metabolism and tumour growth." *Nature* **452**(7184): 230-233.

Davies, K. J. (2000). "An overview of oxidative stress." *IUBMB Life* **50**(4-5): 241-244.

Davies, K. J. (2000). "Oxidative stress, antioxidant defenses, and damage removal, repair, and replacement systems." *IUBMB Life* **50**(4-5): 279-289.

Degols, G. and P. Russell (1997). "Discrete roles of the Spc1 kinase and the Atf1 transcription factor in the UV response of *Schizosaccharomyces pombe*." *Mol Cell Biol* **17**(6): 3356-3363.

Delaunay, A., A. D. Isnard and M. B. Toledano (2000). "H₂O₂ sensing through oxidation of the Yap1 transcription factor." *EMBO J* **19**(19): 5157-5166.

Delaunay, A., D. Pflieger, M. B. Barrault, J. Vinh and M. B. Toledano (2002). "A thiol peroxidase is an H₂O₂ receptor and redox-transducer in gene activation." *Cell* **111**(4): 471-481.

DeNicola, G. M., F. A. Karreth, T. J. Humpton, A. Gopinathan, C. Wei, K. Frese, D. Mangal, K. H. Yu, C. J. Yeo, E. S. Calhoun, F. Scrimieri, J. M. Winter, R. H. Hruban, C. Iacobuzio-Donahue, S. E. Kern, I. A. Blair and D. A. Tuveson (2011). "Oncogene-induced Nrf2 transcription promotes ROS detoxification and tumorigenesis." *Nature* **475**(7354): 106-109.

Erickson, J. R., M. L. Joiner, X. Guan, W. Kutschke, J. Yang, C. V. Oddis, R. K. Bartlett, J. S. Lowe, S. E. O'Donnell, N. Aykin-Burns, M. C. Zimmerman, K. Zimmerman, A. J. Ham, R. M. Weiss, D. R. Spitz, M. A. Shea,

R. J. Colbran, P. J. Mohler and M. E. Anderson (2008). "A dynamic pathway for calcium-independent activation of CaMKII by methionine oxidation." *Cell* **133**(3): 462-474.

Finkel, T. (2011). "Signal transduction by reactive oxygen species." *J Cell Biol* **194**(1): 7-15.

Furukawa, K., Y. Hoshi, T. Maeda, T. Nakajima and K. Abe (2005). "Aspergillus nidulans HOG pathway is activated only by two-component signalling pathway in response to osmotic stress." *Mol Microbiol* **56**(5): 1246-1261.

Galagan, J. E., S. E. Calvo, C. Cuomo, L. J. Ma, J. R. Wortman, S. Batzoglou, S. I. Lee, M. Basturkmen, C. C. Spevak, J. Clutterbuck, V. Kapitonov, J. Jurka, C. Sczarczochio, M. Farman, J. Butler, S. Purcell, S. Harris, G. H. Braus, O. Draht, S. Busch, C. D'Enfert, C. Bouchier, G. H. Goldman, D. Bell-Pedersen, S. Griffiths-Jones, J. H. Doonan, J. Yu, K. Vienken, A. Pain, M. Freitag, E. U. Selker, D. B. Archer, M. A. Penalva, B. R. Oakley, M. Momany, T. Tanaka, T. Kumagai, K. Asai, M. Machida, W. C. Nierman, D. W. Denning, M. Caddick, M. Hynes, M. Paoletti, R. Fischer, B. Miller, P. Dyer, M. S. Sachs, S. A. Osmani and B. W. Birren (2005). "Sequencing of Aspergillus nidulans and comparative analysis with A. fumigatus and A. oryzae." *Nature* **438**(7071): 1105-1115.

Galperin, M. Y. (2010). "Diversity of structure and function of response regulator output domains." *Curr Opin Microbiol* **13**(2): 150-159.

Gasch, A. P., P. T. Spellman, C. M. Kao, O. Carmel-Harel, M. B. Eisen, G. Storz, D. Botstein and P. O. Brown (2000). "Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes." *Mol Biol Cell* **11**(12): 4241-4257.

Giorgio, M., M. Trinei, E. Migliaccio and P. G. Pelicci (2007). "Hydrogen peroxide: a metabolic by-product or a common mediator of ageing signals?" *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**(9): 722-728.

Hagiwara, D., Y. Asano, T. Yamashino and T. Mizuno (2008). "Characterization of bZip-type transcription factor AtfA with reference to stress responses of conidia of Aspergillus nidulans." *Biosci Biotechnol Biochem* **72**(10): 2756-2760.

Halliwell, B. (1999). "Antioxidant defence mechanisms: from the beginning to the end (of the beginning)." *Free Radic Res* **31**(4): 261-272.

Halliwell, B. (2006). "Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now?" *J Neurochem* **97**(6): 1634-1658.

Hampton, M. B., A. J. Kettle and C. C. Winterbourn (1998). "Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing." *Blood* **92**(9): 3007-3017.

Hansberg, W. and J. Aguirre (1990). "Hyperoxidant states cause microbial cell differentiation by cell isolation from dioxygen." *J Theor Biol* **142**(2): 201-221.

Hansberg, W., H. de Groot and H. Sies (1993). "Reactive oxygen species associated with cell differentiation in Neurospora crassa." *Free Radic Biol Med* **14**(3): 287-293.

Harman, D. (1956). "Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry." *J Gerontol* **11**(3): 298-300.

He, X. J., K. E. Mulford and J. S. Fassler (2009). "Oxidative stress function of the Saccharomyces cerevisiae Skn7 receiver domain." *Eukaryot Cell* **8**(5): 768-778.

Hermann, T. E., M. B. Kurtz and S. P. Champe (1983). "Laccase localized in hulle cells and cleistothecial primordia of Aspergillus nidulans." *J Bacteriol* **154**(2): 955-964.

Hess, J. F., R. B. Bourret and M. I. Simon (1988). "Histidine phosphorylation and phosphoryl group transfer in bacterial chemotaxis." *Nature* **336**(6195): 139-143.

Hill, T. W., and E. Käfer. (2001). "Improved protocols for Aspergillus minimal medium: trace element and minimal medium stock solution." *Fungal Genet Newslett* **48**: 20-21.

Hoffmann, B., C. Wanke, S. K. Lapaglia and G. H. Braus (2000). "c-Jun and RACK1 homologues regulate a control point for sexual development in Aspergillus nidulans." *Mol Microbiol* **37**(1): 28-41.

Hung, R. J., C. S. Spaeth, H. G. Yesilyurt and J. R. Terman (2013). "SelR reverses Mical-mediated oxidation of actin to regulate F-actin dynamics." *Nat Cell Biol* **15**(12): 1445-1454.

Iruthayanathan, M., B. O'Leary, G. Paul and J. S. Dillon (2011). "Hydrogen peroxide signaling mediates DHEA-induced vascular endothelial cell proliferation." Steroids **76**(13): 1483-1490.

Jackson, A. L. and L. A. Loeb (2001). "The contribution of endogenous sources of DNA damage to the multiple mutations in cancer." Mutat Res **477**(1-2): 7-21.

Johnson, M. A., H. R. Waterham, G. P. Ksheminska, L. R. Fayura, J. L. Cereghino, O. V. Stasyk, M. Veenhuis, A. R. Kulachkovsky, A. A. Sibirny and J. M. Cregg (1999). "Positive selection of novel peroxisome biogenesis-defective mutants of the yeast *Pichia pastoris*." Genetics **151**(4): 1379-1391.

Jones, R. M., L. Luo, C. S. Ardita, A. N. Richardson, Y. M. Kwon, J. W. Mercante, A. Alam, C. L. Gates, H. Wu, P. A. Swanson, J. D. Lambeth, P. W. Denning and A. S. Neish (2013). "Symbiotic lactobacilli stimulate gut epithelial proliferation via Nox-mediated generation of reactive oxygen species." EMBO J **32**(23): 3017-3028.

Kamata, H. and H. Hirata (1999). "Redox regulation of cellular signalling." Cell Signal **11**(1): 1-14.

Kato, T., Jr., K. Okazaki, H. Murakami, S. Stettler, P. A. Fantes and H. Okayama (1996). "Stress signal, mediated by a Hog1-like MAP kinase, controls sexual development in fission yeast." FEBS Lett **378**(3): 207-212.

Kavitha, S. and T. S. Chandra (2014). "Oxidative Stress Protection and Glutathione Metabolism in Response to Hydrogen Peroxide and Menadione in Riboflavinogenic Fungus *Ashbya gossypii*." Appl Biochem Biotechnol.

Kawasaki, L. and J. Aguirre (2001). "Multiple catalase genes are differentially regulated in *Aspergillus nidulans*." J Bacteriol **183**(4): 1434-1440.

Kawasaki, L., O. Sanchez, K. Shiozaki and J. Aguirre (2002). "SakA MAP kinase is involved in stress signal transduction, sexual development and spore viability in *Aspergillus nidulans*." Mol Microbiol **45**(4): 1153-1163.

Kawasaki, L., D. Wysong, R. Diamond and J. Aguirre (1997). "Two divergent catalase genes are differentially regulated during *Aspergillus nidulans* development and oxidative stress." J Bacteriol **179**(10): 3284-3292.

Krems, B., C. Charizanis and K. D. Entian (1995). "Mutants of *Saccharomyces cerevisiae* sensitive to oxidative and osmotic stress." Curr Genet **27**(5): 427-434.

Krems, B., C. Charizanis and K. D. Entian (1996). "The response regulator-like protein Pos9/Skn7 of *Saccharomyces cerevisiae* is involved in oxidative stress resistance." Curr Genet **29**(4): 327-334.

Kudo, N., H. Taoka, T. Toda, M. Yoshida and S. Horinouchi (1999). "A novel nuclear export signal sensitive to oxidative stress in the fission yeast transcription factor Pap1." J Biol Chem **274**(21): 15151-15158.

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): 655-664.

Kuge, S., N. Jones and A. Nomoto (1997). "Regulation of yAP-1 nuclear localization in response to oxidative stress." EMBO J **16**(7): 1710-1720.

Kukreja, R. C. and M. L. Hess (1992). "The oxygen free radical system: from equations through membrane-protein interactions to cardiovascular injury and protection." Cardiovasc Res **26**(7): 641-655.

Kumar, A., H. Wu, L. S. Collier-Hyams, J. M. Hansen, T. Li, K. Yamoah, Z. Q. Pan, D. P. Jones and A. S. Neish (2007). "Commensal bacteria modulate cullin-dependent signaling via generation of reactive oxygen species." EMBO J **26**(21): 4457-4466.

Lara-Rojas, F., O. Sanchez, L. Kawasaki and J. Aguirre (2011). "*Aspergillus nidulans* transcription factor AtfA interacts with the MAPK SakA to regulate general stress responses, development and spore functions." Mol Microbiol **80**(2): 436-454.

Laursen, J. B., S. Rajagopalan, Z. Galis, M. Tarpey, B. A. Freeman and D. G. Harrison (1997). "Role of superoxide in angiotensin II-induced but not catecholamine-induced hypertension." Circulation **95**(3): 588-593.

Lee, A. C., B. E. Fenster, H. Ito, K. Takeda, N. S. Bae, T. Hirai, Z. X. Yu, V. J. Ferrans, B. H. Howard and T. Finkel (1999). "Ras proteins induce senescence by altering the intracellular levels of reactive oxygen species." J Biol Chem **274**(12): 7936-7940.

Lee, J., C. Godon, G. Lagniel, D. Spector, J. Garin, J. Labarre and M. B. Toledano (1999). "Yap1 and Skn7 control two specialized oxidative stress response regulons in yeast." J Biol Chem **274**(23): 16040-16046.

Lee, J., D. Spector, C. Godon, J. Labarre and M. B. Toledano (1999). "A new antioxidant with alkyl hydroperoxide defense properties in yeast." J Biol Chem **274**(8): 4537-4544.

Lee, S. C., M. Ni, W. Li, C. Shertz and J. Heitman (2010). "The evolution of sex: a perspective from the fungal kingdom." Microbiol Mol Biol Rev **74**(2): 298-340.

Lee, Y. Y., H. I. Jung, E. H. Park, J. H. Sa and C. J. Lim (2002). "Regulation of *Schizosaccharomyces pombe* gene encoding copper/zinc superoxide dismutase." Mol Cells **14**(1): 43-49.

Li, H., S. Horke and U. Forstermann (2013). "Oxidative stress in vascular disease and its pharmacological prevention." Trends Pharmacol Sci **34**(6): 313-319.

Li, S., A. Ault, C. L. Malone, D. Raitt, S. Dean, L. H. Johnston, R. J. Deschenes and J. S. Fassler (1998). "The yeast histidine protein kinase, Sln1p, mediates phosphotransfer to two response regulators, Ssk1p and Skn7p." EMBO J **17**(23): 6952-6962.

Li, S., S. Dean, Z. Li, J. Horecka, R. J. Deschenes and J. S. Fassler (2002). "The eukaryotic two-component histidine kinase Sln1p regulates OCH1 via the transcription factor, Skn7p." Mol Biol Cell **13**(2): 412-424.

Lima, J. F., I. Malavazi, M. E. da Silva Ferreira, M. Savoldi, A. O. Mota, Jr., J. L. Capellaro, M. H. de Souza Goldman and G. H. Goldman (2008). "Functional characterization of the putative *Aspergillus nidulans* DNA damage binding protein homologue DdbA." Mol Genet Genomics **279**(3): 239-253.

Lu, J. M., R. J. Deschenes and J. S. Fassler (2003). "*Saccharomyces cerevisiae* histidine phosphotransferase Ypd1p shuttles between the nucleus and cytoplasm for SLN1-dependent phosphorylation of Ssk1p and Skn7p." Eukaryot Cell **2**(6): 1304-1314.

Lu, J. M., R. J. Deschenes and J. S. Fassler (2004). "Role for the Ran binding protein, Mog1p, in *Saccharomyces cerevisiae* SLN1-SKN7 signal transduction." Eukaryot Cell **3**(6): 1544-1556.

Madrid, M., T. Soto, A. Franco, V. Paredes, J. Vicente, E. Hidalgo, M. Gacto and J. Cansado (2004). "A cooperative role for Atf1 and Pap1 in the detoxification of the oxidative stress induced by glucose deprivation in *Schizosaccharomyces pombe*." J Biol Chem **279**(40): 41594-41602.

Mailloux, R. J. and M. E. Harper (2012). "Mitochondrial proticity and ROS signaling: lessons from the uncoupling proteins." Trends Endocrinol Metab **23**(9): 451-458.

Marnett, L. J. (2000). "Oxyradicals and DNA damage." Carcinogenesis **21**(3): 361-370.

Martinelli, S. D. (1994). "*Aspergillus nidulans* as an experimental organism." Prog Ind Microbiol **29**: 33-58.

Mesquita, F. S., S. N. Dyer, D. A. Heinrich, S. E. Bulun, E. E. Marsh and R. A. Nowak "Reactive oxygen species mediate mitogenic growth factor signaling pathways in human leiomyoma smooth muscle cells." Biol Reprod **82**(2): 341-351.

Morgan, B. A., G. R. Banks, W. M. Toone, D. Raitt, S. Kuge and L. H. Johnston (1997). "The Skn7 response regulator controls gene expression in the oxidative stress response of the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*." EMBO J **16**(5): 1035-1044.

Motoyama, T., N. Ochiai, M. Morita, Y. Iida, R. Usami and T. Kudo (2008). "Involvement of putative response regulator genes of the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae* in osmotic stress response, fungicide action, and pathogenicity." Curr Genet **54**(4): 185-195.

Moye-Rowley, W. S., K. D. Harshman and C. S. Parker (1989). "Yeast YAP1 encodes a novel form of the jun family of transcriptional activator proteins." Genes Dev **3**(3): 283-292.

Nakagawa, C. W., K. Yamada and N. Mutoh (2000). "Role of Atf1 and Pap1 in the induction of the catalase gene of fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*." J Biochem **127**(2): 233-238.

Nakamichi, N., H. Yanada, H. Aiba, K. Aoyama, R. Ohmiya and T. Mizuno (2003). "Characterization of the Prr1 response regulator with special reference to sexual development in *Schizosaccharomyces pombe*." Biosci Biotechnol Biochem **67**(3): 547-555.

Navarro, R. E. and J. Aguirre (1998). "Posttranscriptional control mediates cell type-specific localization of catalase A during *Aspergillus nidulans* development." J Bacteriol **180**(21): 5733-5738.

Nayak, T., E. Szewczyk, C. E. Oakley, A. Osmani, L. Ukil, S. L. Murray, M. J. Hynes, S. A. Osmani and B. R. Oakley (2006). "A versatile and efficient gene-targeting system for *Aspergillus nidulans*." Genetics **172**(3): 1557-1566.

Nguyen, A. N., A. Lee, W. Place and K. Shiozaki (2000). "Multistep phosphorelay proteins transmit oxidative stress signals to the fission yeast stress-activated protein kinase." Mol Biol Cell **11**(4): 1169-1181.

Ohmiya, R., C. Kato, H. Yamada, H. Aiba and T. Mizuno (1999). "A fission yeast gene (*prr1*(+)) that encodes a response regulator implicated in oxidative stress response." J Biochem **125**(6): 1061-1066.

Ohmiya, R., H. Yamada, C. Kato, H. Aiba and T. Mizuno (2000). "The *Prr1* response regulator is essential for transcription of *ste11+* and for sexual development in fission yeast." Mol Gen Genet **264**(4): 441-451.

Ota, I. M. and A. Varshavsky (1993). "A yeast protein similar to bacterial two-component regulators." Science **262**(5133): 566-569.

Palmer, J. M., S. Mallareddy, D. W. Perry, J. F. Sanchez, J. M. Theisen, E. Szewczyk, B. R. Oakley, C. C. Wang, N. P. Keller and P. M. Mirabito "Telomere position effect is regulated by heterochromatin-associated proteins and *NkuA* in *Aspergillus nidulans*." Microbiology **156**(Pt 12): 3522-3531.

Pan, Y., E. A. Schroeder, A. Ocampo, A. Barrientos and G. S. Shadel (2011). "Regulation of yeast chronological life span by TORC1 via adaptive mitochondrial ROS signaling." Cell Metab **13**(6): 668-678.

Patterson, M. J., C. G. McKenzie, D. A. Smith, A. da Silva Dantas, S. Sherston, E. A. Veal, B. A. Morgan, D. M. MacCallum, L. P. Erwig and J. Quinn (2003). "Ybp1 and Gpx3 signaling in *Candida albicans* govern hydrogen peroxide-induced oxidation of the Cap1 transcription factor and macrophage escape." Antioxid Redox Signal **19**(18): 2244-2260.

Podrez, E. A., H. M. Abu-Soud and S. L. Hazen (2000). "Myeloperoxidase-generated oxidants and atherosclerosis." Free Radic Biol Med **28**(12): 1717-1725.

Posas, F. and H. Saito (1997). "Osmotic activation of the HOG MAPK pathway via *Ste11p* MAPKKK: scaffold role of *Pbs2p* MAPKK." Science **276**(5319): 1702-1705.

Posas, F., S. M. Wurgler-Murphy, T. Maeda, E. A. Witten, T. C. Thai and H. Saito (1996). "Yeast HOG1 MAP kinase cascade is regulated by a multistep phosphorelay mechanism in the *SLN1-YPD1-SSK1* "two-component" osmosensor." Cell **86**(6): 865-875.

Quinn, J., V. J. Findlay, K. Dawson, J. B. Millar, N. Jones, B. A. Morgan and W. M. Toone (2002). "Distinct regulatory proteins control the graded transcriptional response to increasing H₂O₂ levels in fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*." Mol Biol Cell **13**(3): 805-816.

Quinn, J., P. Malakasi, D. A. Smith, J. Cheetham, V. Buck, J. B. Millar and B. A. Morgan "Two-component mediated peroxide sensing and signal transduction in fission yeast." Antioxid Redox Signal **15**(1): 153-165.

Raitt, D. C., A. L. Johnson, A. M. Erkin, K. Makino, B. Morgan, D. S. Gross and L. H. Johnston (2000). "The *Skn7* response regulator of *Saccharomyces cerevisiae* interacts with *Hsf1* in vivo and is required for the induction of heat shock genes by oxidative stress." Mol Biol Cell **11**(7): 2335-2347.

Rando, R. R. (1974). "Allyl alcohol-induced irreversible inhibition of yeast alcohol dehydrogenase." Biochem Pharmacol **23**(16): 2328-2331.

Rao, G. N. and B. C. Berk (1992). "Active oxygen species stimulate vascular smooth muscle cell growth and proto-oncogene expression." Circ Res **70**(3): 593-599.

Roetzer, A., E. Klopff, N. Gratz, M. Marcet-Houben, E. Hiller, S. Rupp, T. Gabaldon, P. Kovarik and C. Schuller (2011). "Regulation of *Candida glabrata* oxidative stress resistance is adapted to host environment." FEBS Lett **585**(2): 319-327.

Romero, J. C. and J. F. Reckelhoff (1999). "State-of-the-Art lecture. Role of angiotensin and oxidative stress in essential hypertension." Hypertension **34**(4 Pt 2): 943-949.

Ruijter, G. J., S. A. Vanhanen, M. M. Gielkens, P. J. van de Vondervoort and J. Visser (1997). "Isolation of *Aspergillus niger* *creA* mutants and effects of the mutations on expression of arabinases and L-arabinose catabolic enzymes." Microbiology **143** (Pt 9): 2991-2998.

Sanchez, O. and J. Aguirre (1996). "Efficient transformation of *Aspergillus nidulans* by electroporation of germinated conidia." Fungal Genet Newslett **43**: 48-51.

Sanchez, O., R. E. Navarro and J. Aguirre (1998). "Increased transformation frequency and tagging of developmental genes in *Aspergillus nidulans* by restriction enzyme-mediated integration (REMI)." Mol Gen Genet **258**(1-2): 89-94.

Schulz, T. J., K. Zarse, A. Voigt, N. Urban, M. Birringer and M. Ristow (2007). "Glucose restriction extends *Caenorhabditis elegans* life span by inducing mitochondrial respiration and increasing oxidative stress." Cell Metab **6**(4): 280-293.

Shiozaki, K. and P. Russell (1995). "Cell-cycle control linked to extracellular environment by MAP kinase pathway in fission yeast." Nature **378**(6558): 739-743.

Skromne, I., O. Sanchez and J. Aguirre (1995). "Starvation stress modulates the expression of the *Aspergillus nidulans* brlA regulatory gene." Microbiology **141** (Pt 1): 21-28.

Song, J. Y. and J. H. Roe (2008). "The role and regulation of Trxl, a cytosolic thioredoxin in *Schizosaccharomyces pombe*." J Microbiol **46**(4): 408-414.

Timberlake, W. E. (1980). "Developmental gene regulation in *Aspergillus nidulans*." Dev Biol **78**(2): 497-510.

Todd, R. B., M. A. Davis and M. J. Hynes (2007). "Genetic manipulation of *Aspergillus nidulans*: meiotic progeny for genetic analysis and strain construction." Nat Protoc **2**(4): 811-821.

Tolbert, N. E. and E. Essner (1981). "Microbodies: peroxisomes and glyoxysomes." J Cell Biol **91**(3 Pt 2): 271s-283s.

Toone, W. M., S. Kuge, M. Samuels, B. A. Morgan, T. Toda and N. Jones (1998). "Regulation of the fission yeast transcription factor Pap1 by oxidative stress: requirement for the nuclear export factor Crm1 (Exportin) and the stress-activated MAP kinase Sty1/Spc1." Genes Dev **12**(10): 1453-1463.

Umeda, M., S. Izaddoost, I. Cushman, M. S. Moore and S. Sazer (2005). "The fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* has two importin-alpha proteins, Imp1p and Cut15p, which have common and unique functions in nucleocytoplasmic transport and cell cycle progression." Genetics **171**(1): 7-21.

Valko, M., C. J. Rhodes, J. Moncol, M. Izakovic and M. Mazur (2006). "Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer." Chem Biol Interact **160**(1): 1-40.

Van Remmen, H., Y. Ikeno, M. Hamilton, M. Pahlavani, N. Wolf, S. R. Thorpe, N. L. Alderson, J. W. Baynes, C. J. Epstein, T. T. Huang, J. Nelson, R. Strong and A. Richardson (2003). "Life-long reduction in MnSOD activity results in increased DNA damage and higher incidence of cancer but does not accelerate aging." Physiol Genomics **16**(1): 29-37.

Vargas-Perez, I., O. Sanchez, L. Kawasaki, D. Georgellis and J. Aguirre (2007). "Response regulators SrrA and SskA are central components of a phosphorelay system involved in stress signal transduction and asexual sporulation in *Aspergillus nidulans*." Eukaryot Cell **6**(9): 1570-1583.

Veal, E. A., A. M. Day and B. A. Morgan (2007). "Hydrogen peroxide sensing and signaling." Mol Cell **26**(1): 1-14.

Veal, E. A., S. J. Ross, P. Malakasi, E. Peacock and B. A. Morgan (2003). "Ybp1 is required for the hydrogen peroxide-induced oxidation of the Yap1 transcription factor." J Biol Chem **278**(33): 30896-30904.

Vigneron, A. and K. H. Vousden (2010). "p53, ROS and senescence in the control of aging." Aging (Albany NY) **2**(8): 471-474.

Vivancos, A. P., E. A. Castillo, B. Biteau, C. Nicot, J. Ayte, M. B. Toledano and E. Hidalgo (2005). "A cysteine-sulfinic acid in peroxiredoxin regulates H₂O₂-sensing by the antioxidant Pap1 pathway." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(25): 8875-8880.

Vivancos, A. P., E. A. Castillo, N. Jones, J. Ayte and E. Hidalgo (2004). "Activation of the redox sensor Pap1 by hydrogen peroxide requires modulation of the intracellular oxidant concentration." Mol Microbiol **52**(5): 1427-1435.

Vivancos, G. G., W. A. Verri, Jr., T. M. Cunha, I. R. Schivo, C. A. Parada, F. Q. Cunha and S. H. Ferreira (2004). "An electronic pressure-meter nociception paw test for rats." Braz J Med Biol Res **37**(3): 391-399.

Vivancos, M. and J. J. Moreno (2005). "beta-Sitosterol modulates antioxidant enzyme response in RAW 264.7 macrophages." Free Radic Biol Med **39**(1): 91-97.

Yang, L., L. Ukil, A. Osmani, F. Nahm, J. Davies, C. P. De Souza, X. Dou, A. Perez-Balaguer and S. A. Osmani (2004). "Rapid production of gene replacement constructs and generation of a green fluorescent protein-tagged centromeric marker in *Aspergillus nidulans*." Eukaryot Cell **3**(5): 1359-1362.

Yang, W., J. Li and S. Hekimi (2007). "A Measurable increase in oxidative damage due to reduction in superoxide detoxification fails to shorten the life span of long-lived mitochondrial mutants of *Caenorhabditis elegans*." Genetics **177**(4): 2063-2074.

Yu, J. H., Z. Hamari, K. H. Han, J. A. Seo, Y. Reyes-Dominguez and C. Scazzocchio (2004). "Double-joint PCR: a PCR-based molecular tool for gene manipulations in filamentous fungi." Fungal Genet Biol **41**(11): 973-981.

Zhang, Y., R. Lamm, C. Pillonel, S. Lam and J. R. Xu (2002). "Osmoregulation and fungicide resistance: the *Neurospora crassa* os-2 gene encodes a HOG1 mitogen-activated protein kinase homologue." Appl Environ Microbiol **68**(2): 532-538.

Zhu, J., X. Yu, B. Xie, X. Gu, Z. Zhang and S. Li (2013). "Transcriptomic profiling-based mutant screen reveals three new transcription factors mediating menadione resistance in *Neurospora crassa*." Fungal Biol **117**(6): 422-430.