

11281
27

Universidad Nacional Autónoma de México
Instituto de Fisiología Celular

**Las catalasas monofuncionales grandes y la
diferenciación asexual de *Neurospora crassa***

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTORA EN CIENCIAS
P R E S E N T A LA:
BIOLOGA SHADAY MICHÁN AGUIRRE

Bromodaca

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas •
UNAM a difundir en formato electrónico e imprs.
contenido de mi trabajo recepción

NOMBRE: Shaday Michán
Aguirre

FECHA: 24/03/03

FIRMA: [Signature]

Ciudad Universitaria, México, D. F., 2003

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



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.

PAGINACIÓN DISCONTINUA

ÍNDICE

RESUMEN.....	4
SUMMARY	6
INTRODUCCIÓN GENERAL.....	8
Las especies de oxígeno reactivas (EOR).....	8
Producción de las EOR en los seres vivos.....	10
Daños celulares generados por las EOR.....	11
Mecanismos antioxidantes celulares.....	12
Las EOR en los procesos biológicos.....	21
<i>Neurospora crassa</i> como modelo de estudio.....	24
Las EOR y la diferenciación asexual de <i>Neurospora crassa</i>	26
OBJETIVOS.....	28
RESULTADOS PUBLICADOS.....	29
Regulación y oxidación de dos catalasas monofuncionales grandes.....	29
Resumen de la publicación: Shaday Michán, Fernando Lledías, James D. Baldwin, Donald O. Natvig, and Wilhelm Hansberg. Regulation and oxidation of two large monofunctional catalases. <i>Free Radic Biol Med</i> 33:(4) 521-32.....	29
Publicación: Shaday Michán, Fernando Lledías, James D. Baldwin, Donald O. Natvig, and Wilhelm Hansberg. Regulation and oxidation of two large monofunctional catalases. <i>Free Radic Biol Med</i> 33:(4) 521-32.....	30
El desarrollo asexual de <i>Neurospora crassa</i> se incrementa en las cepas mutantes que no tienen CAT-3.....	41
Resumen de la publicación: Shaday Michán, Fernando Lledías y Wilhelm Hansberg. Asexual development is increased in catalase-3 null mutant strain (sometido para su publicación a <i>Eukaryotic Cell</i>).....	41
Publicación: Shaday Michán, Fernando Lledías y Wilhelm Hansberg. Asexual development is increased in catalase-3 null mutant strain (sometido para su publicación a <i>Eukaryotic Cell</i>).....	42
RESULTADOS NO PUBLICADOS.....	73
El gen <i>cat-3</i> se regula con la luz a través de los factores de transcripción WC-1 y WC-2.....	73
Metodología.....	74
Resultados.....	1
<i>cat-3</i> es un gen fotoinducible.....	76
Los factores white collar regulan la inducción de <i>cat-3</i> con la luz.....	76
Determinación de los sitios de inicio de la transcripción de <i>cat-3</i>	77
Análisis del promotor de <i>cat-3</i>	78

DISCUSIÓN GENERAL	80
Las catalasas monofuncionales grandes de <i>Neurospora crassa</i>	80
Regulación de la CAT-1 y de la CAT-3.....	81
Regulación de <i>cat-3</i> con la luz.....	82
Procesamiento y secreción de la CAT-3.....	83
La pérdida de la actividad de CAT-3 es compensada por otras enzimas.....	84
Otros sistemas antioxidantes se inducen en la mutante <i>cat-3</i>	85
Efectos de la ausencia de la CAT-3 en el desarrollo asexual de <i>N. crassa</i>	86
BIBLIOGRAFÍA	88
APÉNDICE	93

RESUMEN

Nuestro objetivo es entender las causas de la diferenciación celular. Para ello utilizamos como modelo de estudio el hongo filamentoso *Neurospora crassa*. La exposición del micelio vegetativo al aire induce la conidiación de manera sincrónica. Las hifas que están en contacto directo con el aire se adhieren unas con otras y forman el micelio adherido a partir del cual emergen las hifas aéreas. Las puntas de las hifas aéreas se segmentan y forman los conidios. Los datos del laboratorio muestran que se produce un estado hiperoxidante al inicio de la formación de cada una de las estructuras diferenciadas. Hemos detectado que la actividad total de catalasa aumenta considerablemente durante el proceso de conidiación, los conidios presentan 60 veces más actividad que la detectada en el micelio vegetativo.

N. crassa posee cuatro catalasas. En este trabajo describimos los genes *cat-1* y *cat-3* que codifican para las catalasas monofuncionales grandes, CAT-1 y la CAT-3, respectivamente. A diferencia de las catalasas monofuncionales pequeñas, las grandes tienen un dominio COOH-terminal de aproximadamente 150 aminoácidos y son más resistentes al pH, la temperatura y los agentes desnaturizantes. La CAT-1 y la CAT-3 resultaron más parecidas a sus correspondientes homólogas de otros hongos que entre ellas. Las dos catalasas se expresaron de manera diferente durante el ciclo asexual y en condiciones de tensión.

La CAT-1 fue la actividad de catalasa mayoritaria en los conidios, durante la germinación y en la fase de crecimiento exponencial temprano. Se indujo durante el crecimiento preestacionario y con etanol o con un choque de calor. La CAT-3 predominó en el micelio en crecimiento exponencial tardío y al inicio de la conidiación y se indujo con H₂O₂, paraquat, nitrato, ácido úrico, cadmio y luz. La regulación de *cat-3* con la luz depende de los factores de transcripción WC-1 y WC-2.

Obtuvimos mutantes en el gen de *cat-3* por el método de RIP (Repeat Induced Point mutations) y analizamos su fenotipo. Demostramos que la CAT-3 es procesada para su secreción. Se detectó la Cat-3 en el medio sólido y en el medio líquido en el que creció la cepa Wt pero no en el medio en el que creció la cepa mutante *cat-3*. La ausencia de CAT-3 no fue compensada por otras catalasas, aun en condiciones de tensión. Las colonias mutantes fueron más sensibles al H₂O₂ exógeno que las colonias de la cepa silvestre.

En comparación con la cepa silvestre, las cepas mutantes de *cat-3* mostraron los siguientes efectos: 1) las colonias crecidas en la oscuridad presentaron un alto contenido de carotenos; 2) el incremento

en la aireación de los cultivos líquidos promovió la adhesión de las hifas y la oxidación de proteínas totales; 3) la producción de micelio aéreo y conidios fue seis veces mayor en las masas miceliales expuestas al aire y como resultado de una mayor formación de hifas aéreas; 4) el aumento en la cantidad de micelio aéreo y conidios también se observó en las colonias y éstas tuvieron una oxidación total de proteínas tres veces mayor y 5) la luz, que induce una tensión oxidativa en las células, incrementó la síntesis de carotenos tanto en el micelio de la mutante como en el de la Wt.

Estos datos en conjunto muestran que la tensión oxidativa está estrechamente relacionada con el proceso de diferenciación asexual de *Neurospora crassa* y que las catalasas monofuncionales grandes desempeñan un papel importante en el mantenimiento del equilibrio REDOX durante el desarrollo del hongo.

SUMMARY

Our goal is to understand the causes of cell differentiation. For this we use the asexual cell cycle of *Neurospora crassa* as a model system. Air exposure of vegetative mycelia induces a synchronous process of conidiation. Only hyphae in direct contact with air adhere to each other to form the adhered mycelia from which aerial hyphae emerge. Tips of aerial hyphae form conidia. Data from our laboratory have shown that a hyperoxidant state develops at the start of each morphogenetic transition. Total catalase activity increased during conidiation, and conidia have 60 fold more activity than vegetative hyphae.

N. crassa has four catalases. Here we report *cat-1* and *cat-3* genes that codify for large monofunctional catalases CAT-1 and CAT-3, respectively. In contrast to small monofunctional catalases, CAT-1 and CAT-3 have a 150-amino acid COOH-terminus domain. Large catalases are more resistant to pH, temperature and denaturants agents. There is a higher similarity between these catalases and their homologous enzymes in other fungi than between each other. CAT-1 and CAT-3 are differentially regulated during the asexual cycle and under stress conditions.

CAT-1 was the major catalase activity in conidia, during germination and in early exponential growth. It was induced during pre-stationary growth phase and under ethanol and heat shock treatment. CAT-3 was predominant in late exponential growth and at the beginning of conidiation. It was induced by H₂O₂, paraquat, nitrate, uric acid, cadmium or light. Regulation of *cat-3* gene by light was dependent on WC-1 and WC-2 transcription factors.

Mutant strains of *cat-3* were obtained by RIP (Repeat Induced Point mutations) and their phenotype was analyzed. CAT-3 was processed for its secretion and was detected in solid and liquid media where Wt strain was grown, but no in media from the *cat-3* null mutants. CAT-3 absence was not compensated by other catalases, even under different stress conditions. Mutant colonies were more sensitive to exogenous H₂O₂.

Compared to Wt strain, *cat-3* mutant showed the following features in response to oxidative stress: 1) colonies grown in dark had higher carotenes content; 2) increase aeration in liquid culture promoted hyphae adhesion and total protein oxidation; 3) aerial mycelia and conidia production was six fold higher in mycelial mats exposed to air due to increased number of aerial hyphae; 4) increase in aerial

mycelia and conidia was also evident in colonies, and colonies had three fold higher total protein oxidation, and 5) light, which causes oxidative stress, increased carotenes synthesis in mutant and Wt mycelia.

Taken together these data demonstrate that oxidative stress is tightly related to asexual differentiation in *N. crassa* and that large monofunctional catalases have an important role in REDOX maintenance during the fungal development.

INTRODUCCIÓN GENERAL

Las especies de oxígeno reactivas (EOR)

El dióxígeno (O_2), gas que constituye el 21% del aire, se requiere para el metabolismo aeróbico. Sin embargo, como resultado de éste, se forman moléculas más reactivas conocidas como **especies de oxígeno reactivas (EOR)**. Las EOR regulan varios procesos celulares pero también resultan tóxicas para los organismos (Halliwell y Gutteridge, 1999).

La molécula de O_2 es un birradical en su estado basal, o de triplete, debido a que presenta dos electrones desapareados en sus orbitales externos. El giro paralelo de estos electrones dificulta la reducción total del O_2 de tal forma que éste sólo puede recibir electrones libres anti-paralelos de uno en uno. La reducción univalente del O_2 produce EOR.

El primer producto que se forma cuando el O_2 acepta un electrón, es un radical libre (tiene un electrón desapareado) con carga eléctrica negativa llamado **anión superóxido ($O_2^{\cdot -}$)**. Con la adición de otro electrón se forma el ión peróxido que se protona rápidamente en el ambiente celular produciendo el **peróxido de hidrógeno (H_2O_2)**. Éste no es un radical libre puesto que los dos electrones de sus últimos orbitales se encuentran apareados.

El H_2O_2 se descompone fácilmente y al aceptar un electrón genera el **radical hidroxilo ($\cdot OH$)**, que es muy reactivo, y el ión hidroxilo (HO^-). El HO^- se protona rápidamente y forma

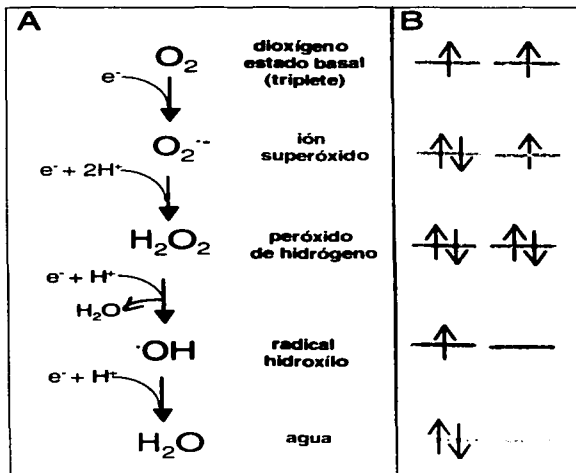


FIG. 1. Especies de oxígeno reactivas (EOR) que se forman durante la reducción del oxígeno molecular en agua (A) y distribución de los electrones en los últimos orbitales de cada EOR (B). Modificación de Simontacchi et al., 2001.

una molécula de agua. El $\cdot\text{OH}$ acepta un electrón y un átomo de hidrógeno (H^+) para formar H_2O (Fig. 1).

Cuando uno de los electrones desapareados del O_2 absorbe energía e invierte su rotación, se forma el **oxígeno en singulete ($^1\text{O}_2$)**. Existen dos formas de $^1\text{O}_2$: la sigma (Σ) que es un radical libre debido a que conserva los dos electrones de los últimos orbitales desapareados, pero con giros antiparalelos; y la delta (Δ), con los mismos electrones apareados (Fig. 2). El singulete Σ tiene una vida media extremadamente corta y decae a la forma Δ o al estado basal $^3\text{O}_2$.

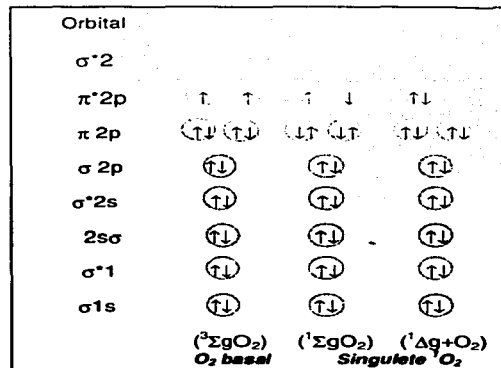


FIG. 2. Configuración electrónica de los oxígenos en singulete Σ y Δ . (Modificación de Halliwell y Gutteridge, 1999)

Las EOR pueden ser radicales libres o no radicales (Tabla. 1). Esto y las diferencias en carga y estructura confieren a cada EOR distinto grado de reactividad. Por ejemplo, el $\text{O}_2^{\cdot-}$ no es muy reactivo, sin embargo, es dañino debido a la capacidad que tiene de originar especies como el $\cdot\text{OH}$ y el $^1\text{O}_2$. El $\text{O}_2^{\cdot-}$ al dismutar produce H_2O_2 y éste último puede generar $\cdot\text{OH}$. Además la dismutación espontanea del $\text{O}_2^{\cdot-}$ produce $^1\text{O}_2$.

Tabla 1. Clasificación de las EORs en radicales libres y no radicales

Radicales Libres	No Radicales
$\text{O}_2^{\cdot-}$ Anión superóxido	H_2O_2 Peróxido de hidrógeno
$\cdot\text{OH}$ Radical hidroxilo	$^1\text{O}_2$ Oxígeno en singulete

El H_2O_2 es un oxidante débil. Difunde y cruza las membranas fácilmente y al reaccionar con algunos metales de transición como el Fe^{2+} y el Cu^+ forma el radical hidroxilo. Fenton en 1894 describió la siguiente reacción para la formación del $\cdot\text{OH}$:



En presencia del $O_2^{\cdot-}$ los iones oxidados de los metales de transición son reducidos por el $O_2^{\cdot-}$ y reciclados para reaccionar nuevamente.



Ambas reacciones acopladas se conocen como el ciclo de Haber-Weiss.



El $\cdot OH$ es la EOR más reactiva, es un radical libre que reacciona rápidamente con casi todas las moléculas de los organismos. Esta EOR también se forma en la fisión homolítica del H_2O_2 , cuando se expone a radiaciones ionizantes.

Producción de las EOR en los seres vivos

Muchas EOR son producidas en los seres vivos como resultado del metabolismo aerobio. La fuente más importante de producción del $O_2^{\cdot-}$ es la cadena de transporte de electrones. A través de ella son acarreados los electrones al complejo citocromo *c* oxidasa para reducir el O_2 en H_2O . De los complejos NADH⁺ coenzima Q reductasa y de las dos formas reducidas de la coenzima Q se transfiere un electrón al O_2 formandose el $O_2^{\cdot-}$. Se estima que del 1 al 2% del oxígeno consumido durante el transporte de electrones en la mitocondria, produce $O_2^{\cdot-}$ (Halliwell y Gutteridge, 1999).

El $O_2^{\cdot-}$ también se forma por la acción de diversas oxidases, principalmente de la oxidasa del NADPH⁺ y de oxidasa de xantina. Además, cada día el 3% de la hemoglobina total se convierte a la forma oxidada (metahemoglobina) y genera $O_2^{\cdot-}$ (Stocker y Frei, 1991).

La fuente principal del H_2O_2 es la dismutación del $O_2^{\cdot-}$ por la superóxido dismutasa. Sin embargo, este también se puede producir como resultado de diversos procesos como: 1) por la acción de las enzimas como la oxidasa de glicolato, la oxidasa del D y L-aminoácido y la oxidasa de laurato, 2) durante la β -oxidación de los ácidos grasos de cadena larga, 3) en la síntesis del colesterol y de las purinas, 4) en el catabolismo de los aminoácidos, 5) en el metabolismo del glicolato, 6) en la fotorrespiración de las plantas, 7) en la fotosíntesis y 8) en la radiólisis del agua.

Las células fagocíticas del sistema inmune de los mamíferos generan una importante cantidad de H_2O_2 a partir de la dismutación del $O_2^{\cdot-}$ producido por la oxidasa del NADPH que se encuentra asociada a la membrana. En las células no fagocíticas también se forma H_2O_2 , aunque este sólo representa el 1% del generado por las células fagocíticas, y la oxidasa del NADPH que participa en la producción del $O_2^{\cdot-}$ es diferente (Gamaley y Kluybin, 1999). En el plasma sanguíneo y en los tejidos

oculares humanos se genera H_2O_2 continuamente a partir de la oxidación del GSH y del ascorbato (Spector, 1991; Halliwell *et al.*, 2000; Long y Halliwell, 2000).

El $^1\text{O}_2$ se genera en los seres vivos mediante reacciones de fotosensibilización en las que intervienen moléculas como los pigmentos de la retina, las clorofilas *a* o *b*, la riboflavina y sus derivados FMN FAD, la bilirrubina o las porfirinas. Los electrones periféricos de estas moléculas fotosensibles se excitan al absorber la luz de cierta longitud de onda. Cuando esta energía almacenada se transmite a las moléculas de O_2 , se produce el cambio en el giro de uno de los electrones externos y se forma el $^1\text{O}_2$. Esta EOR también se puede formar durante la dismutación espontánea del $\text{O}_2^{\cdot-}$, en la reacción de Haber-Weiss y por la descomposición del H_2O_2 (Lledías y Hansberg, 2000).

Daños celulares generados por las EOR

Las EOR causan daños importantes en los componentes celulares. La especie más reactiva es el $\cdot\text{OH}$. Sin embargo, se ha demostrado que el $\Delta^1\text{O}_2$ también causa afecta en los organismos, produce daños en las membranas celulares, en los aminoácidos, en el ADN y en las proteínas (Halliwell y Gutteridge, 1999; Lledías *et al.*, 1998).

Las principales modificaciones que producen las EOR en el ADN son la oxidación de las purinas, el entrecruzamiento con proteínas y la fragmentación. La presencia en el ADN de 8-hidroxi 2'-deoxiguanosina (8-OHdG) es un índice del daño oxidativo en el mismo. Se ha demostrado que el ADN mitocondrial se oxida más que el ADN nuclear (Richter *et al.*, 1988). Si el sistema de reparación celular no es capaz de corregir inmediatamente el daño en el ADN, se generan mutaciones debido al apareamiento de bases erróneo durante su duplicación. Además, las EOR también pueden producir un rearrreglo y la escisión de grandes fragmentos (4 Kpb aproximadamente) del ADN mitocondrial en los animales (Adachi *et al.*, 1993).

La modificación de las proteínas por las EOR se debe principalmente al $\cdot\text{OH}$. Sin embargo, el curso del proceso de oxidación está determinado por la disponibilidad del O_2 , el $\text{O}_2^{\cdot-}$ o de su forma protonada, el HO_2^{\cdot} . Colectivamente las EOR pueden oxidar los residuos de las cadenas laterales de algunos aminoácidos, formar entrecruzamientos proteína-proteína y oxidar la cadena polipeptídica principal produciendo su fragmentación. La mayoría de las EOR pueden oxidar los residuos de cisteína y metionina. Entre dos cisteínas se forma un disulfuro y la metionina forma sulfoxidos de metionina (MeSOX). Estas son las únicas oxidaciones proteicas que pueden ser reparadas ya que la mayoría de las células tienen reductasas de disulfuro y reductasas de MeSOX (Berlett y Stadtman,

1997). Los aminoácidos aromáticos como el triptofano, la fenilalanina, la tirosina y la histidina se oxidan con las EOR. Los primeros tres se hidroxilan y la histidina se convierte en 2-oxohistidina, asparagina o aspático. La oxidación directa en los residuos de lisina, arginina, prolina y treonina produce derivados α -cetoacilos o carbonilos. Estos derivados también se pueden formar en las proteínas por medio de algunas reacciones con los aldehídos producidos durante la peroxidación de los lípidos o con los derivados de carbonilo reactivos generados en la glicación o la glicoxidación. También un corte oxidativo de las proteínas por la vía de la α -aminación o la oxidación de la cadena lateral del glutamilo pueden bloquear el extremo amino-terminal de la proteína con un α -cetoacilo. La presencia de los grupos carbonilos se utiliza como un marcador de la oxidación de las proteínas celulares a través de las EOR y existen varios métodos que permiten su detección y cuantificación. La oxidación de las proteínas está relacionada con el envejecimiento, la tensión oxidativa y varias enfermedades como la diabetes, el Alzheimer y la esclerosis lateral amiotrófica (Berlett y Stadman, 1997).

Los lípidos también son oxidados por las EOR. Los ácidos grasos poliinsaturados que forman las membranas celulares, así como los que constituyen los complejos lipoproteicos, son el principal blanco de las EOR. La oxidación de los lípidos de las membranas altera las interacciones no covalentes dentro de la bicapa lo que provoca la desestabilización de las mismas y la pérdida de su función. Esto puede afectar de manera importante la integridad de los organelos y por consecuencia de la célula completa.

Los daños moleculares generados por las EOR se reflejan, por ejemplo, en la pérdida de la función de los organelos, en la reducción de la eficiencia metabólica, en la ruptura de las cromátidas, en el daño a las membranas y en la fuga de electrolitos.

Mecanismos antioxidantes celulares

En condiciones fisiológicas normales, las EOR son eliminadas constantemente de las células por medio de diferentes mecanismos antioxidantes que son capaces de catabolizar, neutralizar o atrapar dichas especies reactivas. Esto mantiene una concentración basal baja de las EOR y protege los componentes celulares del daño oxidativo.

Las superóxido dismutasas

Existen mecanismos antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos. Dentro de los primeros se encuentran las **enzimas antioxidantes** que aceleran el proceso de eliminación de alguna EOR, por

ejemplo, las superóxido dismutasas (SOD) dismutan el $O_2^{\cdot-}$ con una eficiencia cuatro órdenes de magnitud mayor que la reacción espontánea a pH fisiológico. El H_2O_2 y el O_2 son los productos que se generan en la dismutación del $O_2^{\cdot-}$. Las SOD está presente en casi todos los organismos aerobios. Existen varias isoformas que difieren en los genes que las codifican, la secuencia de aminoácidos, el peso molecular, la estructura y en la localización. En el sitio activo pueden tener Cu(II) y Zn(II), Mn(III), Fe(III) o Ni(II).

La SODCu/Zn es una enzima homodimérica de 32-kDa. Las unidades están asociadas por medio de interacciones no covalentes y cada subunidad tiene un Cu(II) y un Zn(II). Son sensibles al cianuro, al H_2O_2 y a la azida. Están presentes en el citoplasma de todos los eucariotes superiores y en las plantas también se localiza en el estroma del cloroplasto. También se localiza en el espacio periplásmico de algunas bacterias como por ejemplo, *Caulobacter crescentus* (Bowler *et al.*, 1992; Steinam y Ely, 1990).

La SOD extracelular (SODEC) es una glicoproteína compuesta de cuatro subunidades idénticas de 30-kDa. Cada subunidad contienen un Cu(II) y un Zn(II). El polipéptido no glicosilado es de 24-kDa. Posee una señal hidrofóbica que permite el transporte de la enzima al espacio extracelular y un dominio carboxilo terminal cargado positivamente, que es el responsable de la unión del heparina-glicosaminoglicano. Este carbohidrato parece ser el responsable de ligar la enzima con los proteoglicanos sulfatados de las paredes celulares. La enzima se inhibe con el cianuro, la azida y el dietiltiocarbamato. La secuencia de aminoácidos comparte 50% de identidad con la SODCu/Zn. La SODEC se encuentra en elevadas concentraciones fuera de las células, en el fluido cerebroespinal, la linfa y el plasma (Henkle-Duhrsen y Kampkotter, 2001; Zelco *et al.*, 2002).

La SODMn esta codificada en el ADN nuclear, se sintetiza en el citoplasma y se importa a la mitocondria de los eucariotes, donde se encuentra en su forma activa. En los procariotes, la enzima es citoplásmica. La SODMn es tetramérica en plantas y en animales y es dimérica en las bacterias. Presenta un Mn(III) por subunidad y, a diferencia de la SOD Cu/Zn, ésta es resistente al cianuro y al H_2O_2 (Bowler *et al.*, 1992).

La SODFe es dimérica y está presente en las bacterias, las algas y las plantas. En comparación con las otras SOD, ésta sólo es sensible al H_2O_2 . La SODFe y la SODMn son enzimas estructuralmente similares, de hecho, la apoenzima puede funcionar con cualquiera de los dos metales que se

incorpore en su sitio activo (Meier *et al.*, 1982; Stallings *et al.*, 1984). La mayoría de los organismos procariotos, las algas y los protozoarios tienen la SODMn y/o la SODFe.

Recientemente se describió una SODNi en *Streptomyces*. Esta es una enzima citoplásmica tetramérica compuesta de subunidades idénticas de 13-kDa. Se inhibe con el cianuro y el H₂O₂. En el mismo género de bacteria también se encontró una SOD Fe/Zn (Yoon *et al.*, 1996).

Las enzimas que eliminan el H₂O₂ de las células son las catalasas, las peroxidasas y las peroxirredoxinas (Tabla 2).

Las catalasas

Las catalasas utilizan una molécula de H₂O₂ como donadora de electrones para reducir otra molécula de H₂O₂ en O₂ y H₂O. De acuerdo con las características físicas y las propiedades bioquímicas, las catalasas se pueden clasificar en dos subgrupos: el de las catalasas monofuncionales o típicas y el de las pseudocatalasas o catalasas atípicas.

Las catalasas monofuncionales o típicas es el subgrupo más grande de catalasas. Se han reportado más de 75 secuencias de genes que están distribuidos en casi todos los organismos excepto en las arqueobacterias, los anaerobios estrictos y algunos parásitos. La mayoría son homotetrámeros de 200 a 340-kDa y contienen como grupo prostético un hemo en cada subunidad. Los hemos de estas catalasas pueden ser: el hemo *b* o Fe protoporfirina IX como en la catalasa bovina y en la de *Proteus mirabilis*, el hemo *d* como en la de *Penicillium vitae* y la HPII de *Escherichia coli*, y una clorina en *Neurospora crassa* (Jacob y Orme-Johnson, 1979). Además, algunas catalasas como la bovina, la de *Proteus mirabilis* y la de *Micrococcus lisodeikikus*, también contienen un NADPH por subunidad.

Las catalasas monofuncionales se inhiben con el 3-amino-triazol, el cianuro, la azida y la hidroxilamina. Muestran actividad máxima en un intervalo amplio de pH (entre 5-10.5). En las células animales y vegetales se localizan predominantemente en los peroxisomas. Se ha determinado la estructura cristalográfica de tres catalasas de procariotos, la de *Micrococcus luteus*, la de *Proteus mirabilis* y la HPII de *Escherichia coli* y tres de eucariotos, la Cat-A de *Sacharomyces cerevisiae*, una de *Penicillium vitale* y la de hígado de bovino. Aunque la estructura primaria de las seis proteínas presenta grandes diferencias, la estructura tridimensional está bien conservada. Todos los homotetrámeros tienen simetría molecular 222. Cada subunidad forma un glóbulo que deja un brazo amino terminal extendido y en cada una de ellas se pueden identificar cuatro regiones estructurales diferentes: el brazo amino terminal, el dominio de barril β, el dominio de conexión y el dominio α-

hélices. El dominio barril β esta conservado desde los procariotos inferiores hasta los eucariotos superiores, en los dominios de conexión y en las α -hélices existe una ligera variabilidad y la mayor divergencia se localiza en los extremos amino y carboxilo terminales. El grupo hemo no está unido covalentemente a la cadena polipeptídica, el Fe esta en coordinación con una tirosina (Zamocky y Koller, 1999).

Algunas catalasas típicas, conocidas como las catalasas monofuncionales grandes, poseen un dominio adicional de 150 aminoácidos en la región C-terminal, similar a la flavodoxina. Aproximadamente el 9% de las catalasas secuenciadas actualmente corresponden a este grupo (la HP11 de *E. coli* y las de los hongos *P. vitale*, *A. nidulans*, *A. fumigatus*, *P. anserina* y *C. purpurea*). Además, estas catalasas de hongos están glicosiladas, presentan un contenido de carbohidratos de 8.2% a 10.2% (Ruis y Koller, 1997).

Muchos organismos tienen más de una catalasa. En los animales y las plantas las catalasas se encuentran en los peroxisomas. En los hongos las hay citoplásmicas, periplásmicas o extracelulares (Ruis y Koller, 1997).

TABLA 2. Mecanismos antioxidantes enzimáticos.

Enzima antioxidante	EOR que eliminan	Reacción de la enzima
Superóxido dismutasa (SOD)	$O_2^{\cdot -}$	$2O_2^{\cdot -} + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$
Catalasas monofuncionales	H_2O_2	$H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2$
Peroxidasas	H_2O_2	$SH_2 + H_2O_2 \rightarrow S + 2H_2O$
Catalasas-peroxidasas	H_2O_2	Pueden reaccionar como catalasa y como peroxidasa
Peroxirredoxinas	H_2O_2	$SH_2 + H_2O_2 \rightarrow S + 2H_2O$

Las pseudocatalasas o catalasas atípicas utilizan iones Mn en lugar de Fe en su sitio activo. Se han encontrado en bacterias lácticas y termófilas. El peso molecular es de 170 a 210 kDa y pueden formar estructuras oligoméricas inusuales como homopentámeros u homohexámeros. No se inhiben con el cianuro o la azida (Zamocky y Koller, 1999).

Las hemoperoxidasas

Las hemoperoxidasas catalizan la reducción del H_2O_2 utilizando una amplia variedad de compuestos orgánicos o inorgánicos (ver reacción en Tabla 2.). Estas enzimas han sido aisladas de varios organismos y la mayoría presentan un hemo como grupo prostético. A diferencia de las catalasas típicas, en las hemoperoxidasas el Fe del hemo está en coordinación con una histidina. Existen dos superfamilias de hemoperoxidasas, las de animales y las de plantas y microorganismos. Las peroxidases de ambos grupos difieren entre sí en su estructura primaria, secundaria y terciaria.

Las catalasas-peroxidases son un tipo de hemoperoxidasas de plantas y microorganismos. Se caracterizan por tener actividad catalítica bifuncional, es decir, reaccionan como catalasa o como peroxidasa. Para la actividad de peroxidasa se pueden utilizar una amplia variedad de sustratos como donadores de electrones para reducir el H_2O_2 . Estas enzimas tienen un hemo como grupo prostético. Su peso molecular varía de 120 a 340 kDa y en general son homodiméricas aunque también las hay tetraméricas y monoméricas. El recambio catalítico máximo es de dos a tres órdenes de magnitud por abajo de las catalasas típicas. En contraste con estas últimas, las catalasa-peroxidases tiene un óptimo de pH, son más sensibles a la inactivación con temperatura y con un pH extremo, son más resistentes al 3-amino-1,2,4-triazol y el hemo se puede reducir con ditionita. Se inactivan con concentraciones milimolares de H_2O_2 y con etanol-cloroformo (Goldberg y Hochman, 1989)

A pesar de que las catalasas-peroxidases comparten características con las catalasas típicas como la presencia de un grupo hemo y la actividad de catalasa, no existe homología entre los genes de ambos grupos. Sin embargo, todos los genes secuenciados de catalasas-peroxidases si muestran homología entre sí. El análisis molecular sugiere que estas enzimas se originaron como resultado de la duplicación de un gen de hemoperoxidasa. La catalasas-peroxidases se encuentran en las arqueobacterias, las eubacterias y los eucariotes, aunque en éste último sólo se han reportado en hongos (Zamocky y Koller, 1999; Peraza y Hansberg, 2002).

Otras hemoperoxidasas de plantas son la peroxidasa de la raíz fuerte que utiliza una gran variedad de sustratos como guaiacol, NADH, fenoles o tioles y la citocromo c peroxidasa y la ascorbato

peroxidasa que son específicas en cuanto al sustrato. La ascorbato peroxidasa utiliza como cofactor al ascorbato para eliminar el H_2O_2 . Estas peroxidasas las presentan solamente algunas cianobacterias, los cloroplastos de las plantas superiores y el alga *Euglena sp.*

La citocromo *c* peroxidasa se encuentra en algunas bacterias y en la membrana mitocondrial de los hongos. El H_2O_2 reacciona con la enzima y forma un complejo que finalmente reduce el citocromo *c*. La NADH peroxidasa utiliza NADH obtenido de la glucólisis para reducir el H_2O_2 . Está presente en bacterias como *Lactobacillus casei* y *Streptococcus faecalis*.

La lactoperoxidasa presente en la saliva y la leche, la mieloperoxidasa en las células fagocíticas y la peroxidasa de la tiroides son ejemplos de hemoperoxidasas de animales.

La glutatión peroxidasa

La glutatión peroxidasa utiliza glutatión como donador de electrones para reducir una gran variedad de hidroperóxidos entre ellos el H_2O_2 . Esta enzima está presente en los animales, las plantas, los hongos, las algas y algunas bacterias. En los mamíferos existen al menos cuatro isoenzimas que difieren en su estructura y localización. Excepto la glutatión peroxidasa IV que es monomérica, las demás están formadas por cuatro subunidades de 19-22 kDa y cada una contienen una selenocisteína unida covalentemente (Nordberg y Arnér, 2001).

La reacción que catalizan es la siguiente:



Las peroxirredoxinas

Las peroxirredoxinas (Prx) forman una familia de peroxidases diméricas con peso molecular de 20-30 kDa y están presentes en organismos de todos los reinos, desde bacterias hasta mamíferos. En las células eucariotas existen múltiples isoformas, por ejemplo, *S. cerevisiae* y *D. melanogaster* contienen cada una cinco isoformas (Park *et al.*, 2000; Radyuk *et al.*, 2001) y en el humano al menos existen seis isoformas (Seo *et al.*, 2000). Cada una de las isoformas exhibe un patrón diferente de expresión durante el desarrollo, muestra una localización distinta en los organelos celulares y genera distintos intermediarios de reacción durante la catálisis.

Todas las Prx tienen un residuo de cisteína conservado en la región amino terminal de la molécula que corresponde a la Cys 47 en la peroxirredoxina cTPxl de la levadura. Según las cisteínas conservadas, la familia de las Prx se divide en tres grupos: el 1-Cys, el 2-Cys y el 2-Cys atípico. El grupo 1-Cys incluye las Prx de varias especies de arqueobacterias, levaduras, nemátodos, plantas y

animales que sólo tienen la Cys amino terminal conservada. El H_2O_2 oxida la Cys y forma una Cys-SOH que es incapaz de generar un puente disulfuro debido a la ausencia de una segunda Cys cercana. Posiblemente el glutatión (GSH) funcione como donador de electrones en esta reacción. Las Prx 1-Cys se localizan en el citosol, en la mitocondria o en el núcleo celular (Rhee *et al.*, 2001)

En el grupo 2-Cys se encuentran la mayoría de la Prx reportadas. Éstas se caracterizan por presentar una segunda Cys conservada en la región carboxilo terminal, correspondiente a la Cys 170 de la cTPx I de la levadura. Las Cys amino y carboxilo terminales están separadas entre sí por 121 residuos de aminoácidos. Durante la reacción, las Prx 2-Cys forman un puente disulfuro intermolecular entre las dos cisteínas. Únicamente la tioredoxina puede reducir el puente disulfuro y recuperar el estado inicial de las Prx. La segunda Cys se correlaciona con una secuencia específica conservada alrededor de la primera Cys, FTFVCPTEI en las Prx 2-Cys y FTPVCTTEL en las 1-Cys. Las Prx 2-Cys se han detectado en la mitocondria, el citosol y en el medio de cultivo (Rhee *et al.*, 2001).

El tercer grupo de Prx es el 2-Cys atípico y está formado por enzimas de menor tamaño que las 2-Cys típicas. Se localizan en el citosol, la mitocondria y los peroxisomas y no presentan la segunda Cys conservada en el extremo carboxilo terminal. Sin embargo, igual que las Prx 2-Cys típicas, su actividad depende de la presencia de dos cisteínas. Además de la Cys amino terminal, éstas poseen dos cisteínas en las posiciones 73 y 152, la secuencia alrededor de éstas no es homóloga a la secuencia que acompaña la Cys carboxilo terminal de las Prx 2-Cys típicas. Además, la distancia entre la Cys amino terminal y las Cys de las Prx atípicas es substancialmente más pequeña que los 120-123 aminoácidos que separan las dos Cys conservadas en las peroxirredoxinas 2-Cys típicas. Durante la reacción, los peróxidos oxidan la Cys amino terminal y ésta forma un enlace disulfuro con la Cys 152 que, a diferencia de las Prx típicas, éste es intramolecular. La tioredoxina es la enzima que reduce específicamente los disulfuros de estas enzimas. La Cys 73 no participa en la actividad de Prx (Rhee *et al.*, 2001).

Dentro de los mecanismos **antioxidantes no enzimáticos** se encuentran una gran variedad de moléculas que evitan la formación de las EOR, que las neutralizan o que las atrapan:

El glutatión

El glutatión es un tripéptido que contiene cisteína (Fig. 3D). Es el tiol no proteico de bajo peso molecular que se encuentra en mayores concentraciones (milimolar) en las células aerobias. Está

presente en la forma reducida (GSH), en la oxidada ya sea como disulfuro de glutatión (GSSG) o asociado con los tioles de las proteínas (GS-R). Ambas formas oxidadas pueden ser catalíticamente reducidas por la glutatión reductasa dependiente del NADPH o por la tioredoxina (TRX) o la glutarredoxina (GRX). El GSH regula el estado redox de los disulfuros de las proteínas y mantiene los niveles de oxido-reducción intracelulares. Es el cofactor de la glutatión peroxidasa (GSHPx) para la eliminación del H_2O_2 . Además, el GSH forma conjugados con una gran variedad de compuestos electrofílicos por medio de las reacciones catalizadas por la glutatión-S transferasa (GST) o directamente cuando los compuestos electrofílicos son muy reactivos. La conjugación con el GSH es un mecanismo importante para la detoxificación celular (Dickinson y Forman, 2002). En condiciones fisiológicas normales, la concentración de la forma reducida del glutatión es de 10-100 veces mayor que la oxidada. Los cambios en la proporción de ambas formas regulan una gran variedad de reacciones celulares relacionadas con la transducción de señales y el ciclo celular (Filomeni *et al.*, 2002).

El ácido ascórbico

El ácido ascórbico (vitamina C), (Fig. 3B) es una vitamina soluble en agua que reduce el $O_2^{\cdot-}$. Es el cofactor de la ascorbato peroxidasa para la eliminación del H_2O_2 . También reacciona con el 1O_2 , el peroxinitrilo y los radicales peroxilo y regenera otras moléculas antioxidantes como el α -tocoferol, los β -carotenos y el glutatión. Junto con el α -tocoferol limita la propagación de la lipoperoxidación y con el GSH protege a las células del daño oxidativo. El ácido ascórbico y el ácido úrico reaccionan con el ácido hipoclorito producido por la mielóperoxidasa.

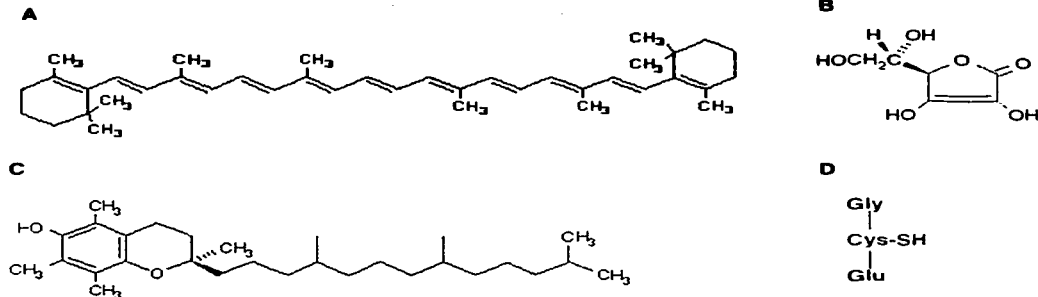


FIG. 3. Moléculas antioxidantes. β -caroteno (A), ácido ascórbico (B), α -tocoferol (C) y glutatión (D).

Los tocoferoles y carotenos

Los tocoferoles y los carotenos son compuestos antioxidantes liposolubles. El α -tocopherol (Vitamina E), (Fig. 3C) está presente en las membranas celulares. Contienen un grupo hidroxilo (Fig. 3C) que reacciona con los electrones desapareados de los radicales lipoperoxilo con lo cual limita la propagación de la lipoperoxidación. Además reacciona con el $^1\text{O}_2$ y lo desactiva. Los carotenos como el β -caroteno (Fig. 3A), la cantaxantina, la luteína y el licopeno desactivan el $^1\text{O}_2$. Los más eficientes son aquellos que contienen más de 11 enlaces dobles conjugados (Thomas *et al.*, 1981).

Los quelantes

Las moléculas quelantes secuestran los metales de transición citoplásmicos evitando así las reacciones de oxido-reducción que producen EOR. La ceruloplasmina, además de secuestrar el Cu, tiene actividad de ferroxidasa, es decir, oxida el Fe^{2+} a Fe^{3+} y con esto se evita la reacción de Fenton en la que se forma el $^{\bullet}\text{OH}$. La albumina inmoviliza el Cu^+ y el Fe^{2+} . Por su parte la transferrina en el plasma sanguíneo, lactoferrina en la leche y ferritina en el citosol, secuestran el Fe^{2+} . Los aminoácidos y otros compuestos como la bilirrubina y el ácido úrico también pueden atrapar iones metálicos. Las metalotioneinas son proteínas pequeñas presentes en las células eucariotas que, además de regular el metabolismo del Cu y del Zn, tienen la capacidad de secuestrar varios metales de transición como Zn, Cu, Cd, Hg o Cu.

Antioxidantes liposolubles

Otros compuestos liposolubles como la melatonina y el ácido lipoico también tiene propiedades antioxidantes. La melatonina atrapa los radicales hidroxilo, peroxilo y posiblemente el oxígeno en singulete (Cagnoli *et al.*, 1995). Además, induce la glutatión peroxidasa potenciando así la defensa celular contra la tensión oxidativa (Reiter *et al.*, 1997) y estabiliza la membrana celular confiriéndole una mayor resistencia al daño oxidativo (García *et al.*, 1998).

El ácido lipoico libre reducido a ácido dihidrolipoico tiene una poderosa capacidad reductora. Las propiedades antioxidantes incluyen la quelación de metales (Scott *et al.*, 1994), el atrapamiento de radicales libres (Scott *et al.*, 1994; Kagan *et al.*, 1992) y la regeneración de otros antioxidantes como el ácido ascórbico, el glutatión y el α -tocopherol (Packer, *et al.*, 1995).

Además, si las EOR escapan de la defensa antioxidante, las células cuentan con mecanismos que reparan el ADN (Breimer, 1988), degradan las proteínas (Marcillat *et al.*, 1988) y metabolizan los lípidos dañados (Halliwell and Gutteridge, 1999).

Las EOR en los procesos biológicos

Las EOR desempeñan un papel importante en la fisiología celular. Las variaciones en la concentración regulan la expresión de los genes, la transducción de señales y el transporte de iones. Con ello se desencadena una amplia variedad de respuestas celulares, desde la proliferación hasta la detención del crecimiento, la senescencia, la diferenciación y la muerte celular. La respuesta varía significativamente dependiendo del tipo de célula, de las especies reactivas que se forman, de la concentración de éstas y del tiempo de exposición. La diversidad en los efectos refleja la amplia variedad de las vías de señalización intracelular que son activadas en respuesta al cambio en la concentración de las EOR (Fig. 4). (Martindale y Holbrook, 2002).

Las EOR regulan la transcripción genética. NFκB y AP-1 son factores de transcripción que están presentes en las células eucariotas y que se activan con el H_2O_2 . NFκB transcribe una gran variedad de genes relacionados con la inmunidad, la inflamación y el cáncer (Sen y Packer, 1996) y AP-1 induce diversos genes que participan en la respuesta a la tensión, la proliferación, la transformación y la muerte celular (Shaulian y Karin, 2002).

OxyR y SoxRS son factores de transcripción bacterianos que se

activan con el H_2O_2 y el $O_2^{\cdot -}$, respectivamente. OxyR transcribe ocho proteínas en respuesta al H_2O_2 , entre ellas una catalasa (*katC*) y una peroxirredoxina (Storz *et al.*, 1990; Demple y Amábile-Cuevas 1991). SoxRS activa la transcripción de un regulón constituido por nueve genes que incluye el de la superóxido dismutasa-Mn, la endonucleasa IV, la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa y seis de función desconocida (Demple y Amábile-Cuevas, 1991; Hidalgo y Demple, 1994).

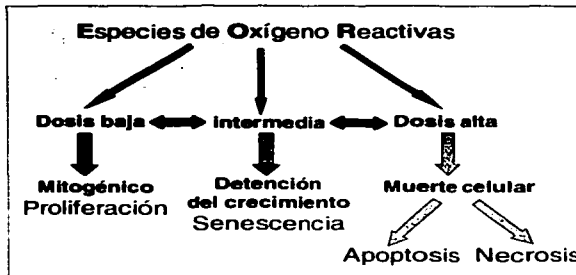


FIG. 4. Las EOR promueven un amplio espectro de respuestas celulares. Generalmente en bajas dosis (particularmente de H_2O_2) las EOR son mitogénicas y promueven la proliferación celular. En dosis intermedias detienen el crecimiento de manera temporal o permanente y promueven la senescencia. En dosis altas causan la muerte celular por apoptosis o necrosis. Modificado de Martindale y Holbrook, 2002.

Además de regular la transcripción genética, también se ha documentado la participación de las EOR a distintos niveles en la cascada de transducción de señales, desde la regulación del transporte de calcio y la fosforilación de proteínas hasta desempeñar *per se* una función de segundos mensajeros.

El Ca^{2+} funciona como segundo mensajero en una gran variedad de procesos biológicos como la contracción muscular, la neurotransmisión, la transcripción génica y el crecimiento celular. Se ha demostrado que las EOR regulan los canales y las bombas de Ca^{2+} . Por ejemplo, el O_2^- y el H_2O_2 inhiben la bomba de Ca^{2+} dependiente de ATP del retículo sarcoplásmico (RS). Una concentración de 3-5 mM de H_2O_2 aumenta la probabilidad de apertura de los canales liberadores del Ca^{2+} del RS del corazón de oveja y un efecto similar se produce en el músculo esquelético de conejo. Los canales de Ca^{2+} del RS también se activan en presencia del colorante rosa de bengala que es un generador de O_2^- (Suzuki *et al.*, 1997).

La fosforilación de proteínas juega un papel importante en la transducción de señales. Las proteínas blanco, que incluyen enzimas, receptores, factores de transcripción y elementos contráctiles, pueden ser activadas o inhibidas por el estado de fosforilación de un solo aminoácido. La fosforilación se regula con dos clases de enzimas, las cinasas de proteína (adicionan fosfatos) y las fosfatasas de proteína (remueven fosfatos). Las cinasas/fosfatasas de serina y treonina y las cinasas/fosfatasas de tirosina son las más estudiadas y se ha demostrado que ambas actividades pueden ser inducidas o inhibidas por las EOR (Remacle *et al.*, 1995; Lander, 1997).

La generación de las EOR en la interacción de un ligante con un receptor y la subsecuente estimulación de la transducción de señales, sugieren que las EOR *per se* desempeñan la función de segundos mensajeros (Tabla 3). Por ejemplo, la interacción del factor de necrosis tumoral alfa ($\text{TNF}\alpha$) con su receptor genera EOR y éstas activan los factores $\text{NF}\kappa\text{B}$ y AP-1. También se induce la muerte celular programada o apoptosis que culmina con la muerte de las células tumorales (Ramacle, 1995; Suzuki *et al.*, 1997).

La estimulación de los osteoblastos de ratón (MC3T3-E1) con el factor de crecimiento transformante $\text{TGF-}\beta 1$ también genera H_2O_2 y con ello la respuesta temprana de crecimiento (*erg-1*). (Suzuki *et al.*, 1997).

Las células del músculo liso vascular estimuladas con angiotensina II, un péptido vaso-activador que produce la contracción muscular y el crecimiento celular, generan O_2^- vía la oxidasa del NADPH. El

H₂O₂ generado por la dismutación del O₂⁻ parece actuar como segundo mensajero en la transducción de la señal de hipertrofia celular (Suzuki *et al.*, 1997). Las mismas células, estimuladas con el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), producen H₂O₂ y este participa en la señalización que incluye la inducción de la fosforilación de tirosinas, la estimulación de una MAP cinasa, la síntesis del ADN y la quimiotáxis (Sunderasan *et al.*, 1995).

Tabla 3. Las EOR: segundos mensajeros?

Ligantes	EOR
Factor de necrosis tumoral- α (TNF α)	H ₂ O ₂ /·OH
Interleucina 1 β	O ₂ ⁻ /H ₂ O ₂
Factor de crecimiento transformante- β 1 (TGF- β 1)	H ₂ O ₂
Factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF)	H ₂ O ₂
Insulina	H ₂ O ₂
Angiotensina II	O ₂ ⁻ /H ₂ O ₂
Vitamina D ₃	O ₂ ⁻
Hormona paratiroidea	O ₂ ⁻

Tomada de Suzuki *et al.*, 1997.

El proto-oncogen p21^{Ras} (c-Ras) participa en varios procesos celulares incluyendo la proliferación, la diferenciación y la organización del citoesqueleto. En varios tumores humanos se ha descrito la sobreexpresión de Ras y mutaciones constitutivamente activas. En fibroblastos NIH 3T3, transformados con una isoforma de p21^{Ras} que está permanentemente activa, HRas^{V12}, la producción de EOR se correlaciona con la habilidad de esas células para progresar a través del ciclo celular en ausencia de factores de crecimiento (Irani *et al.*, 1997).

Aún cuando existe información vasta sobre los diversos procesos celulares en los que las EOR intervienen, todavía falta mucho por conocer.

***Neurospora crassa* como modelo de estudio**

Este trabajo está enfocado en analizar la relación que existe entre las EOR y la diferenciación celular. Para ello utilizamos como modelo de estudio el hongo filamentososo *Neurospora crassa*, ya que presenta varias ventajas como: una fácil manipulación, un crecimiento rápido y masivo, el que cada una de las estructuras asexuales se puede aislar y estudiar independientemente, el que se conocen en detalle sus ciclos de vida y su genética.

Además, el genoma ya está secuenciado (www.genome.wi.mit.edu).

Neurospora crassa es un hongo filamentososo Euscomycete, constituido por células alargadas, multinucleadas, cubiertas por paredes celulares quitinosas, llamadas hifas. Éstas, poseen septos incompletos, interrumpidos por poros de aproximadamente 50 micras. Crecen en las puntas y por ramificación. Un conjunto de hifas forma una "madeja" denominada micelio. *N. crassa* se puede diferenciar de otros hongos filamentosos por el color anaranjado que presenta debido al alto contenido de carotenos. Comúnmente se desarrolla en el bagazo y los residuos procesados de la caña de azúcar. También, es un contaminante en las panaderías y un colonizador precoz de los bosques incendiados (Perkins y Davis, 2000).

En la mayor parte de su ciclo de vida, *N. crassa* es haploide. Se reproduce sexualmente formando ascosporas y asexualmente por medio de conidios. Es un hongo heterotálico, es decir, existen dos tipos sexuales determinados genéticamente (*matA* y *mata*) y cada cepa presenta sólo uno de ellos. En una cruce, cualquiera de los dos tipos sexuales puede funcionar como gameto femenino (receptor) o como masculino (donador). Sin embargo, la fertilización sólo se lleva a cabo entre cepas con tipos sexuales diferentes. La disminución de nitrógeno en el medio promueve la formación de protoperitecios (Springer, 1993), que son estructuras femeninas diferenciadas a partir de las cuales

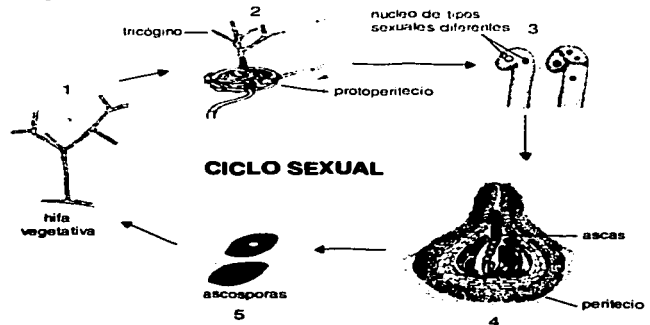


FIG. 5. Ciclo sexual de *N. crassa*. Las hifas en crecimiento vegetativo (1) se diferencian en un protoperitecio a partir del cual emerge el tricógino (2). Este, recibe los gametos masculinos (3) e inicia la formación de los peritecios que portan las ascas (4). Dentro de las ascas se desarrollan ocho ascosporas que son disparadas al exterior a través del orificio superior del peritecio (5).

emerge una hifa especializada llamada tricógino. Ésta se fusiona con los gametos de otra cepa sexualmente compatible. Los núcleos fertilizantes se transportan del tricógino al protoperitecio lo que promueve el desarrollo del peritecio maduro, que es una estructura en forma de pera de 300 micras

de diámetro y que porta cerca de 200 ascas. Al inicio, cada uno de estos sacos o ascas contiene cuatro núcleos provenientes de un evento meiótico. Posteriormente, por mitosis se producen cuatro pares de células o tétradas que se organizan linealmente dentro de las ascas. Estas células, después de crecer y acumular melanina en sus paredes, forman las ascosporas maduras que son disparadas al medio una por una, a través de un orificio apical que contiene el peritecio. Las ascosporas son estructuras muy resistentes, cuando se activan por un choque de calor a 60 °C germinan y forman las hifas que completan el ciclo sexual (Fig. 5).

Se ha reportado que el ciclo de vida asexual se induce por desecación o disminución de la fuente

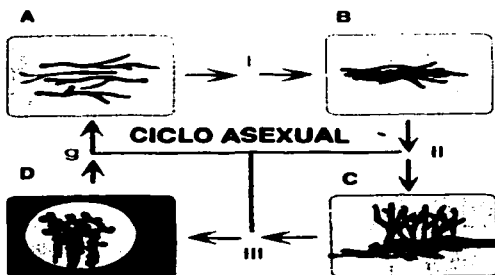


FIG. 6. Ciclo asexual de *N. crassa*. Las hifas vegetativas (A) filtradas y expuestas al aire, se adhieren unas con otras después de 30 min y forman el micelio adherido (B). A las 2 h emerge el micelio aéreo (C) y a las 9h inicia la formación de los conidios (D). Cada transición morfogénica (I, II, III y g) está precedida por un estado hiperoxidante (Hansberg, 1996).

de carbono (Springer, 1993). Sin embargo, se ha observado que la desecación no es necesaria para inducir la conidiación. Es el contacto directo con el aire el que promueve la diferenciación (Toledo *et al.*, 1986).

Durante el ciclo asexual se generan tres estructuras diferentes: el micelio adherido, el aéreo y los conidios (Fig. 6). Durante los primeros 40 minutos de exposición al aire, las hifas del micelio vegetativo (Fig. 7A), que están en contacto directo con el aire, se adhieren unas con otras y forman el micelio adherido. Las hifas de este micelio presentan con el tiempo una mayor septación y vacuolización, además de una

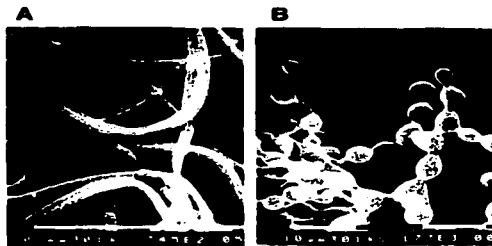


FIG. 7. Micrografía electrónica de las hifas (A) y los conidioforos (B) de *N. crassa*. Fotos de Matt Springer, Stanford University, tomadas del FGSC.

disminución en el número de núcleos (Toledo *et al.*, 1986). A las 2h de exposición al aire, emergen las hifas aéreas del micelio adherido. Éstas crecen y se ramifican en la fase aérea. Después de 8 a 9h de haber expuesto el micelio aéreo al aire, se forman los conidios en las puntas del micelio aéreo por constricción y septación de los conidióforos (Fig. 7B). Los conidios son multinucleados. En un ambiente seco pueden permanecer en vida latente por muchos años. Cuando encuentran las condiciones adecuadas, los conidios germinan y producen hifas nuevamente, con lo que se cierra el ciclo asexual (Fig. 6).

Las EOR y la diferenciación asexual de *Neurospora crassa*.

Durante el ciclo de vida asexual de *N. crassa* se presentan cuatro transiciones morfogénicas. La primera cuando se forma el micelio adherido, la segunda con la formación del micelio aéreo, la tercera cuando inicia la formación de los conidios y la cuarta en la germinación. Al inicio de cada transición morfogénica se ha detectado un estado de tensión oxidativa o hiperoxidante (Tabla. 4, Hansberg *et al.*, 1993; Toledo *et al.*, 1995, Hansberg, 1996 y Lledías *et al.*, 1999).

TABLA 4. Condiciones oxidantes detectadas al inicio de cada transición morfogénica en el ciclo de vida asexual de *N. crassa*.

1. OXIDACIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES (Toledo y Hansberg, 1990, Toledo <i>et al.</i> , 1994)
2. OXIDACIÓN DE ENZIMAS ESPECÍFICAS COMO: a) NADPH-GLUTAMATO DESHIDROGENASA (Aguirre <i>et al.</i> , 1989). b) GLUTAMINO SINTETASA (Aguirre y Hansberg, 1986). c) CATALASA (Lledías <i>et al.</i> , 1998).
3. OXIDACIÓN, DEGRADACIÓN Y POSTERIOR INDUCCIÓN DE LOS CAROTENOS (Hansberg <i>et al.</i> , datos no publicados)
4. PÉRDIDA DEL PODER REDUCTOR CELULAR Y EXCRECIÓN DEL DISULFURO DE GLUTATIÓN (Toledo <i>et al.</i> , 1991, Toledo <i>et al.</i> , 1995).
5. GENERACIÓN DE QUIMIOLUMINISCENCIA DEPENDIENTE DEL O ₂ E INHIBIDA POR ANTIOXIDANTES HIDROSOLUBLES QUE ENTRAN A LA CÉLULA (Hansberg <i>et al.</i> , 1993, Hansberg, 1996).

También, se observa una inducción escalonada de la actividad de catalasa con cada estado diferenciado, de manera que los conidios tienen una actividad de catalasa 60 veces mayor que la del micelio en crecimiento exponencial (Hansberg, 1996; este trabajo).

Con base en los datos anteriores, Hansberg y Aguirre (1990) propusieron que la diferenciación celular de los microorganismos se da como respuesta a la generación de un estado hiperoxidante intracelular. La entrada masiva de oxígeno, la pérdida del poder reductor y la insuficiencia en los sistemas antioxidantes, rompen el equilibrio REDOX e incrementan la concentración intracelular de las EOR. Esto transforma el sistema de un estado estable en crecimiento a uno inestable y transitorio. Las células pueden contender con el estado hiperoxidante y recuperar la estabilidad fisiológica mediante dos mecanismos: por el aumento en la generación de poder reductor (NADPH) y por la activación de la respuesta antioxidante con lo cuál regresan al estado estable original, o bien, por la limitación de la entrada del O₂. En este caso las células alcanzan un estado estable diferente. Durante la diferenciación se pueden formar varias estructuras diferenciadas y el estado diferenciado terminal es aquel que esta más aislado del O₂. La entrada del O₂ a las células diferenciadas, en un medio en el que se puede generar suficiente poder reductor, promueve la germinación y el regreso al estado estable de crecimiento. Si la célula no logra compensar el estado hiperoxidante por alguno de los dos mecanismos anteriores, muere debido al daño que producen las EOR en el ADN, las proteínas y los lípidos.

El aumento dramático en la actividad de catalasa durante la conidiación de *N. crassa* forma parte de la respuesta antioxidante que se presenta en cada transición morfológica. En este hongo se han detectado tres actividades de catalasa (Chary y Natvig, 1989), dos de ellas, la CAT-1 y la CAT-3 son catalasas monofuncionales (Díaz *et al.*, 2001; este trabajo) y la CAT-2 es una catalasa-peroxidasa (Peraza y Hansberg, 2002). La presencia de un gen, que presumiblemente codifica para una catalasa peroxisomal indica la existencia de una cuarta actividad que aún no ha sido caracterizada.

En este trabajo se presenta el estudio detallado de las dos catalasas monofuncionales, CAT-1 y CAT-3, como parte de la respuesta antioxidante durante el ciclo de vida asexual de *Neurospora crassa* y en condiciones de tensión. Así mismo, se describe el efecto de la ausencia de la CAT-3 en la diferenciación asexual del hongo y su papel durante el crecimiento.

OBJETIVOS

- 1) **Estudiar la regulación de las catalasas monofuncionales CAT-1 y CAT-3 como parte de la respuesta antioxidante durante el ciclo de vida asexual de *Neurospora crassa* y en diferentes condiciones de tensión.**
 - a) **Clonar y secuenciar los genes de ambas catalasas**
 - b) **Analizar la inducción de los genes de las dos catalasas en cada una de las estructuras diferenciadas del ciclo asexual, durante cada transición morfogénica y en condiciones de tensión.**
 - c) **Analizar la actividad de catalasa durante el ciclo asexual y en condiciones de tensión.**

- 2) **Definir si la inducción de la CAT-3, considerada parte de la respuesta antioxidante durante el ciclo de vida asexual, esta relacionada con la diferenciación celular del hongo y determinar el papel que desempeña en diferentes condiciones de tensión.**
 - a) **Obtener la mutante de *cat-3***
 - b) **Analizar los efectos de la ausencia de la *cat-3* en el ciclo de vida asexual**
 - c) **Determinar la sensibilidad de la mutante a diferentes condiciones de tensión**
 - d) **Definir si la función de la CAT-3 como enzima antioxidante es redundante o específica.**

RESULTADOS PUBLICADOS

Regulación y oxidación de dos catalasas monofuncionales grandes

Resumen de la publicación: Shaday Michán, Fernando Lledías, James D. Baldwin, Donald O. Natvig, and Wilhelm Hansberg. Regulation y oxidation of two large monofunctional catalases. *Free Radic Biol Med* 33:(4) 521-32.

En este trabajo demostramos que la actividad de catalasa aumenta gradualmente durante la conidiación, los conidios tienen 60 veces más actividad de catalasa que las hifas en crecimiento exponencial (Fig. 1 del artículo). Las secuencias de los dos genes *cat-1* y *cat-3* de *Neurospora crassa*, codifican para las catalasas monofuncionales grandes CAT-1 y CAT-3, respectivamente. La secuencia del extremo amino-terminal de la CAT-3 indica que esta catalasa es procesada y presumiblemente secretada (Fig. 3 y 4 del artículo). Los genes *cat-1* y *cat-3* se regulan de manera diferente durante el ciclo de vida asexual y en diferentes condiciones de tensión (Fig. 5 y 6 del artículo).

La actividad de la CAT-1 fue predominante en los conidios, durante la germinación y en el crecimiento exponencial temprano. También se indujo durante el crecimiento preestacionario y con etanol o choque de calor. La actividad de la CAT-3 predominó durante el crecimiento exponencial tardío y al inicio del proceso de la conidiación. Condiciones de tensión como en presencia de paraquat, H₂O₂, cadmio, ácido úrico, con un choque de calor o el tratamiento con nitrato, también indujeron la CAT-3 (Fig. 2 y 6 del artículo). En general, la presencia de la CAT-1 estuvo asociada con estados celulares de poco crecimiento y la CAT-3 con estados de crecimiento intenso.

El paraquat promovió la modificación y la degradación de la CAT-1. El choque de calor provocó la modificación y la degradación de ambas catalasas, la CAT-1 y la CAT-3. En esta última condición hubo re-síntesis de la CAT-1. Los efectos del paraquat y el choque de calor se observaron solamente en presencia del aire y probablemente esto se relaciona con la generación *in vivo* de oxígeno en singulete. La CAT-3 se modificó con una reacción de fotosensibilización por medio de la cual se produce oxígeno en singulete (Fig. 7 del artículo).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA



REGULATION AND OXIDATION OF TWO LARGE MONOFUNCTIONAL CATALASES

SHADAY MICHÁN,* FERNANDO LLEDÍAS,* JAMES D. BALDWIN,[†] DONALD O. NATVIG,[†] and WILHELM HANSBERG*

*Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F., México; and [†]Department of Biology, University of New Mexico, Albuquerque, NM, USA

(Received 5 March 2002; Revised 26 April 2002; Accepted 2 May 2002)

Abstract—The two *Neurospora crassa* catalase genes *cat-1* and *cat-3* were shown to encode Cat-1 and Cat-3 large monofunctional catalases. *cat-1* and *cat-3* genes are regulated differentially during the asexual life cycle and under stress conditions. A stepwise increase in catalase activity occurs during conidiation. Conidia have 60 times more catalase activity than exponentially growing hyphae. Cat-1 activity was predominant in conidia, during germination and early exponential growth. It was induced during prestationary growth and by ethanol or heat shock. Cat-3 activity was predominant during late exponential growth and at the start of the conidiation process. It was induced under stress conditions, such as H₂O₂, paraquat, cadmium, heat shock, uric acid, and nitrate treatment. In general, Cat-1 activity was associated with nongrowing cells and Cat-3 activity with growing cells. The Cat-3 N-terminus sequence indicates that this catalase is processed and presumably secreted. Paraquat caused modification and degradation of Cat-1. Under heat shock both Cat-1 and Cat-3 were modified and degraded and Cat-1 was resynthesized. Paraquat and heat shock effects were observed only in the presence of air and are probably related to in vivo generation of singlet oxygen. Purified Cat-3 was modified with a photosensitizing reaction in which singlet oxygen is produced. © 2002 Elsevier Science Inc.

Keywords—Catalase, Reactive oxygen species, Singlet oxygen, Stress, Cell differentiation, Conidia, *Neurospora crassa*, Free radicals

INTRODUCTION

The asexual life cycle of the ascomycete *Neurospora crassa* has been used as a model to study cell differentiation [1,2]. When growing hyphae in a liquid medium are filtered and the resulting mycelial mat is exposed to air, a synchronous process of conidiation is started. Hyphae in direct contact with air adhere to each other during the first 40 min. Aerial hyphae begin to grow from the adhered hyphae after 2 h of air exposure. The tips of aerial hyphae start forming conidia after 8–9 h air exposure. A hyperoxidant state is detected at the start of each of these morphogenetic transitions. A hyperoxidant state is defined as an unstable, transient state in which reactive oxygen species surpass the antioxidant capacity of the cell [3,4]. In each transition, massive total protein ox-

idation and degradation is detected [5] and specific enzyme oxidation takes place [6]. Loss of NAD(P)H reducing power, glutathione disulfide excretion, and glutathione oxidation characterizes the conidiation process [7,8]. Oxygen dependent chemiluminescence is detected and antioxidants inhibit chemiluminescence and cell differentiation [9]. Induction of catalase and other antioxidant mechanisms is an expected consequence of a hyperoxidant state [4].

Jacob and Orme-Johnson [10] characterized a catalase activity from *N. crassa*. This catalase is induced by nitrate and was reported to contain a high-spin ferric dihydroporphyrin [10,11]. Chary and Natvig [12] described the presence of three catalases in *N. crassa* that are differentially expressed during the asexual life cycle and in response to different stress conditions. Lledías et al. [13,14] reported that catalases are oxidized in vitro and in vivo by singlet oxygen (¹O₂), giving rise to different catalase activity bands in zymograms. To determine the role of catalases in cell differentiation, it is important to establish the correspondence of genes and

Address correspondence to: Wilhelm Hansberg, M.D., Ph.D., Departamento de Bioquímica, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 70-242, 04510 México City, D. F., México; Tel: +52 (55) 5622 5655; Fax: +52 (55) 5622 5630; E-Mail: whansber@ifisiol.unam.mx.

catalase activities and the conditions under which the different catalase activities are induced and/or oxidized. Here we determined the correspondence of *cat-1* and *cat-3* genes with the two large monofunctional catalases of *N. crassa*, Catalase-1 (Cat-1) and Catalase-3 (Cat-3). A third catalase activity and gene correspond to a catalase-peroxidase called Catalase-2 [15]. A fourth gene predicting a catalase found in the *N. crassa* genome (Whitehead Institute/MIT Center for Genome Research) (www.genome.wi.mit.edu) has not been characterized.

Accumulation of mRNA and regulation of Cat-1 and Cat-3 activities during the asexual life cycle and under stress conditions was determined. Paraquat added to a culture caused modification and disappearance of Cat-1. Under heat shock conditions, both Cat-1 and Cat-3 were modified and probably degraded. However, these effects were only observed in the presence of air. The *in vitro* and *in vivo* electrophoretic mobility shift of catalases was only observed under conditions in which $^1\text{O}_2$ is generated ([13,14] and this report), suggesting that $^1\text{O}_2$ is probably formed under heat shock and paraquat treatment.

MATERIALS AND METHODS

Strains and culture conditions

The 74-ORS23-1A wild type strain obtained from the Fungal Genetics Stock Center (FGSC) was grown in Vogel's minimal medium supplemented with sucrose.

Catalase activity

Catalase (hydrogen peroxide:hydrogen peroxide oxidoreductase) (EC 1.11.1.6) activity was measured by determining the initial rate of dioxygen production with a Clark microelectrode [16]. Reaction was started by injecting catalase, usually 5 μl or less, into a sealed chamber filled with 2 ml of 10 mM of H_2O_2 in 10 mM phosphate buffer (PB), pH 7.8 adjusted by mixing Na_2HPO_4 and KH_2PO_4 solutions. Units (U) are defined as $\mu\text{moles O}_2$ produced per min per mg protein under these conditions. Activity was measured in samples just before loading them on a gel for electrophoresis.

Catalase activity in polyacrylamide gels was determined by incubating the gel after electrophoresis, 5 min in 5% methanol and then, after rinsing three times with tap water, 10 min in 10 mM H_2O_2 . The gel, rinsed with tap water, was incubated in a 1/1 mixture of freshly prepared 2% potassium ferric cyanide and 2% ferric chloride. Blue color developed in the gel except at zones where H_2O_2 was decomposed by catalase [12,17]. Staining was stopped by soaking the gel in a 10% acetic acid and 5% methanol solution.

Gel electrophoresis

One-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) was done according to the Laemmli method but without sodium dodecyl sulfate (SDS); samples had no β -mercaptoethanol and were not boiled. For the two dimensional PAGE, the isoelectrofocusing was done in 5.5% acrylamide gel in capillaries, containing the following ampholites: 0.75% pH 3.5–10, 5%, pH 4.0–6.6, 1.7% pH 5.0–7.0, and 0.8%, pH 2.5–5.0. Samples contained 1% pH 3.5–10 and 5% pH 4–6.5 ampholites and 15% glycerol. H_3PO_4 12 μM was used as anolyte and 20 M NaOH as catholyte and electrophoresis was run in a Mini-Protean II (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) chamber 10 min at 500 V followed by 3.5 h at 750 V. One millimeter thick plate gels were cast with the gels of the first dimension layered on top and were run at 150 V for 2.5 h. After the two-dimensional electrophoresis, gels were fixed and stained for catalase activity. Position in the stained gels was determined with purified Cat-1 and Cat-3.

Catalase induction during the cell cycle and under different stress conditions

Catalase induction during the cell cycle was measured in 10 ml liquid cultures grown from 3×10^5 conidia/ml, incubated at 30°C and 150 rpm. At different times, cultures were recovered by filtration, half of each culture was ground in liquid nitrogen for total RNA isolation, and the other half was treated with acetone and used for determination of catalase activity. Ten milliliter cultures grown from 3×10^5 conidia/ml in 400 ml Vogel's medium, at 30°C, 200 rpm, were filtered and immediately transferred into 10 ml of fresh medium plus one of the following compounds: 10 mM H_2O_2 , 5 mM paraquat, 0.35 M CaCO_3 , 0.66 mM $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2.52 mM CuSO_4 , 0.15 mM CdSO_4 , 1 M NaCl, or 1 M sorbitol. Other cultures were heat shocked at 43°C, incubated without a carbon source, or with 4% ethanol as a sole carbon source, without a nitrogen source, or with 4.76 mM uric acid as a sole nitrogen source. Induction of catalase by NaNO_3 was performed according to Jacob and Orme-Johnson [10]. After each treatment samples were processed as described above.

Conidiation was induced using mycelium grown from 1×10^6 conidia/ml in 400 ml, incubated for 15 and 20 h at 30°C, 200 rpm. Ten or 50 ml of culture were filtered and exposed to the air [1]. Adhered and aerial mycelia were isolated and divided into two parts for RNA isolation and catalase activity determination.

Cloning of cat-1 genomic and cDNA

Based on two fragments of the Cat-1 protein sequence, the degenerated oligonucleotides 5'AAGCA

(AG)AC(CGT)AC(CGT)GC(CT)GA(CT)GA(CT)TGG3' and 5'(AG)TG(ACG)AC(AG)CC(AC)G)AG(CT)TC(ACG)GG(ACG)GTCCA3' were synthesized and used to amplify a 600 bp sequence from genomic DNA. The sequence was cloned into pCRII (Invitrogen, Groningen, Netherlands) yielding pSM7, which was used to hybridize the Orbach/Sachs cosmid library (FGSC). Cosmid D8, E3, E12, F10 Y H7 gave a positive signal and all gave the same digestion pattern with EcoRI, HindIII and KpnI in a Southern blot assay. The H7 cosmid was used for direct sequencing of *cat-1* using the Sanger automatic fluorescent sequencing method (ABI PRISM310 from Perkin.Elmer); sequences were assembled using the GCG software. *cat-1* sequence was deposited in the GeneBank under accession number AY027545.

Cloning of genomic *cat-3*

A chromosomal DNA KpnI fragment (10.4 kDa) from *N. crassa* containing an open reading frame (ORF) that had similarities to catalases was cloned into a pUC19. The *cat-3* gene was identified using a portion of the *cat-R* gene of *Aspergillus niger* [18] in heterologous hybridization experiments employing a *N. crassa* cosmid library [19] (FGSC). A cosmid (G11H8) carrying the *cat-3* gene was mapped to the right arm of linkage group III by restriction polymorphism map analysis [20]. This position is consistent with the location of the gene previously designated *cat-1* [12].

The *cat-3* cDNA was cloned by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) with 3' RACE System for Rapid Amplification of cDNA ends (GIBCO-BRL, Rockville, MD, USA) according to the manufacturer's instructions. Primer 5'-CCCCATATGCGTGTCAACGCTCTT-3' containing the ATG of *cat-3* and a NdeI restriction site was used to amplify a 2.3 kb product using total RNA and the Elongase enzyme mix from GIBCO. This sequence was amplified and cloned into the EcoRV site of pBKS to yield pSM1.

The genomic and cDNA of *cat-3* were sequenced by the Sanger method and assembled using the GCG software. *cat-3* sequence was deposited in the GeneBank under accession number AY027544.

Isolation of nucleic acids and hybridization analyses

Total RNA was isolated with TRIZOL (GIBCO-BRL) according to manufacturer's instructions. Ten micrograms of RNA was loaded on a 0.7% agarose gel containing formaldehyde and run at 60 V. Nucleic acids were transfer to Hybond-XL membranes (Amersham, Buckinghamshire, UK) with a Vacuum Blotter (BIORAD) according to manufacturer's instructions and fixed

with UV light. Hybridization analysis was carried out with a 2.3 kb SpeI *cat-3* cDNA fragment from pSM1 and a 600 bp EcoRI *cat-1* fragment from pSM7. Probes were labeled with the Random Primed DNA Labeling Kit (Boehringer, Mannheim, Germany).

In vivo and in vitro modification of catalases

Fifty milliliters from liquid culture grown for 15 h from 10^6 conidia/ml were transferred to fresh medium containing 5 mM paraquat or subjected to a heat shock of 48°C [12]. Some cultures were aerated by agitation at 300 rpm, others were put in closed Falcon tubes filled to avoid any air chamber.

Purified Cat-3 was modified by a photosensitization reaction [13]. Cat-3 (50 U/10 μ l) in 10 mM PB containing 10 mM uric acid was illuminated with a fluorescent light source (0.4 W/cm²) in the presence of 1.37 mM riboflavin. Histidine (30 mM) and 5-aminosalicylic acid (5 mM) were used as quenchers of singlet oxygen.

Catalases were separated by PAGE, loading 50 U of catalase activity in each lane, and analyzed by zymogram.

RESULTS

Increased catalase activities during conidiation

Catalase activity increased during the stationary growth phase. Activity was higher in adhered hyphae than in growing mycelia and even higher in aerial hyphae. Conidia had 60 times more catalase activity than growing mycelium (Fig. 1A). Cell extracts of the different cell structures analyzed by PAGE under nondenaturing conditions gave different bands of catalase activity in the gel (Fig. 1B). The band of lower mobility corresponds to Cat-1 that is accumulated in conidia. Cat-1 is oxidized by singlet oxygen giving rise to more active enzyme conformers [13]. Some of these bands, Cat-1c and Cat-1e, are observed in the adhered hyphae, aerial hyphae, and conidia (Fig. 1B). In the zymograms, the partially oxidized Cat-1c co-migrated with Cat-3 activity. A third catalase activity, Cat-2, exhibited a higher electrophoretic mobility than Cat-1 and Cat-3 and appeared in aerial hyphae and in conidia (Fig. 1B). Cat-2 is a typical catalase-peroxidase similar in sequence and biochemistry to the bacterial enzymes [15].

Cat-1 and Cat-3 are regulated differentially during the asexual life cycle

To determine which catalase activities are present throughout the asexual life cycle, cell extracts from the different cell structures were analyzed by zymograms

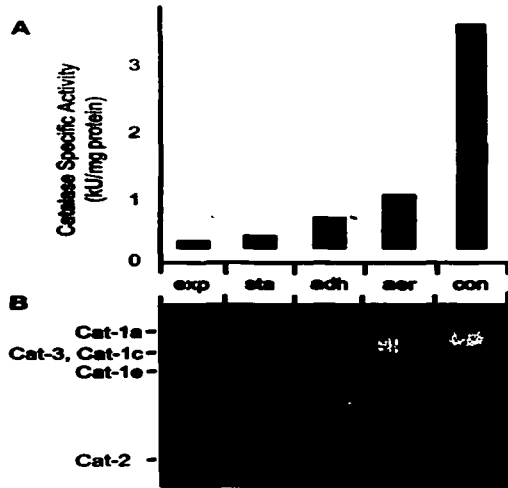


Fig. 1. Catalase activity during the conidiation process. (A) Catalase specific activity in exponentially growing hyphae (Exp), mycelium in stationary growth (Sta), adhered hyphae (Adh), aerial hyphae (Aer), and conidia (Con). (B) Catalase zymogram of a gel after PAGE of 50 μ g protein/lane using extracts from cells indicated in (A).

using two-dimensional PAGE. Cat-1 was the main catalase activity in conidia, during germination of conidia, and initial growth (Fig. 2). The low amount of Cat-3 activity in conidia disappeared during germination and reappeared after several hours of filamentous growth. At the end of the exponential growth phase, Cat-3 was the predominant catalase activity; Cat-1 was a minor component (Fig. 2). Cat-3 activity increased with adhesion of the mycelium. Adhesion marks the start of the conidiation process and aerial hyphae grow from the adhered mycelium [1]. Both enzymes coexisted in aerial hyphae. Concurrent to conidia formation, Cat-1 activity increased and accumulated in conidia (Fig. 2) [4].

Cloning of *cat-1* and sequence comparison with other catalases

Based on the amino acid sequence of two Cat-1 peptides, degenerate oligonucleotides were designed and used for PCR reactions. A 600 bp genomic DNA fragment was then used to obtain the entire *cat-1* gene from a cosmid

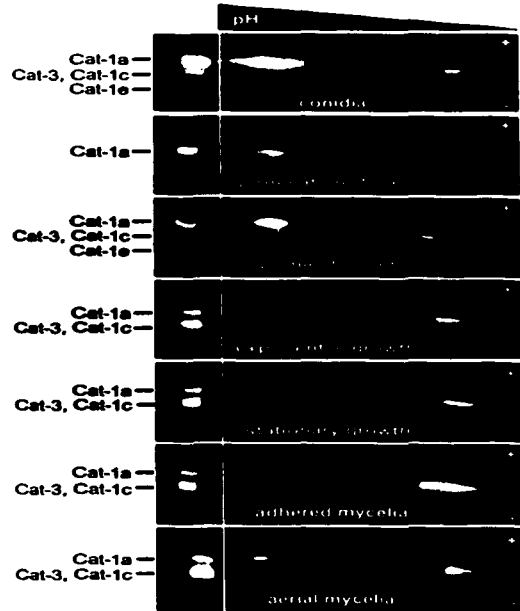


Fig. 2. Cat-1 and Cat-3 during the asexual cell cycle. Catalase zymogram of gels after one (first gel) or two-dimensional PAGE (second gel) of 50 μ g protein from cell extracts from conidia, germinating conidia, mycelium after 12 h exponential growth, in the stationary growth phase, adhered mycelium and aerial mycelium. Cat-1 in the two-dimensional PAGE zymograms is aligned to see the Cat-3 mobility shift which is appreciated to the right of the dashed line. Modified Cat-3 in conidia disappears after 10 min germination. Oxidized Cat-1 conformers are observed in conidia and after 6 h germination.

library. A long ORF predicts a large catalase that corresponds to the Cat-1 activity (see below). *cat-1* is in contig 2.552 (Whitehead Institute/MIT Center for Genome Research) (www.genome.wi.mit.edu); the nearest marker is *con-6* (contig 2.549) of chromosome II. Amino acids for heme binding and for activity are conserved in the catalases shown in Fig. 3. Cat-1 amino acid sequence is 76% identical to *Podospora anserina* CatA (AJ011298), 64% to *Aspergillus fumigatus* CatA (U87630) [21], and 60% to *Aspergillus nidulans* CatA (U37803) [22]. Two in frame ATG codons could generate a Cat-1 of 765 or 736 amino acids and 85.511 or 82.263 Da.

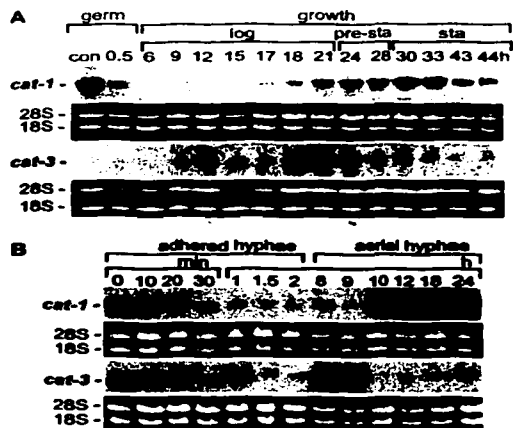


Fig. 5. *cat-1* and *cat-3* mRNA accumulation during the asexual life cycle. (A) Northern analysis using *cat-1* and *cat-3* cDNA as probes and total RNA from conidia (con), and mycelia during germination (germ); logarithmic growth (log), prestationary growth phase (pre-sta) and stationary growth phase (sta). (B) Northern analysis using *cat-1* and *cat-3* cDNA as probes and total RNA from adhered mycelium and aerial mycelium at different times. rRNA is shown as a loading control.

amino acids from an endolysin-C digestion peptide confirmed the correspondence between Cat-3 and the predicted sequence from *cat-3* (Fig. 4). Because the five catalases shown in Fig. 4 contain a putative signal peptide for secretion, our results suggest that Cat-3 is processed at the amino terminus for secretion.

Regulation of *cat-1* and *cat-3* during the *N. crassa* life cycle

Only *cat-1* mRNA was accumulated in conidia, but disappeared at the start of germination (Fig. 5A). However, *cat-3* mRNA is observed in germinating conidia when subjected to stress conditions such as intense light, a source of singlet oxygen, or when carotenes are absent [14] (see below). *cat-3* mRNA appeared in growing mycelia (9 h), accumulated in the late exponential growth phase (18–24 h) and decreased in the stationary growth phase (Fig. 5A). *cat-1* mRNA progressively accumulated during the prestationary and early stationary growth phase (18–33 h) and decreased thereafter (Fig. 5A). *cat-3* and *cat-1* mRNA were present during adhesion of hyphae (Fig. 5B), and both diminished after 1 h.

In aerial hyphae *cat-3* mRNA was detected at the start of conidiation (8–9 h) and decreased afterwards, and *cat-1* increased when conidia are formed and thereafter (10–18 h) (Fig. 5B).

Regulation of *cat-1* and *cat-3* under stress conditions

Growing mycelium was subjected to different stress conditions and, after 3 or 6 h under stress, total catalase activity and zymograms, and *cat-1* and *cat-3* mRNA levels were determined. There was a substantial increase in total catalase activity with paraquat and heat shock, and a moderate increase with uric acid and transition metal ions. Other stress conditions produced no or only slight changes in total catalase activity (Fig. 6). Increased Cat-1 activity and accumulation of *cat-1* was observed with high salt and with ethanol as sole carbon source (Fig. 6, lanes 9 and 13). Under the other stress conditions, *cat-1* mRNA decreased or disappeared.

Cat-3 activity and *cat-3* mRNA accumulation increased with H₂O₂, paraquat, cadmium, heat shock, uric acid, and nitrate. The induction of Cat-3 and *cat-3* mRNA by paraquat was higher than with H₂O₂ (Fig. 6, lanes 3 and 4). A high concentration of CaCO₃ in the growth medium increases catalase activity due to H₂O₂ production by induced glucose oxidase activity [26]. Under such condition accumulation of *cat-3* mRNA also increased (Fig. 6, lane 5). Transition metal ions, such as Cu(II), Fe(II) and Cd(II), increased Cat-3 activity, but after 6 h *cat-3* mRNA accumulation was only observed with cadmium (Fig. 6, lanes 6–8). High salt did not affect Cat-3 activity and sorbitol decreased it. Heat shock increased Cat-3 activity and accumulation of its mRNA (Fig. 6, lane 11). Other stress conditions assayed included carbon starvation, growth with ethanol as a sole carbon source, nitrogen starvation, and growth with uric acid as a sole nitrogen source. Only in the last condition was increased Cat-3 activity and *cat-3* mRNA accumulation observed (Fig. 6, lane 15). In comparison to ammonium, nitrate as nitrogen source increased Cat-3 activity and *cat-3* mRNA accumulation (Fig. 6, lanes 16 and 17).

Cat-1 and *Cat-3* are modified during the asexual life cycle and under stress conditions

Cat-1 is modified in vitro and in vivo conditions when singlet oxygen is formed [13,14]. During the asexual cell cycle, mobility changes of Cat-1 and Cat-3 were observed (Fig. 2). For Cat-1 this was particularly evident in conidia and after 6 h germination; Cat-3 modification was always observed but not when it is synthesized after 6 h germination. A mixture of unmodified and modified Cat-3 was observed in the adhered hyphae (Fig. 2).

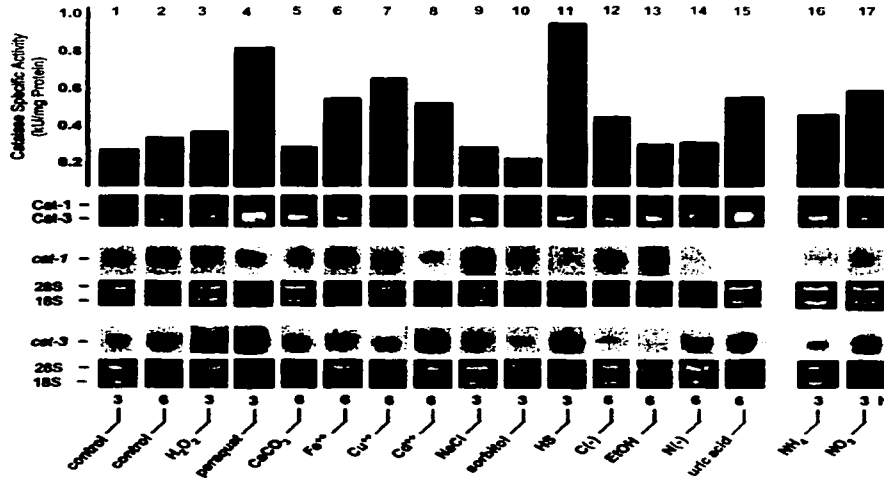


Fig. 6. Cat-1 and Cat-3 in mycelia under different stress conditions. Grown mycelium was transferred into fresh medium and subjected to stress conditions for 3 or 6 h. Half of each culture was used for catalase activity determination and the other half for RNA extraction and northern analysis. Bars indicate catalase specific activity, below bars there are zymograms and northern blots using either *cat-1* or *cat-3* cDNA as probes and rRNA as loading control. Lanes 1 and 2, without stress for 3 or 6 h; stress conditions for 3 or 6 h, indicated in each lane, were: 10 mM H₂O₂; 5 mM paraquat; 0.35 M CaCO₃; 0.66 mM FeSO₄·7H₂O; 2.52 mM CdSO₄; 0.15 mM CdSO₄; 1 M NaCl; 1 M sorbitol; HS = heat shock at 43°C; C(-) = without a carbon source; EtOH = 4% ethanol as a sole carbon source; N(-) = without nitrogen source; uric acid = 4.76 mM uric acid as a sole nitrogen source; NH₄ = grown in NH₄Cl as nitrogen source; NO₃ = grown in Na₂NO₃ as nitrogen source.

Stress conditions in which Cat-3 was induced were tested for modification of Cat-1 and Cat-3. Paraquat is a redox cycling compound that requires the presence of O₂. Thus, paraquat was added to a culture in the presence or absence of air. In the course of 6 h in air, Cat-1 activity disappeared, and there was a marked increase in Cat-3 plus Cat-1c activity. This latter change was not observed in the absence of air (Figs. 7A and 7B). Catalase activities from heat shocked cultures in the presence or absence of air were analyzed by PAGE and zymograms of the gels. Catalase activity increased during the first 3 h of heat shock. During this period, most of Cat-1 and Cat-3 underwent a shift in electrophoretic mobility. These effects were only observed in the presence of air (Figs. 7C and CD, lane 5). Cat-1 reappeared after 6 h of heat shock and a prominent smear indicated the generation of modified catalase conformers (Fig. 7C, lane 6). No changes were apparent in the zymograms in the absence of air. These results suggest that under heat

shock induction, modification, and turnover of catalases depend on the presence of O₂.

Because catalase oxidation (Cat-1 and Cat-2) has been only observed under conditions in which singlet oxygen is produced [13,14], purified Cat-3 was subjected to a photosensitization reaction that produces singlet oxygen. After 3 h in the presence of riboflavin and light, the electrophoretic mobility of Cat-3 increased (Fig. 7E) similarly to other catalases. The presence of singlet oxygen quenchers such as histidine and 5-amino-salicylic acid prevented this change.

DISCUSSION

Two catalase genes *cat-1* and *cat-3* were cloned and the corresponding enzymes Cat-1 and Cat-3 identified. Regulation of these enzyme activities during the asexual life cycle of *N. crassa* and under stress conditions was

Regulation and oxidation of catalases

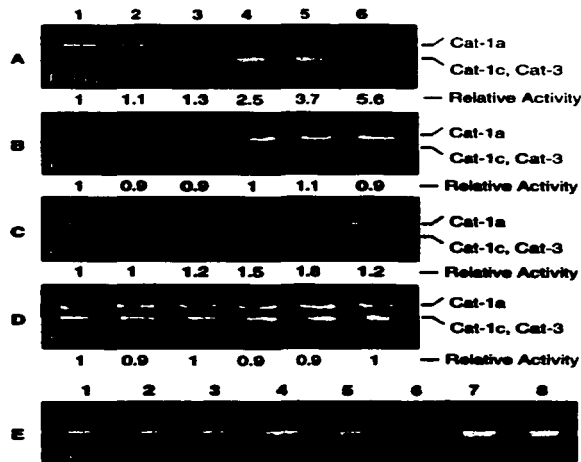


Fig. 7. Oxidation of Cat-1 and Cat-3. (A-D) zymograms of gels after PAGE of protein extracts from growing mycelium. (A) Treated with paraquat in the presence of air; (B) with paraquat in the absence of air; (C) heat shock (48°C) in the presence of air; (D) heat shock (48°C) in the absence of air; lanes 1-6 indicate 0, 0.5, 1, 2, 3, and 6 h incubation; below each zymogram total catalase activity relative to initial activity is indicated; (E) purified Cat-3 oxidized by a photosensitizing reaction. Lane 1 without treatment; lane 2 illuminated for 3 h in the absence of riboflavin; lanes 3-6, illuminated in the presence of riboflavin for 0.5, 1, 2, or 3 h; lane 7, illuminated for 3 h in the presence of riboflavin and 30 mM histidine; lane 8, illuminated for 3 h in the presence of riboflavin and 5 mM 5-aminosalicylic acid. A dashed line is included to better appreciate the mobility changes of Cat-1 and Cat-3.

determined. Both catalases were oxidized *in vivo* probably by the reaction of $^1\text{O}_2$ with the porphyrin.

Catalase genes and activities

The two genes reported encode large catalases (≥ 80 kDa monomer). Like *N. crassa*, *A. fumigatus*, *A. nidulans*, and *P. anserina*, also have two large catalases ([21,22,24,25], AJ011298; AJ011309). These enzymes belong to a family of catalases from bacteria and fungi that have a flavodoxin-like domain at their C-terminal [27]. In contrast to small catalases (≈ 60 kDa monomer), the presence of this domain impairs binding of NADPH in large catalases [28,29]. At the protein level overall sequence identity between Cat-1 and Cat-3 is 36%, with only 29% sequence identity in the C-terminal domains. If the C-terminal is not considered, sequence identity rises to 44%. Despite this relative low similarity, the three-dimensional structure of the C-terminal domain from both enzymes is very similar among them and similar to the corresponding HPII from *Escherichia coli* ([30], Diaz

et al., in preparation). The function of this domain remains to be determined.

In contrast to small catalases, Cat-1 and Cat-3 are thermo- and photo-resistant and withstand denaturation by extreme pH and high concentrations of denaturants [31]. Both enzymes have a chlorin instead of ferroprothemo IX [11,13], both endure molar concentrations of H_2O_2 and have a lower sensitivity to azide inactivation ([31], Diaz et al., unpublished).

The sequence of the Cat-3 N-terminus and of the processed enzyme indicates that this catalase is probably secreted. Catalases homologous to Cat-3 have a similar signal peptide that is processed for secretion [3,21]. In fact, catalase activity was detected in the growth medium, which could correspond to Cat-3.

cat-1 has two in frame translation initiating codons. Alignment with the Cat-1 homologues (Fig. 3) and test code prediction favors the second initiation site. Besides, only this site is in the right context (CCCACCAUG). Thus, translation from the first site is unlikely. If translated from the second site, Cat-1 would still have a long

and loose N-terminus, similar to the homologous *E. coli* HPII. No defined electron density for the first 26 amino acids was found in the HPII crystallographic structure [30]. This was also observed in the Cat-1 structure (Díaz et al., in preparation). The N-terminus of the Cat-1 does not have a recognizable signal peptide, however, the enzyme was found to be associated mainly to the cell wall of conidia [32].

Because both enzymes are at least partially extracellular, their resistance could be related to the harsh conditions of the environments where fungi germinate and grow. In contrast, small catalases in animal cells only require acid resistance for their peroxisomal localization.

Catalase regulation during the asexual life cycle and under stress conditions

Cat-1 and Cat-3 are present throughout the asexual life cycle of *N. crassa* but are expressed differentially. Due to its accumulation in conidia, Cat-1 accounts for most of the activity during germination and initiation of growth. The homologous catalase of Cat-1 in *A. nidulans*, CAtA, is specifically accumulated in spores and conidia from a CAtA mutant strain are sensitive to hydrogen peroxide [22]. This indicates the importance of catalase for germination in substrates, such as plant material, that can generate considerable amounts of hydrogen peroxide through NADPH oxidase [33].

Cat-1 was the main activity during the early exponential growth phase in nutrient liquid medium under non-stressed conditions. On the other hand, during the late exponential growth phase, Cat-3 was the predominant activity and *cat-3* mRNA accumulated. However, a low level of Cat-1 activity was always present during growth. In the prestationary growth phase when growth is restricted by increasing limitation of nutrients, the Cat-1 and *cat-1* mRNA increased.

There was a stepwise increase in catalase activity from the growing mycelium to the quiescent conidium. A hyperoxidant state is generated at the start of each morphogenetic transition of the conidiation process [3,4]. Thus, an increase in catalase activity with the appearance of each differentiated cell structure is an expected consequence of a recurrent hyperoxidant state during the conidiation process. In aerial hyphae, *cat-3* mRNA increased transiently at the start of conidiation. The largest increase in catalase activity occurs after formation of conidia when *cat-1* mRNA is accumulated and Cat-1 builds up to constitute 0.6% of total conidial protein [31].

At the start of germination a hyperoxidant state is developed; this leads to total protein oxidation. The apparent Cat-1 turnover increases in conidia subjected to stress conditions that can generate singlet oxygen [14]. When these results were published only one gene had

been detected (Baldwin, J. L., and D. O. Natvig, Abstr. 18th Fungal Genetics Conf., abstr. 15, p. 31, 1995) and it was suggested that under those stress conditions it was *cat-1* mRNA the one accumulated [14]. With the identification of the two genes encoding Cat-1 and Cat-3 (this report), we now know that the mRNA accumulated in conidia under stress corresponds to Cat-3, and not Cat-1.

Cat-3 activity and *cat-3* mRNA increased in mycelia subjected to stress conditions, such as H₂O₂, paraquat, cadmium, heat shock, uric acid, and nitrate treatment. *cat-1* mRNA accumulated only in a nutrient depleted medium or with an inadequate carbon source for *N. crassa* such as ethanol. Thus, both genes are differentially regulated during the asexual life-cycle and in response to stress conditions. Cat-3 activity probably increases when cells respond to stress conditions that can be rapidly compensated and growth is resumed. Cat-1 activity augments when cells have to respond to severe stress that impairs growth and a resistant cell structure for survival has to be made, such as arthrospores or conidia. Cat-3 associated to growing and Cat-1 to nongrowing conditions can be observed in the transition from exponential growth to the prestationary and early stationary growth phase, and in the transition from growing aerial hyphae to nongrowing conidiated aerial mycelium. In general, catalase activity in *N. crassa* is regulated at the level of mRNA concentration, in contrast to the *A. nidulans* CAtA that is regulated at the level of translation [34]. However, catalase regulation also operates at the level of enzyme degradation (see below). Because both catalases are apparently very similar, it would be interesting to know if there are particular aspects that makes one more suitable for growing and the other for nongrowing cells. Alternatively, this regulation could only be a reflection of gene expression of a similar enzyme under different conditions. Because Cat-1 is present at a low level in a growing liquid culture, it would be interesting to determine if Cat-1 is localized to the nongrowing parts and Cat-3 to the growing tips of hyphae.

Oxidation of catalases by ¹O₂

Cat-1 and all catalases so far tested are oxidized in vitro [13] and in vivo [14] under conditions in which singlet oxygen is generated. Modification was traced to the heme ([13], Díaz et al., in preparation). During the asexual life, mobility changes of Cat-1 and Cat-3 were observed (Fig. 2). Further evidence that Cat-1 and Cat-3 are oxidized in vivo are presented in Fig. 7. Cat-1 was modified when growing mycelium is subjected to heat shock or paraquat. Paraquat treatment caused Cat-1 to disappear in the course of 6 h and heat shock for more

than 2 h produced a smear of Cat-1 activity. Rapid electrophoretic mobility shift of catalase occurs when singlet oxygen is produced; Cat-1 proteolysis was excluded and other reactive oxygen species do not modify the electrophoretic mobility of catalases [13,14]. Thus, changes observed in Figs. 7A and 7C probably indicate oxidation of Cat-1 and Cat-3 by singlet oxygen.

With paraquat Cat-1 is oxidized and degraded, and Cat-3 is synthesized. Under heat shock both Cat-1 and Cat-3 are oxidized and degraded and Cat-1 is resynthesized. Total activity increased during the first 3 h and decreased thereafter, suggesting simultaneous synthesis and degradation. Cat-1 and Cat-3 activity is hardly affected upon modification by singlet oxygen (Fig. 7E) (Díaz et al., in preparation). In the absence of O₂, no changes were observed with paraquat or heat treatment, indicating O₂ involvement in Cat-1 and Cat-3 modification. These experiments and previous data suggest intracellular singlet oxygen formation [13,14]. Under photosensitization conditions that can form singlet oxygen, purified Cat-3 was modified giving rise to a more acidic enzyme conformer. The shift in electrophoretic mobility observed in Cat-3 is smaller than in Cat-1. The reason for this difference is not known. The results in Fig. 7 also suggest that modified Cat-3, like oxidized Cat-1, turns over more rapidly than the nonmodified enzymes. The half-life of the different enzyme conformers is currently being investigated.

Acknowledgements — This research was supported in part by grant number IN214199 from DGAPA, Universidad Nacional Autónoma de México, and grant 33148-N from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, México to W.H. and grant DMB-902177 from the National Science Foundation to D.O.N. We are grateful to Dr. Dan Ebbole, Texas A&M University, for resources and advice for cloning and sequencing *cat-1* gene, Dr. Jesús Aguirre and Dra. Rosa E. Navarro for assistance in cloning *cat-3* cDNA, Adelaida Díaz for purified Cat-1 and Adelaida Díaz and Cristina Martínez for purified Cat-3. We also thank Dr. Jesús Aguirre and Dr. Armando Gómez-Puyou for critically reading the paper. The amino acid sequence analysis was made by Jacques d'Alecyer at the Pasteur Institute; oligonucleotide synthesis and DNA sequence was made at Unidad de Biología Molecular, Instituto de Fisiología Celular, UNAM.

REFERENCES

- Toledo, I., Aguirre, J., Hansberg, W. Aerial growth in *Neurospora crassa*: characterization of an experimental model-system. *Exp. Mycol.* **10**:114-125; 1986.
- Springer, M. L., Yanofsky, C. A morphological and genetic analysis of conidiophore development in *Neurospora crassa*. *Genes Dev.* **3**:559-571; 1989.
- Hansberg, W.; Aguirre, J. Hyperoxidant states cause microbial cell differentiation by cell insulation from dioxygen. *J. Theor. Biol.* **142**:201-221; 1990.
- Hansberg, W. A hyperoxidant state at the start of each developmental stage during *Neurospora crassa* conidiation. *Ciencia e Cultura* **48**:68-74; 1996.
- Toledo, I., Hansberg, W. Protein oxidation related to morphogenesis in *Neurospora crassa*. *Exp. Mycol.* **14**:184-189; 1990.
- Toledo, I.; Aguirre, J.; Hansberg, W. Enzyme inactivation related to a hyperoxidant state during conidiation of *Neurospora crassa*. *Microbiology* **140**:2391-2397; 1994.
- Toledo, I.; Noronha-Dutra, A. A.; Hansberg, W. Loss of NAD(P)-reducing power and glutathione disulfide excretion at the start of induction of aerial growth in *Neurospora crassa*. *J. Bacteriol.* **173**:3243-3249; 1991.
- Toledo, I.; Rangel, P.; Hansberg, W. Redox imbalance at the start of each morphogenetic step of *Neurospora crassa* conidiation. *Arch. Biochem. Biophys.* **319**:519-524; 1995.
- Hansberg, W.; de Groot, H.; Sies, H. Reactive oxygen species associated with cell differentiation in *Neurospora crassa*. *Free Radic. Biol. Med.* **14**:287-293; 1993.
- Jacob, G. S.; Orme-Johnson, W. H. Catalase of *Neurospora crassa*. 1. Induction, purification, and physical properties. *Biochemistry* **18**:2967-2975; 1979.
- Jacob, G. S.; Orme-Johnson, W. H. Catalase of *Neurospora crassa*. 2. Electron paramagnetic resonance and chemical properties of the prosthetic group. *Biochemistry* **18**:2975-2980; 1979.
- Chary, P.; Natvig, D. O. Evidence for three differentially regulated catalase genes in *Neurospora crassa*: effects of oxidative stress, heat shock, and development. *J. Bacteriol.* **171**:2646-2652; 1989.
- Llodias, F.; Rangel, P.; Hansberg, W. Oxidation of catalase by singlet oxygen. *J. Biol. Chem.* **273**:10630-10637; 1998.
- Llodias, F.; Rangel, P.; Hansberg, W. Singlet oxygen is part of a hyperoxidant state generated during spore germination. *Free Radic. Biol. Med.* **26**:1396-1404; 1999.
- Peraza, L.; Hansberg, W. *Neurospora crassa* catalases, singlet oxygen and cell differentiation. *Biol. Chem.* **303**:569-575; 2002.
- Rörth, M.; Jensen, P. K. Determination of catalase activity by means of the Clark oxygen electrode. *Biochim. Biophys. Acta* **139**:171-173; 1967.
- Harris, H.; Hopkinson, D. A. *Handbook of enzyme electrophoresis in human genetics*. Amsterdam: North-Holland Publishing Co.; 1987.
- Fowler, T.; Rey, M. W.; Váňa-Váňa, P.; Power, S. D.; Berka, R. M. The *catR* gene encoding a catalase from *Aspergillus niger*: primary structure and elevated expression through increased gene copy number and use of a strong promoter. *Mol. Microbiol.* **9**:989-998; 1993.
- Vollmer, S. J.; Yanofsky, C. Efficient cloning of genes of *Neurospora crassa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**:4869-4873; 1986.
- Metzenberg, R. L.; Grotelueschen, J. Restriction polymorphism maps of *Neurospora crassa*: update. *Fungal Genet. News* **39**:50-58; 1992.
- Calera, J. A.; Paris, S.; Monod, M.; Hamilton, A. J.; Debeaupuis, J. P.; Diaquin, M.; López-Medrano, R.; Leal, F.; Latge, J. P. Cloning and disruption of the antigenic catalase gene of *Aspergillus fumigatus*. *Infect. Immun.* **65**:4718-4724; 1997.
- Navarro, R. E.; Stringer, M. A.; Hansberg, W.; Timberlake, W. E.; Aguirre, J. *catA*, a new *Aspergillus nidulans* gene encoding a developmentally regulated catalase. *Curr. Genet.* **29**:352-359; 1996.
- Garre, V.; Müller, U.; Tudzynski, P. Cloning, characterization, and targeted disruption of *epcat1*, coding for an in planta secreted catalase of *Claviceps purpurea*. *Mol. Plant Microbe Interact.* **11**:772-783; 1998.
- Kawasaki, L.; Wyssong, D.; Diamond, R.; Aguirre, J. Two divergent catalase genes are differentially regulated during *Aspergillus nidulans* development and oxidative stress. *J. Bacteriol.* **179**:3284-3292; 1997.
- Takasaka, T.; Sayers, N. M.; Anderson, M. J.; Benbow, E. W.; Denning, D. W. *Aspergillus fumigatus* catalases: cloning of an *Aspergillus nidulans* catalase B homologue and evidence for at least three catalases. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **23**:125-133; 1990.
- Liu, J. Z.; Huang, Y. Y.; Liu, L. P.; Ji, L. N. Effects of metal ions on simultaneous production of glutic oxalide and catalase by *Aspergillus niger*. *Letts. Appl. Microbiol.* **32**:16-19; 2001.

- [27] Klotz, M. G.; Klassen, G. R.; Loewen, P. C. Phylogenetic relationships among prokaryotic and eukaryotic catalases. *Mol. Biol. Evol.* **14**:951-958; 1997.
- [28] Jouve, H. M.; Beaumont, F.; Léger, I.; Foray, J.; Pelmont, J. Tightly bound NADPH in *Proteus mirabilis* catalase. *Biochem. Cell Biol.* **67**:271-277; 1989.
- [29] Kirkman, H. N.; Gaetani, G. F. Catalase: a tetrameric enzyme with four tightly bound molecules of NADPH. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**:4343-4347; 1984.
- [30] Bravo, J.; Fita, I.; Gouet, P.; Jouve, H. M.; Melik-Adamsyan, W.; Murshudov, G. N. Structure of catalases. In: Scandalios, J.G., ed. *Oxidative stress and the molecular biology of antioxidant defenses*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1997:407-445.
- [31] Diaz, A.; Rangel, P.; Montes de Oca, Y.; Leddas, F.; Hansberg, W. Molecular and kinetic study of catalase-1, a durable large catalase of *Neurospora crassa*. *Free Radic. Biol. Med.* **31**:1323-1333; 2001.
- [32] Montes de Oca, Y. Detección intracelular de catalasas durante el ciclo de crecimiento y conidiación de *Neurospora crassa*. Bachelor thesis, School of Veterinary Medicine, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City; 1999.
- [33] Levine, A.; Tenhaken, R.; Dixon, R.; Lamb, C. H₂O₂ from oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. *Cell* **79**:583-593; 1994.
- [34] Navarro, R. E.; Aguirre, J. Posttranscriptional control mediates cell type-specific localization of catalase A during *Aspergillus nidulans* development. *J. Bacteriol.* **180**:5733-5738; 1998.

El desarrollo asexual de *Neurospora crassa* se incrementa en las cepas mutantes que no tienen CAT-3

Resumen de la publicación: Shaday Michán, Fernando Lledías y Wilhelm Hansberg. Asexual development is increased in catalase-3 null mutant strain (sometido para su publicación a *Eukaryotic Cell*).

Utilizamos el desarrollo asexual de *Neurospora crassa* como sistema modelo para determinar las causas de la diferenciación celular. La exposición de una masa de micelio al aire induce la adhesión de las hifas y a partir de éstas crece el micelio aéreo en donde finalmente se forman los conidios. Los resultados previos muestran que un estado hiperoxidante se genera al inicio de cada transición morfogénica y que la actividad de catalasa aumenta durante la conidiación. La catalasa-3 (CAT-3) se induce durante el crecimiento exponencial y en diferentes condiciones de tensión. En este trabajo analizamos el efecto en el crecimiento y el desarrollo asexual que presentan las mutantes que no tienen CAT-3.

La ausencia de CAT-3 no se compensó con otras catalasas, aun en condiciones de tensión oxidativa, y las colonias de las cepas mutantes fueron sensibles al H₂O₂. En contraste con la cepa Wt en la que se observó que una fracción de catalasa se secreta, en las mutantes *cat-3* no se detectó actividad extracelular de la enzima. Las colonias de las cepas mutantes que se hicieron crecer en la oscuridad tuvieron niveles elevados de carotenos como consecuencia de la tensión oxidativa. El incremento en la aeración de cultivos líquidos promovió una mayor adhesión de las hifas y la oxidación de las proteínas.

Comparada con la Wt, la mutante *cat-3* produjo seis veces más micelio aéreo y conidios sobre las masas de micelio expuestas al aire, que es el resultado de la formación de un mayor número de hifas aéreas. También las colonias de las cepas mutantes mostraron más micelio aéreo y conidios y la oxidación de proteínas en estas colonias fue tres veces mayor. En cultivos estacionarios las hifas aéreas de las cepas mutantes emergieron mucho y en mayor cantidad que en la cepa silvestre.

Estos resultados indican que la tensión oxidativa, debido a la ausencia de la CAT-3, induce la síntesis de carotenos, la adhesión de las hifas y el desarrollo de más micelio aéreo y conidios.

**PAGINACIÓN
DISCONTINUA**

**FALTA
LAS PAGINAS**

42

A

72

**PAGINACIÓN
DISCONTINUA**

Research article

**Asexual development is increased in *Neurospora crassa*
catalase-3 null mutant strains**

**SHADAY MICHÁN, FERNANDO LLEDÍAS¹, AND
WILHELM HANSBERG***

*Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México,
México, D.F., México*

Running title: oxidative stress and cell differentiation

**Key words: oxidative stress, protein oxidation, carotenes, antioxidant, development,
conidiation, aerial hyphae, *Neurospora crassa*,**

*** Corresponding author: Prof. Wilhelm Hansberg
Instituto de Fisiología Celular,
Universidad Nacional Autónoma de México
Apartado Postal 70-242; 04510 México, D. F. MÉXICO
Phone: (5255) 5622 5655; FAX: (5255) 5622 5630
E-mail: whansber@ifisiol.unam.mx.**

**¹Present address: Departamento de Biología Molecular de Plantas,
Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México,
62250 Cuernavaca, Mor., MÉXICO**

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Abstract.

We use asexual development of *Neurospora crassa* as a model system to determine the causes of cell differentiation. Air exposure of a mycelial mat induces hyphae adhesion which grow aerial hyphae which in turn form conidia. Previous work indicated development of a hyperoxidant state at the start of these morphogenetic transitions and a large increase in catalase activity during conidiation. Catalase-3 (Cat-3) increases during exponential growth and is induced by different stress conditions. Here we analyzed the effect of *cat-3* null mutant on growth and asexual development. The lack of Cat-3 was not compensated by other catalases even under oxidative stress conditions and *cat-3* null mutant colonies were sensitive to H₂O₂. Wild type (Wt) resistance to external H₂O₂ was due to Cat-3 secretion. *cat-3* mutant colonies grown in the dark produced high levels of carotenes as a consequence of oxidative stress. In Cat-3 mutants, increased aeration in liquid cultures lead to increased hyphal adhesion and protein oxidation. Compared to Wt, *cat-3* mutant strains produced six times more aerial hyphae and conidia in air exposed mycelial mats as a result of higher number of aerial hyphae; protein oxidation in colonies was three fold higher and showed more aerial hyphae and conidia; mutant strains developed aerial hyphae earlier in standing liquid cultures. Results indicate that oxidative stress due to lack of Cat-3 induces carotene synthesis, hyphal adhesion, precocious development of more aerial hyphae and conidia. Light exacerbates oxidative stress and increases further carotene synthesis and cell differentiation.

Introduction

Our goal is to determine what causes cell differentiation using the asexual life cycle of *Neurospora crassa* as a model system. There is a wealth of information about the genetics, biochemistry, physiology, cellular and molecular biology of *N. crassa* and its genome has been recently sequenced by Whitehead Institute/MIT Center for Genome Research (www-genome.wi.mit.edu).

A synchronous process of asexual spore (conidia) formation is started when an aerated liquid culture is filtered and the resulting mycelial mat is exposed to air (Toledo *et al.*, 1986; Springer and Yanofsky, 1989). Filaments (hyphae) in direct contact with air adhere to each other within 40 min, adhered mycelium starts growing aerial hyphae after two hours and conidia are formed at the tips of the branched aerial hyphae after 8-9 h of air exposure. Thus, formation of conidia from growing hyphae involves three morphogenetic transitions: growing hyphae to adhered mycelium; adhered mycelium to aerial hyphae; and aerial hyphae to conidia.

A hyperoxidant state develops at the start of these morphogenetic transitions (Toledo and Hansberg, 1990; Toledo *et al.*, 1991, Hansberg *et al.*, 1993, Toledo *et al.*, 1994; Toledo *et al.*, 1995). A hyperoxidant state is defined as an unstable, transient state in which reactive oxygen species (ROS) surpass the antioxidant capacity of the cell (Hansberg and Aguirre, 1990; Hansberg, 1996). The occurrence of a hyperoxidant state is indicated by oxidation of total protein that occurs at the start of the aforementioned morphogenetic transitions (Toledo and Hansberg, 1990; Toledo *et al.*, 1994). Glutamine synthetase and glutamate dehydrogenase oxidation occurs during adhesion of hyphae, formation of aerial hyphae and return to the growth-state (Toledo *et al.*, 1994; Toledo *et al.*, 1995). Catalase is modified during conidiation (Hansberg, 1996) and *in vitro* due to the reaction of singlet oxygen ($^1\text{O}_2$) with its heme (Lledías *et al.*, 1998). Also, during germination of conidia, total

protein oxidation and catalase oxidation by $^1\text{O}_2$ increases with light, a source of $^1\text{O}_2$, or insufficient $^1\text{O}_2$ quenching by carotenes (Lledias *et al.*, 1999).

In studies on the activity of antioxidant enzymes during the asexual life cycle of *N. crassa*, large differences in catalase specific activity were observed. There was a step-wise increase in catalase activity during the process that leads to formation of conidia (conidiation). In fact, conidia have 60 times more catalase activity than hyphae growing in liquid medium (Hansberg, 1996, Michán *et al.*, 2002). Cat-3 and catalase-1 (Cat-1) constitute the main catalase activities and are differentially regulated during the *N. crassa* asexual life cycle. Cat-3 activity increases during exponential growth and is induced by different stress conditions (Michán *et al.*, 2002); Cat-1 increases at the pre-stationary and early stationary growth phases and is accumulated in conidia (Díaz *et al.*, 2001; Michán *et al.*, 2002).

Most of the hydrogen peroxide (H_2O_2) in cells comes from superoxide (O_2^-) dismutation. O_2^- arises mainly by electron leakage from the respiratory chain and from the activity of enzymes, such as NADPH oxidase and other oxidases. O_2^- is dismutated by superoxide dismutase (SOD) to form H_2O_2 and dioxygen (O_2). There is a cytosolic, a mitochondrial and sometimes an extracellular SOD. There is also a high redundancy of enzymes for disposition of H_2O_2 : catalases, catalase/peroxidases, peroxidases and peroxiredoxins. If O_2^- and H_2O_2 disposal is insufficient, hydroxyl radical (HO^\cdot) is formed from H_2O_2 reduction by metal ions and $^1\text{O}_2$ is formed by spontaneous dismutation of O_2^- , metal catalyzed reaction of O_2^- with H_2O_2 and decomposition of H_2O_2 by different compounds (reviewed in Lledias and Hansberg, 2000). Instead, in the presence of SOD and catalase, O_2^- and H_2O_2 are converted quantitatively into water and O_2 . Thus, disposal of O_2^- and H_2O_2 is vital to avoid formation of the highly reactive HO^\cdot and $^1\text{O}_2$.

The evidence that we have accumulated suggests that microbial cells differentiate as a response to a hyperoxidant state by cell insulation from O_2

(Hansberg and Aguirre, 1990; Hansberg, 1996). This hypothesis is summarized as follows:

Stability of the growing state arises from the highly reduced intracellular medium maintained by metabolism. To keep a reduced internal medium, cells have to efficiently reduce entering O_2 . For this, cells have to have a supply of reduced carbon, of nitrogen and phosphorous. Reduction of O_2 into water (oxidative - phosphorylation) liberates energy in form of ATP that is channeled into growth and storage processes.

Stability is lost in any condition in which generation of ROS surpasses the cellular capacity to neutralize them. The hyperoxidant state is inevitably unstable because cellular antioxidant mechanisms are limited and are also inactivated by ROS; it is necessarily transient, because cells either attain a new stable state or die. Cells die because ROS can cause nicks and two-strand breaks in DNA, mRNA instability, protein oxidation, lipid peroxidation, covalent linkages between different components, production and polymerization of oxidized compounds.

A hyperoxidant state can be compensated either by a rapid increase in reducing equivalents or by a decrease in O_2 entrance. In the first case, cells return to the previous stable state, that is, they adapt to a more oxidizing environment or condition. In the second case, cells attain a different stable state. That is, cell differentiation has taken place.

Mechanisms of cell differentiation are O_2 avoidance mechanisms: either by escaping to less oxidizing conditions (e. g. expression of locomotion and chemosensing apparatus), or by insulation from the oxidizing medium. Differentiated states are stable because they are more insulated from environmental dioxygen than the growing state.

From any differentiated state cells return to the growing state by breakage of insulation, which generates a hyperoxidant state that is compensated by an increase in reducing equivalents.

Induction of antioxidant mechanisms is an expected consequence of a hyperoxidant state and explains the increase in catalase activity in our model system. Many other microorganisms have more than one catalase and in some of them a catalase is related to cell differentiation (Loewen and Switala, 1988; Hengge-Aronis, R. 1993; Willekens *et al.*, 1994; Engelmann *et al.*, 1995; Navarro *et al.*, 1996; Kawasaki *et al.*, 1997; Bagyan *et al.*, 1998; Cho *et al.*, 2000; Johnson *et al.*, 2002). However, this does not imply that catalases are essential for cell differentiation. Because of its importance for cell survival, there is ample redundancy in antioxidant mechanisms. Nullification of different antioxidant enzymes is probably required to impair conidiation in *N. crassa* and this probably will lead to cell death. However, we expect that strains mutated in one or more antioxidant system will tend to differentiate precociously, more rapidly and abundantly than Wt cells.

Here we analyzed the effect on asexual development of *cat-3* null mutant strains. These mutants tend to develop oxidative stress, measured by protein oxidation, and react by increasing carotenes levels, by cell adhesion and precocious development of high amounts aerial hyphae and conidia.

MATERIALS AND METHODS

N. crassa strains, plasmids, and growth conditions. Wild type strains, 74-ORS23-1A and ORS-SL6-a, and *his-3* mutant strain (6103A) were obtained from the Fungal Genetics Stock Center (FGSC). The *his-3* strain contains a single mutation in a gene encoding a multifunctional enzyme of histidine biosynthesis. The plasmid pDE1, containing a truncated *his-3* gene, was used to direct *cat-3* integration to this locus (Ebbole, 1990).

Liquid cultures were grown in Vogel's minimal medium (VM) containing 1.5 or 2% sucrose from an inoculum of 1×10^5 to 1×10^6 conidia/ml, at an air/liquid ratio of 3:2, and incubated at 30°C with agitation at 200 or 250 rpm for 12 to 16 h. For *his-3*, growth medium was supplemented with 200 µg/ml of L-histidine.

To impose oxidative stress, mycelium grown from an inoculum of 3×10^5 conidia/ml was harvested by filtration after 14 h growth, washed briefly with fresh medium and transferred to growth medium containing either 1 mM H₂O₂, 30 mM CaCO₃, or 5 mM paraquat. Mycelia were recovered after 0.5, 1, 3 and 6 h and catalase activity in cell extracts was determined.

Conidia were isolated from solid cultures with VM, supplemented with 1.5% sucrose and 1.5% agar, in Erlenmeyer flasks, inoculated with conidia and incubated three days at 30°C in the dark followed by two days at 25°C in the light. To grow colonies, Petri dishes with 1.5% agar in VM supplemented with 0.05 % fructose, 0.05% glucose and 2 % sorbose (VSM) (Davies and De Serres, 1970) were inoculated with 200 - 250 conidia and incubated at 30°C. When colonies were isolated, a cellophane sheet was layered onto solid cultures in Petri dishes before plating of conidia. Cellophane was washed and autoclaved in distilled water. Illumination of colonies in Petri plates was done with a 500 W tungsten bulb at a distance of 50 cm (5 W/cm²) for 1 h.

Treatment with H₂O₂ was done in solid cultures inoculated with 250 conidia, incubated at 30°C, and after two days 10 ml of either 5, 10, 15 or 20 mM H₂O₂ was added to each culture. After ten minutes treatment, H₂O₂ was discarded and incubation was continued for two more days. Colonies were counted and compared with untreated controls.

Hyphal adhesion was determined in liquid cultures of either 5, 10 15 or 20 ml of a growth medium, previously inoculated with 3x10⁵ conidia/ml, in 25 ml Erlenmeyer flasks and grown for 15 h at 30°C and 250 rpm. Cultures were photographed and mycelia harvested by filtration to determine protein oxidation.

For quantification of aerial hyphae and conidia, liquid cultures inoculated with 1x10⁶ conidia/ml were incubated for 16 h at 30°C and 200 rpm. One hundred millilitres of culture were filtered and the resulting mycelial mat was exposed to air for 24 h at room temperature (RT) inside Petri dishes. Adhered to the covers of the dishes, mycelial mats developed aerial hyphae towards gravity. Aerial mycelia were recovered with a spatula, vacuum-dried and weighted. Then, 1ml of sterile water was added, agitated in a Vortex for 5 min and free conidia were counted using a Neubauer chamber. Conidia in colonies were determined in 20 colonies picked at random and counted as indicated. To determine amount of aerial hyphae mycelial mats were covered with filter paper stained, first with Congo red and then with methylene blue to give a dark purple colour. Filters were washed exhaustively with distilled water to eliminate stain excess. Aerial hyphae grew through the stained filter; cultures were photographed after 24 h development.

Disruption of *cat-3*

Two primer oligonucleotides, each containing an EcoRI restriction site (5'-CGCCGAATTCATGCGTGTCAACGCTCTT-3' and 5'CCCGAATTCCTACTCCTCATCATCGC-3'), were designed to amplify *cat-3* cDNA sequence from plasmid pSM1 with the polymerase chain reaction. The

amplified 2-kb *cat-3* cDNA sequence was cloned by replacing the lacZ EcoRI fragment in plasmid pDE1 (Ebbole, 1990) yielding pSM3. The truncated *N. crassa his-3* gene in the plasmid was used for directing integration to this locus. 40 μ l of 1.25×10^{10} conidia/ml from *his-3* mutant strain (FGSC 6103) were electroporated at 1.5 kV with circular pSM3 (500 μ g) (Margolin *et al.*, 1997). Histidine prototrophs were isolated and analyzed by DNA blot hybridization to select transformants with the *cat-3* sequence adjacent to the repaired *his-3* locus. After three cycles of single-colony isolation, a transformant was crossed to the Wt strain to obtain *his-3* prototrophs lacking *cat-3* transcript and Cat-3 protein.

Vegetative mycelia were frozen in liquid nitrogen and stored at -70°C until used. Total RNA was isolated with TRIZOL (GIBCO, BRL), according to instructions from the manufacturer. For *Northern* blots, 10 μ g of RNA per lane were loaded on 0.7 % agarose gel containing formaldehyde, run at 60V, transferred to nylon membranes (Hybond-N, Amersham Pharmacia Biotech) and hybridized with *cat-3* probe. Genomic DNA was isolated as described by Vollmer and Yanofski, 1986. For *Southern* blots, 5 μ g of DNA were digested with 20 U of MscI, electrophoresed on agarose gel, transferred to Hybond-XL membrane (Amersham RPN 203 S) fixed to the membrane with UV light (UV Stratalinker 1800, Stratagene) and hybridized with *cat-3* or *his 3* probes. Radioactivity was detected by autoradiography using Kodak Biomax MR films.

Sexual crosses were performed on synthetic cross medium following the procedure of Davis and De Serres (1970).

Protein isolation. Mycelia were harvested by filtration and resuspended in 1 ml acetone, agitated 15 s in a Vortex, and centrifuged 5 min at $14,000 \times g$. Acetone was eliminated and the precipitate was dried by evaporation. Hundred milligrams of dry pellet were resuspended in 300 μ l of 20 mM HEPES, pH 7.2, containing 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 1 mM dithiothreitol (DTT), and 0.1 mM

desferrioxamine B mesylate (Desferral). Hyphae were broken by agitation with 100 mg glass beads (710-1180 μm) in a Vortex for 30 min, at 4° C. Protein was determined by the method of Bradford.

For detection of secreted Cat-3, mycelia was separated after 16 h growth by filtration and one liter of used medium was dialyzed against distilled water, concentrated in an Amicon YM100 to 1 ml, precipitated with two volumes acetone, and resuspended in 300 μl of the HEPES/PMSF/DTT/Desferral buffer.

Cat-3 activity and immunodetection. Catalase (hydrogen peroxide:hydrogen peroxide oxidoreductase) (EC 1.11.1.6) activity was either measured by determining the initial rate of dioxygen production with a Clark microelectrode or detected in gels after PAGE (Lledías et al., 1998). For catalase activity, PAGE under non-denaturing conditions was used, usually loading 50 U of catalase activity or 30 μg protein in each lane. Minigels of 8 \times 9 cm and 0.75 cm thick with 8% polyacrylamide and 0.2% bis-acrylamide were made according to the Laemmli procedure, but without SDS and β -mercaptoethanol and without boiling the samples. For Cat-3 immunodetection denaturing conditions were used. After PAGE gels were immediately used for immunodetection or stained for catalase activity. Two dimensional PAGE was done as described before (Lledías et al., 1998). For immunodetection proteins were electrotransferred to nitrocellulose filters (GibcoBRL) at 100 V for 1 h using a Mighty Small Transfer unit (Hoeffer) and the buffer described by Towbin et al. (1979). Filters were blocked with 3% skimmed milk in phosphate buffer saline (PBS)-Tween-20 (0.03%) buffer at RT and then incubated with rabbit sera containing polyclonal anti-Cat-3 or anti-Cat-1 antibodies diluted according to the title in PBS-Tween-20, 0.1% skimmed milk. Antibodies were detected with anti-rabbit IgG coupled to horseradish peroxidase and developed with 4-chloro-1-naphthol as substrate.

Carotenoids extraction and determination. Three-day-old colonies (250) growing over cellophane on solid cultures were illuminated for 1 h with intense light (5 W/cm^2) and immediately recovered with a spatula. Colonies were resuspended in 400 μl of 20 mM HEPES, pH 7.2, and broken by agitating in an Eppendorf tube with 300 mg glass beads at maximal speed of a Vortex, at 4°C , for 30 min. Carotenoids were extracted from 400 μl cell extracts, containing 4 mg of protein, with 400 μl butanol-chloroform (1:3 v/v). The mixture was stirred 2 min in a Vortex at full speed and thereafter centrifuged in a microfuge. The butanol-chloroform phase, containing most of the carotenoids, was recovered, diluted 50 times with butanol-chloroform and spectra were run in a Beckman spectrometer.

Carbonyl content in total protein. Liquid grown mycelium was harvested by filtration and dried with acetone. Protein was extracted as mentioned above and carbonyl content was determined as described by Ahn *et al.* (1987), but the extraction with butanol/chloroform was repeated six times to assure elimination of all lipids (carotenes). Colonies (150) on cellophane overlaid solid cultures with VSM were grown for three days in dark at 30°C . Plates were then illuminated with a 500 W tungsten bulb at a distance of 50 cm (5 W/cm^2) for 1 h and then incubated in the dark for four days. Control plates were maintained in the dark. Colonies were recovered with a spatula and dried with acetone. Protein was extracted from five colonies in 300 μl buffer and carbonyl content was determined as described above.

RESULTS

Disruption of *cat-3*. During meiosis in *N. crassa*, chromosomal sequences that are repeated in the haploid genome are mutated through a process called repeat-induced point mutation (RIP). In this process methylation of cytosines generate C to T and G to A transitions that inactivates every repeated sequence (Cambareri-*et al.*, 1989). RIP has been used with great success to generate null mutants of *N. crassa* by introducing a copy of the gene to be disrupted into the genome and crossing the transformed strain.

A 2-kb fragment of *cat-3* cDNA was cloned in a plasmid containing an N-terminal truncated *his-3* gene and used to transform a *N. crassa* histidine auxotroph containing a point mutation in the *his-3* locus. Histidine prototrophs were isolated and analyzed by DNA blot hybridization to select transformants containing *cat-3* sequence adjacent to repaired *his-3* locus. After three cycles of single-colony isolation, a transformant was crossed to Wt strain to obtain *his-3* prototrophs without *cat-3* transcript and Cat-3 protein. Twenty out of the forty-two randomly picked progeny colonies were Cat-3 defective, indicating 1:1 segregation. The phenotype of two of them, *cat-3⁵¹* and *cat-3⁶⁰*, was characterized and compared to the Wt strain.

No Cat-3 activity (Fig. 1A) or *cat-3* transcript (Fig. 1B) were detected in both mutant stains. In addition, no Cat-3 antigen was detected using polyclonal antibodies directed against purified Cat-3 (Fig. 1D). As a control, Cat-1 antigen was detected in similar amounts in Wt and Cat-3 mutant strains (Fig. 1E). To further confirm the Cat-3 absence and of possible mutant peptides with catalase activity, two-dimensional (2-D) polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) was performed. Only Cat-1 was detected in *cat-3⁵¹* (Fig. 1G) and *cat-3⁶⁰* strains (Fig. 1H).

To prove that the lack of Cat-3 was due to *cat-3* RIP mutation, *cat-3⁶⁰* and Wt DNA were digested with different restriction enzymes that are sensitive to DNA methylation and analyzed by DNA blot hybridization with *cat-3* as probe. Using *MscI*, *cat-3* hybridized to a DNA fragment from *cat-3⁶⁰* with a higher molecular weight, consistent with loss of the single *MscI* site in the gene (Fig. 11).

Cat-3 loss is not compensated by other catalases and mutant strains are H₂O₂ sensitive. Because *N. crassa* has three monofunctional catalases and one catalase/oxidase (Peraza and Hansberg, 2002), increasing the activity of another catalase could compensate for the lack of Cat-3 in the mutant strains. Previous experiments indicated that H₂O₂, CaCO₃, and particularly paraquat induced *cat-3* transcript and Cat-3 activity (Michán *et al.*, 2002). We assayed total catalase activity in liquid cultures subjected to these oxidative stress conditions: in *cat-3* mutant strains with or without stress total catalase activity remained at similar levels (Fig. 2A-C); in the Wt strain six hours stress lead to two fold increase in catalase activity in the first two conditions (Fig. 2A, B) and seven to eight fold increase with paraquat (Fig. 2C). These results indicate that the lack of Cat-3 was not compensated by other catalases.

Other H₂O₂ disposing enzymes such as peroxiredoxins and/or peroxidases could also have a compensating effect. To analyze the H₂O₂ sensitivity of the *cat-3* mutant strains, 20 mM H₂O₂ was added to two-day-old colonies grown in Petri dishes. H₂O₂ was eliminated after ten minutes and colony survival was analyzed two days later. *cat-3* mutant strains did not resist this treatment while Wt strain seemed unaffected (Fig. 3A). Similar assays with 5 to 20 mM H₂O₂ concentrations showed a dose response effect. At 10 mM H₂O₂ only 25 to 30% of the *cat-3* colonies survived compared to over 90% of the Wt. (Fig. 3B).

Cat-3 is a secreted enzyme. Cat-3 has an N-terminal signal peptide that is processed (Michán *et al.*, 2002) and probably used for enzyme secretion, as was

found for homologous catalases (Calera *et al.*, 1997; Garre, *et al.*, 1998). The ability of Wt strain to cope with high concentrations of external H₂O₂ could be due to Cat-3 secretion. Thus, colonies in Petri dishes were stained for catalase activity. A large halo of catalase activity observed in Wt colonies was absent or strongly reduced in the *cat-3⁶⁰* strain (Fig. 4A), suggesting that Cat-3 activity diffuses out from colonies.

To confirm Cat-3 secretion, liquid medium in which Wt or mutant strains grew for 16 h was dialyzed, concentrated, and analyzed for Cat-3 activity and protein. Cat-3 activity (Fig 4B) and Cat-3 protein analyzed by immunodetection (Fig. 4C) was found in growing medium from Wt but not from *cat-3* mutant strains. These results demonstrate that Cat-3 is a secreted enzyme.

***cat-3* mutants show increased carotene content in the dark and after a pulse of light.** Colonies of *cat-3* null mutants were more pigmented than Wt. Pigmentation in *N. crassa* is mainly due to carotenes. Carotene synthesis is induced by oxidative stress and by light. Carotene content was measured in three-day-old colonies grown in the dark or grown in the dark and then illuminated for 1h at 5 W/cm². In the dark, low amount of carotenes was detected in Wt colonies, however carotene level was 7.7 fold higher in *cat-3* mutant strains (Fig. 5), denoting increased oxidative stress in these strains. Upon illumination total carotene content increased, 4.8 and 2.3 fold in Wt and mutant strains, respectively. Even under these conditions mutant strains still had 3.7 times more carotenes than Wt (Fig. 5).

Increased hyphal adhesion and protein oxidation in *cat-3* mutants. Hyphal adhesion is dependent on air and is the first morphogenetic step towards the conidiation process. Aerial hyphae in a mycelial mat develop only from a layer of adhered hyphae (Toledo *et al.*, 1989). Hyphal adhesion can also be observed in liquid cultures under oxidative stress conditions, such as increased aeration (v. gr. by increasing the air to liquid ratio). To analyze hyphal adhesion in *cat-3* mutants,

liquid medium was inoculated with conidia and distributed in 25 ml Erlenmeyer flasks at different air to liquid ratios. Adhesion of Wt hyphae was minimal at the highest air to liquid ratio. In *cat-3* mutant strains adhesion was observed at all ratios and increased considerably with aeration from many small aggregates to a single clump (Fig. 6A). Under these conditions, final biomass was similar in all stains (not shown).

To confirm that adhesion of hyphae was related to oxidative stress, protein oxidation was measured in total mycelial extracts. Protein oxidation, measured as carbonyl content in total protein, increased with hyphal adhesion and aeration in all strains, but was consistently higher in *cat-3* null mutants (Fig. 6B).

***cat-3* mutants show increased aerial hyphae development and formation of conidia.** Second and third steps in the conidiation process are aerial hyphae development and formation of conidia at the tips of aerial hyphae. The amount of aerial hyphae and conidia was determined in air exposed mycelial mats. Aerial hyphae and conidia were more abundant in *cat-3* mutant strains than in Wt (Fig. 7A, B). In fact, mutant strains produced 6 times more aerial hyphae and conidia than Wt (Fig. 7C).

Aerial hyphae and conidia were also more abundant in seven-day-old colonies of the *cat-3⁶⁰* mutant strain compared to Wt (Fig. 8A, B). To confirm that this trait was related to oxidative stress, protein oxidation was determined in colonies. After three days growth in Petri dishes Wt and *cat-3⁶⁰* colonies had a similar amount of carbonyls in total protein. Four days later, protein oxidation was lower in Wt and two-fold higher in *cat-3⁶⁰* colonies (Fig. 8C), indicating oxidative stress in mutant colonies.

To increase oxidative stress in colonies, a high-intensity pulse of light (5 W/cm²) for 1 h was given to three-day-old colonies and total protein carbonyl content was analyzed four days later. Protein carbonyl content increased three-fold

in Wt and 50% in *cat-3^Δ* colonies (Fig. 8C) and there was a marked increase in the amount of aerial hyphae in Wt colonies (not shown). Illumination with intense light increased oxidative stress and cell differentiation in Wt colonies.

To show increased aerial hyphae per area, mycelial mats were covered with a dark purple stained filter paper through which aerial hyphae can grow. In *cat-3* null mutants the whole paper was covered with aerial hyphae while in the Wt there was some uncovered space (Fig. 9A). Edges of the mycelial mat are more air exposed and develop more aerial hyphae, particularly in the *cat-3* mutant strain (Fig. 9A).

Precocious development of aerial hyphae and conidia was anticipated. Air exposure of mycelial mats synchronizes the conidiation process and occurs too fast to measure differences in time. Due to developmental asynchrony in colonies, no conclusive results were obtained. However in standing liquid cultures, mycelium concentrates after some time at the air/liquid interface where hyphae adhere and start forming aerial hyphae. After 24 h the *cat-3* mutant strain had developed aerial hyphae in abundance while the wild type was starting to form them (Fig. 9B). Aerial hyphae developed precociously and abundantly in the *cat-3* null mutant strain.

DISCUSSION

Here we present evidence indicating that *cat-3* null mutant strains tend to develop oxidative stress (increased protein oxidation), and react by increasing antioxidant levels (carotenes), and by developing high amounts of differentiated cell structures (adhered hyphae, aerial mycelium and conidia).

Cat-3 was shown to be secreted from Wt colonies and from hyphae in liquid cultures. The protein has a signal peptide for secretion that is processed (Michán *et al.*, 2002); Cat-3 homologues are also secreted (Calera *et al.*, 1997; Garre, *et al.*, 1998). However, Cat-3 detected from the used medium represents only a few percent (<3%) of total catalase activity detected in cell extracts (not shown). Thus, loss of Cat-3 into the medium is low and most of the activity in mycelial cell extracts is intracellular or bound to cell wall. Secretion of catalase might be related to plant substrates on which many fungi grow where high concentrations of H₂O₂ can arise from O₂⁻ produced by plant NADPH oxidase.

The lack of Cat-3 in mutant strains was not compensated by other catalase activities, even under oxidative stress conditions. Cat-1, a large monofunctional catalase that is very similar to Cat-3, is expressed mainly in non-growing cells, such as hyphae in early stationary growth phase and in conidia (Díaz *et al.*, 2001, Michán *et al.*, 2002). Cat-4 is a small monofunctional catalase that because of its signal peptide is presumably restricted to peroxisomes. Cat-2, a catalase/peroxidase that is closely related to the bacterial enzymes, is expressed in lysing hyphae, such as hyphae in late stationary growth phase, in the mycelial substrate that supports growth of aerial hyphae or in conidiating aerial hyphae (Peraza and Hansberg, 2002), cells in which vacuolization is observed (Toledo *et al.*, 1986).

Besides catalases, other H₂O₂ detoxifying enzymes are found in the *N. crassa* genome (www.genome.wi.mit.edu): three peroxiredoxins, a glutathione peroxidase,

cytochrome *c* peroxidase and probably other peroxidases. However these enzymes are efficient only at low concentrations of H₂O₂; millimolar concentrations of H₂O₂ can only be disposed by catalases (Seaver and Imlay 2001; Hoffman *et al.*, 2002). Thus, in spite of such high redundancy of H₂O₂ detoxifying enzymes, other enzymes cannot compensate the loss of Cat-3 activity during growth because these enzymes are much less efficient, are expressed in other cells or have different cell localization. Susceptibility of *cat-3* mutant strains was made evident by treating colonies with H₂O₂: Wt colonies were hardly affected by 20 mM of H₂O₂ while *cat-3* mutant strains did not survive this treatment.

Because lack of Cat-3 was not compensated enzymatically other antioxidants are expected to be induced in *cat-3* null mutant strains. Carotenes are antioxidants that are especially effective in quenching ¹O₂ (Sundquist *et al.*, 1994). In *N. crassa* carotenes are induced by light through the WC1/WC2 pathway, but carotene induction during conidiation is independent of light and WC genes (Harding and Turner, 1981; Linden and Macino, 1997). Singlet oxygen is an inducer of carotene synthesis in *Phaffia rhodozyma* (Schroeder and Johnson, 1995). Singlet oxygen is produced by blue light through photosensitization reactions. However, in the dark, H₂O₂ is a main source for singlet oxygen generation (reviewed in Lledias and Hansberg, 2000). *N. crassa* carotene mutant strains are sensitive to light and ¹O₂ (Thomas, *et al.*, 1981). Singlet oxygen is generated during *N. crassa* conidia germination (Lledias *et al.*, 1999), conidiation, and under different stress conditions (heat shock or paraquat treatment) (Michán *et al.*, 2002). Wt colonies hardly had carotenes when grown in the dark and synthesized them mainly when in the presence of light. Instead, *cat-3* mutant strains grown in the dark had increased amounts of carotene content. These results are consistent with ¹O₂ generation and ¹O₂ induction of carotene synthesis in mutant strains growing in the dark. Carotene synthesis in Wt and mutant strains was enhanced further by light and/or by ¹O₂

generated by photosensitization. Illumination of Wt colonies for 1 h increased their protein carbonyl content three fold (Fig. 8), again indicating oxidative stress due to photosensitization.

Besides carotene synthesis, *cat-3* mutant hyphae tended to adhere to each other when grown in liquid cultures. Hyphal adhesion is related to a carbohydrate that is secreted and polymerized at the cell wall, functioning as cement between hyphae (Hansberg, unpublished observations). When a mycelial mat is exposed to the air, a layer of adhered hyphae is formed within minutes. This layer of adhered hyphae is often mistakenly interpreted as desiccation. A layer of adhered hyphae also forms in standing liquid cultures; and is not formed in mycelial mats in the absence of air or in the presence of antioxidants. Aerial hyphae develop only from the layer of adhered hyphae and represent the first step of the conidiation process (Toledo *et al.*, 1986). Only in this layer of the mycelial mat are proteins and specific enzymes oxidized, degraded, and some of them resynthesized (Toledo *et al.*, 1994). Hyphal adhesion correlated with protein oxidation in liquid cultures. *cat-3* mutant hyphae grew as aggregates that increased in size depending on aeration; Wt hyphae also tend to form aggregate at a high aeration rate. Hyphae adhesion is a cellular response to oxidative stress. It probably has the effect of reducing the local concentration of O₂ by active respiration. Deposited carbohydrates at the cell wall could also reduce the entrance of O₂ to the adhered hyphae.

Aerial hyphae develop from adhered hyphae and conidia are formed at their tips, representing the second and third steps of the conidiation process. Most conspicuous features of *cat-3* null mutant strains are the increased amount of aerial hyphae mass and number of conidia produced: both were six times the amount determined in the Wt strain. According to our hypothesis, *cat-3* mutant hyphae in the adhered mycelium would be prone to develop a hyperoxidant state and thus should develop increased number of aerial hyphae initials. Number of aerial hyphae

per area was higher in mutant strains compared to wild type. The fact that aerial hyphae mass in Fig. 7A is taller in mutant strain than in WT does not mean longer aerial hyphae. Because aerial hyphae grew towards gravity, the more packed aerial hyphae of the mutant strains were straighter than in Wt. In fact, once taken out from Petri dishes and inverted, aerial mycelium of all mats collapsed after a while and difference in height was no longer apparent. Aerial hyphae morphology in the mutant strains was similar to Wt under the light microscope (not shown).

Precocious development of aerial hyphae was anticipated. A large time difference in the appearance of aerial hyphae was detected in standing liquid cultures. After one day the *cat-3* mutant strains had formed abundant aerial hyphae while Wt were starting to form them.

Interestingly, the *N. crassa* Cu, Zn superoxide dismutase null mutant strain *sod-1* (Chary *et al.*, 1994) has a similar phenotype to *cat-3* mutant strains with respect to carotene production, adhesion of hyphae, and increased amount of aerial mycelium and conidia formation (Hansberg, unpublished results). However, and as expected, *sod-1* is more resistant to H₂O₂ and more sensitive to paraquat treatment than *cat-3*.

Deletion of *N. crassa gna-1*, encoding G α_i protein, reduces the cAMP level causing decreased apical extension rate, carotene accumulation, increased tolerance to heat shock and H₂O₂ treatment and short aerial hyphae and hyperconidiation, a phenotype similar to the adenylate-cyclase-deficient *cr-1* mutant strain (Cruz *et al.*, 1988). Mutant strains with G α_i permanently activated show an increased cAMP level, have close to Wt apical extension rate, low carotene content, decreased tolerance to heat shock and H₂O₂ treatment, increased proliferation of aerial hyphae but low amount of conidia formation (Yang and Borkovich, 1998).

Increased mass of aerial hyphae in *cat-3* null mutant strains correlates with increased number of aerial hyphae that develop probably due to oxidative stress in

substrate mycelium; increased aerial hyphae in the permanent *Gα*₁ activation strain is probably due to prolonged growth of aerial hyphae before oxidative stress develops and conidia are formed. cAMP levels are probably inversely related to stress intensity in *N. crassa*, a high level of cAMP meaning low stress and consequently growth of aerial hyphae, low stress response and decrease formation of conidia. If so, we would expect low levels of cAMP in *cat-3* mutant strains.

A catalase mutant strain in *Streptomyces coelicolor* affected aerial mycelium development but this trait is probably related to the osmosensitive phenotype of this strain (Cho *et al.*, 2000).

Double and triple catalase mutant strains of *Aspergillus nidulans* had no apparent effect on conidiation, although colonies from *catB* mutant strains and conidia from *catA* mutant stains are sensitive to H₂O₂ (Navarro *et al.*, 1996, Kawasaki *et al.*, 1997, Kawasaki and Aguirre, 2001). This could indicate different fungal strategies to cope with oxidative stress and to start cell differentiation. However, *A. nidulans* has been used mainly for genetic studies and to this end growth conditions and strains were selected for rapid and abundant production of conidia. *A. nidulans* laboratory strains already grow in an adhered form. Thus, we will test the phenotype of null mutant strains affected in CatB, the Cat-3 homologue, under other growth conditions similar to those used in *N. crassa*, and of different genetic backgrounds.

Taken together, results presented here support the "Dioxygen Avoidance Theory of Cell Differentiation" (Hansberg and Aguirre, 1990, Hansberg, 1996).

ACKNOWLEDGMENTS

This research was supported in part by grant number IN214199 from DGAPA, Universidad Nacional Autónoma de México, and grant 33148-N from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, México.

We are grateful to Dr. Dan Ebbole (Texas A and M University, Texas, USA) for help with the RIPing protocol. We thank Jesús Aguirre (IFCE-UNAM, México) for critically reviewing the manuscript and Leonardo Peraza for photographs in Fig. 9

REFERENCES

1. **Ahn, B., S. G. Rhee, and E. R. Stadtman.** 1987. Use of fluorescein hydrazide and fluorescein thiosemicarbazide reagents for the fluorometric determination of protein carbonyl groups and for the detection of oxidized protein on polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.* **161**:245–257.
2. **Bagyan, I., L. Casillas-Martínez, and P. Setlow.** 1998. The *katX* gene which encodes for the catalase in spore of *Bacillus subtilis*, is a forespore-specific gene controlled by σ^F , and *katX* is essential for hydrogen peroxide resistance of the germinating spore. *J. Bacteriol.* **180**:2057–2062.
3. **Calera, J. A., S. Paris, M. Monod, A. J. Hamilton, J. P. Debeaupuis, M. Díaquin, R. López-Medrano, F. Leal, and J. P. Latge.** 1997. Cloning and disruption of the antigenic catalase gene of *Aspergillus fumigatus*. *Infect. Immun.* **65**:4718–4724.
4. **Cambareri, E. B., B.C. Jensen, E. Schabtach, and E.U. Selker.** 1989. Repeat-induced G-C to A-T mutations in *Neurospora*. *Science* **244**:1571–1575.
5. **Chary P., D. Dillon, A. L. Schroeder, and D. O. Natvig.** 1994. Superoxide dismutase (*sod-1*) null mutants of *Neurospora crassa*: oxidative stress sensitivity, spontaneous mutation rate and response to mutagens. *Genetics* **137**:723–730.
6. **Cho, Y-H., E-J Lee, and J-H Roe.** 2000. A developmentally regulated catalase required for proper differentiation and osmoprotection of *Streptomyces coelicolor*. *Mol. Microbiol.* **35**:150–160.
7. **Davis, R.H., and J. F. De Serres.** 1970. Genetic and microbiological research techniques for *Neurospora crassa*. *Methods Enzymol.* **17A**:79–143.
8. **Díaz A., P. Rangel, Y. Montes de Oca, F. Lledías, and W. Hansberg.** 2001. Molecular and kinetic study of Catalase-1, a durable large catalase of *Neurospora crassa*. *Free Radic. Biol. and Med.* **31**:1323–1333.

9. **Ebbole, D.** 1990. Vectors for construction of translational fusions of β -galactosidase. *Fungal Genet. Newsl.* **37**:15–16.
10. **Engelmann, S., C. Linder, and M. Hecker.** 1995. Cloning, nucleotide sequence and regulation of *katE* encoding: a σ^B -dependent catalase in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **177**:5598–5605.
11. **Garre, V., U. Muller, and P. Tudzynski.** 1998 Cloning, characterization, and targeted disruption of *cpca1*, coding for an in planta secreted catalase of *Claviceps purpurea*. *Mol. Plant Microbe Interact.* **11**: 72–783.
12. **Hansberg, W., and J. Aguirre.** 1990. Hyperoxidant states cause microbial cell differentiation by cell insulation from dioxygen. *J. Teor.Biol.* **142**:201–221.
13. **Hansberg, W., H. de Groot, and H. Sies.** 1993. Reactive oxygen species associated with cell differentiation in *Neurospora crassa*. *Free Radic. Biol. Med.* **14**:287–293.
14. **Hansberg, W.** 1996. A hyperoxidant state at the start of each developmental stage during *Neurospora crassa* conidiation. *Ciência e Cultura* **48**:68–74.
15. **Harding R. W., and R. V. Turner.** 1981. Photoregulation of carotenoid biosynthetic pathway in albino and white collar mutants of *Neurospora crassa*. *Plant Physiol.* **68**:745–749.
16. **Hengge-Aronis, R.** 1993. Survival of hunger and stress: the role of *rpoS* in early stationary phase gene regulation in *E. coli*. *Cell* **72**:165–168.
17. **Hoffman B, H. J. Hecht, and L. Flohe.** 2002. Peroxiredoxins. *Biol. Chem.* **383**:347–364.
18. **Johnson C. H., M. G., Klotz, J. L. York, V. Kruff, and J. E. McEwen.** 2002. Redundancy, phylogeny and differential expression of *Histoplasma capsulatum* catalases. *Microbiology* **148**:1129–1142.
19. **Kawasaki, L., D. Wysong, R. Diamond, and J. Aguirre.** 1997. Two

- divergent catalase genes are differentially regulated during *Aspergillus nidulans* development and oxidative stress. *J. Bacteriol.* **179**:3284–3292.
20. **Kawasaki, L., and J. Aguirre.** 2001. Multiple catalase genes are differentially regulated in *Aspergillus nidulans*. *J Bacteriol* **183**:1434–1440.
 21. **Linden, H., and G. Macino.** 1997. White collar 2, a partner in blue-light signal transduction controlling expression of light-regulated genes in *Neurospora crassa*. *EMBO J.* **16**:98–109.
 22. **Lledías, F., P. Rangel, and W. Hansberg.** 1998. Oxidation of catalase by singlet oxygen. *J. Biol. Chem.* **273**:10630–10637.
 23. **Lledías, F., P. Rangel, and W. Hansberg.** 1999. Singlet oxygen is part of a hyperoxidant state generated during spore germination. *Free Radic. Biol. Med.* **26**:1396–1404.
 24. **Lledías, F., and W. Hansberg.** 2000. Catalase modification as a marker for singlet oxygen. *Methods Enzymol.* **319**:110–119.
 25. **Loewen, P.C., and J. Switala.** 1988. Purification and characterization of spore-specific catalase–2 from *Bacillus subtilis*. *Biochem. Cell Biol.* **66**:707–714.
 26. **Margolin, B.S., M. Freitag, and E. U. Selker.** 1997. Improved plasmids for gene targeting at the *his-3* locus of *Neurospora crassa* by electroporation. *Fungal Genet. Newsl.* **44**:34–36.
 27. **Michán, S., F. Lledías, J. D. Baldwin, D. O. Natvig, and W. Hansberg.** 2002. Regulation and oxidation of two large monofunctional catalases. *Free Radic. Biol. Med.* **33**:521–532.
 28. **Navarro, R.E., M. A. Stringer, W. Hansberg, W. E. Timberlake, and J. Aguirre.** 1996. *catA*, a new *Aspergillus nidulans* gene encoding a developmentally regulated catalase. *Curr. Genet.* **29**:352–359.
 29. **Seaver L. C., and J. A. Imlay.** 2001. Alkyl hydroperoxide reductase is the primary scavenger of endogenous hydrogen peroxide in *Escherichia coli*.

- J. Bacteriol. **183**:7173–7181.
30. **Schroeder, W.A., and E. A. Johnson.** 1995. Singlet oxygen and peroxy radicals regulate carotenoid biosynthesis in *Phaffia rhodozyma*. J. Biol. Chem. **31**:18374–18379.
 31. **Springer, M.L., and C. Yanofsky.** 1989. A morphological and genetic analysis of conidiophore development in *Neurospora crassa*. Genes and Develop-
3:559–571.
 32. **Sundquist A.R., K. Briviba, and H. Sies.** 1994. Singlet oxygen quenching by carotenoids. Methods Enzymol. **234**:384–388.
 33. **Thomas, S.A., M. L. Sargent, and R. W. Tuveson.** 1981. Inactivation of normal and mutant *Neurospora crassa* conidia by visible light and near-UV: role of $^1\text{O}_2$, carotenoid composition and sensitizer location. Photochem Photobiol. **33**:349–354.
 34. **Toledo, I., J. Aguirre, and W. Hansberg.** 1986. Aerial growth in *Neurospora crassa*: characterization of an experimental model-system. Exp. Mycol. **10**:114–125.
 35. **Toledo, I., and W. Hansberg.** 1990. Protein oxidation related to morphogenesis in *Neurospora crassa*. Exp. Mycol. **14**:184–189.
 36. **Toledo, I., A. A. Noronha-Dutra, and W. Hansberg.** 1991. Loss of NAD(P)-reducing power and glutathione disulfide excretion at the start of induction of aerial growth in *Neurospora crassa*. J. Bacteriol. **173**:3243–3249.
 37. **Toledo, I., J. Aguirre, and W. Hansberg.** 1994. Enzyme inactivation related to a hyperoxidant state during conidiation of *Neurospora crassa*. Microbiol. **140**:2391–2397.
 38. **Toledo, I., P. Rangel, and W. Hansberg.** 1995. Redox imbalance at the start of each morphogenetic step of *Neurospora crassa* conidiation. Arch. Biochem. Biophys. **319**:519–524.

39. **Towbin, H., T. Stachelin, and J. Gordon.** 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrilamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**:4350–4354.
40. **Vattanaviboon, P., and S. Mongkolsuk.** 2000. Expression analysis and characterization of the mutant of a growth-and starvation-regulated monofunctional catalase gene from *Xanthomonas campestris* pv. *Phaseoli*. *Gene* **241**:259–265.
41. **Vollmer, S.J., and C. Yanofsky.** 1986. Efficient cloning of genes of *Neurospora crassa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**:4869–4873.
42. **Willekens, H., C. Langebartels, C. Tiré, M. van Montagu, D. Inzé, and van W. Camp.** 1994. Differential expression of catalase genes in *Nicotiana plumbaginifolia* (L.). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**:10450–10454.
43. **Yang, Q., and K. Borkovich.** 1998. Mutational activation of *Gα* causes uncontrolled proliferation of aerial hyphae and increased sensitivity to heat and oxidative stress in *Neurospora crassa*. *Genetics* **151**:107–117.

Figure legends

Figure 1. *cat-3* null mutant strains lack *cat-3* transcript Cat-3 protein. A. Catalase activity in gels after PAGE under non-denaturing conditions of 30 μ g protein extract from either Wt, *cat-3⁵¹* or *cat-3⁶⁰* strains. B. Autoradiography of total RNA (10 μ g) isolated from growing Wt, *cat-3⁵¹* or *cat-3⁶⁰* mycelia, hybridized with a *cat-3* radioactive probe. C. Ethidium bromide staining of the gel used in B to evaluate RNA loading. D and E. Immunodetection of Cat-3 and Cat-1 in Wt, *cat-3⁵¹* and *cat-3⁶⁰* cell-extracts. Specific polyclonal Cat-3 or Cat-1 antibodies were used and developed with a peroxidase-bound anti-rabbit antibody. F - H. Catalase activity in gels after 2-D PAGE of cell-extracts from Wt (F), *cat-3⁵¹* (G) or *cat-3⁶⁰* (H). I. Southern blot analysis of DNA from Wt and *cat-3⁶⁰* digested with MscI and hybridized with a *cat-3* radioactive probe; phage λ DNA digested with Hind III was used as molecular weight standards.

Figure 2. Lack of Cat-3 activity in a *cat-3* null mutant strain is not compensated by other catalases. Wt (white bars) and *cat-3⁶⁰* (dark bars) mycelium grown for 14 h was transferred to fresh medium containing A. 1mM H₂O₂, B. 30mM CaCO₃, or C. 5mM paraquat. After 0.5, 1, 3 or 6 h treatment, catalase activity was determined in cell-extracts. Results are average of three independent experiments.

Figure 3. *cat-3* null mutants strains are sensitivity to H₂O₂. Wt, *cat-3⁵¹* or *cat-3⁶⁰* conidia (250) were plated on VSM and after two days colonies were covered with a H₂O₂ solution. After a 10 min treatment, H₂O₂ solution was discarded and plates were incubated for another two days. Thereafter colonies were counted and compared to untreated controls. A. Plates of Wt and mutant strain colonies after a 20 mM H₂O₂ treatment. B. Percentage of colonies that survived H₂O₂ treatment at the indicated concentrations.

Figure 4. Cat-3 is an extracellular enzyme. A. Plates with Wt or *cat-3⁶⁰* four-day-old colonies were stained for catalase activity. B. Cat-3 activity and C. immunodetection of Cat-3: purified Cat-3 (lane 1); total protein from the Wt (lane 2), *cat-3⁵¹* (lane 3) or *cat-3⁶⁰* (lane 4) growth media after PAGE under non-denaturing conditions. After transfer to nitrocellulose filters, Cat-3 specific polyclonal antibodies were detected by the activity of peroxidase-bound anti-rabbit antibodies.

Figure 5. Carotene content in Wt and *cat-3⁶⁰* colonies. Spectra of isolated carotenes from cell extracts containing 4 mg protein. Wt and *cat-3⁶⁰* three-day-old colonies, grown in the dark on cellophane covered solid medium, were illuminated for 1 h with intense light (5 W/cm²) and carotenes were immediately extracted (Wt + L and *cat-3⁶⁰* + L). Control plates were also illuminated but wrapped with aluminum foil (Wt + D and *cat-3⁶⁰* + D). A representative experiment, of four independent experiments performed, is shown.

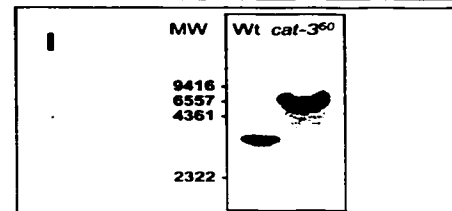
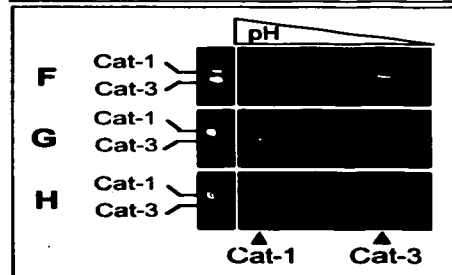
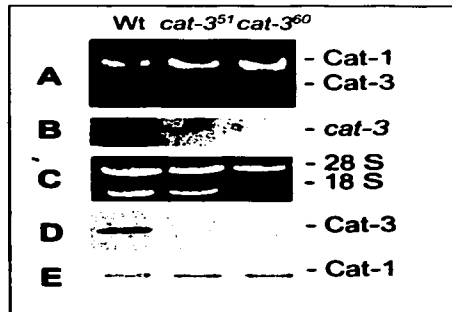
Figure 6. Adhesion of hyphae and carbonyl content of mycelia grown under different aeration conditions. Conidia from either Wt or *cat-3⁶⁰* were inoculated in liquid medium. Then, 20, 15, 10, or 5 ml were poured into 25 ml Erlenmeyer flasks and incubated for 15 h at 30°C and 250 rpm. Cultures were transferred to Petri dishes for documentation of hyphal adhesion and thereafter mycelium was recovered for determination of protein carbonyl content. A. Adhesion of Wt and *cat-3⁶⁰* hyphae. Lane 1: 5 ml (ratio: 4:1), lane 2: 10 ml (ratio: 3:2). B. Protein carbonyl content from Wt or *cat-3⁶⁰* mycelium growing at an air to liquid ratio of 1:4, 2:3, 3:2 or 4:1. Results are average of two independent experiments.

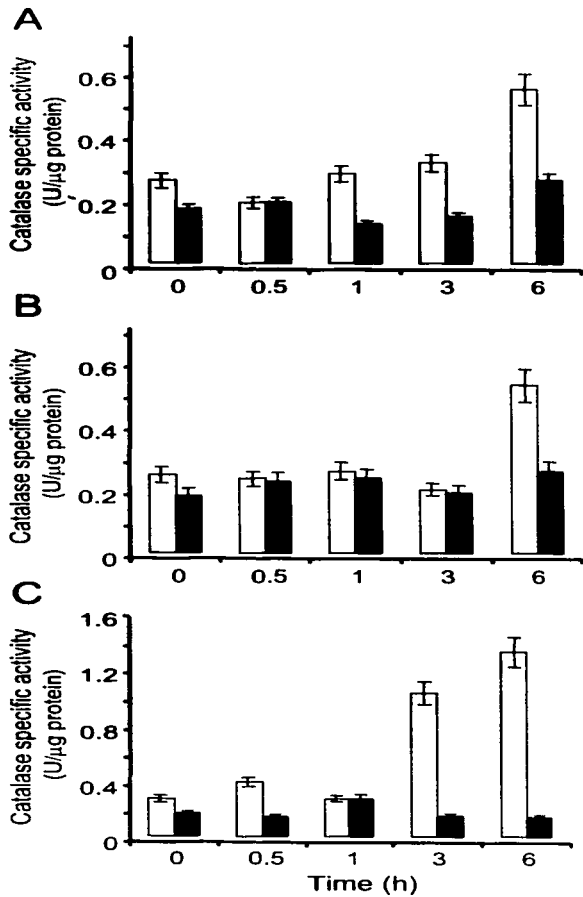
Figure 7. Enhancement of aerial hyphae and conidia formation in *cat-3⁶⁰* strain. Wt or *cat-3⁶⁰* cultures (100 ml) were filtered and the resulting mycelial mats were exposed to air for 24 h. A. Photographs from the side and B. top view of the mycelial mats show aerial mycelium (A) and conidia (B) from Wt and *cat-3⁶⁰* strains. C. aerial mycelium dry weight and number of conidia from Wt and *cat-3⁶⁰* strains. Results are average of four independent experiments.

Figure 8. Conidiation of Wt and *cat-3⁶⁰* colonies. Colonies were grown on VSM for seven days at 30°C. A. Photographs of Wt and *cat-3⁶⁰* seven-day-old colonies. B. Number of conidia per colony. Average of three groups of 20 colonies picked at random. C. Protein carbonyl content of Wt (dark bar) and *cat-3⁶⁰* (gray bar) colonies grown in the dark on cellophan covered plates with VSM after three days (1) or seven days (2). Three-day-old colonies were illuminated with intense light (5W/cm²) for 1 h and thereafter incubated for another four days in the dark; Wt (dashed bar) and *cat-3⁶⁰* (white bar). Results are average from four independent experiments.

Figure 9. Aerial hyphae density in mycelial mats and precocious aerial hyphae formation in standing liquid cultures. A. Mycelial mats were covered with a dark stained filter paper at the start of development. Aerial hyphae grew through the filter paper. Photographs were taken after 24 h. B. Standing liquid cultures after 24 h of development. Liquid cultures were grown for 16 h and then 4 ml were placed at the bottom of tubes, taking care to not touch the tube walls with the pipette.

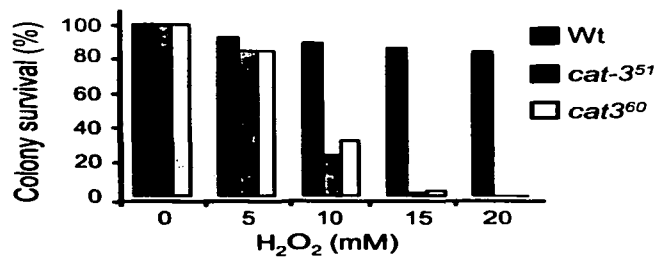
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

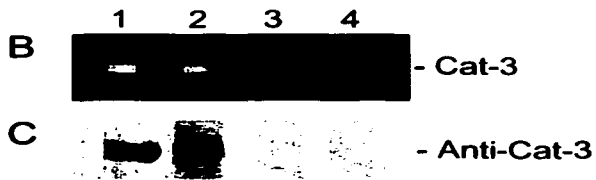
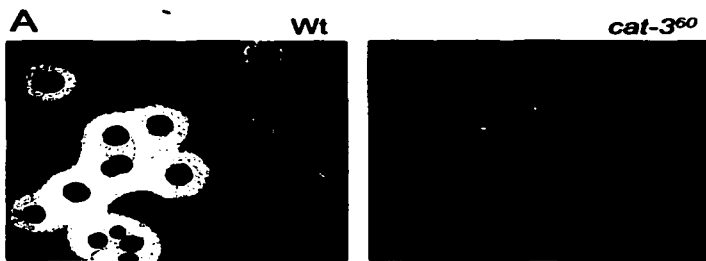


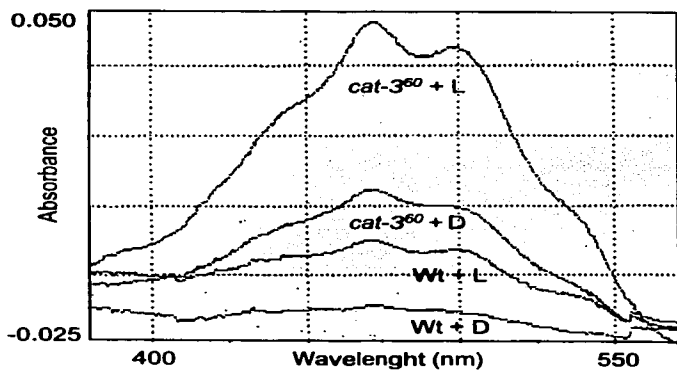


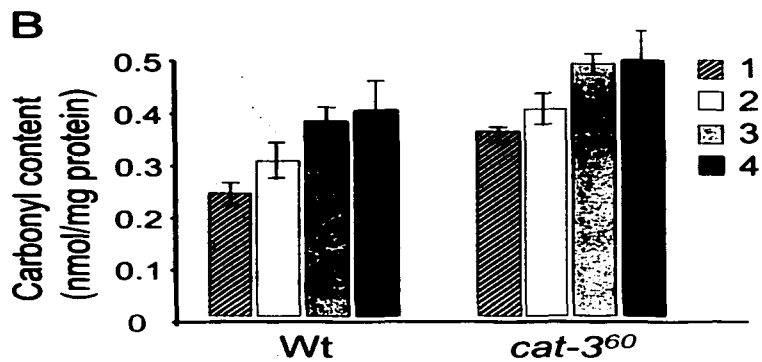
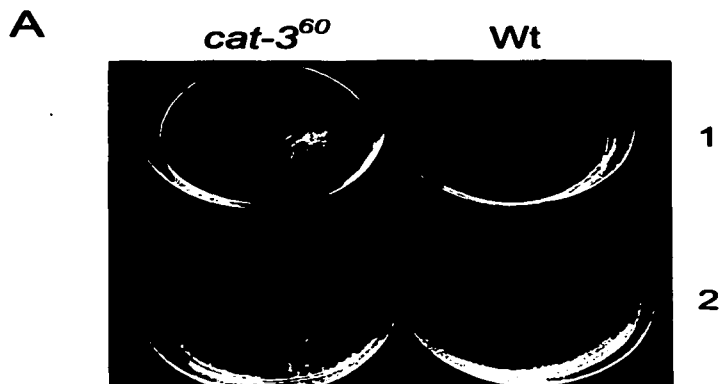
A

Control

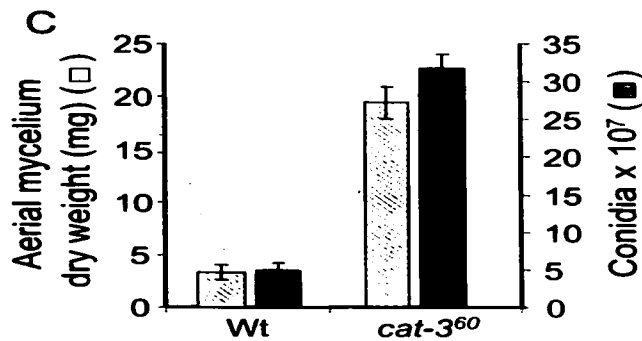
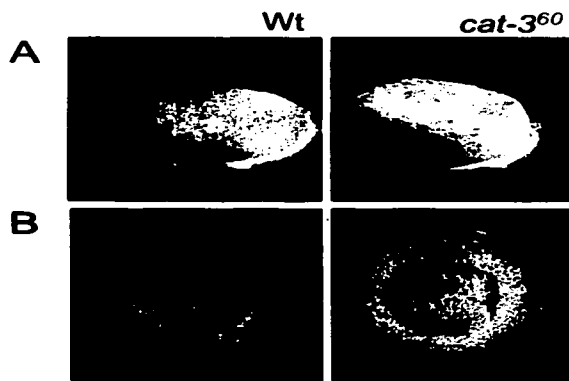
H₂O₂ (20 mM)**B**

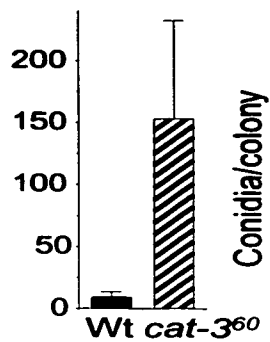
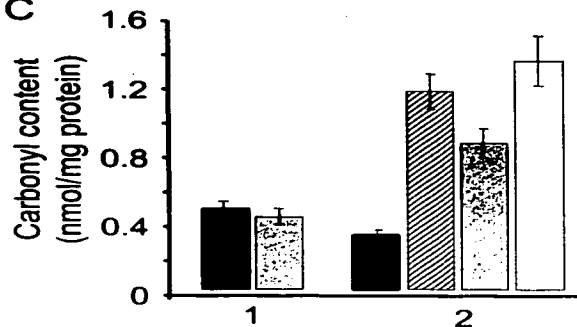


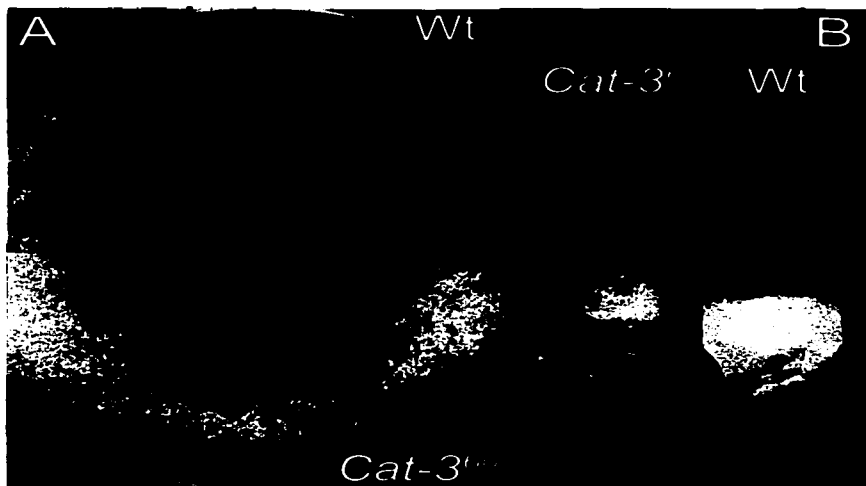




TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



A**B****C**



RESULTADOS NO PUBLICADOS

El gen *cat-3* se regula con la luz a través de los factores de transcripción WC-1 y WC-2

Neurospora crassa percibe la luz en el intervalo de UV-A/azul (350-520 nm). Como parte de la respuesta temprana, en los primeros 30 minutos de la exposición de la luz azul, se hiperpolariza la membrana celular y se induce la carotenogénesis en el micelio (Nelson *et al.*, 1989; Schmidhauser *et al.*, 1990). En la respuesta tardía, se estimula la formación de las estructuras diferenciadas como las macroconidios (Turian, 1977) y los protoperitecios (Degli-Innocenti *et al.*, 1983). La luz azul también pone en fase y suprime (en exposición continua) el ritmo circadiano de conidiación (Crosthwaite *et al.*, 1995). Se ha estimado que entre 60 y 80 genes de *N.crasa* son inducidos con la luz azul (Nawrath y Russo, 1990).

Las mutantes *white collar* (*wc-1* y *wc-2*) son ciegas, no presentan ninguna de las respuestas a la luz azul (Linden *et al.*, 1997). WC-1 y WC-2 son factores de transcripción que poseen un dominio de dedos de zinc, similar a los dominios de unión al ADN de los factores GATA (Ballario *et al.*, 1996; Linden y Macino, 1997). Ambas proteínas se transportan al núcleo. También tienen un dominio PAS a partir del cual se forman homo o heterodímeros. WC-1 y WC-2 se unen a las cajas GATA de los promotores de los genes fotoinducibles y activan su transcripción (Carattoli *et al.*, 1994; Ballario *et al.*, 1996; Linden y Macino 1997). WC-1 presenta, además, un dominio LOV que tiene 55% de similitud con el de NPH1, un posible fotorreceptor de luz azul en *Arabidopsis*, y 63% de similitud con el producto de *bat* de *Halobacterium halobium*, el cual codifica para un regulador transcripcional de la bacteriopsina sensible a la luz y al oxígeno (Ballario *et al.*, 1998). Además, se ha demostrado que WC-1 une una flavina y que funciona como fotorreceptor.

En esta parte del trabajo, demostramos que *cat-3* constituye uno de los genes que participan en la respuesta temprana a la luz. Similar a otros genes, la fotorregulación de *cat-3* también depende de los factores WC-1 y WC-2. Además, se presenta el análisis del promotor de *cat-3*, los sitios de inicio de la transcripción y la presencia de cajas GATA, CAAT y secuencias APE, típicas de los promotores fotorregulados.

Metodología

Regulación del gene *cat-3* por luz

Se inocularon 3×10^7 conidios de las cepas Wt (74-ORS23-1A), *wc-1* (4395) o *wc-2* (4402), obtenidas del Fungal Genetics Stock Center, en matraces de 250 ml que contenían 100 ml de medio Vogel líquido suplementado con 2% de sacarosa. Después de crecer 21 h a 30°C y 150 rpm en obscuridad, se transfirieron 50 ml de cada cultivo a matraces de 250 ml. Un matraz de cada cepa se mantuvo en la obscuridad y el otro se expuso a la luz a $1.1 \mu\text{W}/\text{cm}^2$. Ambos cultivos se incubaron a 30°C y 150 rpm. De cada muestra se filtraron diez mililitros en cada uno de los tiempos indicados y se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido. Los micelios congelados se trituraron con un mortero y se extrajo el ARN total con TRIZOL, siguiendo las indicaciones del fabricante. Se separó el ARN total por electroforesis (6 μg /carril) en un gel de agarosa con formaldehído (Sambrook *et al.*, 1989) a 60 V y se transfirieron a una membrana de Hybond XL (Amersham, Buckinghamshire, UK) con una cámara de vacío (BIO-RAD) de acuerdo con las instrucciones descritas por el fabricante. Se fijó el ARN a las membranas con luz UV (Stratalinker) y se hibridó con un fragmento de 2 Kpb de cDNA de *cat-3*. El fragmento se obtuvo del plásmido pSM5 (ver apéndice) por digestión con EcoRI/NcoI y se marcó radiativamente con el estuche Random Prime DNA Labeling Kit (Boehringer, Mannheim, Germany).

Del medio inoculado con los conidios de las cepas *wc-1* y *wc-2* se tomaron 10 ml y se colocaron en matraces de 25 ml. Después de crecer 16 h a 30°C y 150 rpm bajo luz tenue, se les adicionó 5 mM de paraquat o 0.5 mM de H₂O₂ y se incubaron por 3 h. Las muestras se procesaron siguiendo el protocolo descrito anteriormente.

Determinación de los inicios de la transcripción.

Se sintetizó el oligonucleótido PE114 (5' CCTCCTTCAACCTCTGACGGGCG 3') que hibrida 114 pb abajo del ATG del ARNm de *cat-3*. Se marcaron 20 pmoles del oligonucleótido con 2 μl de γ ATP³² (6000 Ci/mmol) en presencia de T4 cinasa (GIBCO) en un volumen final de 20 μl que se ajustó con H₂O previamente tratada con dietilpirocarbonato (DEPC). La mezcla se dejó incubando 1 h a 37°C y se filtró en una columna NENSORB™20 (Dupond) según las instrucciones del fabricante. El filtrado se secó en el SAVANT y se resuspendió en 10 μl de H₂O tratada con DEPC. Los inicios de transcripción se determinaron por medio del ensayo de extensión de oligonucleótidos "primer extensión". Para ello se hibridaron 0.5 pmoles del oligonucleótido con 5 μg de poliA o 20 μg del ARN total obtenido de los micelios que estuvieron en presencia o no de 5 mM paraquat por 1 h. A la mezcla de hibridación se le adicionó, NaCl y Tris-HCl 1M, pH 8, a una concentración final de 188 mM

y 27 mM respectivamente. Se adicionó H₂O tratada con DEPC para completar un volumen final de 24.42 µl. La mezcla se incubó a 95°C por 3 minutos y se dejó enfriar gradualmente. Cuando alcanzó los 42 °C, se le adicionaron 0.5 µl de ARNsin 100 U/µl (Promega), 7.2 µl de RT Buffer 5X (GIBCO), 3.7 µl de DTT 10 mM, 1µl de dNTP's 40 mM y 0.5 µl de Superscript Reverse Transcriptase 18 U/µl (GIBCO). Esta mezcla con volumen total de 37.52 µl se incubó 1h a 42 °C. Los fragmentos de ADN de la reacción, se precipitaron con 10 µl de acetato de amonio 10 M, pH4 y 100 µl de ETOH absoluto, toda la noche a -70 °C. Al día siguiente, se recuperaron los fragmentos del ADN mediante centrifugación a 14,000 rpm, 15 minutos a 4 °C. El sobrenadante se retiró y el botón se lavó dos veces con 100 µl de ETOH al 70%. El botón seco se resuspendió en 4 µl de H₂O tratada con DEPC y 4 µl de Stop Solution del Kit de Sequenase. Para analizar los fragmentos amplificados, se hizo una reacción de secuencia utilizando el oligonucleótido PE114 marcado con S³⁵ y el plásmido pCat-1 (que contiene la secuencia del gen de *cat-3*) y se corrió en un gel. En otro carril paralelo, se cargaron 4 µl de la muestra con los fragmentos de la reacción de *primer extensión* y se obtuvo la autorradiografía.

Fusiones del promotor de *cat-3* con el gen de la β -galactosidasa.

Se diseñaron cuatro oligonucleótidos. Al primero, que hibrida con el ATG del gen *cat-3* se le adicionó un sitio BglIII (5'GCATGGTATTGTGTTGTCTGG3') y se denominó lacZ1. Los otros tres, que son complementarios a las secuencias localizadas en las posiciones -250, (5'CCCCAGATCTGTCAGTCTGTCGGTCTG3'); - 537, (5'CCCGAGATCTAGTGCAACTGTACTCC3') y -1038, (5'CCCCAGATCTACCTTGAGATTAGCACTCC3') se denominaron lacZ4, lacZ2 y lacZ3 respectivamente. Se amplificaron los fragmentos del promotor con la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando el oligonucleótido lacZ1 junto con lacZ-2. Lo mismo se hizo con lacZ3 y con lacZ4. Los fragmentos resultantes de 250, 537 y 1038 pb se clonaron en los sitios SmaI/BglIII del plásmido pDE1 (Ebbole, 1990) para producir los plásmidos pSM250, pSM500 y pSM1000, respectivamente (ver apéndice). La secuencia del plásmido pSM500 y del pSM1000 mostró que se mantuvo el marco de lectura en ambos eventos de fusión. Sin embargo, la secuencia de dos clonas del plásmido pSM250 (pSM250T4 y la pSM250T7) indicó la pérdida de dos nucleótidos por lo que el marco de lectura quedó alterado (ver apéndice).

Las transformaciones de la cepa *his-3* (6103, FGSC) se realizaron siguiendo el método descrito en la segunda publicación de esta tesis).

Resultados

cat-3 es un gen fotoinducible

El análisis del ARNm de *cat-3* en los micelios que fueron iluminados después de crecer en la oscuridad, mostró una inducción transitoria, que es similar a la de otros genes fotorregulados (Fig. 8A). Se observó una acumulación del mensajero de *cat-3* a los 20 minutos de iluminación que disminuye a los 40 minutos y alcanza los niveles basales a los 60 minutos (Fig. 8B).

Los factores white collar regulan la inducción de *cat-3* con la luz

Los micelios de las mutantes *wc-1* y *wc-2* presentaron muy poco transcrito de *cat-3*, aún durante la exposición a la luz (Fig. 8C y D). Sin embargo, cuando se trató el micelio con paraquat o con H₂O₂, la inducción de *cat-3* en las cepas *white collar* fue similar a la cepa silvestre (Fig. 9). Estos datos demuestran que la fotoinducción de *cat-3* es regulada por los factores de transcripción WC-1 y WC-2 y que la inducción por paraquat y H₂O₂ es independiente de estos factores.

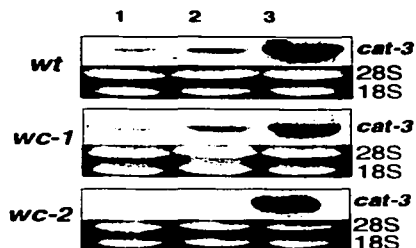


FIG. 9. Los factores WC-1 y WC-2 no regulan la inducción de *cat-3* por H₂O₂ o paraquat. Acumulación del mensajero de *cat-3* en las cepas *wt*, *wc-1* y *wc-2*. El ARN total se extrajo del micelio en crecimiento (1), tratado con 1 mM de H₂O₂ (2) o con 5 mM de paraquat (3). Como control de carga se muestran los ARN ribosomales 18S y 28S teñidos con bromuro de etidio.

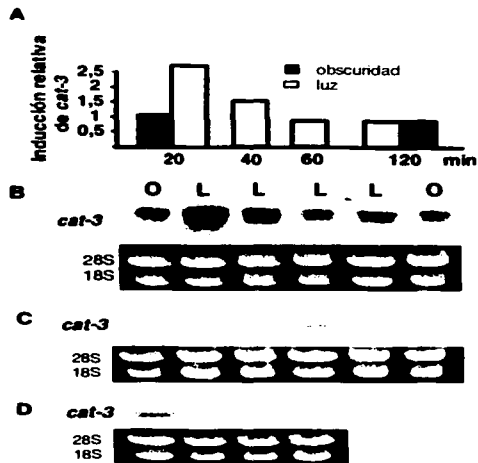


FIG 8. Inducción de *cat-3* con la luz a través de WC-1 y WC-2. Los micelios se crecieron en medio líquido por 21 h en oscuridad y después se iluminaron según los tiempos indicados (L). Los cultivos control se mantuvieron en oscuridad (O). Densitometría de las bandas de ARNm de *cat-3* de la cepa *Wt*. Los valores son relativos al primer control (A). *Northems* que muestran la acumulación del mensajero de *cat-3* y los ARNr respectivos teñidos con bromuro de etidio como control de carga de las cepas *Wt* (B), *wc-1* (C) y *wc-2* (D).

Determinación de los sitios de inicio de la transcripción de *cat-3*

Se determinaron los sitios de inicio de la transcripción con la técnica de "primer extension". Se probaron tres oligonucleótido que hibridan en diferentes posiciones con el ARN mensajero de *cat-3*: uno en el ATG y los otros dos a +46 pb y +114 pb del ATG. Sin embargo, sólo el oligonucleótido de la posición 114 en presencia de poliA⁺ generó varios productos. Dos de ellos, los correspondientes a los extremos 5' amplificados hasta los sitios -87 y -36 pb del ATG, mostraron una mayor intensidad por lo que los consideramos sitios preferenciales para el inicio de la transcripción de la *cat-3*. También se observaron dos bandas tenues en los sitios -11 y -250 pb (Fig 10A).

Cuando se utilizó ARN total, en lugar de poliA⁺, no se obtuvieron productos. Sin embargo, con ARN total de micelio tratado con 5 mM de paraquat, se observaron los mismos sitios preferenciales de inicio de la transcripción, el -87 y el -36, además se intensificó el sitio -250 (Fig. 10B).

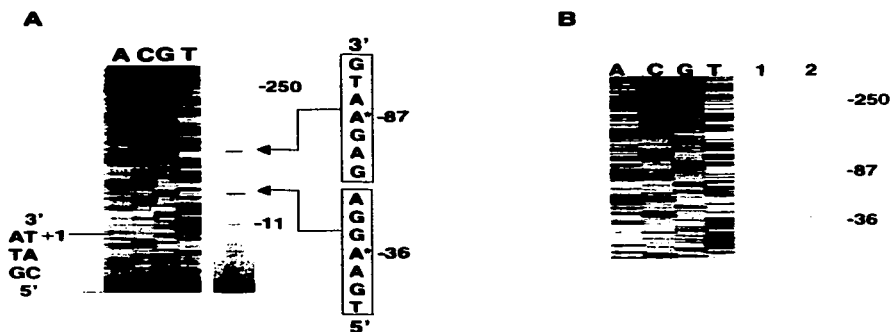


FIG. 10. Sitios de inicio de la transcripción de *cat-3*. El "primer extension" con poliA⁺ mostró dos sitios de inicio preferenciales, uno a -36 y otro a -87 (A). El ensayo realizado con ARN total no dio señal (1B) pero cuando éste se obtuvo de micelios tratados con 5 mM de paraquat, se detectaron los sitios preferenciales y se intensificó el sitio de -250 pb.

Análisis del promotor de *cat-3*

A diferencia del promotor de *cat-1*, el promotor de *cat-3* presenta cuatro pares de secuencias APE (Fig. 11A). Estas son secuencias típicas de los promotores regulados con luz en *Neurospora crassa* y no se han encontrado en el promotor de otros genes que no son fotoinducibles. En los primeros 500 pb antes del ATG están los cuatro sitios APE del promotor así como las cajas GATA. Dentro de los primeros 250 pares de bases antes del ATG (Fig. 11C) se presenta una organización similar a la del mínimo promotor de *al-3* que es fotoinducible, cajas CAAT, cajas GATA y un sitio APE. Este gen codifica para la geranil geranil pirofosfato sintasa (Carattoli, *et al.*, 1999), (Fig. 11B). En el promotor de *cat-3*, también hay secuencias conservadas con las que interaccionan los factores de transcripción como: HSF (Fernandes *et al.*, 1994), STRE (Schueller *et al.*, 1994) y AP-1 (Abate *et al.*, 1990), (Tabla 5). Estos factores regulan la expresión de varios genes que responden a diferentes condiciones de tensión (Schueller *et al.*, 1994; Fernandes *et al.*, 1994).

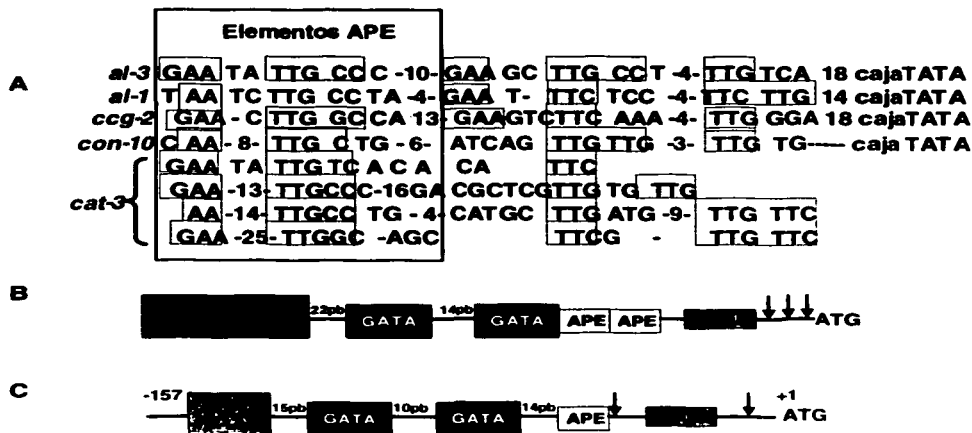


FIG. 11. Posibles secuencias del promotor para la regulación de *cat-3* con luz. Las secuencias APE, que sólo están conservadas en los genes foto regulados, están enmarcadas con un rectángulo (A). Se muestran también las cajas conservadas en el mínimo promotor de *al-3* que es fotoinducible (B) y una organización similar en un fragmento del promotor de *cat-3* (C). Las flechas indican los sitios de inicio de la

Para analizar en detalle el promotor, se hicieron tres construcciones: una con 250 pb antes del ATG (pSM250), otra con 543 pb (pSM500) y la última con 1038 (pSM1000), fusionadas al gen de la β -galactosidasa (*lacZ*) como proteína reportera (ver apéndice). La secuencia de las construcciones mostró que los ATG de los plásmidos pSM500 y pSM1000 quedaron en marco con el gen *lacZ*. Sin embargo, las dos clonas de pSM250, la pSM250T4 y la pSM250T7, que se secuenciaron, perdieron el marco debido a la pérdida de dos bases.

Con las construcciones pSM500 y pSM1000 se transformó la cepa *his-3* (FGSC 6103). La recombinación homóloga del gen *his-3* truncado en el extremo amino-terminal de los plásmidos con el locus *his-3* de una cepa que presenta una mutación puntual en el extremo carboxilo terminal permitió seleccionar las cepas transformadas debido a la pérdida de la auxotrofia. Éstas, se resembraron 3 veces para obtener los homocariotos.

El análisis de las cepas transformadas permitirá determinar si el fragmento del promotor contenido entre los -500 y -1000 pb del promotor, se requiere para la inducción de *cat-3* con la luz y las diferentes condiciones de tensión. Esperamos que algunas secuencias dentro de los 500 pb antes del ATG sean indispensables para la regulación de *cat-3* con la luz.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

DISCUSIÓN GENERAL

Las catalasas monofuncionales grandes de *Neurospora crassa*

Los genes *cat-1* y *cat-3* codifican para dos catalasas monofuncionales grandes, la CAT-1 y la CAT-3, respectivamente. El análisis filogenético de las catalasas monofuncionales muestra que las catalasas compuestas de subunidades grandes (mayores de 80 kD) están presentes sólo en bacterias y en hongos y se agrupan en un clado diferente al de las catalasas constituidas por subunidades pequeñas (50-65 kDa) (Klotz *et al.*, 1997; Johnson *et al.*, 2002). El tamaño de las catalasas grandes es el resultado de la extensión de 40-70 residuos en el extremo amino-terminal y la adición de un dominio del tipo flavodoxina de 150 residuos en el extremo carboxilo-terminal (Klotz *et al.*, 1997). Las catalasas pequeñas como la de bovino y la humana tienen la capacidad de unir NADPH en el extremo carboxilo terminal de cada subunidad. En las catalasas grandes, la presencia del dominio tipo flavodoxina impide la interacción del NADPH con las subunidades (Kirkman *et al.*, 1984; Jouve *et al.*, 1989).

La CAT-1 y CAT-3 son resistentes a la luz, la temperatura, el pH y los agentes desnaturizantes (Díaz *et al.*, 2001). Además, ambas enzimas tienen como grupo prostético una clorina en vez del ferro-protohemio IX (Jacob y Orme-Johnson, 1979; Lledías *et al.*, 1998), toleran concentraciones molares de H₂O₂ y muestran una menor sensibilidad a la inactivación por azida (Díaz *et al.*, 2001; Díaz y Hansberg, resultados no publicados). Estas características de las catalasas grandes aseguran una mayor protección antioxidante en los micro-organismos expuestos a diferentes condiciones de tensión.

La secuencia de proteína de la CAT-1 y la CAT-3 presenta sólo un 36% de identidad entre ellas. Comparten un mayor porcentaje de identidad (60%) con sus homólogos de otros hongos, que entre ellas mismas. Esto también se observa entre las Cat-A y Cat-B de *Podospora anserina*, *Aspergillus nidulans* (Navarro *et al.*, 1996; Kawasaki *et al.*, 1997), *Aspergillus fumigatus* (Calera *et al.*, 1997) e *Histoplasma capsulatum* (Johnson *et al.*, 2002). El análisis filogenético muestra que el clado que contiene exclusivamente catalasas monofuncionales grandes se divide en dos subclados: el de las CAT-A, en el que está la CAT-1 de *N. crassa* y en donde predominan las catalasas bacterianas y el de las CAT-B en el que se localiza la CAT-3 y la mayoría de las catalasas de hongos (Johnson *et al.*, 2002).

**FALTA
PAGINA**

81

etanol o en una alta concentración de NaCl. Esto sugiere que cada una de ellas desempeña una función específica en el hongo.

Regulación de *cat-3* con la luz

La inducción de los genes fotoinducibles en *N. crassa* es transitoria. Los genes *bli-3* y *bli-4* (inducidos con la luz azul) (Somer *et al.*, 1989), *con-5* y *con-10* (genes de la conidiación); *al-1*, *al-2* y *al-3* (fitoeno deshidrogenasa, fitoeno sintasa y geranil-geranil pirofosfato sintasa, respectivamente) (Nelson *et al.*, 1989; Schmidhauser *et al.*, 1990); *frq* (oscilador del ciclo circadiano), *ccg-4* y *ccg-6* (genes regulados por el ciclo circadiano) y *wc-1* y *wc-2* (factores de transcripción) pertenecen a los genes de regulación temprana. La inducción se da en los primeros minutos de la exposición a la luz azul, alcanza un máximo entre 20-30 minutos y después decrece. Este mismo comportamiento se observó en la acumulación del mensajero *cat-3*. De manera similar a los otros genes inducidos con la luz, la fotoinducción de *cat-3* depende de los factores de transcripción WC-1 y WC-2. En cambio, la inducción de *cat-3* con H₂O₂ y con paraquat es independiente de estos factores.

El fragmento de 250 pb antes del ATG del promotor de *cat-3* contiene cuatro posibles elementos para la fotorregulación del gen que están organizados de manera similar en el promotor mínimo de *al-3* (Carattoli *et al.*, 1994). Ambos incluyen secuencias APE, cajas GATA y CCAAT. Sin embargo, en el caso de la *cat-3*, estas cajas son GGATA y no HGATA (donde H puede ser C, A o T).

El factor de transcripción AREA que tiene dedos de zinc y pertenece a la clase cuatro, a la que también pertenecen los WC, sólo pueden interaccionar con las cajas HGATA (Ravagnani *et al.*, 1997). A diferencia de otros factores de la misma clase (como AREA, GLEN3 y NIT2), el WC-1 y el WC-2 tienen la característica inusual de que el asa de los dedos de zinc está formada por 18 aminoácidos en lugar de 17. Además, el residuo de leucina hidrofóbico, responsable de la interacción con las cajas HGATA, está sustituido en el WC-1 y el WC-2 por un residuo de ácido glutámico que es hidrofílico (Ballario *et al.*, 1996; Linden y Macino, 1997). Posiblemente, las modificaciones en los dedos de zinc de WC-1 y de WC-2 permiten la unión de estos factores a las cajas GGATA. Sería interesante determinar si efectivamente dicha interacción se lleva a cabo, analizar con las construcciones pSM-250, pSM-500 y pSM-1000 las regiones en donde se localizan las secuencias responsables de los diferentes tipos de regulación que presenta el gen *cat-3*. Además, sería también importante determinar si las cajas HSF, STRE y AP-1 del promotor son funcionales.

El gen *cat-3* es el primer gen de catalasa fotoinducible encontrado en hongos. En plantas, las catalasas Cat3 de maíz (Redinbaugh *et al.*, 1990); CAT2 (Zhong *et al.*, 1994) y CAT3 (Zhong y McClung, 1996) de *Arabidopsis thaliana* y Cat-1 de *Nicotiana plumbaginifolia* (Willekens *et al.*, 1994) se inducen con la luz.

La CAT-3, el hemo y sus modificaciones.

La CAT-1 se oxida *in vitro* en presencia de 1O_2 (Lledías *et al.*, 1998) e *in vivo* durante la germinación de los conidios (Lledías *et al.*, 1999), generando isoformas más ácidas y con una mayor movilidad electroforética. La CAT-3 se modifica *in vivo* en el micelio expuesto a un choque térmico en presencia del aire e *in vitro* cuando se expone a una reacción de fotosensibilización en la que se produce el 1O_2 . Sin embargo, el cambio en la movilidad electroforética observado en la CAT-3 oxidada fue mucho menor que el de la CAT-1 (primera publicación en este trabajo). También se observa unas isoformas más ácidas en las catalasas de diversos organismos expuestas al 1O_2 (Lledías *et al.*, 1998; Lledías y Hansberg, 1999).

Los estudios de la CAT-1 demuestran que las isoformas son el resultado de la oxidación del hemo (Lledías *et al.*, 1998). Aun cuando la causa de la modificación en la CAT-3 no ha sido estudiada en detalle, las características de la proteína sobreexpresada en *E.coli*, sugiere que también en este caso el hemo está relacionado. La CAT-3 sobreexpresada tiene una movilidad electroforética que es diferente a la CAT-3 extraída de *N. crassa* y además, es fotosensible (Michan, Lledías y Hansberg, datos no publicados). Las catalasas como la humana, la de bovino, la de maíz o la de girasol son fotosensibles, a diferencia de la Cat-1 y la Cat-3 que no pierden actividad aún exponiéndolas a la luz intensa por largos periodos (Lledías *et al.*, 1998; Lledías y Hansberg, datos no publicados).

Procesamiento y secreción de la CAT-3

La CAT-3 se secreta al medio al igual que las catalasas homólogas de otros hongos. La actividad de la CAT-3 se detectó en el medio de cultivo sólido y también en un medio líquido en el que creció la cepa silvestre. Sin embargo, la CAT-3 secretada representó sólo una pequeña fracción (<3%) de la actividad determinada en los extractos celulares (datos no mostrados). Esto y el que únicamente un porcentaje bajo (5-10%) de la CAT-3 tenga un amino terminal procesado, sugieren que sólo una pequeña fracción de la CAT-3 se procesa y se secreta. La mayoría de la CAT-3 se encuentra en la fracción soluble y está asociada con pared celular (Montes de Oca, 1999).

El extremo amino terminal de la fracción de CAT-3 que se secreta, posiblemente se procesa de forma similar a la Cat-B de *A. fumigatus* (Calera *et al.*, 1997). El corte de una peptidasa elimina los primeros 18 aminoácidos y una endopeptidasa tipo-KEK2 sustrae los 13 residuos siguientes.

Tomando en cuenta que la actividad extracelular de CAT-3 aumenta conforme el cultivo avanza en su crecimiento (datos no mostrados) y que sólo una pequeña fracción de la CAT-3 se secreta, sería interesante conocer en detalle cómo se regula el procesamiento y la secreción de la enzima y determinar si este tipo de regulación desempeña un papel importante en la fisiología del hongo.

El gen *cat-1* tiene dos codones de inicio de la traducción en marco. El alineamiento con los genes homólogos y el análisis del uso de codones sugiere que el segundo inicio es el correcto. Además, sólo el segundo codón de inicio está en un contexto de la secuencia consenso para los sitios de inicio de la transcripción. El amino terminal de la CAT-1 no muestra la secuencia de un péptido señal, sin embargo, el amino terminal de esta catalasa también se procesa (Díaz y Hansberg, datos no publicados). Esta catalasa también se encuentra asociada a la pared celular, que en este caso es de los conidios (Montes de Oca, 1999).

La ausencia de una catalasa extracelular en la mutante sin CAT-3, demuestra que ésta es la única catalasa que *N. crassa* secreta al medio. Se ha demostrado la secreción de otras catalasas, como la CAT-B de *A. fumigatus* y la CAT-1 de *C. purpurea* (Calera *et al.*, 1997; Garre *et al.*, 1998). La secreción de la CAT-3 puede estar relacionada con las concentraciones elevadas de H_2O_2 que se pueden producir a partir del O_2^- que genera la NADPH oxidasa de las plantas (Doke *et al.*, 1996), ya que en condiciones silvestres *N. crassa* crece en sustratos vegetales.

La pérdida de la actividad de CAT-3 es compensada por otras enzimas

N. crassa tiene varias enzimas que participan en la detoxificación del H_2O_2 . Sin embargo, la ausencia de la actividad de CAT-3 en la cepa mutante no puede ser compensada por la CAT-1 o por otras actividades de catalasa, aún en condiciones de tensión oxidativa. La CAT-1 y CAT-3 se expresan durante el ciclo de vida asexual de manera diferente y, en las condiciones de tensión en las que se induce la CAT-3, la CAT-1 no incrementa.

Además de las dos catalasas monofuncionales grandes, el hongo tiene una catalasa monofuncional pequeña (CAT-4) localizada probablemente en los peroxisomas y una catalasa-peroxidasa (CAT-2) que se expresa en la hifas en donde se observa vacuolización como las de la fase de crecimiento

estacionario tardío, las del micelio adherido o en las bases de las hifas aéreas conidantes (Peraza y Hansberg, 2002). Además, en el genoma de *N. crassa* se han encontrado secuencias que codifican para tres peroxirredoxinas, una glutatión peroxidasa, una citocromo *c* peroxidasa y probablemente otras peroxidases. Sin embargo, a diferencia de las catalasas que funcionan en concentraciones milimolares de H_2O_2 , éstas enzimas son eficientes únicamente a bajas concentraciones de H_2O_2 .

La falta de compensación de la actividad de CAT-3 se manifiesta en la sensibilidad que mostraron las mutantes *cat-3* al H_2O_2 . Mientras que el 90% de las colonias Wt lograron sobrevivir al tratamiento con 10 mM de H_2O_2 durante 10 minutos, el 70% de las colonias mutantes no lo resistieron.

En conclusión, a pesar de la redundancia de enzimas que participan en la detoxificación del H_2O_2 , ninguna de ellas es capaz de compensar la pérdida de la actividad de la CAT-3 durante el crecimiento debido a que son más ineficientes, presentan otra localización celular o se expresan en diferentes condiciones o/y estructuras celulares.

Otros sistemas antioxidantes se inducen en la mutante *cat-3*

En respuesta al estado hiperoxidante y a la falta de compensación de la actividad de catalasa, se esperaba que otros sistemas antioxidantes se indujeran en la mutante *cat-3*. Los carotenos son compuestos que tienen una función antioxidante. Aquellos que contienen más de once enlaces dobles conjugados son muy eficientes para inactivar el 1O_2 y evitar el daño fotooxidativo (Thomas *et al.*, 1981). Los carotenos se sintetizan en *N. crassa*: durante el crecimiento en respuesta a la luz azul, a través de los factores de transcripción WC-1 y WC-2, y de manera constitutiva durante la conidiación independiente de la luz y de los factores WC (Rau y Mitzka-Schnabel, 1985; Bramley y Mackenzie, 1988).

Ambos tipos de inducción están relacionados con la producción de 1O_2 y otras EOR. La iluminación con luz azul de los compuestos intracelulares fotoactivos, como las flavinas, promueve las reacciones de fotosensibilización en las que se produce 1O_2 (Halliwell y Gutteridge, 1999). Durante la conidiación se observan las isoformas oxidadas de la CAT-1. Las isoformas oxidadas pueden ser un marcador intracelular del 1O_2 (Lledías y Hansberg, 2000). Schroeder y Johnson (1995) demostraron que el 1O_2 induce la síntesis de los carotenos en *Phaffia rhodozyma*. Los carotenos de *Sclerotium rolfsii* (Georgiui *et al.*, 2001) también se inducen por una tensión oxidativa durante la formación de los esclerosios.

Además, algunas EOR como el O_2^- y el H_2O_2 pueden generar de manera espontánea 1O_2 en las células. De hecho el H_2O_2 es la principal fuente del 1O_2 en la oscuridad (revisado en Lledías y Hansberg, 2000). Las colonias Wt de *N. crassa* que crecen en la oscuridad prácticamente no tienen carotenos y éstos se inducen en presencia de la luz. Sin embargo, las cepas mutantes en *cat-3*, crecidas en oscuridad, muestran un contenido elevado de carotenos. Estos resultados son consistentes con la generación del 1O_2 a partir del H_2O_2 y la inducción de la síntesis de carotenos debido al 1O_2 . El contenido de carbonilos en la Wt iluminada por 1 h aumenta tres veces. Esto indica que la fotosensibilización genera condiciones hiperoxidantes.

Efectos de la ausencia de la CAT-3 en el desarrollo asexual de *N. crassa*

La filtración y exposición del micelio vegetativo al aire induce la conidiación de *N. crassa*. Se ha considerado que la desecación es la que dispara el proceso de conidiación. Sin embargo, de todo el micelio filtrado, sólo se diferencia el que se mantiene en contacto directo con el aire. La adhesión del micelio, primer paso del proceso de conidiación, se produce a los pocos minutos de la exposición al aire y está relacionada con la secreción y polimerización de un carbohidrato en la pared celular que funciona como cemento de unión entre las hifas (Hansberg, datos no publicados). La capa del micelio adherido también se forma en cultivos líquidos no agitados, condiciones en las que no se puede desecar el micelio.

Por otro lado, en las masas de micelio no expuestas al aire o en presencia de antioxidantes el micelio no se adhiere, lo cual sugiere que se requiere una tensión oxidativa para la adhesión de las hifas. Sólo en el micelio adherido se ha detectado la oxidación y la degradación de proteínas y de algunas enzimas específicas (Toledo *et al.*, 1994). Además, el micelio adherido sirve de sustrato para el desarrollo de las hifas aéreas, la siguiente estructura diferenciada del ciclo asexual. Las hifas de las mutantes sin *cat-3* se tienden a adherir unas con otras durante el crecimiento en cultivos líquidos y muestran una mayor oxidación de proteínas con la aereación.

Según nuestra hipótesis, el estado hiperoxidante en el micelio adherido de la mutante debería conducir a la formación de un mayor número de hifas aéreas. La mutante de *cat-3* produce seis veces más micelio aéreo y más conidios que la Wt.

Algunas cepas mutantes de catalasa en otros hongos no presentan efectos relacionados con los procesos de diferenciación (Navarro *et al.*, 1996; Kawasaki *et al.*, 1997; Calera *et al.*, 1997; Garre *et al.*, 1998). Sin embargo, la ausencia de la Cat-B en la bacteria *Streptomyces coelicolor* produce

osmosensibilidad y afecta la producción del micelio aéreo (Cho, *et al.*, 2000). La mutante *sod-1* que carece de la SOD Cu-Zn (Chary *et al.*, 1994), tiene un fenotipo parecido al de la mutante *cat-3*. La cepa mutante *sod-1* presenta más carotenos, la adhesión de las hifas es mayor y también se producen más hifas aéreas y conidios (Peraza y Hansberg, datos sin publicar). A diferencia de la *cat-3*, la *sod-1* es más sensible al paraquat y es resistente al H₂O₂.

La eliminación del gen que codifica para la proteína G α , de *N. crassa* produce el siguiente fenotipo: disminuye el nivel del AMPc, el crecimiento apical y la acumulación de los carotenos, aumenta la tolerancia al choque de calor y al tratamiento con H₂O₂ y produce menos hifas aéreas pero más conidios. Un fenotipo similar lo presenta la mutante deficiente de la adenilato ciclasa. Las cepas mutantes que tiene la proteína G α , permanentemente activa muestran un incremento del AMPc, bajo contenido de carotenos, un crecimiento apical similar al de la Wt, una disminución de la tolerancia al choque de calor y al tratamiento con H₂O₂ y un aumento en la producción del micelio aéreo, pero una disminución en el número de conidios (Yang y Borkvich, 1998).

Lo anterior sugiere que el nivel del AMPc está relacionado con la señal de carbono reducido. Un nivel alto de AMPc podría indicar suficiencia de carbono reducido, lo que se traduce en una menor protección antioxidante (menos carotenos, menor termotolerancia y menor sensibilidad al H₂O₂), un mayor crecimiento y menor diferenciación. Un nivel bajo de AMPc podría indicar una limitación de carbono reducido y traducirse en una mayor protección antioxidante, menor crecimiento y una mayor diferenciación celular. La determinación de los niveles de AMPc durante el ciclo asexual de la mutante *cat-3* permitirían entender un poco más sobre dichas relaciones.

En este trabajo demostramos que las catalasas monofuncionales grandes juegan un papel específico en el mantenimiento del equilibrio REDOX intracelular y específicamente la función de la CAT-3 está relacionada con el proceso de diferenciación asexual de *N. crassa*.

BIBLIOGRAFÍA

- Abate, C.L., Patel, F.J., Rauscher, 3rd, y Curran, T. (1990) Redox regulation of Fos and Jun DNA-binding activity in vitro. *Science* **249**: 1157-1161.
- Adachi, K., Fujiura, Y., Mayumi, F., Nozuhara, A., Sugiu, Y., Sakanashi, T., Hidaka, T. y Toshima H. (1993) A deletion of mitochondrial DNA in murine doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Biochem Biophys Res Commun* **15**: 945-951.
- Aguirre, J. y Hansberg, W. (1986) Oxidation of *Neurospora crassa* glutamine synthetase. *J Bacteriol* **166**: 1040-1045.
- Aguirre, J., Rodríguez, R. y Hansberg, W. (1989) Oxidation of *Neurospora crassa* NADP-specific glutamate dehydrogenase by activated oxygen species. *J Bacteriol* **171**: 6243-6250.
- Ballario, P., Vittorioso, P., Magrelli, A., Talora, C., Cabibbo, A. y Macino, G. (1996) White collar-1, a central regulator of blue light responses in *Neurospora*, is a zinc finger protein. *EMBO J* **15**: 1650-1657.
- Ballario, P., Talora, C., Galli, D., Linden, H. y Macino, G. (1998) Roles in dimerization and blue light photoresponse of PAS and LOV domains of *Neurospora crassa* white collar proteins. *Mol Microbiol* **29**: 719-729.
- Berlett, B.S. y Stadtman, E.R. (1997) Protein oxidation in aging, disease and oxidative stress. *J Biol Chem* **272**: 20313-20316.
- Bowler, C., Van Montagu, M. y Inzé, D. (1992) Superoxide dismutase and stress tolerance. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **43**: 83-116.
- Bramley, P.M. y Mackenzie, A. (1988) Regulation of carotenoid biosynthesis. *Curr Top Cell Regul* **29**: 291-343.
- Breimer, L.H. (1988) Ionizing radiation-induced mutagenesis. *Br J Cancer* **57**: 6-18.
- Cagnoli, M.C., Atabay, C., Kharlamova, E. y Manev, H. (1995). Melatonin protects neurons from singlet oxygen-induced apoptosis. *J Pineal Res* **18**: 222-226.
- Calera, J.A., Paris, S., Monod, M., Hamilton, A.J., Debeauvais, J.P., Diaquin, M., López-Medrano R., Leal, F. y Latge, J.P. (1997) Cloning and disruption of the antigenic catalase gene of *Aspergillus fumigatus*. *Infect Immun* **65**: 4718-4724.
- Carattoli, A., Cogoni, C., Morelli, G. y Macino, G. (1994) Molecular characterization of upstream regulatory sequences controlling the photoinduced expression of the albino-3 of *Neurospora crassa*. *Mol Microbiol* **13**: 787-795.
- Chary, P. y Natvig, D.O. (1989) Evidence for three differentially regulated catalase genes in *Neurospora crassa*: effects of oxidative stress, heat shock, and development. *J Bacteriol* **171**: 2646-2652.
- Cho, Y.H., Lee, E.J. y Roe, J.H. (2000) A developmentally regulated catalase required for proper differentiation and osmoprotection of *Streptomyces coelicolor*. *Mol Microbiol* **35**: 150-160.
- Crosthwaite, S.K., Loros, J.J. y Dunlap, J.C. (1995) Light-induced resetting of a circadian clock is mediated by a rapid increase in frequency transcription. *Cell* **81**: 1003-1012.
- Degli-Innocenti, F., Pohl, U. y Russo, V.E.A. (1983) Photoinduction of protoconidia in *Neurospora crassa* by blue light. *Photochem and Photobiol* **37**: 49-51.
- Demple, B. y Amábilis-Cuevas, C.F. (1991) Redox redux: the control of oxidative stress responses. *Cell* **67**: 837-839.
- Díaz, A., Rangel, P., Montes de Oca, Y., Liedías, F. y Hansberg, W. (2001) Molecular and kinetic study of Catalase-1, a durable large catalase of *Neurospora crassa*. *Free Radic Biol Med* **31**: 1323-1333.
- Dickinson, D.A. y Forman H.J. (2002) Cellular glutathione and thiols metabolism. *Biochem Pharmacol* **64**: 1019-1026.
- Doke N, Miura Y, Sanchez LM, Park HJ, Noritake T, Yoshioka H, Kawakita K. (1996) The oxidative burst protects plants against pathogen attack: mechanism and role as an emergency signal for plant bio-defence--a review. *Gene* **179**:45-51.
- Ebbole, D. J. (1990) Vectors for construction of translational fusions to beta-galactosidase. *Fungal Genet News* **37**: 15-16.
- Fernandes, M., Xiao, H. y Lis, J.T. (1994) Fine structure analyses of the *Drosophila* and *Saccharomyces* heat

- shock factor-heat shock element interactions. *Nucleic Acids Res* **22**: 167-173.
- Filomeni, G., Rotilio, G. y Ciriolo, M.R. (2002) Cell signalling and the glutathione redox system. *Biochem Pharm* **64**: 1057-1064.
- Gamaley, I.A. y Kluybin, I.V. (1999) Role of reactive oxygen species: signaling and regulation of cellular functions. *Review Cytology* **188**: 203-255.
- Garcia, J.J., Reiter, R.J., Ortiz, G.G., Oh, C.S., Tang, L., Yu, B.P. y Escames, G. (1998) Melatonin enhances tamoxifen's ability to prevent the reduction in microsomal membrane fluidity induced by lipid peroxidation. *J Membr Biol* **162**: 59-65.
- Garre, V., Müller, U. y Tudzynski, P. (1998) Cloning, characterization, and targeted disruption of *cpcat1*, coding for an in planta secreted catalase of *Claviceps purpurea*. *Mol Plant Microb Interact* **11**: 772-783.
- Georgiou, C.D., Zervoudakis, G., Tairis, N. y Komaros, M. (2001) β -carotene production and its role in sclerotial differentiation of *Sclerotium rolfsii*. *Fungal Genet Biol* **34**: 11-20.
- Goldberg, I. y Hochman, A. (1989) Purification and characterization of a novel type of catalase from the bacterium *Klebsiella pneumoniae*. *Biochim Biophys Acta* **991**: 330-336.
- Halliwel, B. y Gutteridge, M.C. (1999) Free radicals in Biology and Medicine, 3rd ed. Clarendon Press, Inglaterra pp. 936.
- Halliwel, B., Clement, M.V. y Long, L.H. (2000). Hydrogen peroxide in human body. *FEBS Lett* **466**: 10-13.
- Hansberg, W. y Aguirre, J. (1990) Hyperoxidant states cause microbial cell differentiation by cell insulation from dioxygen. *J Theor et Biol* **142**: 201-221.
- Hansberg, W., de Groot, H. y Sies, H. (1993) Reactive oxygen species associated with cell differentiation in *Neurospora crassa*. *Free Radic Biol Med* **14**: 287-293.
- Hansberg, W. (1996) A hyperoxidant state at the start of each developmental stage during *Neurospora crassa* conidiation. *Ciência e Cultura* **48**: 68-74.
- Henkle-Duhrsen, K., y Kampkötter, A. (2001) Antioxidant enzyme families in parasitic nematodes. *Mol Biochem Parasitol* **114**: 129-142.
- Hidalgo, E. y Demple, B. (1994) An iron-sulfur center essential for transcriptional activation by the redox-sensing SoxR protein. *EMBO J* **13**: 138-146.
- Irani, K., Xia, Y., Zweier, J.L., Sollott, S.J., Der, C.J., Fearon, E.R., Sundaresan, M., Finkel, T. y Goldschmidt-Clermont, P.J. (1997) Mitogenic signaling mediated by oxidants in Ras-transformed fibroblasts. *Science* **275**: 1649-1652
- Jacob, G.S. y Orme-Johnson, W.H. (1979) Catalase of *Neurospora crassa*. 2. Electron paramagnetic resonance and chemical properties of the prosthetic group. *Biochemistry* **18**: 2975-2980.
- Johnson, C.H., Klotz, M.G., York, J.L., Kruff, V. y McEwen, J.E. (2002) Redundancy, phylogeny and differential expression of *Histoplasma capsulatum* catalases. *Microbiol* **148**: 1129-1142.
- Jouve, H.M., Beaumont, F., Léger, I., Foray, J. y Pelmont, J. (1989) Tightly bound NADPH in *Proteus mirabilis* catalase. *Biochem Cell Biol* **67**: 271-277.
- Kagan, V.E., Shvedova, A., Serbinova, E., Khan, S., Swanson, C., Powell, R. y Packer, L. (1992) Dihydroliipoic acid: a universal antioxidant both in the membrane and in the aqueous phase. Reduction of peroxy, ascorbyl and chromanoxyl radicals. *Biochem Pharmacol* **44**: 1637-1649.
- Kawasaki, L., Wysong, D., Diamond, R. y Aguirre, J. (1997) Two divergent catalase genes are differentially regulated during *Aspergillus nidulans* development and oxidative stress. *J Bacteriol* **179**: 3284-3292.
- Kirkman, H.N. y Gaetani, G.F. (1984) Catalase: a tetrameric enzyme with four tightly bound molecules of NADPH. *Proc Natl Acad Sci*. **81**: 4343-4347.
- Klotz, M.G., Klassen, G.R. y Loewen, P.C. (1997) Phylogenetic relationships among prokaryotic and eukaryotic catalases. *Mol Biol Evol* **14**: 951-958.
- Lander, H.M. (1997) An essential role for free radicals and derived species in signal transduction. *FASEB J* **11**: 118-124.
- Linden, H. y Macino, G. (1997) White collar 2, a partner in blue-light signal transduction, controlling expression of light-regulated genes in *Neurospora crassa*. *EMBO J* **16**: 98-109.

**FALTA
PAGINA**

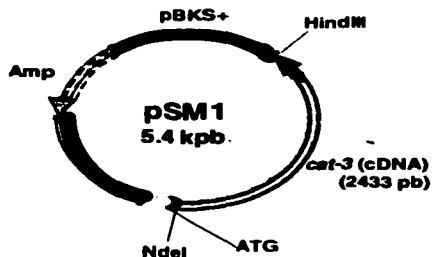
90

- Remacle, J., Raes, M., Toussaint, O., Renard, P. y Rao, G. (1995) Low levels of reactive oxygen species as modulators of cell function. *Mut Res* **316**: 103-122.
- Rhee, G.S., Kang, S.W., Chang T.S., Jeong W. y Kim, K. (2001) Peroxiredoxin, a novel family of peroxidases. *IUBMB Life* **52**: 35-41.
- Richter, C., Park, J.W. y Ames, B.N. (1988) Normal oxidative damage to mitochondrial and nuclear DNA is extensive. *Proc Natl Acad Sci USA* **85**: 6465-6467.
- Ruis, H. y Koller, F. (1997) Biochemistry, molecular biology, and cell biology of yeast and fungal catalases. En: *Oxidative stress and the molecular biology of antioxidant defenses*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. pp. 309-342.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. y Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Schmidhauser, T.J., Lauter, F.R., Russo, V.E.A. y Yanofsky, C. (1990) Cloning, sequence and photoregulation of *al-1*, a carotenoid biosynthetic gene of *Neurospora crassa*. *Mol Cell Biol* **10**: 5064-5070.
- Schroeder, W.A. y Johnson, E.A. (1995) Singlet oxygen and peroxy radicals regulate carotenoid biosynthesis in *Phaffia rhodozyma*. *J Biol Chem* **270**: 18374-18379.
- Schueler, C., Brewster, J. L., Alexander, M. R., Gustin, M. C. y Ruis, H. (1994) The HOG pathway controls osmotic regulation of transcription via the stress response element (STRE) of the *Saccharomyces cerevisiae* CTT1 gene. *EMBO J* **13**: 4382-4389.
- Scott, B.C., Arouma, O.I., Evans, P.J., O'Neill, C., Van der Vliet, A., Cross, C.E., Tristschler, H. y Halliwell, B. (1994) Lipoic and dihydrolipoic acid as antioxidants. A critical evaluation. *Free Radic Res* **20**: 119-133.
- Sen, C.K. y Packer, L. (1996) Antioxidant and redox regulation of gene transcription. *FASEB J* **10**:709-720.
- Seo, M.S., Kang, S.W., Kim, K., Baines, I.C., Lee, T.H. y Rhee, S. G. (2000) Identification of a new type of mammalian peroxiredoxin that forms an intramolecular disulfide as a reaction intermediate. *J Biol Chem* **275**: 20346-20354.
- Shaulian, E. y Karin, M. (2002) AP-1 as a regulator of cell life and death. *Nat Cell Biol* **4**: 131-136.
- Simontacchi, M., Galatro, A. y Puntarulo, S. (2001) El estrés oxidativo en las plantas. *Ciencia Hoy* **10** (60).
- Sommer, T., Chambers, J.A.A., Eberle, J., Lauter, F.R. y Russo, V.E.A. (1989) Fast light regulated genes of *Neurospora crassa*. *Nucleic Acids Res* **14**:5713-5723.
- Spector, A. (1991). The lens and oxidative stress. En: *Oxidative stress: oxidants and antioxidants*. Sies, H. (ed), Academic Press, Inglaterra, pp 529-557.
- Springer, M.L. (1993) Genetic control of fungal differentiation: the three sporulation pathways of *Neurospora crassa*. *BioEssays* **15**: 365-374.
- Stallings, W.C., Patridge, K. A., Strong, R. K. y Ludwig, M. L. (1984) Manganese and iron superoxide dismutases are structural homologs. *J Biol Chem* **259**: 10695-10699.
- Steinam, H. M. y Ely, B. (1990) Copper-Zinc superoxide dismutase of *Caulobacter crescentus*: cloning, sequencing, and mapping of the gene and periplasmic location of the enzyme. *J Bacteriol* **172**: 2901-2910.
- Stocker, R. y Frei, B. (1991). Endogenous antioxidant defences in human blood plasma. En: *Oxidative stress: oxidants and antioxidants*. Sies, H. (ed), Academic Press, Inglaterra, pp. 213-243.
- Storz, G., Tartaglia, L.A. y Ames, B.N. (1990) Transcriptional regulator of oxidative stress-inducible genes: direct activation by oxygen. *Science* **248**: 189-194.
- Sundaresan, M., Yu, Z.X., Ferrans, K.I. y Finkel, T. (1995) Requirement for generation of H₂O₂ for platelet derived growth factor signal transduction. *Science* **270**: 296-299.
- Suzuki, Y.J., Forman, H.J. y Sevanian, A. (1997) Oxidants as stimulators of signal transduction. *Free Radic Biol Med* **22**: 269-285.
- Thomas, S.A., Sargent, M.L. y Tuveson, R.W. (1981) Inactivation of normal and mutant *Neurospora crassa* conidia by visible light and near-UV: role of ¹O₂, carotenoid composition and sensitizer location. *Photochem Photobiol* **33**: 349-354.
- Toledo, I., Aguirre, J. y Hansberg, W. (1986) Aerial growth in *Neurospora crassa*: characterization of an experimental model system. *Exp Mycol* **10**: 114-125.
- Toledo, I. y Hansberg, W. (1990) Protein oxidation related to morphogenesis in *Neurospora crassa*. *Exp Mycol* **14**: 184-189.

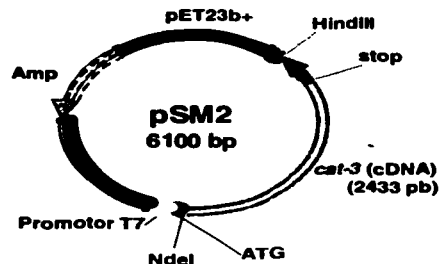
- Toledo, I., Noronha-Dutra, A.A. y Hansberg, W. (1991) Loss of NAD(P)-reducing power and glutathion disulfide excretion at the start of induction of aerial growth in *Neurospora crassa*. *J Bacteriol* **173**: 3243-3249.
- Toledo, I., Aguirre, J. y Hansberg, W. (1994) Enzyme inactivation related to a hyperoxidant state during conidiation of *Neurospora crassa*. *Microbiol* **140**: 2391-2397.
- Toledo, I., Rangel, P. y Hansberg, W. (1995) Redox imbalance at the start of each morphogenetic step of *Neurospora crassa* conidiation. *Arch Biochem Biophys* **319**: 519-524.
- Turian, G. (1977) Fungal differentiation. En: *Biotechnology and fungal differentiation*. Meyrath, J. y Bu'Lock, J.D. (eds), Academic Press, Inglaterra, pp.1-15.
- Willekens, H.C., Langebartels, C., T're, C., Van Montagu, M., Inze, D. y Van Camp, W. (1994) Differential expression of catalase genes in *Nicotiana plumbaginifolia*. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**: 10450-10454.
- Yang, Q. y Borkovich, K. (1998) Mutational activation of Gα causes uncontrolled proliferation of aerial hyphae and increased sensitivity to heat and oxidative stress in *Neurospora crassa*. *Genetics* **151**: 107-117.
- Youn, H.D., Kim, E.J., Roe, J.H., Hah, Y.C. y Kang, S.O. (1996) A novel nickel-containing superoxide dismutase from *Streptomyces* spp. *Biochem J* **15**: 889-896.
- Zamocky, M. y Koller, F. (1999) Understanding the structure and function of catalases: clues from molecular evolution and *in vitro* mutagenesis. *Prog Biophys Mol Biol* **72**: 19-66.
- Zelko, I.N., Mariani, T.J. y Folz, R.J. (2002) Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Radic Biol Med* **33**: 337-349.
- Zhong, H.H., Young, E.A., Pease, R.P., Hangater, R.P. y McClung, R.C. (1994) Interactions between light and the circadian clock in the regulation of the CAT2 expression in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **104**: 889-898.
- Zhong, H.H. y McClung, R.C. (1996) The circadian clock gates expression of two *Arabidopsis* catalases genes to distinct and oppositive circadian phases. *Mol Gen Genet* **251**: 196-203.

APÉNDICE

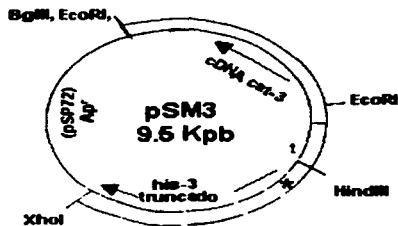
Se presentan los mapas de los plásmidos construidos durante el desarrollo de esta tesis



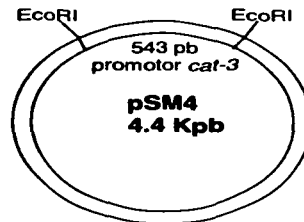
Notas sobre la construcción: el cDNA de *cat-3* se clonó en el sitio EcoRV de pBKS+/- (Stratagene) en sentido a la secuencia HindIII del plásmido. Los detalles de la construcción se describen en la primera publicación.



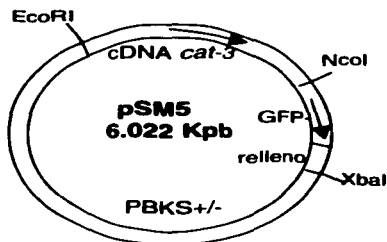
Notas sobre la construcción: el cDNA de *cat-3* con toda la región 3' que no se traduce se clonó en los sitios NdeI/HindII del plásmido pET23b+ (Novagen). El cDNA no se dejó en marco con las colas de histidina del plásmido. Los detalles de la construcción se describen en los procedimientos experimentales de esta tesis.



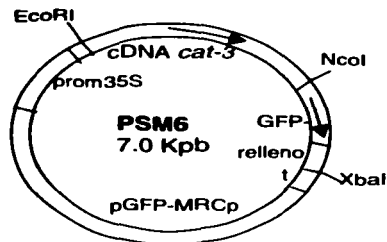
Notas sobre la construcción: la secuencia de lacZ contenida en el fragmento EcoRI de pDEI (FGSC) se reemplazó por el cDNA de *cat-3* que contiene desde el ATG hasta el STOP. Este plásmido se utilizó para el RIPing. Los detalles de la construcción se describen en la segunda publicación.



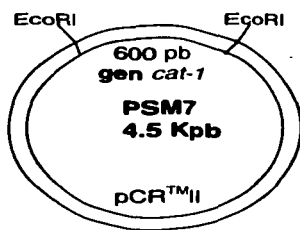
Notas sobre la construcción: 543 pb del promotor de *cat-3* se amplificaron por PCR con los oligonucleótidos o1lacZ1 y o1lacZ2 (ver los procedimientos experimentales de esta tesis) y se clonaron en el sitio EcoRI de PCRTMII (Invitrogen).



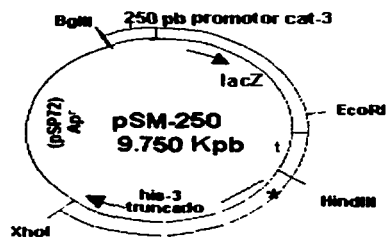
Notas sobre la construcción: el fragmento EcoRI/XbaI de pSM6 que contiene el cDNA de *cat-3* fusionado con la GFP (uso de codón adaptado para plantas) se subclonó en los sitios compatibles de pBKS+/-.



Notas sobre la construcción: el cDNA de *cat-3*, desde el ATG hasta antes del STOP se amplificó por PCR con los oligonucleótidos GFP_{Prv} (5'CGCCGCCATG GCCTCATCATCGCCATC3') y GFP_{fw} (5'CGCCGAATTCATGCGTGTCAACGCTCT T3') y se clonó adelante de la GFP (Genebank: CVU43284) en los sitios EcoRI/NcoI de pGFP-MRCp.

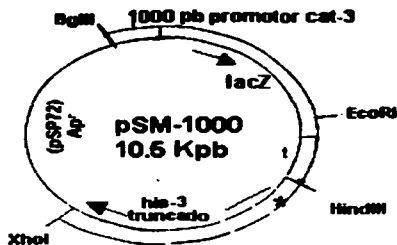


Notas sobre la construcción: un fragmento de 600 pb del gen *cat-1* se amplificó por PCR con oligos degene-rados y se clonó en los sitios EcoRI de pCR™II (Invitro-gene). Ver detalles de la construcción en la primera publicación de esta tesis.

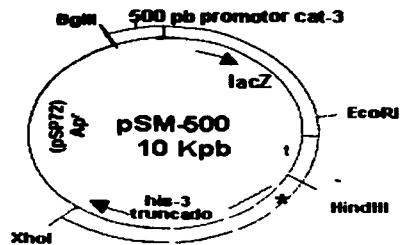


Notas sobre la construcción: un fragmento de 250 pb del promotor de *cat-3* se clonó en los sitios BglII/SmaI de pDEI (FGSC), adelante del gen de la β-galactosidasa (*lacZ*). De este plásmido se secuenciaron dos de las tres clonas que se obtuvieron, la T4 y T30. Ambas, presentaron una pérdida de 2 pb cercana al ATG, lo que afectó el marco de lectura. Los detalles de la construcción se describen en los procedimientos experimentales de esta tesis.

Secuencia en marco:
 ATG CGG GCC GTC GTT TTA
 Secuencia de las clonas T4 y T30
 AT - -G GGC CGT CGT CGT TTT A



Notas sobre la construcción: 1048 pb del promotor de *cat-3* se clonaron en los sitios BglII/SmaI de pDEI (FGSC) en marco con *lacZ* como proteína reportera. Los detalles de la construcción se describen en los procedimientos experimentales de esta tesis.



Notas sobre la construcción: 543 pb del promotor de *cat-3* se clonaron en los sitios BglII/SmaI de pDEI (FGSC) en marco con *lacZ* como proteína reportera. Los detalles de la construcción se describen en los procedimientos experimentales de esta tesis.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN