



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO

INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

EVALUACIÓN DE NoxR Y RacA COMO POSIBLES
REGULADORES DE LA ACTIVIDAD DE LA
NADPH OXIDASA NoxA DE *Aspergillus nidulans*

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS
P R E S E N T A :
I.B.I. ADRIANA HERNÁNDEZ BECERRIL

ASESOR: DR. JESÚS AGUIRRE LINARES

México, D.F., 2010



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Este trabajo se realizó en el laboratorio 107 oriente bajo la dirección del Dr. Jesús Aguirre Linares, en el departamento de Biología Celular y Desarrollo del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México. La alumna Adriana Hernández Becerril contó con el apoyo económico de CONACYT.

Este trabajo fue posible gracias a los donativos del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT IN228507-2) y de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico-UNAM (DGAPA, PAPIIT-UNAM (IN201709/20).

Agradezco el apoyo técnico de la Biol. Olivia Sánchez, durante la realización de este trabajo.

A mi madre, Tomasa Becerril

A Fernando Lara

Agradecimientos:

A mi familia... A mi madre, por su cariño, su dedicación durante todos estos años y por brindarme su apoyo en todos mis proyectos y uno que otro desatino. A Juan Carlos mi hermano y amigo de toda la vida. A mi tía Felicitas y a mis sobrinos Luis Angel, Ictius y Hernán

Agradezco al Dr. Jesús Aguirre por haberme brindado la oportunidad de participar en este proyecto y ser parte de su equipo de trabajo. Agradezco además su apoyo, dedicación y sobre todo su confianza y amistad.

A los miembros de mi comite tutorial: Dr. Luis Covarrubias y Dr. Felipe Cruz por sus aportaciones y sugerencias a este trabajo.

A los miembros del jurado: Dr. Luis Covarrubias Robles, Dr. Luis Servín González, Dr. Guillermo Aguilar Osorio, Dr. Julio Morán Andrade y Dr. Héctor Riveros Rosas por su revision crítica y sus sugerencias para mejorar este trabajo.

A Fernando, por su cariño, su apoyo, por toda la felicidad que me ha brindado y hemos compartido en este tiempo juntos y por mostrarme las gratas sorpresas que da la vida.

A mis compañeros y amigos del laboratorio 107 oriente: Olivia Sánchez, Fernando Lara, Jenny Arratia, Nallely Cano, Itzel Vargas, Martha Camacho y Fabián Marquez, por su ayuda, su amistad y por haber hecho del laboratorio más que un lugar de trabajo, un hogar.

A mis amigos de siempre: Mayra, Francisco, Lizbeth, Néstor y Oscar por su apoyo y cariño durante tantos años y por mantenerme aún en la realidad.

A mis compañeros y amigos de los pasillos del IFC: Teresa Lara, Jonathan Rodríguez, Vanessa Vega, Pablo Rangel, José Luis Ramos y Miguel Shingu

INDICE

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
1. LAS ESPECIES REACTIVAS DEL OXÍGENO	2
1.1 Aspectos generales	2
1.2 Mecanismos antioxidantes	2
1.3 Las ERO como señales celulares	4
1.4 Fuentes intracelulares de ERO	8
2. LAS NADPH OXIDASAS (NOX)	8
2.1 NOX en células fagocíticas	8
2.2 NOX en células no fagocíticas	11
· Nox1	12
· Nox3	12
· Nox4	13
· Nox5	13
· Duox	14
· Nox en plantas (Rboh)	15
· Nox en <i>Dictyostelium discoideum</i>	16
3. SISTEMAS NOX EN HONGOS	16
3.1 Proteínas homólogas a gp91phox	16
3.2 La regulación de NOX en los hongos	19
4. RAC	20
4.1 Funciones bioquímicas y biológicas	20
4.2 Rac y el crecimiento polar en los hongos	21
5. <i>Aspergillus nidulans</i> COMO MODELO DE ESTUDIO	22
6. NOX Y ERO DURANTE LA DIFERENCIACIÓN CELULAR EN LOS HONGOS	23
HIPOTESIS	25
OBJETIVO GENERAL	25
Objetivos particulares	25
MATERIALES Y MÉTODOS	26
1. Cepas, medios y condiciones de crecimiento de <i>A. nidulans</i>	26
2. Técnicas de biología molecular.	27
· Cancelación de los genes noxA y noxR	27
· Construcción del alelo DARac	29
· Extracción de ADN	31
· Hibridación tipo Southern blot	31
3. Ensayo de detección de Especies Reactivas de Oxígeno	32
4. Inducción del ciclo sexual en <i>A. nidulans</i>	32
5. Determinación de actividad de Catalasa y fosforilación de Saka.	32
RESULTADOS	34
DISCUSIÓN	57
CONCLUSIONES	64
PERSPECTIVAS	65
REFERENCIAS	66

RESUMEN

Las especies reactivas del oxígeno (ERO) tienen efectos nocivos sobre diversas biomoléculas y componentes celulares. Sin embargo, se ha propuesto que las ERO también pueden funcionar como señales celulares capaces de regular la diferenciación celular en los microorganismos eucariotes. Generalmente las ERO se producen de manera no intencional como subproductos del metabolismo, principalmente durante la respiración. Por otro lado, las NADPH oxidasas (NOX) son enzimas multiméricas cuya función es producir el ion superóxido de manera regulada. La NOX de células fagocíticas (Nox2), por mucho tiempo el único ejemplo de este tipo de enzimas, requiere la formación del complejo catalítico flavocitocromo b_{558} , formado por la subunidad catalítica gp91^{phox} y la proteína de membrana p22^{phox}, el cual es activado por las subunidades citosólicas regulatorias p47^{phox}, p40^{phox}, p67^{phox} y la GTPasa Rac2.

Recientemente se encontraron proteínas homólogas a gp91^{phox} en células animales no fagocíticas y en diversos microorganismos eucariotes. En el hongo *Aspergillus nidulans* se caracterizó a NoxA como una NADPH oxidasa microbiana ortóloga de gp91^{phox}, y se demostró que es esencial para la diferenciación de los cuerpos fructíferos sexuales. En este trabajo identificamos a los ortólogos de p67^{phox} (NoxR) y Rac2 (RacA) en *A. nidulans* y mostramos que una mutante $\Delta noxR$, al igual que una mutante $\Delta noxA$, está afectada en el desarrollo sexual, sugiriendo que NoxR regula la actividad de NoxA. Se realizó además la expresión de una forma dominante activa de RacA (DARacA) bajo el control de un promotor inducible. En condiciones de inducción las colonias presentan defectos en la conidiación y una mayor producción del ion superóxido. Por otra parte, la expresión de DARacA en esporas inhibe el crecimiento polar pero no la duplicación nuclear, mientras que su expresión en el micelio detiene el crecimiento polar e induce un crecimiento isodiamétrico. Estos mismos fenotipos se observan cuando DARacA se expresa en ausencia de NoxA, lo cual indica que los efectos de DARacA en el patrón de crecimiento de las esporas y las hifas son independientes de la función de NoxA. No obstante, la inducción de DARacA durante el desarrollo sexual induce la formación de cuerpos fructíferos de mayor tamaño, para lo cual sí se requiere de la presencia de NoxA. Proponemos que NoxA y NoxR tienen un papel menor en el desarrollo asexual, en tanto que durante el desarrollo sexual la activación de NoxA a través de NoxR y RacA es necesaria para la formación de los cuerpos fructíferos. Estos resultados apoyan nuestra hipótesis sobre la diferenciación celular como una respuesta a un estado hiperoxidante.

INTRODUCCIÓN

1. LAS ESPECIES REACTIVAS DEL OXÍGENO

1.1 Aspectos generales

Todos los organismos aerobios utilizan el oxígeno molecular (O_2) como aceptor final de electrones durante la respiración. Sin embargo, al mismo tiempo deben enfrentar los efectos tóxicos que esto genera, como lo es la producción de distintas especies reactivas del oxígeno (ERO).

Las ERO son derivados del O_2 que son más reactivos que éste en su estado basal, y pueden generarse por dos mecanismos: 1), la ruptura o excitación del O_2 , de la cual se forman el oxígeno atómico (O), el ozono (O_3) y el oxígeno en singulete (1O_2); y 2), la reducción parcial del oxígeno que da lugar al anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el radical hidroxilo (HO^{\bullet}) (Halliwell y Gutteridge, 1999).

El $O_2^{\bullet-}$ es un subproducto de la respiración. Cerca del 1-2% del O_2 consumido durante la respiración se reduce parcialmente, formado así el anión superóxido, el cual puede dismutar de manera espontánea o mediante actividad enzimática, a H_2O_2 (Kamata y Hirata, 1999), por lo cual se cree que la mayor fuente de ERO *in vivo* es la mitocondria.

Tanto el $O_2^{\bullet-}$ como el H_2O_2 son poco reactivos en comparación con otras ERO, pero su toxicidad se debe a que ambos pueden generar HO^{\bullet} en presencia de metales de transición como Fe^{2+} mediante las reacciones de Fenton y de Haber-Weiss (Halliwell y Gutteridge, 1999).

Las ERO pueden causar daño oxidativo ya que son capaces de oxidar macromoléculas biológicas. En especial el HO^{\bullet} reacciona fácilmente casi con cualquier biomolécula, por lo cual puede oxidar ADN, proteínas y lípidos (Kirkinezos y Moraes, 2001), causando su ruptura y otros tipos de inactivación.

1.2 Mecanismos antioxidantes

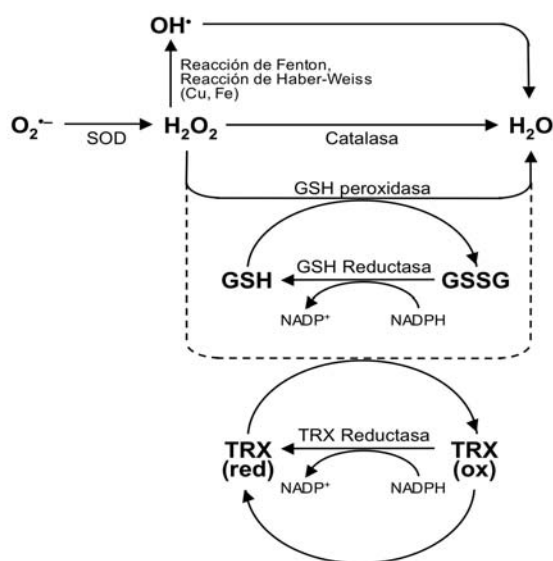
Los organismos aerobios han desarrollado sistemas de defensa antioxidante que les permiten contender contra las ERO. Estos sistemas incluyen el uso de compuestos antioxidantes y la participación de enzimas que descomponen las ERO.

Los compuestos antioxidantes reaccionan directamente con agentes oxidantes para inactivarlos; vitaminas como la C (ácido ascórbico) y la E (tocoferol), el ácido úrico y los β -carotenos son algunos ejemplos de este tipo de compuestos (Davies, 2000).

Entre los sistemas enzimáticos que descomponen ERO se encuentran las superóxido dismutasas (SODs), las catalasas, las peroxidasas y las peroxirredoxinas (Fig. 1).

Las superóxido dismutasas (SODs) llevan a cabo la dismutación del $O_2^{\bullet-}$ a H_2O_2 y O_2 en la reacción general: $2 O_2^{\bullet-} + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$

Todos los miembros de la familia SOD utilizan metales de transición en su sitio activo, por lo que existen varios tipos de SODs: las que tienen Cu^{2+} y Zn^{2+} y las que tienen Mn^{3+} o Fe^{3+} (Davies, 2000; Halliwell, 2006).



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

Fig 1. Las ERO y los sistemas antioxidantes enzimáticos.

Las catalasas son un grupo de metalo-enzimas que descomponen el H_2O_2 en O_2 y H_2O . La mayor parte de las catalasas se encuentran en los peroxisomas con el fin de descomponer el H_2O_2 generado durante la oxidación de ácidos grasos (Halliwell, 2006).

Las peroxidasas son otro grupo de hemoenzimas que participan en la descomposición del H_2O_2 así como de peróxidos orgánicos. Por ejemplo, la glutatión peroxidasa utiliza el poder reductor del glutatión (GSH), el cual es un tripéptido que se puede oxidar en presencia de varios radicales, formando así el disulfuro de glutatión (GSSG). El GSH participa en la ruptura de los puentes disulfuro de las proteínas y en la eliminación del

H_2O_2 y se mantiene en su forma reducida a través del sistema de la glutatión reductasa, la cual utiliza NADPH como donador de electrones (Davies, 2000).

Las peroxirredoxinas son enzimas que carecen de grupos prostéticos y catalizan la reducción del H_2O_2 y de hidroperóxidos orgánicos. Contienen una cisteína conservada que por oxidación forma puentes disulfuro intermoleculares y que son reducidos subsecuentemente por acción de la tiorredoxina (Georgiou y Masip, 2003).

Las tiorredoxinas son proteínas pequeñas que juegan un papel importante en la reducción de grupos disulfuro en proteínas oxidadas. La tiorredoxina oxidada se restaura directamente mediante la acción de la tiorredoxina reductasa, usando NADPH como donador de electrones (Arner y Holmgren, 2000; Kamata y Hirata, 1999).

1.3 Las ERO como señales celulares

Las células son capaces de responder a diversos estímulos a través de vías de señalización que usan componentes como cinasas de proteínas, fosfatasas, fosfolipasas, entre otros, los cuales producen o responden a pequeñas moléculas difusibles llamadas segundos mensajeros. Aunque las ERO se han visto como subproductos no deseados del metabolismo y mucho se ha estudiado sobre sus efectos dañinos, evidencia reciente sugiere que las ERO funcionan como segundos mensajeros en procesos de señalización y regulación celular (Finkel, 1998) (Aguirre et al., 2005; Hansberg y Aguirre, 1990).

El H_2O_2 es una molécula pequeña capaz de difundir a través de las membranas, además de ser un oxidante moderado, con lo cual puede oxidar ciertos grupos sulfhidrilo de proteínas. Sin embargo la oxidación de estos grupos no es al azar, ya que no todos los residuos de cisteína presentes en las proteínas son susceptibles a oxidación por H_2O_2 . La reactividad de estos residuos de cisteína esta dada por su grado de exposición al solvente y su estado de ionización; por ejemplo, se requiere que tales cisteínas tengan valores bajos de pK_a (menores a 7.0) (D'Autreaux y Toledano, 2007; Rhee, 1999). Proteínas como las tiorredoxinas, las peroxirredoxinas, las fosfatasas de tirosina (PTPs) son candidatos a oxidación reversible por H_2O_2 (Rhee, 1999).

A continuación se describen de manera general algunos componentes de vías de señalización afectados por las ERO y el estrés oxidativo.

- **Proteínas cinasas de Serina/Treonina**

➤ **MAPKs (Mitogen Activated Protein Kinases)**

Las MAPKs abarcan una gran cantidad de cinasas de Serina/Treonina involucradas en regular una amplia gama de procesos celulares, en los que se incluye la proliferación, diferenciación, la adaptación al estrés y la apoptosis. Las MAPKs se activan a través de cascadas de señalización que incluyen a las MAPKK y MAPKKK. En mamíferos se han identificado cuatro módulos MAPKs activados por vías separadas: ERK 1/2 (extracellular signal regulated kinases), JNK (c-jun N-terminal kinases), p38 y ERK5 también llamada Big MAPK. La vía ERK está comúnmente ligada a la proliferación celular, mientras las vías JNK y p38 se relacionan principalmente con adaptación a distintos tipos de estrés (Torres y Forman, 2003).

Se ha visto que el estrés oxidativo induce la activación de vías MAPKs. Por ejemplo, condiciones de estrés oxidativo estimulan la activación de ERK, en la cual los receptores de factores de crecimiento juegan un papel importante como mediadores de estos efectos (Martindale y Holbrook, 2002).

El estado redox de la célula es un factor clave en la activación de las vías MAPK por estrés oxidativo. En ausencia de estrés la tioredoxina (Trx) se une a ASK1 (MAPKKK involucrada en la activación de p38 y JNK) con lo cual, esta se inhibe. El estrés oxidativo causa la disociación del complejo Trx-ASK1, lo que conduce a la activación de JNK y p38 (Saitoh et al., 1998). Evidencia bioquímica indica que bajo condiciones normales, la glutatión S-transferasa (GST) se une a JNK e inhibe su activación, pero esta interacción se rompe por estrés oxidativo (Adler et al., 1999).

Las MAPKs median sus efectos a través de la fosforilación de una amplia gama de proteínas efectoras, como pueden ser diversos factores transcripcionales. En fibroblastos de músculo cardiaco, la angiotensina II (Ang II) es capaz de activar vías MAPK de manera dependiente de ERO, lo cual conduce a un incremento en la expresión del gen IL-6, vía fosforilación del factor de transcripción CREB, a través de las vías ERK y p38 (Sano et al., 2001).

En hongos se ha descrito la activación de módulos de MAPKs del tipo p38 en respuesta a diferentes tipos de estrés, entre los que se incluye el estrés oxidativo. Por ejemplo, en *Schizosaccharomyces pombe* se caracterizó a Spc1 (también llamada Sty1) como una MAPK que se activa en respuesta a estrés osmótico, limitación de nutrientes y estrés oxidativo (Nguyen et al., 2000; Shiozaki y Russell, 1995).

En el hongo multicelular *Aspergillus nidulans* se identificó a SakA como un miembro de la familia de MAPK que se activa en respuesta a estrés. Se ha visto que SakA se fosforila

en respuesta a estrés osmótico y oxidativo y durante el desarrollo asexual justo después de la inducción de la conidiación (Kawasaki et al., 2002).

➤ **Akt**

Al igual que las vías de MAPK, la activación de Akt involucra múltiples eventos de fosforilación. Akt es una proteína cinasa de Ser/Tre, la cual juega un papel importante en la integración de respuestas celulares a factores de crecimiento y otras señales extracelulares. Akt se activa en respuesta a estas señales a través de la vía PI3K (Phosphatidylinositol 3-kinase). La forma activa de PI3K fosforila los lípidos de membrana que contienen inositol, formando así fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato. Akt es reclutado a la membrana por PI3K donde es activado por fosforilación (Fresno Vara et al., 2004; Toker y Cantley, 1997). Sin embargo se ha visto que Akt también se activa en respuesta a la generación de ERO o a alteraciones en el estado redox intracelular. La activación de Akt en respuesta a exposición a oxidantes parece ser mediada principalmente a través de receptores a factores de crecimiento. Por ejemplo, la estimulación de células HeLa con H_2O_2 conduce a la activación de Akt de manera dependiente del receptor a EGF (Epidermal Growth Factor) (Wang et al., 2000).

• **Proteínas cinasas de tirosina**

Se ha visto que la unión de numerosos ligandos, como algunos factores de crecimiento, a sus receptores estimula la producción de ERO, las cuales juegan un papel importante en la transducción de señales (Droge, 2002; Finkel, 2003). Ejemplo de este tipo de factores son PDGF (platelet-derived growth factor) y EGF.

PDGF y EGF estimulan el crecimiento a través de la activación de sus receptores (receptor tyrosine kinase, RTK) mediante la fosforilación de éstos. Se ha visto que agentes como el H_2O_2 y la radiación UV inducen la fosforilación de los receptores de PDGF y EGF, a través de la inhibición reversible de fosfatasas de tirosina (Knebel et al., 1996).

La estimulación de células vasculares de músculo liso de rata con PDFG produce un incremento en la concentración intracelular del H_2O_2 , la cual se requiere para la fosforilación de residuos de tirosina, activación de vías MAPK, síntesis de ADN y quimiotaxis (Sundaresan et al., 1995).

Existen reportes en los que la producción de ERO en células no fagocíticas en respuesta a la estimulación con PDFG es dependiente de la actividad de una NADPH oxidasa (Bae et al., 2000).

- **Proteínas fosfatasas de tirosina (PTPs)**

Las proteínas fosfatasas de tirosina (PTPs) contienen residuos de cisteína reactivos los cuales son oxidados fácilmente por oxidantes moderados como el H_2O_2 . Reportes recientes han demostrado que oxidantes generados como respuesta a la unión de factores de crecimiento puede oxidar reversiblemente PTPs y por tanto inactivarlas. En células Rat-1, la estimulación con PDFG induce la oxidación y por lo tanto la inactivación de la fosfatasa de tirosina SHP-2 (Meng et al., 2002).

La inhibición de PTPs mediada por H_2O_2 contribuye a la activación de distintas vías MAPKs, a través de diferentes vías de señalización. En células T, la estimulación con H_2O_2 induce la fosforilación de las MAPKs ERK, p38 y JNK, la cual se relaciona con la inhibición de la actividad de diversas PTPs como CD45, SHP-1 y HePTP. La expresión ectópica de formas silvestres de estas PTPs inhiben la fosforilación específica de ERK, p38 o JNK inducida por H_2O_2 (Lee y Esselman, 2002).

- **Factores de transcripción.**

Las ERO también participan en las vías de señalización que controlan la homeóstasis intracelular de ERO. En bacterias, por ejemplo, los factores transcripcionales SoxR y OxyR se activan por oxidación, lo que estimula la transcripción de genes en respuesta al $O_2^{\cdot-}$ y al H_2O_2 (D'Autreaux y Toledano, 2007; Finkel, 1998).

En levaduras, el factor transcripcional Yap1, el cual es un homólogo funcional de OxyR, se activa por oxidación en respuesta a un incremento en los niveles de H_2O_2 , sin embargo la oxidación no ocurre directamente por H_2O_2 sino por acción de Gpx3/Orp1, una enzima glutatión peroxidasa (Delaunay et al., 2002). Un número significativo de los genes activados por Yap1 están directamente involucrados en la detoxificación de ERO y la formación de poder reductor, entre ellos diversas isoformas de las catalasas y superóxido dismutasas, alquil hidróxido reductasas, peroxirredoxinas, glutatión peroxidasa y citocromo C peroxidasa (Dumond et al., 2000).

Trabajos recientes en *S. pombe* muestran que el factor transcripcional Atf1, un homólogo de los factores transcripcionales ATF de mamíferos, tiene una función clave en

la percepción y respuesta a señales de estrés. La activación de Atf1, a través de su fosforilación por la vía de MAPK Spc1, conduce a la expresión de numerosos genes necesarios en la respuesta a estrés oxidativo (Chen et al., 2003).

1.4 Fuentes intracelulares de ERO

La mitocondria no es la única fuente intracelular de ERO. Las cadenas de transporte de electrones del retículo endoplasmático constituyen otra fuente de $O_2^{\bullet-}$, tal es el caso del citocromo P_{450} que participa en la oxidación de ácidos grasos pero que también reduce el O_2 a $O_2^{\bullet-}$. La membrana nuclear contiene también sistemas de transporte de electrones, como citocromo oxidasa, lo cual puede generar ERO mediante fuga de electrones en estos sistemas (Halliwell y Gutteridge, 1999).

En los peroxisomas se produce gran cantidad de H_2O_2 debido principalmente a la acción de algunas oxidasas y enzimas que participan en la β -oxidación (Boveris et al., 1972). Enzimas solubles como la xantina oxidasa, la aldehído oxidasa, la triptofano dioxigenasa y la flavoproteína deshidrogenasa constituyen otra fuente intracelular de ERO (Thannickal y Fanburg, 2000).

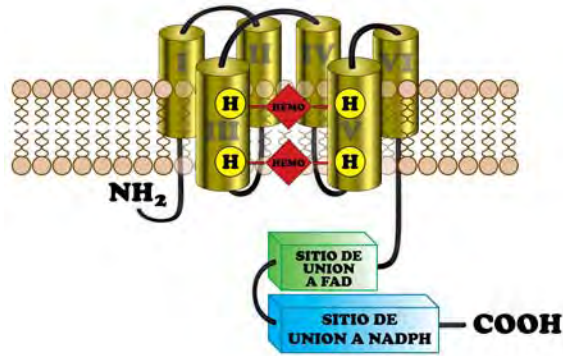
Un tipo de oxidasa muy caracterizado lo constituye la NADPH oxidasa (NOX) de células fagocíticas, la cual produce $O_2^{\bullet-}$ mediante la reducción parcial del oxígeno y tiene una función especializada en la defensa celular (Kamata y Hirata, 1999).

2. LAS NADPH OXIDASAS (NOX)

2.1 NOX en células fagocíticas

Las NADPH oxidasas (NOX) son enzimas multiméricas que producen $O_2^{\bullet-}$ mediante la reducción parcial del oxígeno, usando NADPH como donador de electrones.

La producción de $O_2^{\bullet-}$ dependiente de NOX en células fagocíticas requiere la formación de un complejo multienzimático formado por la subunidad catalítica gp91phox, la proteína de membrana p22phox, las subunidades citosólicas regulatorias p47phox, p40phox, p67phox y la GTPasa Rac (Lambeth, 2004).



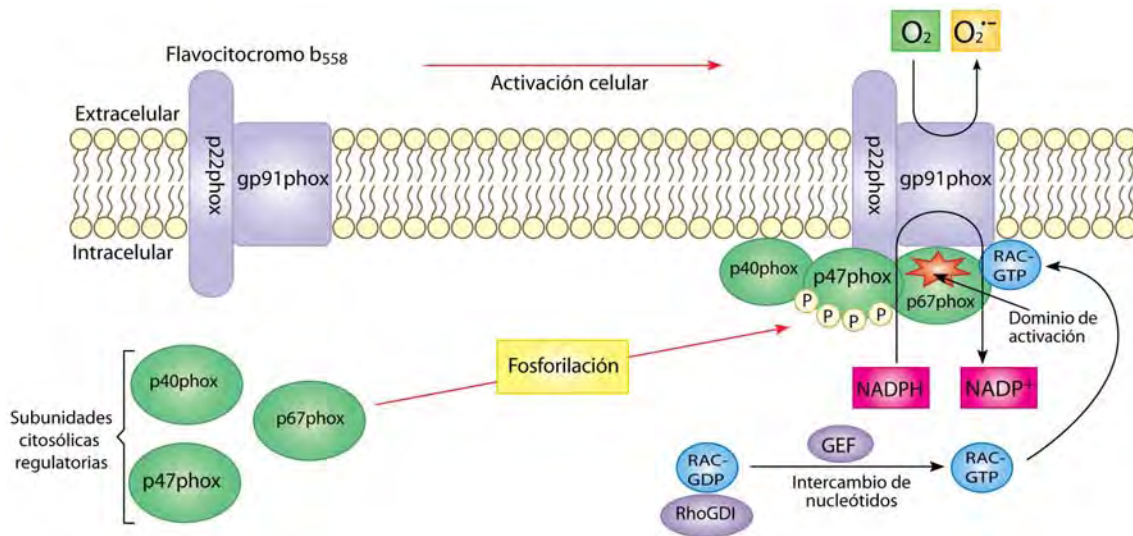
Modificado de Sumimoto H, *et al.*, 2005, *Biochem Biophys Res Commun.* 338:677-686

Fig 2. Estructura de gp91phox/Nox2. En el extremo amino-terminal la subunidad gp91phox contiene seis hélices transmembranales, representadas por cilindros. Los grupos hemo se representan como rombos y en las hélices III y V en círculos se muestran los residuos de histidina conservados. La hélice VI se conecta con el extremo carboxilo-terminal, localizado en el citosol, donde se localiza el dominio de unión a FAD y a NADPH.

La proteína gp91phox, también denominada Nox2, constituye el centro catalítico de la NOX de fagocitos, y se trata de una glicoproteína integrada en la membrana (Fig 2). gp91phox contiene 2 grupos hemo en la región transmembranal amino-terminal, la cual comprende 6 estructuras α -hélice; mientras que la región citoplasmática carboxilo-terminal presenta dominios de unión a NADPH y FAD (Sumimoto *et al.*, 2005; Sumimoto, 2008).

En los segmentos transmembranales de la región amino-terminal se encuentran 4 residuos de histidina conservados. Estos residuos, localizados en la III y la V hélice, constituyen los ligandos axial y distal para la unión de los dos grupos hemo no idénticos. Modelos moleculares indican que los dos grupos hemo se localizan cerca de las caras interna y externa de la membrana, orientados hacia la superficie (Fig 2), lo que constituye un conducto para el paso de electrones desde el NADPH citosólico, hacia FAD y a través de la membrana hasta el oxígeno molecular para formar el anión $O_2^{\bullet -}$ (Lambeth *et al.*, 2007).

La subunidad gp91phox se encuentra en la membrana asociada con la proteína p22phox, formando el complejo conocido como flavocitocromo b_{558} , el cual requiere la translocación de las subunidades regulatorias y de Rac a la membrana para su activación (Fig. 3) (Lambeth, 2004; Vignais, 2002).

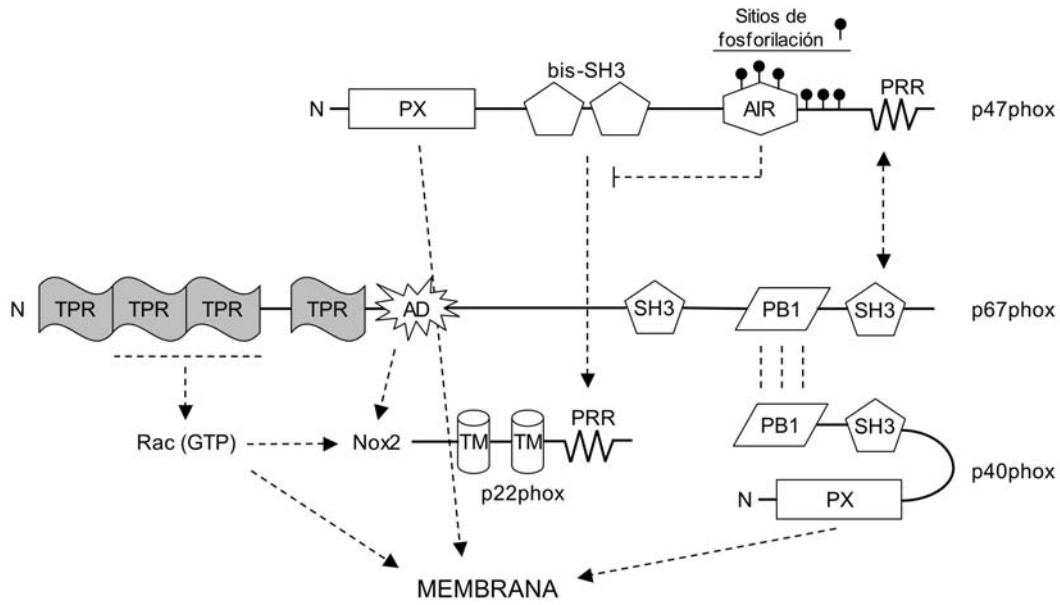


Modificado de Lambeth, J.D. 2004 *Nat. Rev. Immunol.* 4:181-189

Figura 3. Activación de la NADPH oxidasa en células fagocíticas. La activación del complejo NOX en células fagocíticas requiere el reclutamiento de las proteínas citosólicas regulatorias, p67phox, p47phox, p40phox, y la GTPasa Rac.

En células fagocíticas no estimuladas, el flavocitocromo b_{558} se encuentra inactivo, las subunidades p47phox, p67phox y p40phox se encuentran agrupadas en un complejo citosólico mientras que Rac se mantiene en el citosol asociada con la proteína inhibidora RhoGDI (Rho GDP-Dissociation Inhibitor) (Lambeth et al., 2007).

Cuando el fagocito es estimulado por exposición a bacterias o a agentes inflamatorios, p47phox es fosforilada en su región autoinhibitoria (el Benna et al., 1994), permitiendo así la unión de sus dominios SH3 (Src homology 3) al dominio PRR (regiones ricas en prolina) de la subunidad p22phox, y la interacción de su dominio PX (Phox domain, típicamente involucrado en unión a lípidos) con la membrana (Sumimoto et al., 2005). El reclutamiento de p67phox a la membrana, posterior a la estimulación celular, depende de la interacción de su dominio SH3 carboxilo-terminal con el dominio PRR de p47phox (Finan et al., 1994). p67phox contiene además un dominio PB1 (nombrado por su presencia en proteínas Phox y Bem1p) el cual forma un complejo con el dominio PB1 de p40phox, permitiendo así la unión de p40phox al complejo (Kuribayashi et al., 2002) (Fig. 4).



Modificado de Lamberth, J.D. et al. 2007 *Free Radical Biology & Medicine* 43:319-331

Figura 4. Interacciones necesarias para la activación de gp91phox/Nox2. Con flechas se indican las interacciones entre los componentes o dominios de las subunidades citosólicas requeridas para la activación de Nox2. En condiciones de activación los dominios SH3 de p47phox se unen a las regiones PRR de p22phox. Simultáneamente existe unión de la región PRR de p47phox con el dominio SH3 de p67phox. Rac-GTP se transloca a la membrana de manera independiente de los componentes phox, donde interactúa con p67phox a través de sus dominios TPR, y con gp91phox. Abreviaturas: PX, phox domain; SH3, Src homology 3 domain; AIR, autoinhibitory region; PRR, proline-rich regions; TPR, tetratricopeptide repeats; AD, activation domain; PB1, dominio originalmente identificado en p47phox y Bem1p; TM, region transmembranal.

La activación celular también induce el intercambio de GDP por GTP en Rac, a través de los factores GEF (Guanine Exchange Factors), la disociación de Rac de la proteína inhibitoria RhoGDI y su translocación a la membrana (Fig. 3) (Abo et al., 1994; Heyworth et al., 1994). Rac en su forma unida a GTP, interactúa directamente con la región amino-terminal de p67phox, la cual contiene cuatro dominios TPR (tetratricopeptide repeats) (Koga et al., 1999).

2.2 NOX en células no fagocíticas

En los últimos años se han encontrado proteínas homólogas a gp91phox en células no fagocíticas, por ejemplo, en el genoma humano se han identificado 7 genes pertenecientes a la familia Nox: Nox1-Nox5, y las oxidasas duales Duox1 y Duox2. Las

enzimas Nox también están presentes en una gran variedad de eucariontes entre los que se incluyen las plantas y los hongos.

- **Nox1**

Nox1, (originalmente conocido como Mox1) fue el primer homólogo de gp91phox en ser descrito; el gen que codifica para esta enzima fue clonado a partir de células epiteliales del colon (Suh et al., 1999). Al igual que gp91phox, Nox1 contiene los seis dominios transmembranales en el extremo amino, así como los dominios de unión a NADPH y FAD en el extremo carboxilo; y su secuencia de aminoácidos comparte el 56% de identidad con la de gp91phox (Sumimoto et al., 2005).

Nox1 también se asocia con la proteína de membrana p22phox (Fig. 5). Se ha reportado que la producción de superóxido dependiente de Nox1 requiere además del homólogo de p47phox, llamado NOXO1 (Nox Organizer 1) y del homólogo de p67phox, NOXA1 (Nox Activator 1) (Takeya et al., 2003); así como la participación de Rac (Cheng et al., 2006). Aunque con una estructura similar a la de p47phox en cuanto a dominios, NOXO1 carece de la región autoinhibitoria (AIR), lo cual coincide con el hecho de que Nox1 es capaz de producir $O_2^{\bullet -}$ aún en ausencia de un activador de gp91phox, como PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate). La actividad constitutiva de Nox1 parece deberse en parte a que NOXO1, al carecer de la región AIR, presenta sus dominios SH3 en una forma más accesible, de manera que se une a p22phox en células no estimuladas (Takeya et al., 2003).

NOXA1 tiene una arquitectura de dominios similar a la de p67phox, presenta un dominio SH3 en el extremo C-terminal que le permite interactuar con NOXO1; así como los dominios TPR, de unión a Rac, en el extremo N-terminal. Aunque NOXA1 tiene el dominio PB1, éste carece de un residuo conservado de lisina, presente en p67phox, importante para la unión a p40phox (Takeya et al., 2003).

- **Nox3**

Nox3 muestra la identidad más alta con gp91phox con un 58% (Sumimoto et al., 2005). El gen de Nox3 se clonó originalmente a partir de células fetales de riñón (Cheng et al., 2001). Sin embargo, ahora se sabe que también se expresa en el oído interno de ratones, y juega un papel importante en la formación de la otoconia (Paffenholz et al., 2004).

Nox3 requiere la asociación de p22phox para su actividad (Fig. 5), y se ha visto que esta interacción es dependiente de la región PRR de p22phox (Kawahara et al., 2005). Nox3

parece ser constitutivamente activa cuando se expresa con p22phox, ya que produce de manera espontánea pequeñas cantidades de $O_2^{\bullet -}$ para lo cual no requiere coexpresión de otras subunidades como p47phox, p67phox, NOXO1 o NOXA1 ni estimulación con PMA (Ueno et al., 2005). Sin embargo, NOXO1 estimula la actividad de Nox3 aún en ausencia de NOXA1 o p67phox, mientras que la expresión de p67phox por si sola también mejora la producción de $O_2^{\bullet -}$ dependiente de Nox3 (Cheng et al., 2004).

Rac parece no estar involucrada en la regulación de Nox3. Estudios en células HeLa en los que se expresan formas dominante negativa o constitutivamente activa de Rac1 no afectan la actividad de Nox3 (Ueno et al., 2005).

- **Nox4**

A diferencia de Nox1 y Nox3, Nox4 muestra solo un 39% de identidad con gp91phox (Sumimoto et al., 2005). Nox4, originalmente encontrada en células de la corteza de riñón (Geiszt et al., 2000), también se expresa en las células epiteliales de los tubulos distales.

En células de riñón Nox4 colocaliza con p22phox (Fig. 5), y forma un complejo capaz de producir $O_2^{\bullet -}$ sin la participación de cualquiera de las otras subunidades conocidas, en las que se incluyen p47phox, p67phox, NOXO1 o NOXA1. Sin embargo, a diferencia de Nox3, la interacción de Nox4 con p22phox no depende de la región PRR de p22phox (Kawahara et al., 2005).

Rac tampoco parece tener efecto en la actividad de Nox4. En células que expresan Nox4, el silenciamiento de Rac1 mediante el uso de RNAi, no afecta la producción de $O_2^{\bullet -}$ dependiente de esta oxidasa; tampoco la expresión de las formas dominante negativa o constitutivamente activa de Rac1 tienen efecto en su actividad (Martyn et al., 2006).

Recientemente se ha visto que Nox4 es la principal NOX expresada en ESC (Embryonic Stem Cells) no diferenciadas y en cardiomiocitos neonatales. La producción de $O_2^{\bullet -}$ dependiente de Nox4 juega un papel importante en la diferenciación de cardiomiocitos a partir de ESC y en la activación de una vía MAPK que conduce a la activación del factor transcripcional MEF2C (Li et al., 2006).

- **Nox5**

Nox5 presenta una estructura similar a la de gp91phox, pero además contiene cuatro dominios de unión a calcio, tipo EF-hand, en el extremo amino-terminal (Fig. 5) que

regulan su actividad (Banfi et al., 2001). La región de Nox5 parecida a gp91phox muestra solo 22-27% de identidad en la secuencia de aminoácidos con las otras proteínas Nox1-Nox4 (Sumimoto et al., 2005).

En contraste con las proteínas Nox1-Nox4, Nox5 no requiere la formación de un complejo con la subunidad p22phox para su activación. El silenciamiento de p22phox en células transfectadas con Nox5 no tiene efectos en la producción de $O_2^{\bullet -}$ dependiente de esta oxidasa (Kawahara et al., 2005).

La actividad de Nox5 no requiere la presencia de ninguna subunidad regulatoria y es dependiente de la concentración intracelular de calcio. El extremo amino-terminal de Nox5 parece operar de manera similar a la calmodulina, en la cual la unión de calcio induce un cambio conformacional en la enzima. Esto permite la interacción del extremo amino de Nox5 con el dominio catalítico, con lo cual se propone que se activa la transferencia de electrones desde el NADPH hasta el oxígeno (Banfi et al., 2001).

Reportes recientes indican que la regulación de la actividad de Nox5 también está mediada por fosforilación de residuos específicos en el extremo carboxilo. PMA es capaz de activar a Nox5, aún a bajas concentraciones de calcio, mediante la fosforilación de los residuos de Thr⁴⁹⁴ y Ser⁴⁹⁸, incrementando así la sensibilidad de la enzima por el calcio (Jagnandan et al., 2007).

- **Duox**

La oxidasas duales (Duox) presentan estructura similar a la de Nox5, a la cual se agrega una región α -hélice transmembranal en el extremo amino-terminal, seguida por un dominio de peroxidasa similar al de mieloperoxidasa (MPO). Se predice que este dominio de peroxidasa está orientado hacia el exterior de la membrana, donde puede emplear las ERO producidas por la región catalítica para producir otras especies oxidantes (Lambeth, 2004).

En humano se presentan dos enzimas Duox, DUOX1 y DUOX2, las cuales fueron descritas originalmente en células de la glándula tiroidea (De Deken et al., 2000). Mutaciones en THOX2, el gen que codifica para la enzima Duox2, son responsables de la inhibición de la síntesis de hormona tiroidea y se asocian con hipertiroidismo congénito severo (Moreno et al., 2002).

Ahora se sabe que Duox1 también se expresa abundantemente en pulmón, páncreas, placenta, próstata y testículos; mientras que Duox2 es altamente expresada en colon de

adulto y en una gran variedad de células fetales; además animales como *C. elegans* poseen enzimas del tipo Duox (Edens et al., 2001).

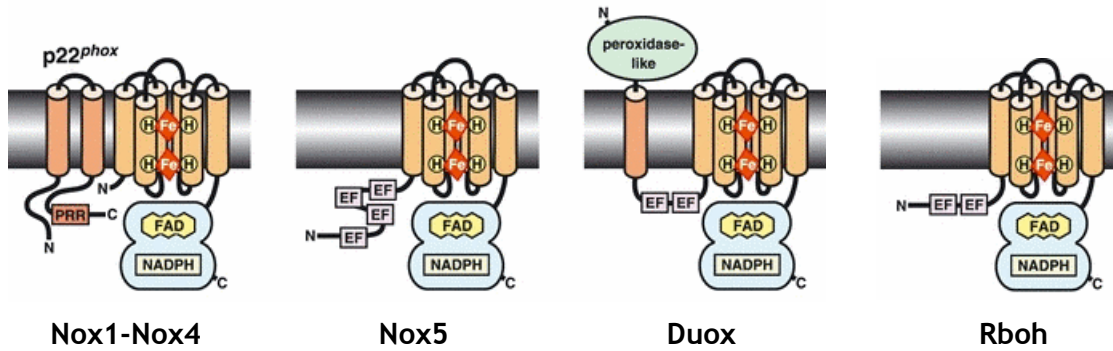
Debido a la similitud en estructura a gp91phox, se cree que las enzimas Duox generan $O_2^{\bullet -}$ el cual puede dismutar en H_2O_2 . Células no tiroideas transfectadas con Duox1 o Duox2 muestran que la forma parcialmente glicosilada de la proteína Duox2 es capaz de generar H_2O_2 a través de la dismutación del anión superóxido, de manera dependiente de NADPH y Ca^{2+} (Ameziane-El-Hassani et al., 2005).

- **Nox en plantas (Rboh)**

La producción de ERO mediada por NADPH oxidasa juega un papel importante en diversos procesos celulares de defensa y desarrollo celular en plantas (Foreman et al., 2003; Torres et al., 2002). Se han identificado homólogos a gp91phox en plantas, los cuales se denominan Rboh (Respiratory burst homologs) y se han identificado en especies como arroz (*Oryza sativa*), *Arabidopsis thaliana* y tabaco (*Nicotiana benthamiana*). En contraste con la estructura de gp91phox, las Rboh presentan una extensión en el extremo amino-terminal que contiene dos motivos EF-hand de unión a Ca^{2+} (Fig. 5) (Keller et al., 1998).

En *Arabidopsis thaliana* se han identificado 10 homólogos de gp91phox a los cuales se les llamó *AtrbohA-J*. Sin embargo, no se han encontrado homólogos de p47phox y p67phox en su genoma. Se ha visto que *AtrbohD* y *AtrbohF* se requieren para la producción de ERO necesarias en los mecanismos de defensa (Torres et al., 2002); mientras que la producción de ERO dependiente de RHD2/AtrbohC se requiere para la expansión celular, a través de la activación de canales de calcio, en los pelos radiculares (Foreman et al., 2003).

A diferencia de las NOX de células fagocíticas, las NOX de plantas no poseen subunidades regulatorias con excepción de Rac (Gu et al., 2004). Estudios recientes en *Oryza sativa* indican que OsRac1 aumenta la producción de ERO en respuesta a agentes patógenos. Mediante el uso de ensayos de doble-híbrido y de microscopía FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer), se encontró que existe interacción entre Rac y Rboh a través de su extremo amino-terminal, el cual contiene los motivos de unión a calcio. El análisis con FRET también sugirió que el aumento en la concentración citosólica de Ca^{2+} disminuye la interacción Rac-Rboh (Wong et al., 2007).



Tomado de Sumimoto H. 2008, *FEBS Journal*, 275

Figura 5. Modelos estructurales de los miembros de la familia Nox. Los cilindros representan las seis α -hélices transmembranales. EF, representan los dominios EF-hand de unión a Ca^{2+} . En todos los homólogos a gp91phox mostrados en la figura, la región amino terminal contiene los sitios de unión a NADPH y a FAD. Una α -hélice transmembranal adicional está presente en las proteínas Duox, seguida por una extensión en el dominio N-terminal homólogo a una peroxidasa.

- **Nox en *Dictyostelium discoideum***

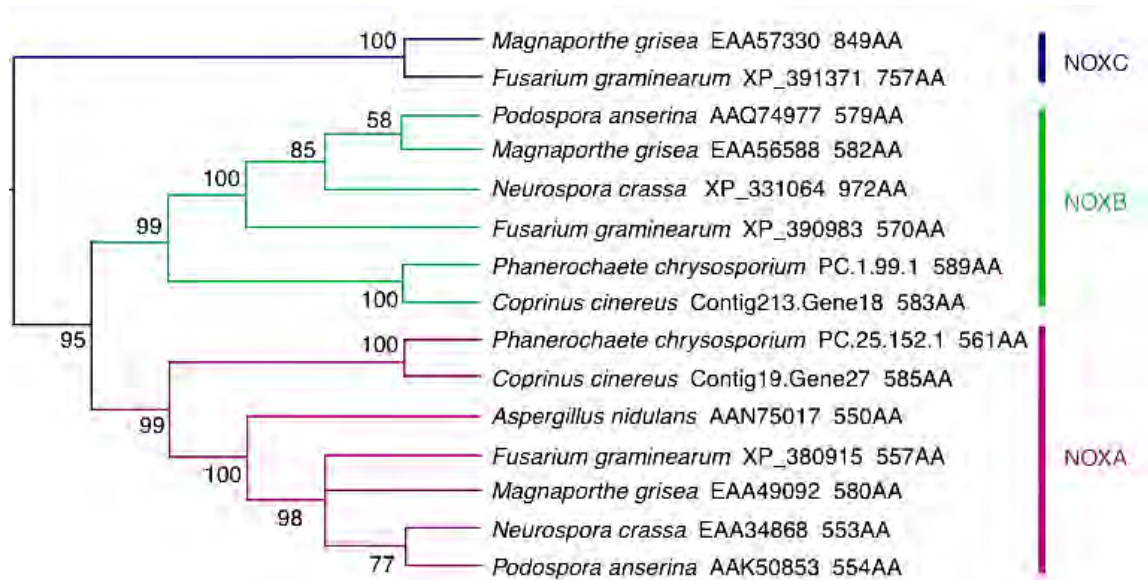
El protista *Dictyostelium discoideum*, un microorganismo eucarioto, posee en su genoma 3 genes codificantes para enzimas NADPH oxidasas, NoxA, NoxB y NoxC (Lara-Ortiz et al., 2003); además de homólogos a las subunidades p22phox y p67phox. La isoforma NoxC presenta un dominio EF-hand adicional en el extremo amino-terminal, de manera similar a Nox5. La eliminación de cualquiera de las isoformas de Nox, así como de p22phox impiden la producción de esporas y la formación de los cuerpos fructíferos. Sin embargo no se determinó la participación del homólogo a p67 en la activación de las Nox (Lardy et al., 2005).

3. SISTEMAS NOX EN HONGOS

3.1 Proteínas homólogas a gp91phox

El gen *noxA* de *Aspergillus nidulans* fue el primer miembro caracterizado de una nueva subfamilia de NADPH oxidasas presente en microorganismos eucariontes (Lara-Ortiz et al., 2003). Posteriormente se describieron homólogos de NOX en otros hongos

filamentosos; sin embargo, este tipo de enzimas no se han encontrado en hongos unicelulares como las levaduras.



Tomado de Aguirre J. et al., 2005 *TRENDS in Microbiology* 13:111-118

Figura 6. Filogenia de NADPH oxidasas presentes en hongos. La presencia de homólogos de NoxA en los hongos definió 3 nuevas subfamilias de este tipo de proteínas, NOXA, NOXB y NOXC.

Mediante análisis filogenético de las NOX presentes en los hongos, se ha podido clasificar a éstas en 3 subfamilias, NOXA, NOXB y NOXC (Fig. 6) (Aguirre et al., 2005; Lara-Ortiz et al., 2003). A diferencia de los miembros de las familias NOXA y NOXB, las proteínas de la familia NOXC presentan dominios de unión a calcio, tipo EF hand, de manera similar a los presentes en Nox5 y Rboh (Aguirre et al., 2005).

En *Aspergillus nidulans* se determinó que el gen *noxA* codifica para una NADPH oxidasa homóloga a gp91phox, a la que se denominó NoxA. NoxA presenta características similares a la de las proteínas NOX, su estructura contiene los seis dominios transmembranales predichos, los cuatro residuos de histidina conservados, así como los dominios de unión a FAD y NADPH. La interrupción del gen *noxA* no mostró efectos en el crecimiento y el desarrollo asexual, pero disminuyó notablemente la producción de ERO e impidió la diferenciación de los cuerpos fructíferos (cleistotecios) durante el desarrollo sexual. Además se vió que la desrepresión de *noxA* está relacionada con un desarrollo abundante y prematuro de los cleistotecios (Lara-Ortiz et al., 2003).

De forma similar en *Podospora anserina* se identificaron dos genes codificantes para enzimas NOX, *PaNox1* y *PaNox2*, y se demostró que estos genes juegan un papel crucial en el ciclo de vida de este hongo. Las mutantes en *PaNox1* están bloqueadas en la diferenciación de cuerpos fructíferos y presentan problemas en la formación de micelio aéreo y la pigmentación. La delección de *PaNox2* bloquea específicamente la germinación de las ascosporas (Malagnac et al., 2004).

Recientemente en el hongo *Neurospora crassa*, también se identificó la presencia de dos proteínas NOX, NOX-1 y NOX-2, las cuales participan de manera específica en diferentes etapas de desarrollo del hongo. La delección de NOX-1 resulta en el bloqueo del desarrollo sexual, aunque también disminuye el desarrollo asexual y el crecimiento; mientras que la carencia de NOX-2 impide la germinación de las esporas sexuales (ascosporas) (Cano-Dominguez et al., 2008).

Además de participar en procesos de diferenciación durante el desarrollo sexual y asexual en los hongos, las enzimas NOX juegan un papel importante en la regulación de interacciones, mutualistas o antagonistas, de hongos con otros organismos.

El hongo *Epichloë festucae* posee dos proteínas NOX; NoxA y NoxB. Aunque la delección del gen *noxB* no tiene efecto en el crecimiento del hongo, se vio que la producción de ERO a través de la NADPH oxidasa, NoxA, regula el crecimiento del hongo dentro de su hospedero, *Lolium perenne*, y por tanto su interacción mutualista con la planta (Tanaka et al., 2006).

La eliminación del gen *cpnox1* en el hongo patógeno *Claviceps purpurea* parece no afectar la penetración del hongo en la epidermis de la planta hospedera, sin embargo impide la colonización del ovario. En cultivos axénicos, las mutantes en este gen muestran morfología de colonia similar a una cepa silvestre, sin embargo se disminuye el porcentaje de germinación de las conidias (Giesbert et al., 2008).

El hongo patógeno *Magnaporthe grisea* infecta la planta de arroz a través de la formación de una estructura de penetración llamada apresorio. Mutantes de este hongo en los genes *nox1* o *nox2* forman el apresorio pero son incapaces de penetrar la planta y por tanto no son patógenas (Egan et al., 2007).

El hongo patógeno *Botrytis cinerea* posee dos genes codificantes para enzimas NADPH oxidasas, *bcnoxA* y *bcnoxB*. El análisis mediante el uso de mutantes nulas muestra que NoxB se requiere para la formación de la estructura de penetración, mientras que NoxA es necesaria para el crecimiento posterior dentro de la planta (Segmuller et al., 2008).

3.2 La regulación de NOX en los hongos

Aunque no existen reportes aún de la presencia de subunidades regulatorias homólogas a p22phox, p47phox y p40phox en los hongos, recientemente se identificó un gen homólogo de p67phox en el hongo *E. festucae* denominado NoxR. En este estudio también se identificaron homólogos en otros hongos (Takemoto et al., 2006).

En *E. festucae* NoxR no se requiere para el crecimiento del hongo en cultivos axénicos, sin embargo parece regular la actividad de NoxA durante el crecimiento del hongo en la planta y resulta indispensable en la interacción simbiótica. Se determinó que las mutantes carentes de *noxR* presentan incremento en la ramificación de las hifas en el tejido meristemático, lo que causa estancamiento en el crecimiento de la planta y envejecimiento prematuro. En este mismo trabajo se vió la interacción de NoxR con RacA, mediante un sistema de doble híbrido (Takemoto et al., 2006). Un estudio reciente muestra que RacA se requiere para la activación de NoxA y la producción de ERO; dicho estudio muestra que la eliminación del gen *racA* disminuye la producción de superóxido y en cultivos axénicos reduce el crecimiento radial, mientras que en la planta genera mayor ramificación de las hifas y por tanto el crecimiento extensivo del hongo, en un fenotipo similar al visto en las mutantes carentes de *noxA* o *noxR* (Tanaka et al., 2008).

N. crassa posee dos NADPH oxidasas y un sólo ortólogo de NoxR, denominado NOR-1, el cual es indispensable para la actividad de NOX-1 y NOX-2. Mutantes en el gen *nor-1* muestran defectos en la esporulación, el crecimiento y en el desarrollo de cuerpos fructíferos, de manera similar a una mutante Δ *nox-1*; así como producción de ascosporas no viables, fenotipos que comparte con la mutante Δ *nox-2* (Cano-Dominguez et al., 2008).

El análisis de la estructura de proteínas homólogas a NoxR presentes en hongos indica que éstas poseen cuatro dominios TPR (Tetratricopeptide domain) en el extremo N-terminal seguidos por el dominio de activación (AD) y contienen además un dominio PB1 en el extremo C-terminal similar al de p67phox. Dicho dominio contiene residuos conservados importantes para la interacción con otras proteínas; por lo que se piensa que debe existir una proteína, aún desconocida, que interactue con NoxR a través de su dominio PB1. Una búsqueda en las bases de datos disponibles de diversos hongos identificó a 3 proteínas, adicionales a NoxR, que presentan un dominio PB1; estas proteínas son: un ortólogo de Bem1 de *S. cerevisiae*, un ortólogo de Cdc24 de *S. cerevisiae* y una proteína CBSn-PB1 (Kawahara y Lambeth, 2007).

Se propone que el ortólogo de Bem1 actúa como un organizador, similar a p47phox o p40phox, estabilizando la interacción entre la subunidad catalítica y NoxR; mientras que el ortólogo de Cdc24 podría actuar como un "intercambiador" a través de su dominio RhoGEF, catalizando la conversión de Rac-GDP a Rac-GTP. La proteína con dominios CBS (cistation beta-sintasa) podría actuar como sensor del nivel de energía celular a través de su unión a nucleótidos de adenosina, tal función podría relacionarse con el requerimiento de las enzimas Nox de nucleótidos reducidos de piridina (Kawahara y Lambeth, 2007).

En un estudio reciente se analizó el papel de BemA como posible análogo de p40phox y regulador de NoxA de *A. nidulans*. La eliminación del gen *bemA* causa acumulación de ERO en regiones subapicales donde la morfología de las hifas es irregular (hifas hinchadas), con lo que los autores proponen la participación de BemA en la regulación espacial de NoxA (Semighini y Harris, 2008).

4. RAC

Rac pertenece a la familia de proteínas Rho-GTPasas. Similar a otras GTPasas, Rac cicla entre un estado activo cuando tiene unido GTP, y un estado inactivo en el que tiene unido GDP. Esta actividad es controlada por GEFs (Guanine Exchange Factors), GAPs (GTPase Activating Proteins) y GDIs (Guanine Nucleotide Dissociation Inhibitors). En su estado activo Rac realiza sus funciones regulatorias a través de interacciones específicas con sus proteínas efectoras (Bustelo et al., 2007; Jaffe y Hall, 2005).

4.1 Funciones bioquímicas y biológicas de Rac

Se han identificado múltiples efectores de Rac entre los que se incluyen cinasas de Ser/Tre, cinasas de tirosina, cinasas de lípidos, lipasas, oxidasas y proteínas de ensamblaje. Como resultado de la modulación en la actividad de tales efectores se generan entre otras respuestas, regulación en la organización del citoesqueleto y regulación de actividades específicas durante el ciclo celular (Bustelo et al., 2007).

La activación de Rho GTPasas como Rho, Rac y Cdc42 controlan la polimerización y la organización de los filamentos de actina. Rac, junto con Cdc42, se requiere para la

activación del complejo Arp2/3 (factor de polimerización de la actina) lo que promueve la polimerización periférica de la actina (Millard et al., 2004).

Las proteínas Rac regulan la polimerización de la actina durante la formación de lamelipodia en varios aspectos. Primero, Rac puede activar proteínas nucleadoras de actina como el complejo ARP2/3 (a través de proteínas homólogas a la familia WASP) y las forminas mDia (Jaffe y Hall, 2005). Segundo, Rac puede afectar la disponibilidad de los extremos de actina libres a través de la remoción de proteínas que se unen a los extremos de los filamentos de actina y previenen su polimerización. Tercero, pueden incrementar la disponibilidad de los monómeros de actina para su incorporación a los filamentos, a través de la regulación de las cofilinas (Wang et al., 2007).

Como se ha indicado, Rac también participa en la regulación de múltiples actividades enzimáticas, entre ellas la activación de enzimas de la familia de las NADPH oxidasas. Se ha visto que Rac tiene como efector a p67phox, y que su interacción con esta proteína es indispensable para la activación del complejo de NADPH oxidasa en células fagocíticas (Diekmann et al., 1994).

4.2 Rac y el crecimiento polar en los hongos

Se ha demostrado que en el hongo *Colletotrichum trifolli*, la expresión de una forma dominante activa de la GTPasa Ras (DARas) induce la producción de ERO intracelular, aberraciones en la morfología de las hifas y disminución en la esporulación asexual. En este mismo estudio se mostró que mutantes que expresan una forma dominante activa de Rac (DARac) muestran aberraciones en la morfología de las hifas; mientras que la mutantes que expresan la forma dominante negativa DNRac inhiben el crecimiento de las hifas. La coexpresión de DARas y DARac conduce la activación de una vía MAPK, en tanto que la coexpresión de DARas y DNRac disminuye la producción de ERO; en ambos casos se restaura el fenotipo silvestre (Chen y Dickman, 2004).

En el hongo dimórfico *Penicillium marneffe* se determinó que el gen *cf1B* codifica para un homólogo de Rac, el cual se requiere para el establecimiento de la polaridad celular durante el crecimiento de las hifas. La eliminación del gen *cf1B* resulta en la pérdida de la polaridad durante el crecimiento, la formación inapropiada de septos, alteraciones en el citoesqueleto de actina y una disminución en la tasa de germinación (Boyce et al., 2003).

Al igual que otros hongos filamentosos, *A. nidulans* posee un homólogo de Rac, al cual se denominó RacA. La eliminación del gen *racA* no afecta la morfología de las hifas, pero si causa múltiples defectos en la morfología de los conidióforos como reducción en el número de métulas y fiálides y en algunos casos su ausencia, reducción en la longitud del tallo y ramificaciones del tallo y la vesícula, fenotipos que comparte con una mutante en el gen *cdc42* (Virag et al., 2007).

En el hongo patógeno *Claviceps purpurea*, se ha demostrado que Rac juega un papel fundamental en el crecimiento y el desarrollo. Las mutantes Δrac presentan colonias con morfología amorfa (forma de coral), no son capaces de esporular, pierden la capacidad para infectar a la planta y las hifas muestran hiper-ramificación y pérdida de la polaridad (Rolke y Tudzynski, 2008). Estos defectos también se presentan en cepas carentes de la PAK Cla4, la cual se ha identificado que actúa río abajo de Rac en el hongo *Ustilago Maydis* (Mahlert et al., 2006). Mediante ensayos de doble-híbrido se confirmó a Cla4 como efector de Rac (Rolke y Tudzynski, 2008).

RacA también es importante para el crecimiento de *E. festucae*; la eliminación del gen *racA* disminuye la producción de ERO y el crecimiento radial en cultivo; en tanto que en la planta produce hiperramificación de las hifas y una colonización extensiva, lo que ocasiona la muerte de la planta (Tanaka et al., 2008).

5. *Aspergillus nidulans* COMO MODELO DE ESTUDIO

Aspergillus nidulans es un hongo ascomiceto que debido a sus características ha sido ampliamente usado como modelo de estudio, y su caracterización ha contribuido al conocimiento de una amplia gama de procesos biológicos. *A. nidulans* presenta dos ciclos reproductivos, uno asexual y otro sexual.

En *A. nidulans* la reproducción asexual se caracteriza por la formación de esporas asexuales o conidias en estructuras especializadas llamadas conidióforos. La formación de conidias se produce como respuesta a factores ambientales como puede ser la exposición al aire (Adams et al., 1998), o la limitación de nutrientes (Skromne et al., 1995). En una interfase aérea, la conidiación comienza con la formación de una célula pie a partir de una hifa, la cual da origen al tallo del conidióforo que crece por extensión apical hacia la fase aérea. Cuando ha alcanzado cierta longitud, la punta del tallo se hincha para formar una vesícula multinucleada, a partir de la cual se producen

múltiples yemas uninucleadas, llamadas mètulas. Las mètulas producen una segunda capa de células uninucleadas llamadas fiálides. Las esporas asexuales o conidias se producen por divisiones mitóticas repetidas de los núcleos de las fiálides de manera que uno de los núcleos hijos entra en la espora y el otro es retenido en la fiálide para dividirse nuevamente. En contraste el núcleo de la espora permanece arrestado en la fase G1 del ciclo celular (Bergen y Morris, 1983); (Casselton y Zolan, 2002).

En presencia de nutrientes, las conidias germinan a través de un periodo inicial de crecimiento isotrópico, seguido por la formación de un tubo germinal elongado.

El ciclo sexual se induce por condiciones de limitación de oxígeno o por ausencia de luz (Purschwitz et al., 2008) y comprende la formación de cuerpos fructíferos denominados cleistotecios, los cuales contienen esporas sexuales o ascosporas. *A. nidulans* es un hongo homotálico, lo que significa que es fértil por sí mismo, pero también pueden realizarse cruza entre homocariones con núcleos genéticamente diferentes (Casselton y Zolan, 2002).

Este hongo es fácilmente manipulado mediante el uso de técnicas de genética clásica; además puede ser transformado con ADN mediante recombinación heteróloga u homóloga; posee múltiples marcadores de selección, como *pyrG*, *riboB*, *pyroA*, *argB*, entre otros, lo que también lo hace un excelente modelo para estudios de genética molecular (Todd et al., 2007). Entre las ventajas que presenta, su genoma se encuentra secuenciado y disponible via The Broad Institute (<http://www.broad.mit.edu/annotation/fgi/>) (Galagan et al., 2005).

Otra ventaja importante que presenta *A. nidulans* respecto a otros hongos, es que sólo posee un homólogo de Nox2/gp91phox y uno sólo de p67phox.

6. LAS NOX Y LAS ERO DURANTE LA DIFERENCIACIÓN CELULAR EN LOS HONGOS

La producción regulada de ERO a través de las NOX resulta consistente con estudios previos que indican la participación de ERO en funciones biológicas específicas como la diferenciación sexual y la regulación del crecimiento.

En 1990, Hansberg y Aguirre, propusieron que la diferenciación celular ocurre como respuesta a un estrés oxidativo. En *Neurospora crassa* al inicio de cada etapa morfogénica hay una sobreproducción de ERO, lo que genera un estado hiperoxidante en la célula.

El reciente descubrimiento de las enzimas NOX en los hongos y la demostración de que son esenciales para la diferenciación sexual, es consistente con el papel esencial de las ERO en la diferenciación celular en los hongos (Cano-Dominguez et al., 2008; Lara-Ortiz et al., 2003; Malagnac et al., 2004) y posiblemente en otros organismos. Por ejemplo en *D. discoideum* se ha visto que se produce ión superóxido en las etapas tempranas del desarrollo multicelular (Bloomfield y Pears, 2003).

Sin embargo, poco se ha descrito sobre la participación de proteínas que regulen los sistemas Nox en hongos. En *A. nidulans*, por ejemplo, no se ha reportado la participación de RacA como regulador de NoxA, es por ello nuestro interés en estudiar la regulación de NoxA, y en tal contexto este trabajo muestra avances importantes al respecto.

HIPOTESIS

Proponemos que las proteínas NoxR y RacA funcionan como activadores de la NADPH oxidasa NoxA y que se requieren para modular la producción de especies reactivas de oxígeno durante el crecimiento la diferenciación celular en el hongo *Aspergillus nidulans*.

OBJETIVO GENERAL

Determinar el papel de las subunidades NoxR y RacA como posibles reguladores de la actividad de NoxA en *Aspergillus nidulans*.

Objetivos particulares

- Generar cepas de *A. nidulans* mutantes en *noxA* ($\Delta noxA$) y en *noxR* ($\Delta noxR$).
- Generar cepas de *A. nidulans* que expresen la forma dominante activa de la proteína RacA (DARacA), bajo el control de un promotor inducible.
- Localizar *in vivo* la proteína RacA mediante la generación de cepas de *A. nidulans* que expresen la forma dominante activa de la proteína RacA (DARacA) unida a la proteína monomérica roja fluorescente (mRFP).
- Generar mutantes dobles de *A. nidulans* $\Delta noxA$, DARacA y caracterizar dichas mutantes en cuanto a la diferenciación celular y la producción de especies reactivas de oxígeno.

MATERIALES Y MÉTODOS

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

El medio de cultivo en el que se crece *A. nidulans* es el descrito por (Hill y Kafer, 2001), con glucosa al 1% (MM) y adicionado con los requerimientos específicos para cada cepa; los medios sólidos se prepararon con agar al 1.25%. Se utilizó una temperatura de incubación de 37°C. Los cultivos líquidos se crecieron a la misma temperatura a 300 rpm. Todos los medios de cultivo y material empleado se esterilizaron a 121°C durante 15 minutos. Las cepas utilizadas se describen en la Tabla 1.

Tabla 1. Cepas de *A. nidulans* empleadas

Nombre	Genotipo	Origen
CLK43	<i>pabaA1, yA2</i>	Kawasaki et al., 2002
pw1	<i>biA1; argB2; metG1; veA1</i>	P. Weglenski
A1153	<i>pabaA1; pyroA4; argB2; nkuA::bar; veA1^y</i>	Fungal Genetics Stock Center
A1155	<i>pyrG89; pyroA4, nkuA::bar; veA1^y</i>	Fungal Genetics Stock Center
11035	<i>pyrG89; pyroA4; riboB2; ΔnkuA::argB; veA1</i>	M. Hynes y col.
CFL3	<i>pabaA1, yA2; pyrG89; veA1</i>	F. Lara
CFL6	<i>pabaA1, yA2; pyroA4; veA1</i>	F. Lara
TTL3	<i>pabaA1, yA2; ΔargB::trpCΔB; ΔnoxA::argB; trpC801; veA1</i>	Lara-Ortiz y col., 2003
TJAQ15	<i>pabaA1, yA2; ΔflbD::AfpyrG, veA1</i>	J. Arratia
TAH1	<i>pyrG89; pyroA4, nkuA::bar; ΔnoxA::AfpyrG; veA1</i>	Este trabajo, A1155 transformada con el producto de PCR noxA-AfpyrG-noxA
TAH2	<i>pyrG89, ΔnoxR::AfpyroA; pyroA4, nkuA::bar; veA1</i>	Este trabajo, A1155 transformada con el producto de PCR noxR-AfpyroA-noxR
TAH3	<i>pabaA1, yA2, ΔnoxR::AfpyroA; pyroA4; veA1</i>	Este trabajo, CFL6 transformada con el producto de PCR noxR-AfpyroA-noxR
TAH4	<i>pabaA1; argB::alcA::rac^{G18V}; pyroA4; nkuA::bar; veA1^a</i>	Este trabajo, A1153 transformada con el plásmido pAH3
TAH5	<i>pabaA1; argB::alcA::rac^{G18V}::mRFP; pyroA4; nkuA::bar; veA1</i>	Este trabajo, A1153 transformada con el plásmido pAH4
CAH4	<i>pabaA1, yA2; ΔnoxA::AfpyrG; veA1^z</i>	Este trabajo, progenie de TAH1 x TJAQ15
CAH6	<i>pabaA1, yA2; argB::alcA::rac^{G18V}; veA1^{b,z}</i>	Este trabajo, progenie de TAH4 x CAH4
CAH7	<i>pabaA1, yA2; argB::alcA::rac^{G18V}; veA1^{a,z}</i>	Este trabajo, progenie de TAH4 x CAH4
CAH8	<i>pabaA1, yA2; argB::alcA::rac^{G18V}; ΔnoxA::AfpyrG; veA1^{b,z}</i>	Este trabajo, progenie de TAH4 x CAH4
CAH9	<i>pabaA1, yA2; argB::alcA::rac^{G18V}; ΔnoxA::AfpyrG; nkuA::bar; veA1^{a,y}</i>	Este trabajo, progenie de TAH4 x CAH4
CAH11	<i>pabaA1, yA2; argB::alcA::rac^{G18V}::mRFP; veA1^z</i>	Este trabajo, progenie de TAH5 x pw1

a. Contiene un número indeterminado de copias de la construcción *alc::rac^{G18V}*

b. Contiene una sola copia de la construcción *alc::rac^{G18V}*

y. Presenta reemplazo del gen *nkuA* por el gen *bar* (bacterial Basta-resistence), lo cual le confiere resistencia al herbicida Ignite (Basta)

z. Contiene el gen silvestre *nkuA*, confirmado mediante sensibilidad al herbicida Ignite.

En los experimentos de inducción de DARacA durante la germinación, las conidias de la cepa silvestre y de las mutantes con el alelo *alcA::racA^{G18V}* se inocularon (1×10^6 esporas/ml) en medio mínimo con Treonina 100 mM (MMT) durante 24 h a 37°C y 300 rpm. Posteriormente se tomaron alícuotas de los cultivos y se fijaron en una solución de 3.7% de formaldehído, 50 mM de NaHPO₄ (pH 7.0) y 0.2% de Tween 80 durante 1 h en agitación. Las muestras se lavaron con agua destilada y se tiñeron con una solución de 0.1 µg/ml de 4,6-diamidino-2-fenilindol (DAPI-SIGMA) durante 15 min en agitación y se lavaron con agua destilada. Se observaron bajo microscopía de epifluorescencia en un microscopio NIKON Eclipse E600 para la detección de núcleos y de fluorescencia. Esta misma técnica de tinción con DAPI se usó para la detección de núcleos durante la germinación de las mutantes $\Delta noxA$ y $\Delta noxR$.

Para la inducción de DARacA en micelio, se germinaron 1×10^6 esporas/ml de la cepa silvestre así como de las mutantes *alcA::racA^{G18V}* y *alcA::racA^{G18V}::mRFP* en medio mínimo con glucosa durante 14 h a 37°C y 300 rpm y posteriormente se transfirió el micelio a medio mínimo con treonina 100 mM como fuente de carbono durante un máximo de 24 h en las mismas condiciones de temperatura y agitación. Las muestras se observaron en un microscopio NIKON Eclipse E600 para la detección de fluorescencia.

- Cuantificación del número de esporas/cm²

Conidias de la cepa silvestre y de las mutantes $\Delta noxA$ y $\Delta noxR$ se inocularon por punto en el centro de placas de medio mínimo con 1% de glucosa y se incubaron a 37°C durante 5 días y al término de ese tiempo se determinó el diámetro y el área de cada colonia. Cada colonia se raspó con una varilla en forma triangular y con una solución estéril de Tween al 0.1%. El total de las esporas colectadas de cada colonia se resuspendió en 10 ml de la solución de Tween en tubos Falcon de 50 ml. Se agitó cada tubo vigorosamente con el vortex y se centrifugaron durante 10 min. Los pellets de esporas se resuspendieron en 1 a 2 ml de agua y se cuantificó el número de esporas/ml. Con el dato del área se realizó el cálculo de número de esporas/cm².

2. Técnicas de biología molecular.

- Cancelación de los genes *noxA* y *noxR*

La obtención de construcciones genéricas para la cancelación de los genes *noxA* y *noxR* se realizó empleando la técnica de Double-Joint PCR (DJPCR) descrita por (Yu et al.,

2004). Mediante reacciones independientes de PCR se amplificó 1 kb río abajo del ORF del gen a eliminar, para lo cual se usaron los pares de primers noxAfor y noxA5tail para la cancelación de *noxA* y los primers noxR5for y noxR5tail para el gen *noxR* (ver Tabla 2), así como 1 kb río arriba utilizando los pares de primers noxA3tail, noxA3rev y noxR3tail, noxR3rev para la eliminación de *noxA* y *noxR* respectivamente. Se amplificó también la secuencia codificante de los marcadores de selección *AfpyrG* de *A. fumigatus* para reemplazar *noxA* y *AfpyroA* de *A. fumigatus* en el caso de *noxR*. En una nueva PCR se generó el producto de fusión empleando las tres secuencias amplificadas anteriormente para cada caso y primers anidados en las secuencias no codificantes en los extremos 5' y 3' (primers noxAnestfor y noxAnestrev para *noxA* y primers noxRnestfor y noxRnestrev para *noxR*).

Tabla 2. Pares de Oligonucleotidos empleados		
Nombre	Secuencia (5' → 3')	Región que amplifica
DARac5f	CCTTTGCGTCGCTGGATC	5' de <i>racA</i> (con la mutación)
DARacMLo	CCGACAGCGACGTCGCC	
DARacMUp	GGCGACGTCGCTGTCCG	3' de <i>racA</i> (con la mutación)
DARac3f	CGGGGATGGGGAGGATGG	
RacpENTR	CACCATGGCGACTGGACC	ORF de <i>racA</i> con la mutación
RacStop	TCACAGAATCGTACACTTCTTGTTTC	ORF de <i>racA</i> con la mutación (contiene stop codon)
RacS/Stop	CAGAATCGTACACTTCTTGTTTCCTC	ORF de <i>racA</i> con la mutación (no contiene stop codon)
noxA5for	GCTGGGGTCGAGTGGAACG	5', 1kb río arriba del ORF de <i>noxA</i>
noxA5tail	GGTGAAGAGCATTGTTTGAGGCCGGCGATGACGGTGCTGG	
noxA3tail	GCATCAGTGCCTCCTCTCAGACCACTCTTGACGCGCTCC	3', 1kb río abajo del ORF de <i>noxA</i>
noxA3rev	GGTTTCCATGCCGAGAG	
noxAnestfor	GATAGAAGAACGACCACCGAAG	Producto de fusión con el marcador <i>pyrG</i>
noxAnestrev	CAGACTCAGGCCCCACGCAGAC	
noxR5for	GACGGCCGCTTTTGTAACC	5', 1kb río arriba del ORF de <i>noxR</i>
noxR5tail	TTAGTAATCCAGCATCTGATGTCCGGCTGACACCGGCTGGAG	
noxR3tail	GTCCTTCATTATGTAGACTCGCGGGATCGCCCAATCACCG	3', 1kb río abajo del ORF de <i>noxR</i>
noxR3rev	GCGTTTGCTGCAAGGAGG	
noxRnestfor	GTAGTAGGCTGGAGGCGGAAAC	Producto de fusión con el marcador <i>pyroA</i>
noxRnestrev	GTTCGGGCGTAAGCTCTG	

Los productos de fusión obtenidos se emplearon para transformar las cepas A1155 y CFL6 de *A. nidulans* (ver Tabla 1) en eventos independientes. La construcción conteniendo el marcador de selección reemplaza al gen seleccionado mediante un evento de doble recombinación homóloga.

Las transformaciones de las cepas de *A. nidulans* se realizaron mediante la utilización de

técnicas de fusión de protoplastos o de electroporación de conidias electrocompetentes de acuerdo a lo reportado por (Sanchez et al., 1998; Sánchez y Aguirre, 1996). Todas las transformantes se analizaron por hibridaciones tipo Southern blot.

- Construcción del alelo DARac

La forma dominante activa de RacA (DARac) de *A. nidulans* se obtuvo mediante la sustitución de la glicina 18 de RacA por valina (G18V), de acuerdo a lo reportado por Chen y Dickman (2004).

La mutación en el codón GGT a GTC en la secuencia de *racA* de *A. nidulans* resultó en el cambio de la glicina 18 por valina.

La generación de la forma DARacA se realizó utilizando una técnica de mutagenesis dirigida (Overlap extension) en el gen *racA*, para lo cual se diseñaron oligonucleotidos con la secuencia de la mutación deseada, GGT \Rightarrow GTC, que resulta en el cambio G18V en la proteína (ver Tabla 2, oligos DARacMUp y DARacMLo). Se empleó DNA genómico de la cepa silvestre CLK43 como molde. La mutación se logró mediante amplificación por PCR de las regiones 5' y 3' de la secuencia codificante de manera que dichas secuencias se sobreponen en la región donde se insertó la mutación (Fig 7).

Los primers diseñados para la amplificación de las dos regiones del gen tienen una longitud entre 17 y 18 pares de bases. Es importante notar que la mutación se insertó a la mitad de la secuencia de los primers (ver Tabla 2 primers DARacMLo y DARacMUp, la mutación se indica en negritas y subrayado).

Las reacciones se realizaron con la enzima *Platinum pfx* de Invitrogen. El programa de PCR para la amplificación de la región 5' conteniendo la mutación consistió de desnaturalización inicial a 93°C durante 3 minutos, 30 ciclos de: desnaturalización a 93°C por 30 segundos, alineación a 54°C por 45 seg, extensión a 72°C por 2 min, y por último una extensión final a 72°C por 7 min, lo cual generó un fragmento de aproximadamente 200 pares de bases. Para la amplificación de la región 3' con la mutación se empleo el mismo programa de PCR pero con una temperatura de alineamiento de 57°C, generando así un producto de 900 pares de bases.

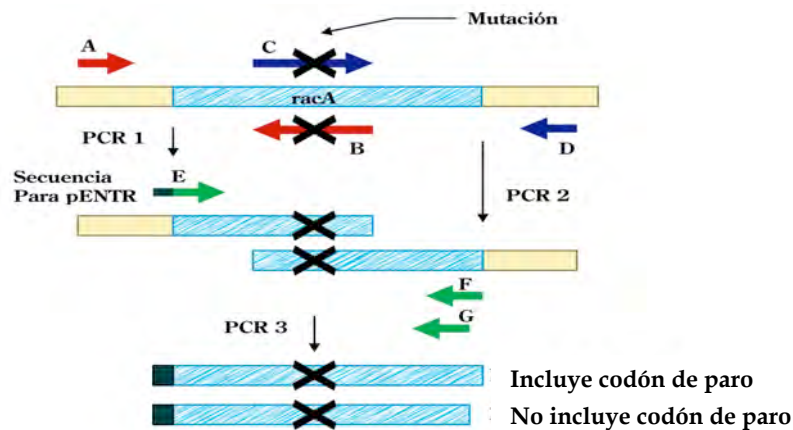


Figura 7. Construcción del alelo DARacA mediante mutagénesis dirigida por PCR. Los primers indicados con las letras A-G corresponden a DARac5f, DARacMLo, DARacMUp, DARac3f, RacpENTR, RacStop y RacS/Stop respectivamente.

Posteriormente mediante PCR y utilizando como molde los fragmentos amplificados previamente se obtuvo la secuencia completa del ORF de *racA* con la mutación deseada, para lo cual se emplearon los oligonucleótidos RacpENTR y RacStop. En otra reacción de PCR se obtuvo la secuencia codificante del gen pero sin el codón de paro, la cual servirá para fusionar con la secuencia de la proteína roja fluorescente. En dicha reacción se utilizaron los primers RacpENTR y RacS/Stop (Fig 7). El oligonucleótido RacpENTR se diseñó conforme al manual pENTR Direccional Topo Cloning de Invitrogen, y contiene al inicio, justo antes del codón ATG, la secuencia CACC para ser clonado en el vector pENTR (ver Tabla 2, primer RacpENTR).

Ambos productos de PCR se clonaron en el vector pENTR en reacciones independientes con lo cual se obtuvieron los vectores pAH1 y pAH2 (Tabla 3). Se mandaron secuenciar ambas clonas y se verificó la presencia de la mutación esperada, así como la ausencia de mutaciones no deseadas a lo largo de la secuencia de *racA*. Posteriormente se realizaron reacciones de recombinación de estos vectores con dos plásmidos destino pMT-OvE y pMT-mRFP (Toews et al., 2004). De tales reacciones se obtuvieron los plásmidos pAH3 y pAH4 (Tabla 3), los cuales se purificaron y cuantificaron. Se utilizaron 3µg de dichos vectores para transformar la cepa A1153 *A. nidulans*. Las transformaciones se realizaron mediante la técnicas de fusión de protoplastos de acuerdo a lo reportado por (Sanchez et al., 1998; Sánchez y Aguirre, 1996). Las transformantes se analizaron por hibridaciones tipo Southern blot.

Tabla 3. Vectores empleados		
Nombre	Descripción	Origen
pAH1	Contiene la secuencia de <i>racA</i> ^{G18V} completa.	Clonación del producto de PCR DARacStop en el vector pENTR
pAH2	Contiene la secuencia de <i>racA</i> ^{G18V} sin el codón de paro.	Clonación del producto de PCR DARacS/Stop en el vector pENTR
pAH3	La secuencia de <i>racA</i> ^{G18B} queda bajo el control del promotor de <i>alcA</i> . El vector tiene como marcador selectivo el gen <i>argB</i>	Recombinación del vector pAH1 con el vector destino pOVE
pAH4	La secuencia de <i>racA</i> ^{G18B} queda bajo el control del promotor de <i>alcA</i> y fusionada al gen <i>mRFP</i> . El vector tiene como marcador selectivo el gen <i>argB</i>	Recombinación del vector pAH2 con el vector destino mRFP

- Extracción de ADN

Se emplearon conidias de las diferentes cepa para inocular aproximadamente 30 ml de medio mínimo líquido en cajas petri y se incubaron durante 12 horas a 37°C sin agitación. La película de micelio se colectó y se secó en papel absorbente, posteriormente se congeló en nitrógeno líquido. El micelio congelado se secó al vacío durante 4 horas y se pulverizó. El ADN se obtuvo de acuerdo al protocolo de Timberlake (1980).

- Hibridación tipo Southern blot

Se digirieron aproximadamente 10µg de ADN con las enzimas de restricción requeridas y RNAasa (10µg/ml) durante toda la noche a temperatura ambiente. Se separaron mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1%. El gel se incubó en una solución de HCl 0.25N a temperatura ambiente por 15 min. con agitación. Se realizaron tres lavados con agua y se desnaturalizó en una solución NaCl 1.5M y NaOH 0.5M por 30 min. a temperatura ambiente y con agitación. Nuevamente se realizaron 3 lavados con agua y el gel se neutralizó en una solución Tris-HCl 0.5 M (pH 7.2) y NaCl 1.5 M por 30 min. a temperatura ambiente y con agitación. El gel se transfirió durante toda la noche a una membrana de nylon Hybond-N conforme al protocolo de Sambrook y Russel (2001). El ADN se fijó a la membrana mediante exposición a luz UV. La membrana se prehibridó en una botella de vidrio a 65°C durante dos horas en solución de hibridación con ADN de esperma de salmón 0.1mg/ml y se hibridó con la sonda marcada radiactivamente en solución de hibridación nueva. Las sondas se marcaron empleando el kit Random Prime

Labelling System de GE Healthcare, según las especificaciones del fabricante. La hibridación se realizó a 65°C durante toda la noche. Posteriormente la membrana se sometió a un lavado con solución SSC 2X, SDS 0.1% durante 45 min. a 65°C; y un segundo lavado con solución SSC 0.1X y SDS 0.1% durante 45 min. más. La membrana se expuso a un cassette de revelado, el cual se reveló mediante el uso de un scanner sensible a sondas radioactivas (Typhon).

3. Ensayo de detección de Especies Reactivas de Oxígeno

Para la detección de ion superóxido, las conidias de la cepa silvestre así como de las mutante *alcA::racA^{G18V}* se inocularon en placas de MM a diferentes niveles de inducción del promotor *alcA*: represión 1% de glucosa, desrepresión 0.1% de glucosa e inducción 100 mM de treonina. Se incubaron las placas durante 24 h a 37°C y al término de este tiempo las colonias se incubaron en una solución 0.3 mM de NBT (cloruro de nitroazul de tetrazolio) y 0.3 mM de NADPH durante 30 min a temperatura ambiente y en oscuridad. Transcurrido este tiempo las colonias se fotografiaron bajo el microscopio estereoscópico.

4. Inducción del ciclo sexual en *A. nidulans*

Para la inducción del ciclo sexual de las diferentes cepas de *A. nidulans* se inocularon placas de agar al 1.25% más suplementos y sin glucosa con 1000 esporas concentradas en 2 µl y se incubaron a 37° C durante 5 días. Al término de este tiempo de incubación se colocaron cilindros de Medio sintético de cruza (SC) (Davies y de Serres, 1970) de aproximadamente 1cm de diámetro al borde de las colonias. Las cajas se sellaron con cinta para inducir ciclo sexual y se incubaron nuevamente durante 5 días a 37° C.

En un ensayo más homogéneo de inducción del ciclo sexual, se realizaron cultivos a confluencia. Se inocularon 1×10^5 esporas en un tubo con 4 ml de medio mínimo suplementado, glucosa al 1% y agar suave (0.625 g/100 ml) a no más de 45°C. El inóculo se mezcló en el vortex y se vertió inmediatamente en placas de MM sólido con 1% de glucosa y más suplementos. Las cajas petri se dejaron 30 min a temperatura ambiente sobre una superficie plana hasta que solidificó el agar suave y posteriormente se incubaron a 37°C durante 24 h. Transcurrido este tiempo se sellaron las cajas con cinta y se incubaron durante 8 días más. En este tiempo se extrajo de manera aleatoria con un

sacabocados un área de 1 cm de diámetro de la caja para la medición del diámetro de los cleistotecios presentes en dicha área. Se realizó la medición del diámetro de 100 cleistotecios de la cepa silvestre y 100 de la mutante *alcA::racA^{G18V}*. La medición se realizó en un microscopio estereoscópico con ocular graduado.

5. Determinación de actividad de Catalasa B y fosforilación de Saka.

Para la inducción de DARacA en micelio se germinaron 1×10^6 esporas de la cepa silvestre así como de una mutante *alcA(p)::racA^{G18V}* en medio mínimo con glucosa durante 14 h a 37°C y 300 rpm y posteriormente se transfirió el micelio a medio mínimo con treonina 100 mM como fuente de carbono o a medio mínimo con glucosa durante un máximo de 24h en las mismas condiciones de temperatura y agitación; las muestras de micelio se colectaron en los tiempos indicados y se congelaron en Nitrógeno líquido. Los extractos de proteína se obtuvieron de micelio molido.

La determinación de la actividad de catalasa B mediante geles nativos fue determinada como se reporta anteriormente (Kawasaki et al., 1997). Se cargaron 50 µg de proteína en geles nativos de polyacrilamida con resolución al 8%. Los geles se corrieron a 100V por 3.5h.

Para los ensayos de detección de proteína Saka fosforilada (Kawasaki et al., 2002), las muestras de micelio molido se resuspendieron en buffer de extracción conteniendo SDS y se disgregaron mediante vortexeo. Los residuos celulares se separaron mediante centrifugación a 4°C, se colectó el sobrenadante de cada muestra y se mantuvieron en hielo. La proteína se cuantificó por el método de Bradford. Se usaron 50 µg de proteína de cada muestra para inmunodetección con anticuerpo anti-phospho-p38 y anti-Hog1.

RESULTADOS

1. Eliminación de los genes *noxA* y *noxR* mediante la técnica de DJ-PCR (Double Joint PCR)

En 2003, Lara-Ortiz y colaboradores, interrumpieron el gen *noxA* de *A. nidulans*. En dicho estudio el marcador *argB* reemplazó la secuencia de *noxA* que codifica los aminoácidos 255 a 342 (sitios de unión a FAD). Se determinó así la necesidad de NoxA para el desarrollo sexual del hongo, particularmente en la formación de cuerpos fructíferos. Sin embargo, en estas mutantes se ha detectado un transcrito de mayor tamaño y se desconoce si puede generar una proteína con función parcial. Es por ello que nos interesó el cancelar por completo el gen *noxA* y ver si existían diferencias en comparación con la mutante reportada (Lara-Ortiz et al., 2003).

Para la cancelación del gen *noxA*, se generó una construcción utilizando la técnica de Double Joint PCR (Yu et al., 2004). Se amplificaron por PCR secuencias de aproximadamente 1kb río arriba y 1kb río abajo de la secuencia codificante del gen; así como un marcador de selección, en este caso el gen *AfpyrG* de *A. fumigatus*. Mediante una nueva PCR se obtuvo el producto de fusión empleado para transformar *A. nidulans*, esperando que mediante un evento de doble recombinación homóloga se reemplazara el gen silvestre por el marcador de selección (Fig 8).

La transformación con dicha construcción se realizó mediante electroporación de esporas electrocompetentes de la cepa A1155 (Tabla 1). La cepa A1155 presenta un alelo mutante del gen *nkuA*, lo cual elimina la recombinación no-homóloga, aumentando notablemente la eficiencia de recombinación homóloga en eventos de integración de ADN (Nayak et al., 2006). Se obtuvieron 6 transformantes las cuales se confirmaron mediante hibridación tipo Southern. Todas las transformantes obtenidas presentaron el evento deseado (Fig 9), lo que confirmó que en estas mutantes el marcador *AfpyrG* reemplazó al gen *noxA*. Se decidió trabajar con la transformante 3 a la cual se denominó TAH1.

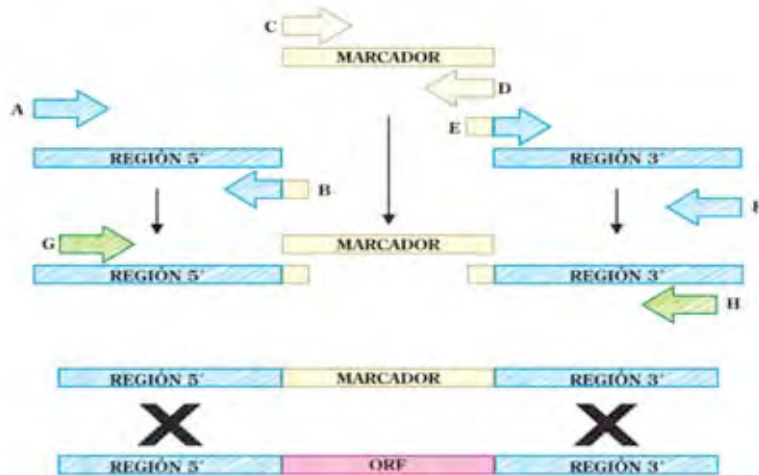


Figura 8. Estrategia de eliminación de genes mediante la técnica Double Joint PCR. Se amplificó mediante reacciones independientes de PCR 1kb río abajo (Primers A y B) y un 1kb río arriba (Primers E y F) del ORF del gen a eliminar; se amplificó también la secuencia codificante para el marcador de selección (Primers C y D). En una nueva PCR se generó el producto de fusión empleando los tres fragmentos amplificados anteriormente y primers anidados en los extremos 5' y 3' (Primers G y H). La construcción conteniendo el marcador de selección reemplaza al gen seleccionado mediante un evento de doble recombinación homóloga.

Con el fin de obtener las cepas $\Delta noxA$ en un fondo genético similar (*pabaA1*, *yA2*; esto es auxótrofas a ácido para-aminobenzóico) se realizaron diferentes cruzas sexuales de la mutante TAH1 con cepas silvestres en el gen *noxA*. Sin embargo, la mutante $\Delta noxA$ mostró dificultad para cruzarse con otras cepas. Sólo la mutante $\Delta flbD$ (TJAQ15, Tabla 1) fue capaz de cruzarse con la mutante $\Delta noxA$ (TAH1) aunque los cuerpos fructíferos que se obtuvieron fueron muy frágiles y en número reducido, éstos contenían progenie de ambas cepas parentales. De esta progenie se obtuvieron 5 posibles candidatas $\Delta noxA$, las cuales se confirmaron por hibridación tipo Southern (Fig 9).

En las cepas A1155 y A1153 la mutación en el gen *nkuA* consiste en su reemplazo por el gen *bar* (bacterial Basta-resistance), lo cual le confiere al hongo resistencia al herbicida Ignite (Basta). Para identificar cuáles mutantes obtenidas de la cruce TAH1 x TJAQ15 contienen el gen silvestre *nkuA* se realizó una prueba de sensibilidad a Ignite (2 mg/ml, en medio mínimo sin nitrógeno), y se determinó que 3 de las cepas fueron sensibles, en tanto que las otras dos cepas mostraron resistencia al herbicida de manera similar a la cepa A1155.

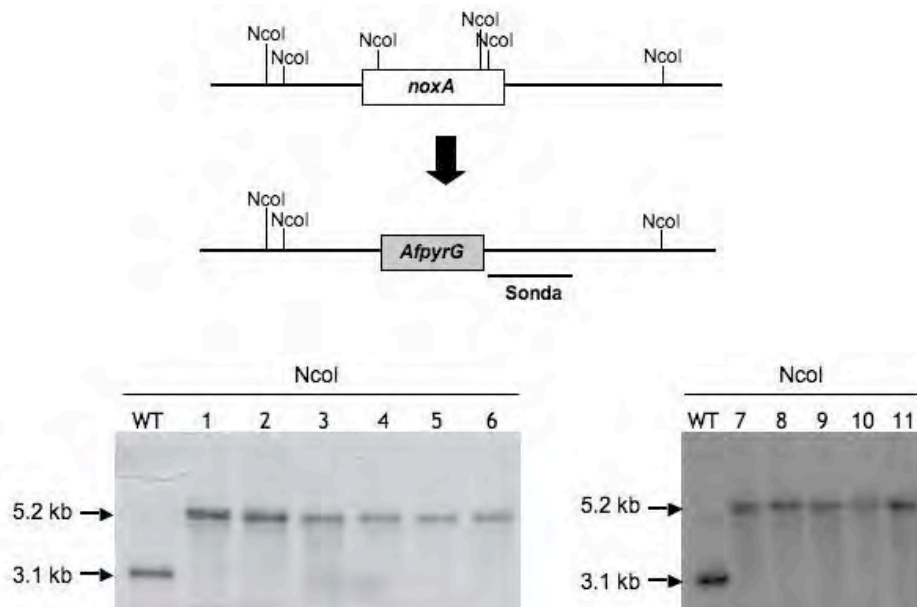


Figura 9. Eliminación del gen *noxA*. La construcción generada mediante PCR para cancelar el gen *noxA*, la cual contiene el gen *AfpyrG* como marcador selectivo, se usó para transformar la cepa A1155 de *A. nidulans*. El ADN de las cepas transformantes y de la cepa silvestre se digirió con la enzima *NcoI* y se usó para hibridación tipo Southern con la sonda indicada (panel superior). El patrón de digestión de la cepa silvestre corresponde a una banda de 3.1 kb, mientras que el reemplazo del gen *noxA* genera una banda de 5.2 kb. El ADN de las cepas 1 a 6 (panel inferior izquierdo) corresponde a transformantes de la cepa A1155; todas las transformantes muestran el evento esperado y de estas cepas se seleccionó de manera arbitraria a la transformante 3 a la cual se denominó TAH1. El ADN de las cepas 7 a 11 (panel derecho) proviene de las cepas obtenidas mediante cruce sexual de la mutante TAH1 ($\Delta noxA$) con la cepa TJAQ15 ($\Delta flbD$); se eligió a la cepa 7 a la cual se llamó CAH4, y se confirmó contiene el alelo silvestre del gen *nkuA*, mediante prueba de sensibilidad a Ignite.

Por otra parte, existen reportes previos de la presencia de ortólogos de subunidades regulatorias de NOX en microorganismos eucariontes. En 2005, Lardy y col. identificaron un ortólogo de p67phox en *D. discoideum*, sin embargo no se determinó su participación en la actividad de las Nox presentes en este organismo. En el hongo *E. festucae* también se identificó un ortólogo de esta subunidad, al que se denominó NoxR, y se vio que esta proteína regula la actividad de NoxA durante el crecimiento del hongo dentro de la planta hospedera (Takemoto et al., 2006).

En *A. nidulans*, identificamos un ortólogo a p67phox el cual se denominó NoxR. Con el fin de determinar la posible participación de NoxR en la activación de NoxA, decidimos eliminar el gen *noxR*. Para la eliminación de este gen también se empleó la técnica de DJ-PCR descrita anteriormente. De igual manera se amplificaron las secuencias de 1kb

río arriba y 1kb río abajo del ORF de *noxR*. En este caso, se usó como marcador selectivo el gen *AfpyroA* de *A. fumigatus*. El producto de fusión de estos tres fragmentos se generó mediante una nueva PCR y se empleó para transformar la cepa A1155 mediante electroporación. Se obtuvieron 4 transformantes, los cuales se confirmaron mediante hibridación tipo Southern (Fig 10).

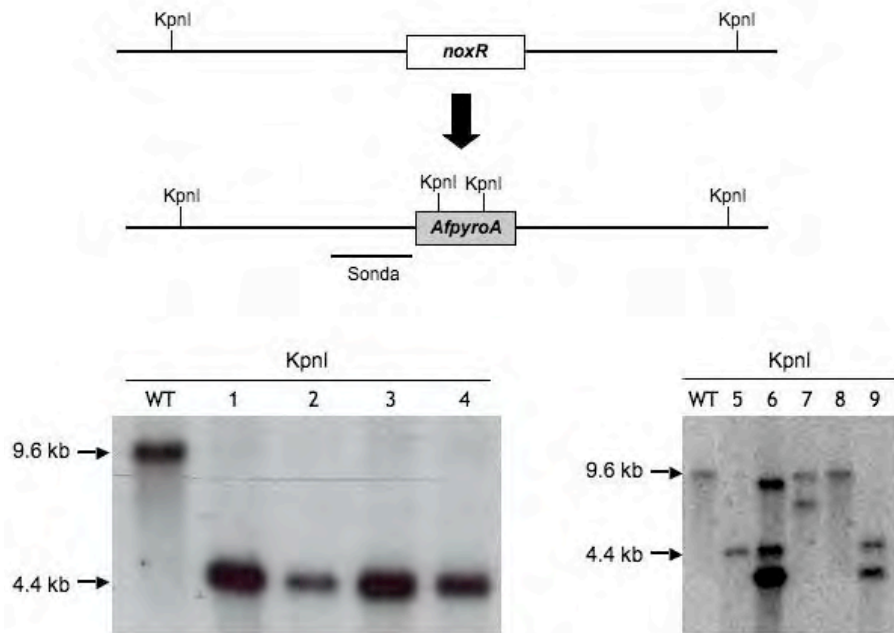


Figura 10. Eliminación del gen *noxR*. La construcción para cancelar el gen *noxR*, la cual contiene el gen *AfpyroA* como marcador selectivo, se generó mediante PCR y se usó para transformar las cepas A1155 y CFL6. El ADN de las cepas transformantes y de la cepa silvestre se digirió con la enzima *KpnI* y se usó para hibridación tipo Southern con la sonda indicada (panel superior). El patrón de digestión de la cepa silvestre corresponde a una banda de 9.6 kb, mientras que el reemplazo del gen *noxR* genera una banda de 4.4 kb. Las cepas 1 a 4 (panel inferior izquierdo) corresponden a transformantes de la cepa A1155 y presentan el evento de integración esperado; se eligió de manera arbitraria a la transformante 2 a la cual se le llamó TAH2. Las cepas 5 a 9 (panel inferior derecho) corresponden a transformantes de la cepa CFL6, solo la transformante 5 mostró el evento esperado y a esta se le llamó TAH3.

De manera similar a una mutante $\Delta noxA$, la mutante $\Delta noxR$ (TAH2) fue incapaz de cruzarse eficientemente con cepas silvestres, por lo que no fue posible obtener la mutante $\Delta noxR$ en el fondo genético *pabaA1*, *yA2* mediante cruce sexual. Así, se optó por generar una nueva mutante mediante transformación por electroporación de la cepa silvestre CFL6 (*pabaA1*, *yA2*; *pyroA4*; *veA1*). Se obtuvieron 5 transformantes y solo la transformante 5, a la cual se le llamó TAH3, presentó el evento de recombinación esperado, confirmado mediante hibridación tipo Southern (Fig 10).

2. Las mutantes $\Delta noxA$ y $\Delta noxR$ no están afectadas en el crecimiento radial, pero sí están afectadas en la producción de conidias.

Con respecto a la cepa silvestre, las mutantes $\Delta noxA$ (CAH4) y $\Delta noxR$ (TAH3) no mostraron grandes diferencias en el crecimiento radial de las colonias (Fig. 11A). Sin embargo, éstas presentaron una coloración ligeramente más tenue, lo cual fue más evidente durante las primeras horas de crecimiento. Se pensó que esta diferencia podría deberse a una menor producción de esporas, por lo cual se cuantificó el número de esporas producidas en estas condiciones de crecimiento. Los resultados en la figura 11B muestran que tanto la mutante $\Delta noxA$ como la mutante $\Delta noxR$ produjeron aproximadamente un 50% menos de esporas que la cepa silvestre, sin embargo es importante notar que la producción de esporas en la mutante $\Delta noxA$ fue aún menor que en la mutante $\Delta noxR$.

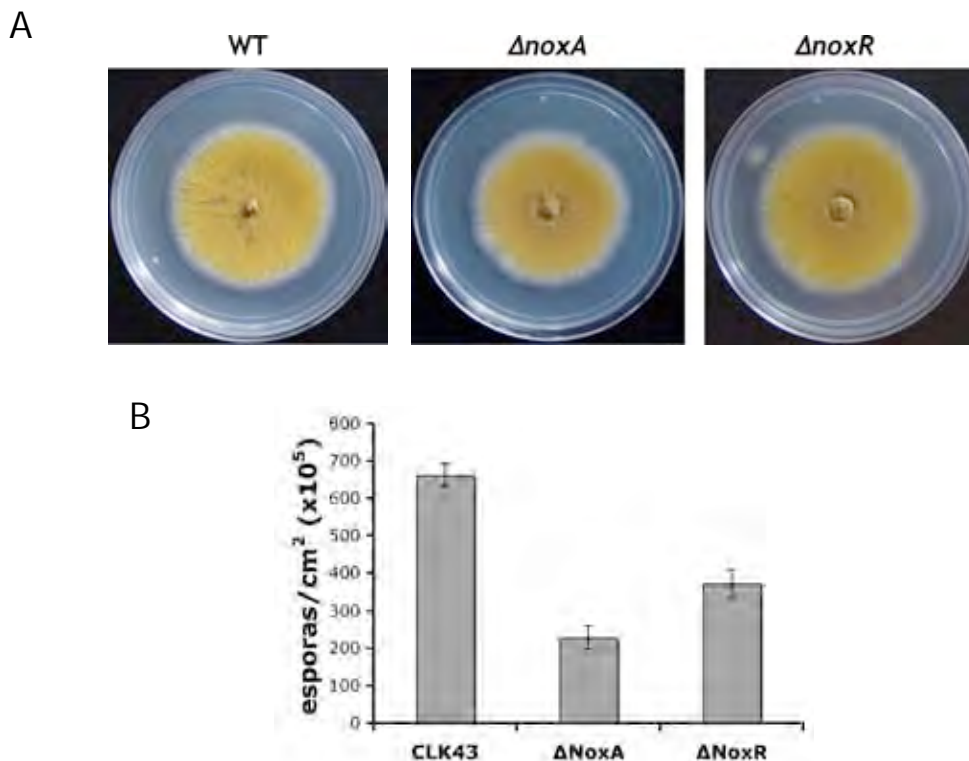


Figura 11. Las mutantes $\Delta noxA$ y $\Delta noxR$ no están afectadas en el crecimiento radial pero sí están afectadas en la conidiación. A. Crecimiento radial. Conidias de las cepas silvestre y de las mutantes CAH4 ($\Delta noxA$) y TAH3 ($\Delta noxR$) se inocularon por punto en placas de medio mínimo con 1% de glucosa y se incubaron a 37°C durante 5 días. B. Se cuantificó el número total de esporas producidas en las condiciones descritas en A, y se calculó el número de esporas/cm². Las columnas representan valores promedio de 3 réplicas en cada caso, las barras de error indican la desviación estándar.

Aunque las mutantes $\Delta noxA$ y $\Delta noxR$ no estuvieron afectadas en el crecimiento, es evidente que presentaron defectos en la conidiación. Es por ello que decidimos analizar si la disminución en la producción de esporas observada en éstas mutantes se debía a la formación de conidióforos incompletos o defectuosos. Los resultados mostrados en la figura 12 indican que ambas mutantes desarrollan conidióforos completos de manera similar a los formados por una cepa silvestre. Se observó la presencia de las estructuras propias de un conidióforo: vesícula, métula, fialide y esporas, y en ambas mutantes la morfología de estas estructuras fue similar a la de los conidióforos silvestres (Fig. 12).

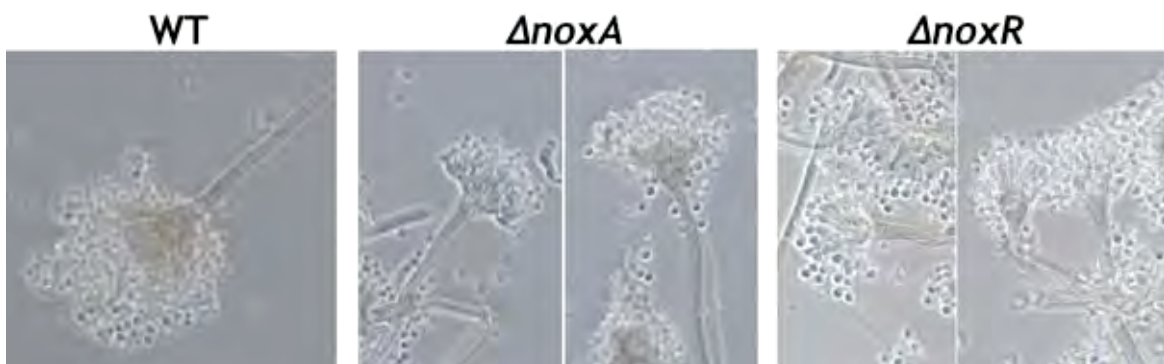


Figura 12. Las mutantes $\Delta noxA$ y $\Delta noxR$ desarrollan conidióforos completos, al igual que una cepa silvestre. Se inocularon por punto placas de medio mínimo con conidios de la cepa silvestre CLK43 y de las cepas CAH4 ($\Delta noxA$) y TAH3 ($\Delta noxR$). Las fotos muestran la morfología de los conidióforos después de 5 días de crecimiento a 37°C.

3. NoxA y NoxR parecen no tener un papel fundamental durante la germinación y el crecimiento vegetativo.

En un estudio reciente se reportó que la carencia de NoxR en *A. nidulans* genera un patrón de germinación atípico en el cual se forma más de un tubo germinal, de manera aleatoria y no bipolar como en el caso de una cepa silvestre (Semighini y Harris, 2008). Decidimos analizar el patrón de germinación de las mutantes $\Delta noxA$ y $\Delta noxR$ generadas en este estudio, en comparación con el de una cepa silvestre.

Ambas mutantes mostraron patrones de germinación similares al de una cepa silvestre, es decir, al cabo de 6 h de haberse realizado el inóculo se observó que la mayor parte de

las conidias formó un tubo germinal (Fig. 13A). Además la tinción con DAPI para la detección de núcleos indicó que la migración y distribución de estos a lo largo de los tubos germinales ocurrió de manera similar a lo visto en la cepa silvestre.

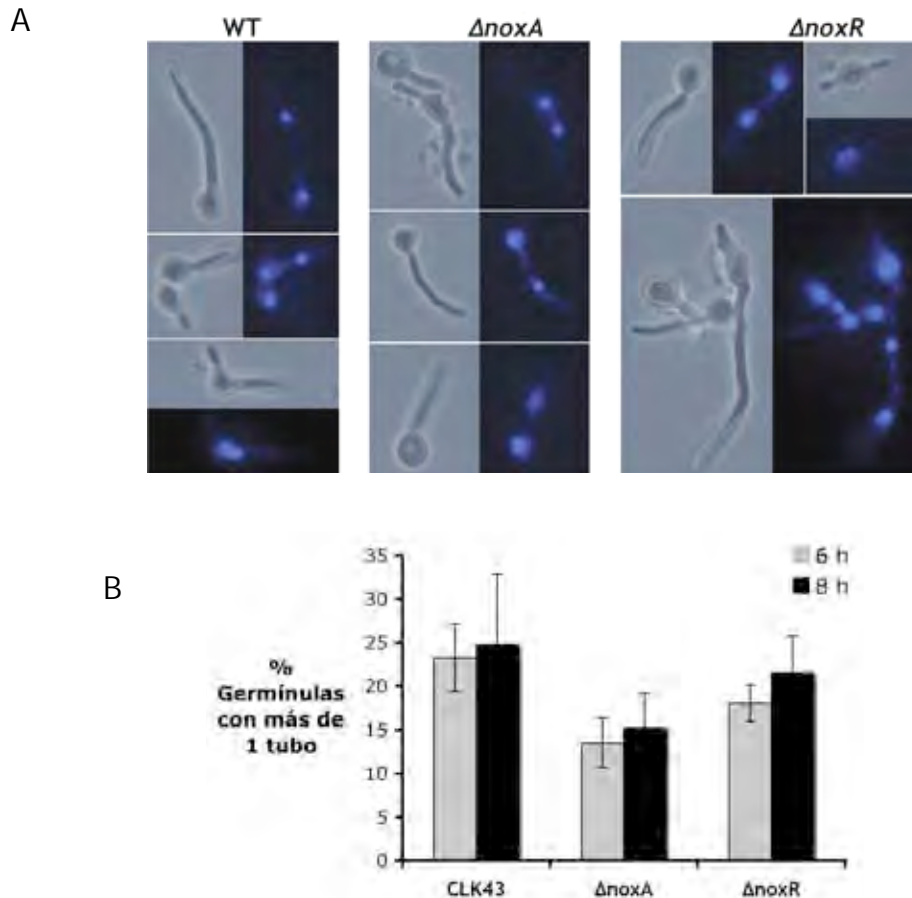


Figura 13. Germinación de las cepa silvestre y cepas mutantes $\Delta noxA$ y $\Delta noxR$. Conidias de las cepas silvestre, así como de las mutantes CAH4 ($\Delta noxA$) y TAH3 ($\Delta noxR$) se inocularon en medio mínimo líquido a una concentración final de 10^6 esporas/ml y se incubaron durante 6 h en agitación (300 rpm) a 37°C. A. Las germinulas se fijaron y se tiñeron con DAPI para la detección de núcleos y se observaron en microscopia de fluorescencia. B. Del total de germinulas se cuantificó el porcentaje que presentó más de un tubo germinal en las condiciones descritas en A al cabo de 6 y 8 h. Las barras corresponden a valores promedio de dos experimentos diferentes con dos réplicas cada uno.

Si bien las mutantes $\Delta noxA$ y $\Delta noxR$ presentaron la formación de dos tubos en algunas de las germinulas, este mismo fenómeno se observó en la cepa silvestre, por lo que no puede considerarse un evento exclusivo de las mutantes. Por ello se cuantificó el porcentaje de las germinulas que mostraron la formación de más de un tubo durante las primeras 6 y 8 h de germinación. La figura 13B indica que la proporción de germinulas

que presentaron más de un tubo fue similar tanto en la cepa silvestre como en las mutantes y es menor al 25%, lo cual sugiere que en realidad NoxA y NoxR no juegan un papel durante la germinación.

Adicionalmente quisimos saber si *noxA* se expresa durante la geminación y el crecimiento vegetativo. Para ello muestras de la cepa silvestre CLK43 en diferentes tiempos de crecimiento se utilizaron para la extracción de RNA y se analizaron en una hibridación tipo Northern con una sonda específica para *noxA*. Como se muestra en la figura 14, los niveles del mensajero de *noxA* fueron casi imperceptibles hasta las 4 h de germinación, y después mostraron niveles muy bajos hasta las 14 h. El hecho de que las mutantes $\Delta noxA$ y $\Delta noxR$ no mostraron algún fenotipo relevante durante esta fase del crecimiento coincidió con los bajos niveles de expresión de *noxA* mostrados (Fig 14).

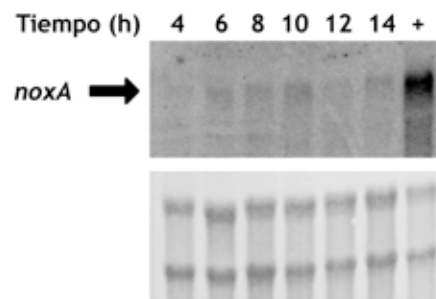


Figura 14. El mensajero de *noxA* se expresa poco durante la germinación y el crecimiento vegetativo. Conidios de la cepa silvestre CLK43 (1×10^7 esporas/ml) se inocularon en medio mínimo con glucosa a 37°C y 300 rpm. Las muestras se colectaron en los tiempos indicados para la extracción de RNA total, y este se usó para la hibridación tipo Northern con la sonda específica para *noxA*. + es el control positivo para *noxA*, que corresponde a un extracto de micelio de 14 h transferido a medio mínimo sin nitrógeno, durante 4 h, condición en la que *noxA* se expresa fuertemente. El panel inferior muestra los RNA ribosomales como control de carga.

4. Las mutantes $\Delta noxA$ y $\Delta noxR$ están bloqueadas en el desarrollo sexual

Aunque la mutante $\Delta noxA$ fue capaz de cruzarse al menos con una cepa y formar cuerpos fructíferos híbridos, fue incapaz de cruzarse consigo misma y por lo tanto no desarrolló cleistotecios; es decir que está impedida en el desarrollo sexual de manera similar a la mutante reportada previamente por Lara-Ortiz y col. (2003). De igual forma la mutante $\Delta noxR$ se incubó en condiciones de reproducción sexual y se vio que también está bloqueada en la formación de cuerpos fructíferos (Fig. 15).

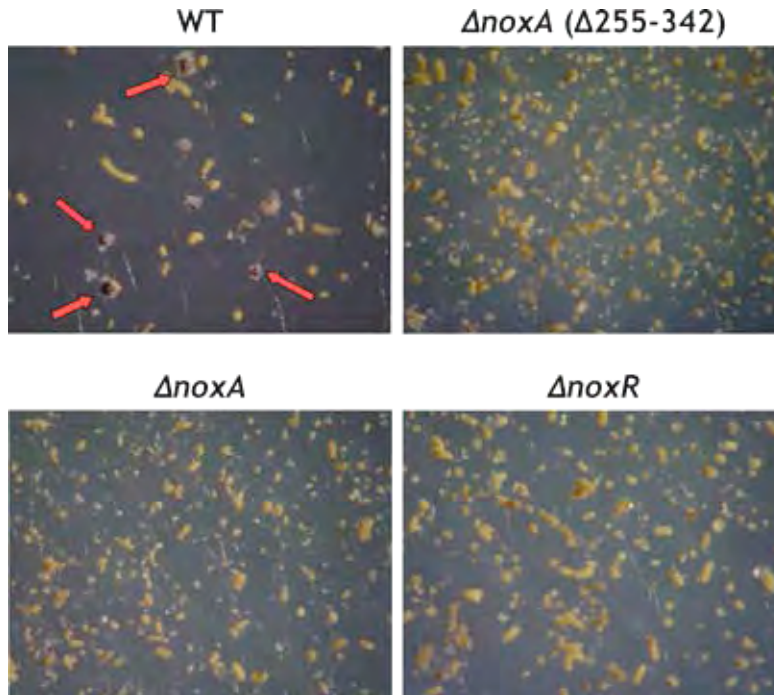


Figura 15. Las mutantes $\Delta noxA$ y $\Delta noxR$ son incapaces de formar cuerpos fructíferos sexuales. Conidios de la cepas silvestre CLK43, TTL3 ($\Delta noxA$, $\Delta 255-342$), CAH4 ($\Delta noxA$) y TAH3 ($\Delta noxR$) se inocularon placas de agar al 1.25% más suplementos (1000 esporas concentradas en 2 μ l) y se incubaron a 37° C durante 5 días. Al cabo de este tiempo se colocaron cilindros de Medio SC de aproximadamente 1cm de diámetro al borde de las colonias y se sellaron las cajas con cinta para inducir ciclo sexual. Se incubaron nuevamente durante 5 días y se observaron al microscopio. En la cepa silvestre algunos cleistotecios se indican con las flechas.

5. Construcción de un alelo dominante DARacA mediante mutagénesis dirigida

Si la inactivación de NoxA y NoxR disminuye y bloquea el desarrollo asexual y sexual respectivamente, resultó importante para este trabajo determinar si un incremento en la actividad de NoxA estimula el desarrollo de *A. nidulans*.

Como estrategia experimental se decidió expresar un alelo que genera un proteína RacA constitutivamente activa (DARacA), potencialmente capaz de actuar constitutivamente sobre sus posibles efectores, entre ellos la NADPH oxidasa NoxA.

Se sabe que la forma constitutivamente activa de las proteínas Rac es incapaz de hidrolizar GTP. En mamíferos una de las mutaciones comunes que generan esta forma activa de Rac es el cambio de la glicina 12 por valina (revisado en Heasman y Ridley, 2008).

Previamente en el hongo *C. trifolii* se reportó que el cambio de la glicina 18 de Rac1 por valina (G18V) genera una forma dominante activa de esta proteína (Chen y Dickman, 2004). La secuencia de aminoácidos de RacA de *A. nidulans* presenta alta similitud con la secuencia de Rac1 de *C. trifolii*, así como a la de otras isoformas de Rac presentes en diversos hongos. Como se indica en la figura 16, las secuencias de aminoácidos de estas proteínas están muy conservadas, incluyendo el residuo de Glicina 18.

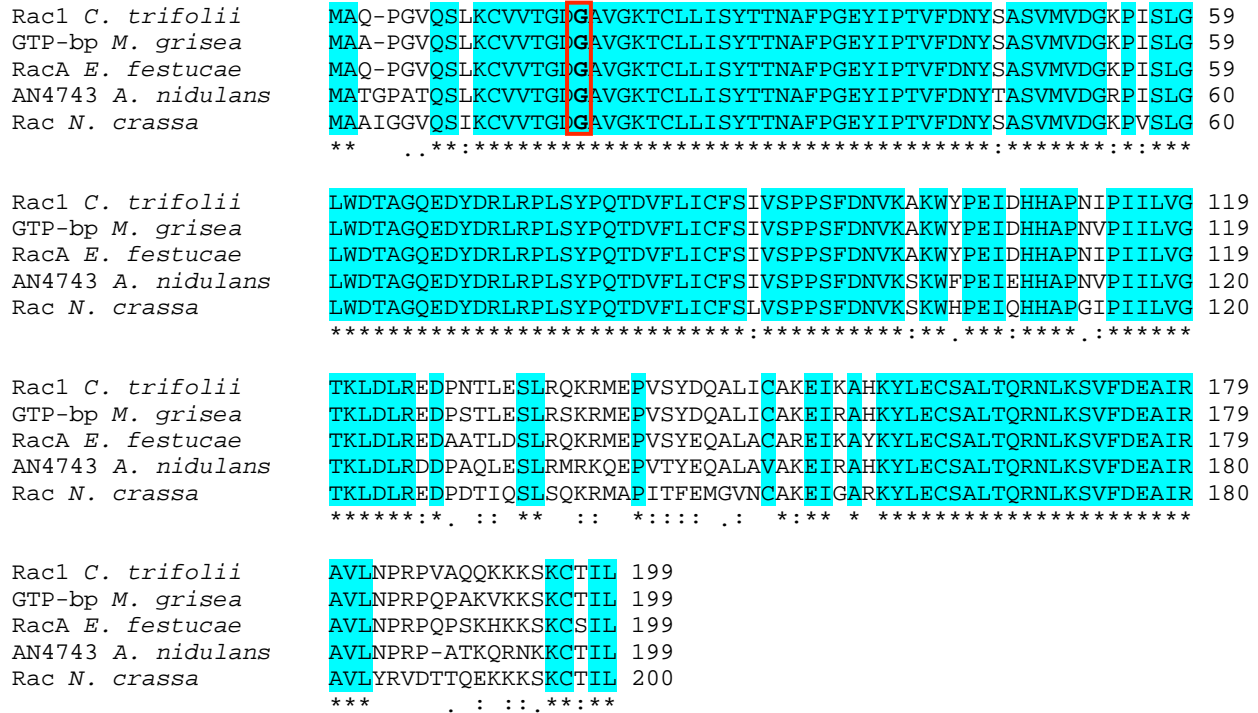


Fig 16. La secuencia de aminoácidos de las isoformas de Rac presentes en diversos hongos se encuentra muy conservada. AN4743 está reportada como proteína hipotética similar a RacA en *A. nidulans*. La secuencia de aminoácidos de RacA de *A. nidulans* se alinea con Rac1 de *C. trifolii*, *M. grisea*, *E. festucae* y *N. crassa*. Rac se encuentra muy conservada entre estos hongos, incluyendo la Glicina 18 (G18) indicada en el recuadro rojo.

Los vectores pAH3 y pAH4 (ver Tabla 3), en los cuales la secuencia de *racA*^{G18V} está bajo el control del promotor *alcA* y en el caso de pAH4 se fusionó además con la secuencia de la proteína roja fluorescente, se emplearon para transformar la cepa silvestre A1153 de *A. nidulans* mediante la técnica de fusión de protoplastos. Las transformantes obtenidas se confirmaron mediante hibridación tipo Southern (Fig. 17).

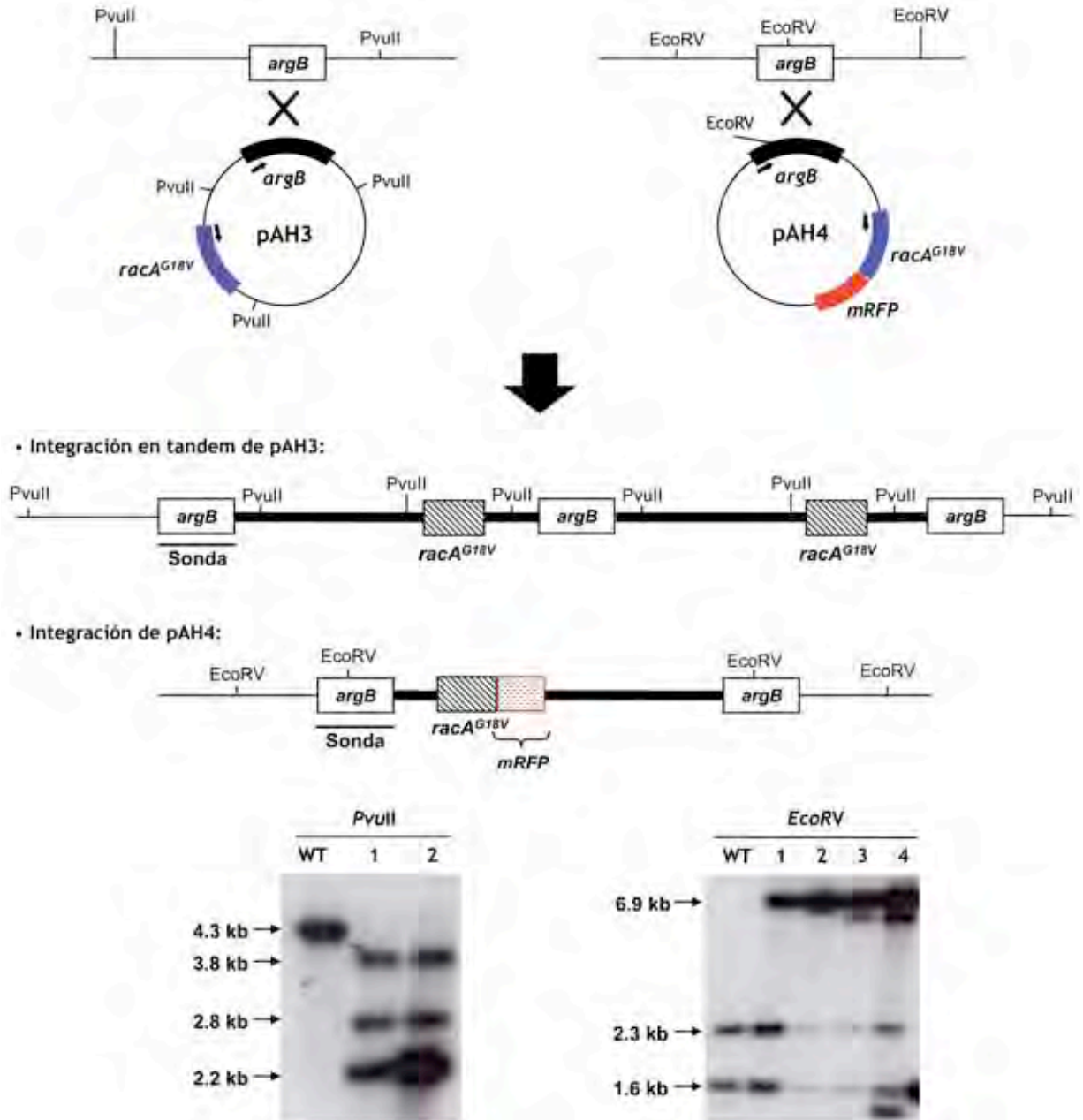


Figura 17. Integración de los plásmidos pAH3 y pAH4 y confirmación mediante hibridación tipo Southern. Los plásmidos pAH3 y pAH4 los cuales contienen el alelo dominante activo de *racA* (*racA^{G18V}*) se usaron para transformar la cepa A1153 de *A. nidulans*. ADN de las transformantes con pAH3 se digirió con la enzima *PvuII*, y el ADN de las transformantes con pAH4 se digirió con *EcoRV*. En ambos casos también se realizaron digestiones de ADN de la cepa silvestre con las enzimas indicadas. La hibridación se realizó con la sonda indicada. El patrón de digestión con *PvuII* corresponde a una banda de 4.3 kb para la cepa silvestre y bandas de 3.8, 2.8 y 2.2 kb en el caso de integración en tandem de pAH3 (panel inferior izquierdo), se eligió a la transformante 1 a la cual se llamó TAH4. La digestión con *EcoRV* genera un patrón de bandas de 2.3 y 1.6 kb para el gen silvestre *argB* y una banda adicional de 6.9 kb para la integración de pAH4 (panel inferior derecho), de estas se eligió a la transformante 1 y se le llamó TAH5.

Es importante señalar que la integración de los plásmidos esta dirigida al locus de *argB*, por lo cual las mutantes obtenidas contienen dos copias del gen *racA*: el alelo dominante activo, bajo el control del promotor *alcA*, integrado en *argB*; y el gen silvestre.

Como se muestra en la figura 17 las transformantes obtenidas con el plásmido pAH3 contienen más de un evento de integración. Generalmente la integración del plásmido ocurre por un evento sencillo de recombinación homóloga, sin embargo la integración de más de una copia puede ocurrir por eventos secuenciales de recombinación o por integración de plásmidos cointegrados.

6. La inducción de DARacA disminuye el crecimiento radial, la conidiación y parece aumentar la producción de $O_2^{\bullet-}$

Dado que el promotor *alcA* se reprime por glucosa (Bailey y Arst, 1975), se desreprime en condiciones de baja disponibilidad de glucosa y se induce fuertemente en presencia de treonina (Creaser et al., 1985; Waring et al., 1989), se decidió probar la mutante con el alelo *alcA::racA^{G18V}* confirmada (TAH4) en diferentes medios con el fin de ver los efectos del nivel de expresión de DARacA en el crecimiento y morfología del hongo (Figura 18).

Los resultados en la Fig 18 indican que la mutante *alcA::racA^{G18V}* creció menos radialmente respecto de la cepa silvestre y produjo menor cantidad de esporas, lo cual está indicado por la pobre coloración de la colonia; además las colonias mutantes presentaron una morfología más abultada y con mayor cantidad de micelio aéreo incluso en condiciones represoras (glucosa al 1%). Se ha visto que en medio sólido existe desrepresión del promotor de *alcA*, aún en presencia de glucosa, especialmente en los conidióforos (Marhoul, 1996). Los fenotipos mostrados se acentuaron en condiciones de desrepresión (glucosa 0.1%) y de inducción (treonina 100 mM), ya que aunque estas condiciones también afectaron el crecimiento en la cepa silvestre, fue notable una disminución en el crecimiento radial y la esporulación en la mutante *alcA::racA^{G18V}* (Figura 18, panel izquierdo).

Se determinó de manera cualitativa, la formación de ion superóxido en estas cepas mutantes, en los medios descritos anteriormente, mediante el uso de NBT, el cual forma

un precipitado azul-morado cuando se oxida por acción del anión superóxido. Como se muestra en la figura 18 (panel derecho), las mutantes que expresan DARacA presentaron mayor formación del precipitado azul respecto a la cepa silvestre, lo cual sugiere una mayor formación del anión superóxido, incluso en medio sin inducción (1% de glucosa). Esto se volvió más evidente en condiciones de desrepresión y de inducción con treonina, donde se observó mayor formación del precipitado azul-morado.

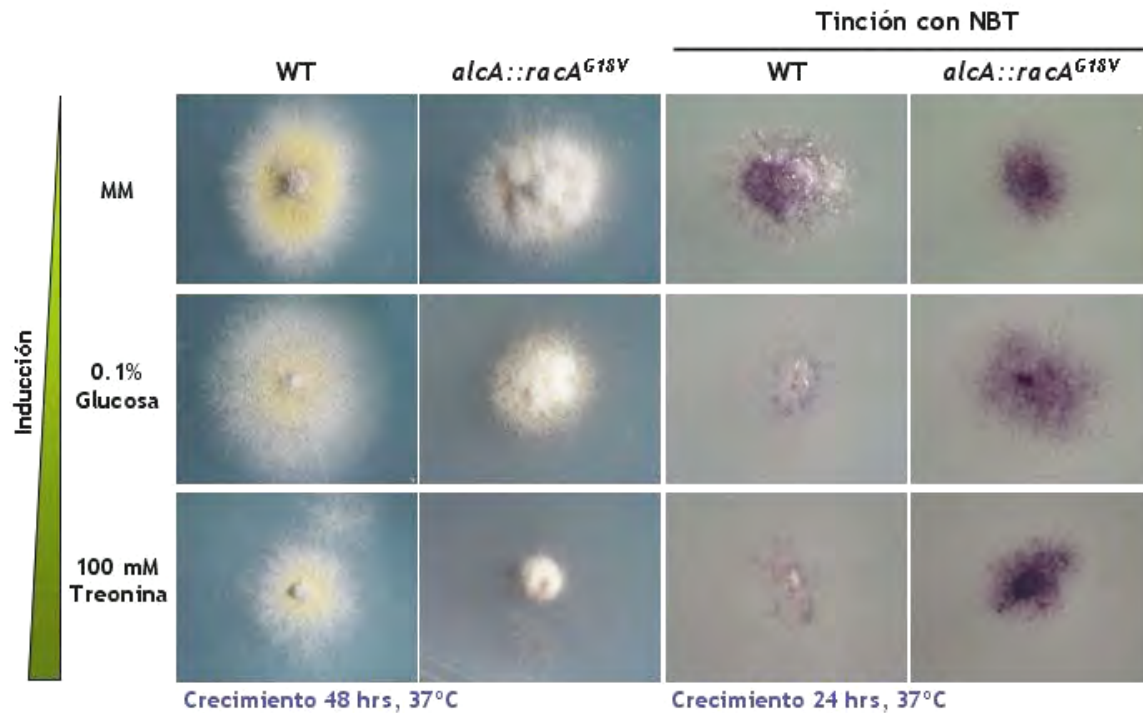


Figura 18. Efecto de la inducción de DARacA sobre el crecimiento radial, la conidiación y la producción del ión superóxido. Conidios de la cepa silvestre y de la mutante TA4 (*alcA::racA^{G18V}*) se inocularon en cajas de medio mínimo con diferentes fuentes de carbono y se incubaron a 37°C durante los tiempos indicados. Para la tinción con NBT, a las 24 hrs de crecimiento se adicionó una solución de NBT 0.3 mM, NADPH 0.3 mM y se incubó durante 30 min a temperatura ambiente y en la oscuridad. Las fotografías se obtuvieron en un microscopio estereoscópico.

7. La inducción de DARacA en esporas inhibe el establecimiento del crecimiento polar

Cuando las mutantes *alcA::racA^{G18V}* se inocularon directamente en medio líquido con treonina se observó que las conidias se hincharon y aumentaron su tamaño. Sin embargo, aún después de 24 horas no fueron capaces de formar un tubo germinal, en claro

contraste con la cepa silvestre. Sin embargo, en dichas conidias se observó la presencia de más de un núcleo (tinción con DAPI), lo cual indica que al igual que en la cepa silvestre ocurre la división nuclear, pero no se establece el crecimiento polar para formar el tubo germinal (Fig 19).

A manera de control, se inocularon esporas de la cepa mutante en medio mínimo con glucosa (condición represora) y se observó que en dichas condiciones la germinación ocurrió de manera similar a lo visto en una cepa silvestre, es decir, se observó la formación del tubo germinal (datos no mostrados).

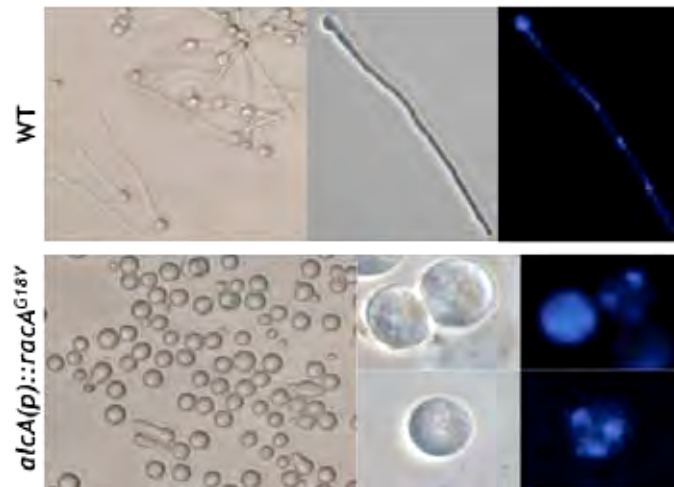


Figura 19. La inducción de DARacA en las conidias impide el establecimiento del crecimiento polar. Conidias de las cepas silvestre y de la mutante TAH4 (*alca::racA^{G18V}*) se germinaron en medio mínimo con treonina 100 mM como fuente de carbono durante 24 hrs, a 37°C y con agitación a 300 rpm. En el panel derecho se muestran tinciones con DAPI para la detección de los núcleos. Las fotografías se tomaron usando microscopia de contraste de fases y de epifluorescencia.

8. La inducción de DARacA en micelio cambia el patrón de crecimiento polar a no polar

Con el fin de evaluar los efectos de la inducción de DARacA durante el crecimiento vegetativo se realizó un ensayo de inducción de expresión de DARacA en medio líquido. Esporas de las mutantes con la integración *alca::racA^{G18V}* se germinaron en medio mínimo con glucosa durante 14 h y posteriormente se transfirieron a medio mínimo con treonina (100 mM) como medio de inducción durante 24 h más (Fig. 20).

En una cepa silvestre el cambio de la fuente de carbono durante el crecimiento vegetativo no provocó cambios en el patrón de crecimiento, ya que este siguió siendo apical. Sin embargo, la inducción del alelo constitutivamente activo de RacA en el micelio generó un cambio en el patrón de crecimiento de las hifas, de polar a no polar, ya que se observó la formación de estructuras circulares en las puntas de las hifas. Este efecto fue muy rápido, ya que pudo apreciarse desde la primera hora de inducción (Fig. 20). La formación de estas estructuras se apreció prácticamente en todas las puntas de las hifas. Sin embargo, al cabo de 24 h de inducción, estas estructuras ya no se observaron y las puntas de las hifas ya no se encontraron redondeadas, lo cual sugiere que el cambio morfológico en el patrón de crecimiento fue transitorio.

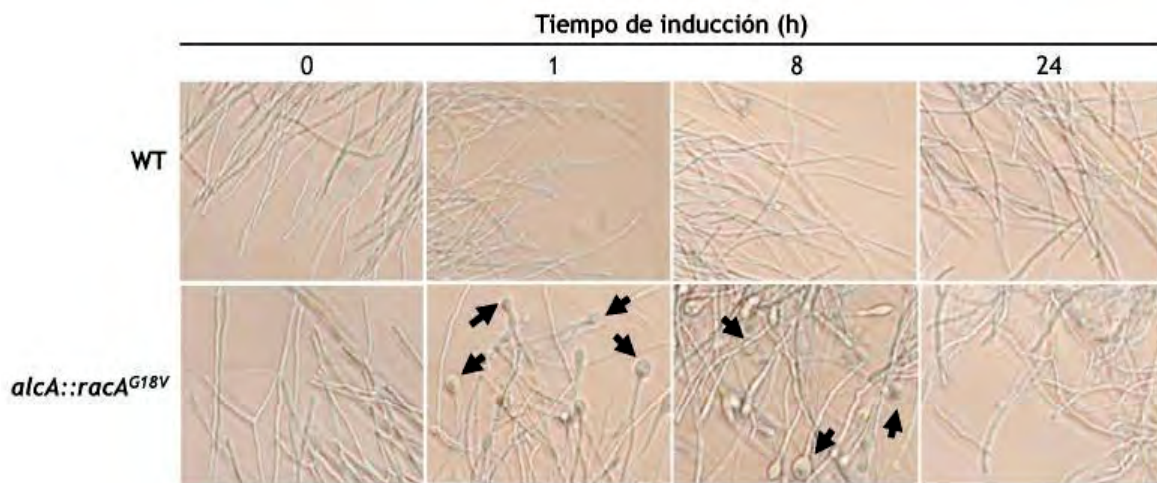


Figura 20. La inducción de DARacA en el micelio cambia el patrón de crecimiento polar a no-polar. Conidios de la cepa silvestre así como de la transformante TAH4 (*alca::racA^{G18V}*) fueron germinados en medio mínimo con glucosa durante 14 h y posteriormente se transfirieron a medio mínimo con treonina 100 mM durante 24 h más.

9. Localización de la proteína DARacA mediante la fusión con la proteína monomérica roja fluorescente (mRFP).

Se realizó el mismo experimento de inducción de DARacA en micelio, pero empleando la cepa con la integración *alca::racA^{G18V}::mRFP*. En condiciones de inducción de DARacA-mRFP en micelio, también se observó un cambio en el patrón de crecimiento de la hifa, de polar a no-polar (Fig. 21). La fusión de DARacA con la proteína fluorescente parece afectar ligeramente la función de DARacA, ya que se observó un retraso en la aparición

del cambio morfológico descrito. La presencia de puntas globosas no fue tan perceptible al cabo de 2 h de inducción, sin embargo a las 4 h de inducción el cambio de crecimiento polar a no-polar se observó prácticamente en todas las puntas de las hifas.

La fluorescencia colocalizó con la formación de las puntas hinchadas, lo cual sugiere que la proteína DARacA se concentra principalmente en las estructuras donde ocurre el cambio en el patrón de crecimiento (Fig. 21).

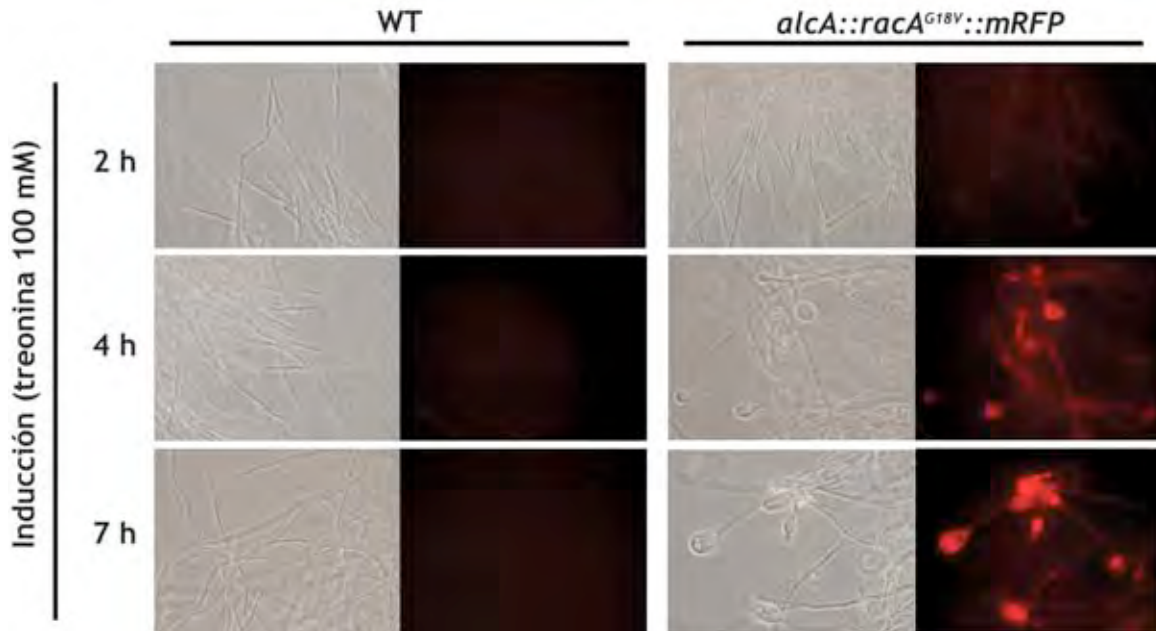


Figura 21. La proteína DARacA-mRFP se localiza principalmente en las puntas globosas de las hifas. Conidios de la cepa silvestre y de la transformante TAH5 (*alcA::racA^{G18V}::mRFP*), en la que DARacA esta fusionada a la proteína roja fluorescente (mRFP), se germinaron en medio mínimo con glucosa durante 14 h a 37°C y 300 rpm y posteriormente se transfirieron a medio mínimo con treonina 100 mM durante los tiempos indicados. Las fotografías se tomaron usando microscopia de contraste de fases y de epifluorescencia.

10. La inducción de DARacA en micelio no induce actividad de la Catalasa B ni la fosforilación de la MAPK Saka como respuesta antioxidante

Si la inducción de DARacA resulta en la activación de NoxA y la producción de ERO, es importante determinar si se activan vías de señalización que respondan a la presencia de ERO exógenas. En 1997, Kawasaki y col. reportaron que la actividad de la Catalasa B de *A. nidulans* es baja en las conidias, desaparece después de la germinación y comienza a

aumentar después de 10 h de crecimiento y también durante la conidiación. Además se vió que esta catalasa se induce en respuesta al H₂O₂ exógeno.

Es por ello que se realizó un ensayo de actividad de catalasa para determinar la inducción de la catalasa B en condiciones de inducción de DARacA durante el crecimiento vegetativo, esto es en micelio. La actividad de catalasa B detectada en una cepa silvestre en condiciones de inducción con treonina se mantuvo prácticamente uniforme desde la primera hora de inducción, y decayó un poco en el tiempo 24 h. De manera similar, la mutante *alcA::racA^{G18V}* presentó actividad constante de esta enzima antioxidante durante la inducción, y solo se observa que a las 24 h esta actividad no ha decaído. Sin embargo, el comportamiento en la actividad de esta enzima es el mismo tanto en la cepa silvestre como en la mutante (Fig. 22).

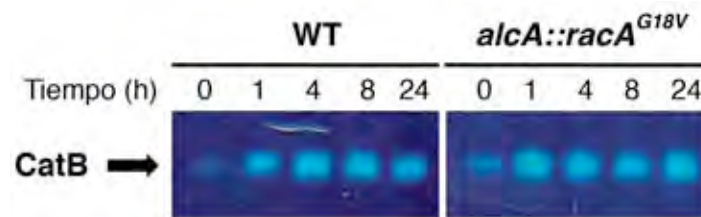


Figura 22. Gel de actividad de Catalasa B. En cada caso se emplearon 50 µg de proteína extraída de micelio de la cepa silvestre así como de la mutante TAH4 (*alcA::racA^{G18V}*) en los tiempos de inducción indicados. Las condiciones de inducción son descritas en la figura 20.

Por otra parte se ha visto que el gen *sakA* de *A. nidulans* codifica para una proteína MAPK, la cual se activa en respuesta al estrés osmótico y oxidativo en el hongo (Kawasaki et al., 2002). Se decidió entonces medir los niveles de fosforilación de dicha proteína en condiciones de inducción de DARacA en el micelio. En el Western-blot de la figura 23 (panel inferior) se muestra el total de proteína SakA presente en extractos de micelio sometido a condiciones de inducción (100mM de treonina) y de represión (MM con glucosa 1%). Tanto en la cepa silvestre como en la mutante *alcA::racA^{G18V}* no se detectó proteína en su forma fosforilada en ninguna de las dos condiciones probadas (Fig 23, panel superior).

La presencia de SakA no fosforilado en condiciones de inducción de DARacA sugiere que en estas condiciones no se activó la vía de señalización de SakA, lo cual concuerda con la falta de inducción de actividad de Catalasa B, en las mismas condiciones.

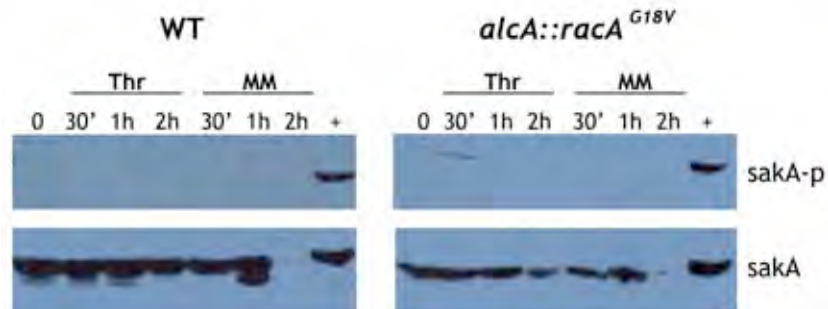


Figura 23. Ensayo de Inmunodetección de SakA total y fosforilada (SakA-P). Extractos de proteína proveniente de micelio de la cepa silvestre así como de la mutante TAH4 (*alcA::racA^{G18V}*), en las condiciones descritas en la figura 20 y en los tiempos indicados, se corrieron en SDS-PAGE y se realizó un western blot con anticuerpos anti-p38 (SakA-P) y antiHog1 (SakA). + es el control positivo para SakA-P, que corresponde a un extracto de conidias de la cepa silvestre, en la que se sabe que SakA se encuentra fosforilada (Lara-Rojas, et al., enviado).

11. Los efectos en el crecimiento y la morfología generados por la inducción de DARacA no son dependientes de NoxA

Es importante determinar si los efectos observados por la inducción de DARacA se deben a la activación de NoxA, para lo cual se generaron cepas dobles mutantes *alcA::racA^{G18V} ΔnoxA*, mediante una cruce sexual. Es importante mencionar que también se obtuvieron dobles mutantes con más de un evento de integración *alcA(p)::racA^{G18V}*. Dichas mutantes se confirmaron mediante hibridación tipo Southern, como se describió anteriormente (datos no mostrados).

Se compararon los fenotipos de las mutantes dobles con respecto a la cepa silvestre y a las mutantes sencillas *alcA::racA^{G18V}* y *ΔnoxA*. Como se había mostrado previamente en condiciones de represión (glucosa 1%) la mutante *alcA(p)::racA^{G18V}* formó mayor cantidad de micelio aéreo y menor cantidad de conidios. Los resultados en la figura 24A muestran que en las mutantes dobles *alcA::racA^{G18V} ΔnoxA*, ya sea que contengan 1 o más copias de la construcción *alcA::racA^{G18V}*, se observaron estos mismos fenotipos, es decir presentaron mayor formación de micelio aéreo así como defectos en la esporulación. De hecho las mutantes que presentan más de una integración de *alcA::racA^{G18V}* se ven

ligeramente más afectadas en la esporulación respecto a las que tienen solo una copia, ya que se observa una coloración más tenue de las colonias y mayor formación de micelio aéreo (Fig. 24A).

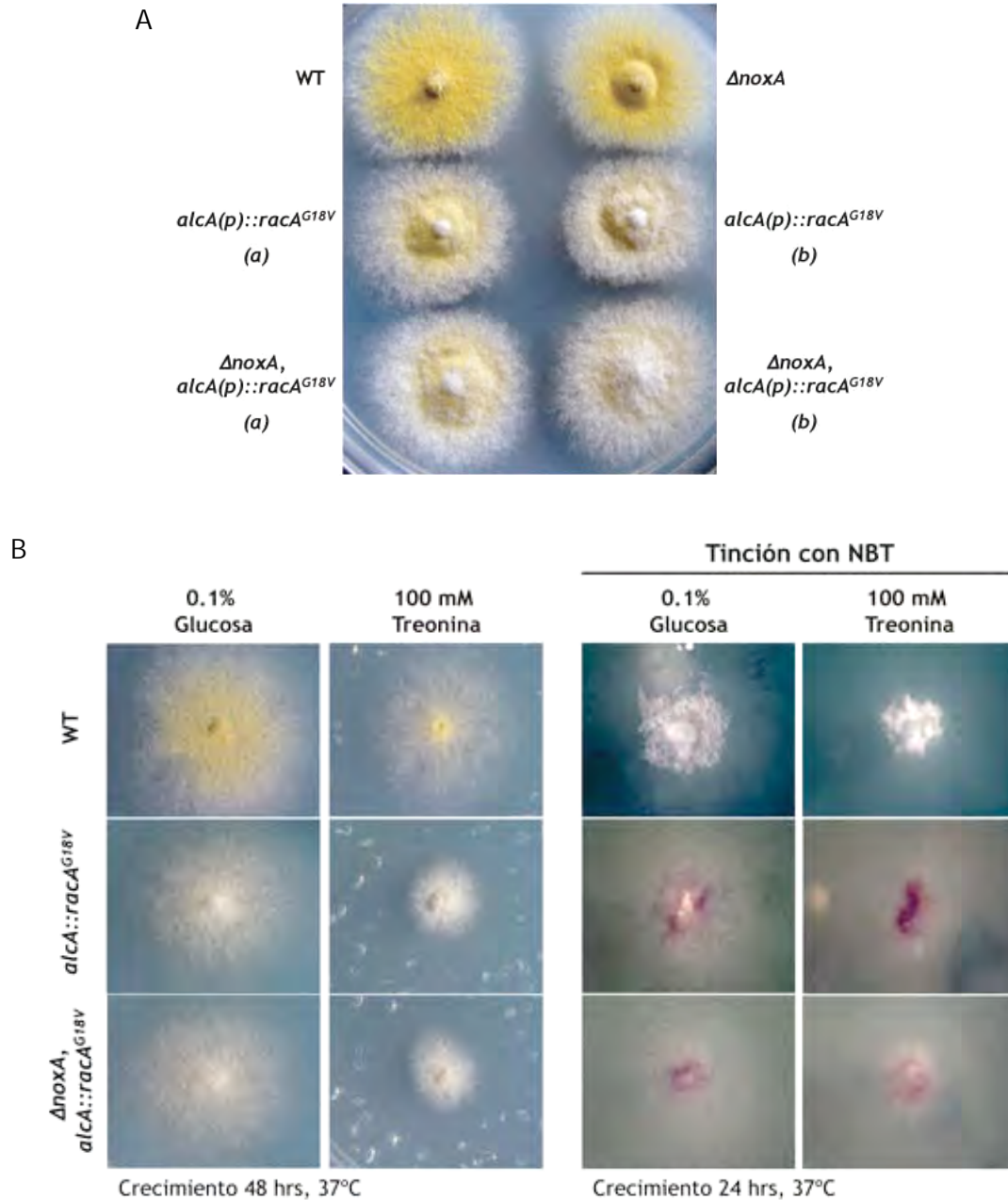


Figura 24. A. Morfología de las mutantes *alcA(p)::racA^{G18V}* y *alcA(p)::racA^{G18V} ΔnoxA*, crecimiento en medio mínimo con glucosa durante 3 días a 37°C. (a) contienen una sola copia de la construcción *alc::rac^{G18V}*; (b) contienen un número indeterminado de copias de la construcción *alc::rac^{G18V}*. B. Inducción de la expresión de DARacA y detección de $O_2^{\cdot -}$ a diferentes niveles de expresión. La tinción con NBT es como se indica en la Fig. 18.

Como se vio en la mutante sencilla, estos fenotipos se acentúan en condiciones de desrepresión y de inducción, tanto la mutante sencilla como la doble disminuyeron el crecimiento radial y la conidiación (Fig. 24B, panel izquierdo).

Se evaluó también de manera cualitativa, mediante el uso de NBT, la capacidad de producción del ion superóxido en condiciones de desrepresión y de inducción. Las mutantes que expresan DARacA en un fondo NoxA silvestre presentan formación del precipitado azul ligeramente mayor respecto a la mutante doble *alcA::racA^{G18V} ΔnoxA*, lo cual sugiere una participación de NoxA en la producción de ión superóxido en las mutantes que expresan DARacA (Fig. 24B).

La producción de anión superóxido en la mutante que integró sólo una copia de la construcción *alcA::racA^{G18V}* parece ser menor que en la que integró más de una copia (ver fig. 18), por lo que parece haber un efecto en la dosis génica.

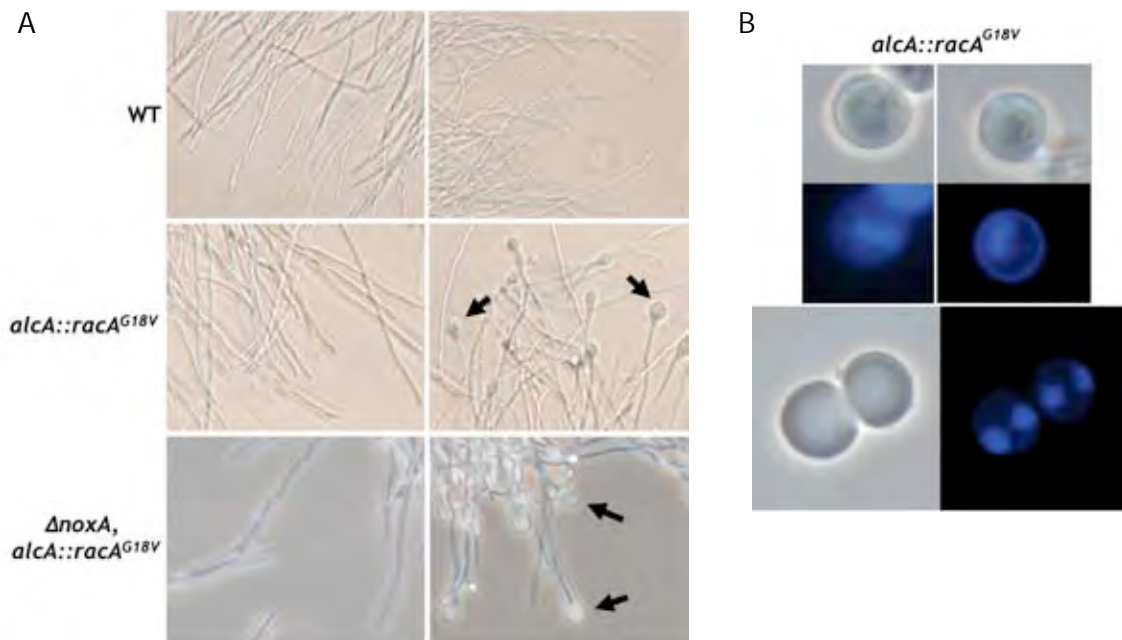


Figura 25. Los efectos en el crecimiento vegetativo y la germinación debidos a la inducción de DARacA no son dependientes de NoxA. A. Conidios de la cepa silvestre así como de las mutantes *alcA::racA^{G18V}* y *alcA::racA^{G18V} ΔnoxA* se crecieron en medio mínimo con glucosa al 1% durante 14 h y posteriormente se transfirieron a medio mínimo con treonina 100 mM. B. Conidias de la cepa mutante *alcA::racA^{G18V} ΔnoxA* se germinaron directamente en medio mínimo con treonina 100 mM durante 24 h. Las conidias se fijaron y se tiñeron con DAPI para resaltar los núcleos y se observaron bajo microscopia de fluorescencia.

Las mutantes dobles *alcA::racA^{G18V} ΔnoxA* también se sometieron a los experimentos de inducción de DARacA en esporas y en micelio como se describió para la mutante sencilla *alcA::racA^{G18V}*. En ambas condiciones se observaron los mismos cambios en el patrón de crecimiento que se observaron en la mutante sencilla: la expresión de DARacA en el micelio, en un fondo *ΔnoxA*, cambió el patrón de crecimiento de las hifas, de polar a no-polar (Fig. 25A); en tanto que la expresión de DARacA en esporas no impidió la división nuclear, pero si inhibió el establecimiento del crecimiento polar, evitando la formación de un tubo germinal (Fig. 25B). En estos fenotipos parece no haber diferencias entre las mutantes que integraron una copia de la construcción *alcA::racA^{G18V}* con respecto a las que contienen más de una copia.

12. La desrepresión de DARacA durante el desarrollo sexual induce la formación de cleistotecios de mayor tamaño para lo cual se requiere de NoxA

Dado que es durante el ciclo sexual que el gen *noxA* se expresa a altos niveles y en donde NoxA juega un papel esencial en la formación y desarrollo de los cuerpos fructíferos, se decidió ver el efecto de la inducción de DARacA durante esta etapa del desarrollo, en presencia y ausencia de NoxA.

Durante la inducción del ciclo sexual en condiciones de desrepresión (baja disponibilidad de glucosa), la mutante *alcA::racA^{G18V}* genera cleistotecios más grandes que los producidos por la cepa silvestre. Sin embargo en un fondo mutante *ΔnoxA* la desrepresión de DARac no induce la formación de las estructuras propias del ciclo sexual (Fig 26, panel derecho).

Se observa también que alrededor de estos cleistotecios de mayor tamaño hay mayor cantidad de células Hülle, que parecen estar más adheridas a los cuerpos fructíferos que en la cepa silvestre.

Adicionalmente se probó la viabilidad de las ascosporas contenidas en estos cleistotecios de mayor tamaño y se observó que dichas ascosporas germinan, lo cual indica que son viables (no se muestra).

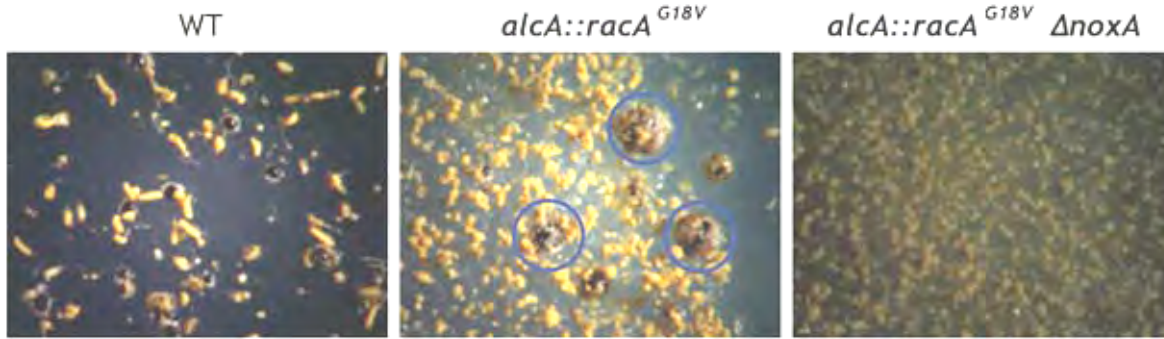
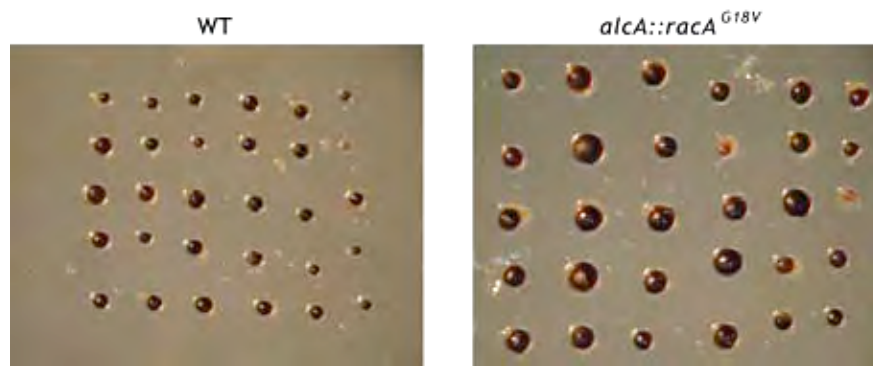


Figura 26. Las mutantes que expresan el alelo DARacA induce la formación de cleistotecios de mayor tamaño, de manera dependiente de NoxA. La inducción del ciclo sexual se realizó como se describe en la figura 10. Los cleistotecios de mayor tamaño están indicados por círculos.

Con el fin de evaluar qué tan reproducible es la formación de cleistotecios de mayor tamaño, se realizó un ensayo más homogéneo de inducción del ciclo sexual (ver Materiales y métodos), y los cleistotecios formados por la cepa mutante y por la silvestre se agruparon en clases de acuerdo a su tamaño.

Aunque el tamaño de los cleistotecios fue variable aún en la cepa silvestre, es evidente que en la mutante la desrepresión del alelo $racA^{G18V}$ consistentemente indujo la formación de cleistotecios de mayor tamaño (Fig 27A). De hecho el análisis estadístico de la distribución del tamaño de los cleistotecios (Fig 27B) mostró que más del 60% de los cleistotecios producidos por la cepa silvestre miden entre 60 y 99 μm de diámetro, en tanto que en la mutante, en condiciones de desrepresión de DARacA, la distribución de los diámetros se concentra entre 100 y 159 μm (casi el 70%), aunque se observa que algunos cleistotecios alcanzan tamaños de casi 200 μm de diámetro.

A



B

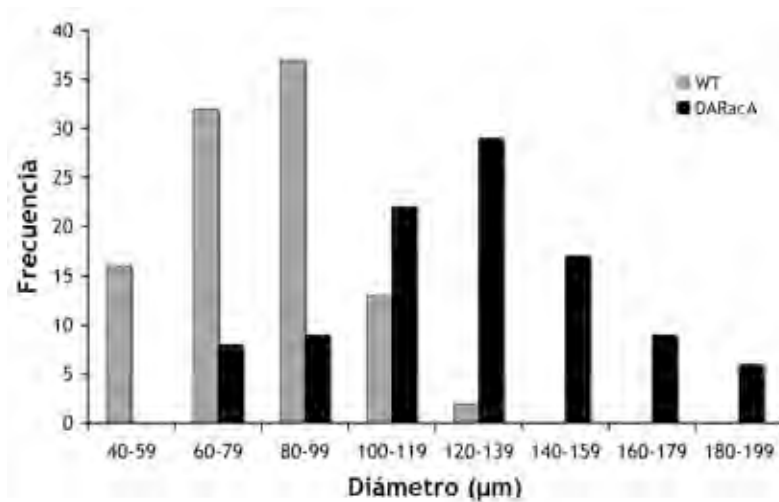


Figura 27. La desrepresión de DARacA durante el ciclo sexual induce la formación de cleistotecios de mayor tamaño. Esporas de 5 días de crecimiento de la cepa silvestre (CLK43) y de la mutante CAH6 (*alcA::racA^{G18V}*) se inocularon a una densidad de 1×10^5 en agar suave (MM con glucosa al 1%) y se incubaron a 37°C durante 24 h. Al término de este tiempo las placas se sellaron con cinta para inducir ciclo sexual y se incubaron durante 8 días más. A. Se tomaron muestras aleatorias de los cultivos, se limpiaron los cleistotecios y se fotografiaron en el microscopio estereoscópico (aumento 6x). B. Con un ocular graduado se midió el diámetro de 100 cleistotecios en cada cepa y se determinó estadísticamente su distribución en clases.

DISCUSIÓN

- NoxR se requiere para regular la actividad de NoxA principalmente durante el desarrollo sexual.

En células de mamífero se han caracterizado ampliamente las proteínas que regulan la actividad de las enzimas NOX (p67phox, p47phox, p40phox y Rac) y de que manera ocurren las interacciones entre dichas proteínas. Sin embargo, poco se sabe sobre las proteínas que intervienen en la activación de las NOX presentes en los hongos, aunque recientemente se identificaron homólogos a p67phox en diversos hongos (NoxR).

Previamente se reportó que en *A. nidulans* el gen *noxA* se expresa durante el ciclo sexual, y que la eliminación parcial de dicho gen impide la formación de cleistotecios (Lara-Ortiz et al., 2003). Sin embargo no se identificaron defectos en el crecimiento, la morfología de las hifas o el desarrollo asexual.

En este trabajo se determinó que la eliminación total del gen *noxA* ($\Delta noxA$) así como la eliminación del gen *noxR* no solo impiden la diferenciación de cleistotecios durante el ciclo sexual, sino que también causan defectos en la esporulación asexual. La eliminación del único gen Nox en *A. nidulans* no mostró efectos en el crecimiento radial, a diferencia de lo que ocurre en hongos como *N. crassa* en el que la eliminación de una de sus isoformas Nox disminuye el crecimiento radial (Cano-Dominguez et al., 2008; Malagnac et al., 2004), o en el patógeno *M. grisea* donde se vio que la mutantes en el gen *nox1* presentan un ligero incremento en el crecimiento radial (Egan et al., 2007).

Las mutantes $\Delta noxR$ generadas en este estudio, al igual que una mutante nula en el gen *noxA*, no muestran diferencias en el crecimiento radial respecto a una cepa silvestre. Estos datos sugieren que al menos en el crecimiento radial la participación de NoxA y de NoxR no parece ser necesaria, probablemente porque este proceso no requiere la producción de ERO derivadas de la actividad de NoxA.

Por otro lado, ambas mutantes presentan defectos en la esporulación asexual, ya que la mutante $\Delta noxA$ produce sólo cerca del 30% de conidios en comparación con los producidos por una cepa silvestre, en tanto que la mutante $\Delta noxR$ produce cerca del

50%. Sin embargo, tales defectos en la esporulación no se deben a alteraciones en la morfología de los conidióforos, ya que ambas mutantes forman conidióforos completos. Se sabe que defectos en la migración nuclear no sólo causan una formación defectuosa de conidióforos, sino también una reducción en el número de esporas (Morris et al., 1995). A este respecto resultaría interesante evaluar si la disminución en la producción de esporas en las mutantes $\Delta noxA$ y $\Delta noxR$ se debe a problemas en la división o en la migración nuclear en la última etapa del desarrollo del conidióforo, cuando se forman las esporas.

Es importante notar que aún cuando ambas mutantes producen menor cantidad de esporas, los defectos en la conidiación son mayores en la mutante $\Delta noxA$. Es posible que aún cuando NoxR no se encuentra en el sistema, NoxA pueda estar llevando a cabo otras funciones distintas de la producción de ERO, a través de su interacción con otras proteínas, lo cual estaría reflejado en la diferencia en la producción de esporas. Resulta importante distinguir si las funciones de NoxA y NoxR en este fenómeno tienen que ver con la producción de ERO o con funciones de andamiaje e interacciones con otras proteínas. Por ejemplo, se ha propuesto que BemA puede participar en el complejo NOX, de manera similar a p47phox o p40phox, y establecer una posible interacción con NoxR. Un estudio reciente muestra que en *A. nidulans* la proteína BemA se localiza en las puntas de las hifas durante el crecimiento apical y que una mutante $\Delta bemA$ presenta una morfología moderadamente anormal en el crecimiento apical de las hifas, además muestra defectos en la formación del conidióforo, ya que forma vesículas pero se detiene el desarrollo posterior. Sin embargo, dicha mutante es capaz de formar cleistotecios durante el ciclo sexual (Leeder y Turner, 2008). En este sentido, BemA podría estar participando en la estabilización y localización del complejo NOX durante la conidiación y el crecimiento, pero parece no ser esencial en el ciclo sexual.

Durante la realización de este trabajo, Semighini y Harris (2008) mostraron que la cancelación de *noxR* en *A. nidulans* conduce a un patrón de germinación diferente, en el cual ocurre la formación de más de un tubo germinal, de manera aleatoria y no bipolar como en el caso de una cepa silvestre, y que esto se correlaciona con una deslocalización de la producción de ERO durante la germinación. En este trabajo mostramos que las mutantes $\Delta noxA$ y $\Delta noxR$ muestran patrones de germinación similares al de la cepa silvestre. Además, encontramos que el mensajero de *noxA* es casi

indetectable a las 4 h de germinación y en tiempos posteriores, por lo cual es poco probable que los defectos de las mutantes $\Delta noxR$ reportados por Semighini y Harris estén relacionados con el papel de NoxR como regulador de NoxA. Por ahora ignoramos las razones de las discrepancias entre nuestros resultados y los reportados por Semighini y Harris, sin embargo las condiciones experimentales son diferentes, dichos autores utilizan temperaturas de incubación de 28 °C, en tanto que en nuestro trabajo se utilizaron temperaturas de 37 °C.

Sin duda el fenotipo más dramático se vió durante la inducción del desarrollo sexual, en el cual la carencia de NoxR impide la formación de cleistotecios, de manera similar a lo visto en una mutante $\Delta noxA$.

Dado que las mutantes $\Delta noxA$ y $\Delta noxR$ presentan los mismos fenotipos en la diferenciación asexual y sexual, esto indica que NoxR tiene un papel fundamental para la actividad de NoxA y por tanto para el desarrollo de *A. nidulans*.

- La inducción de DARacA genera cambios morfológicos en el desarrollo asexual, la germinación y el crecimiento vegetativo de manera independiente de NoxA.

Dado que la eliminación de componentes de mecanismos pro-oxidantes, como NoxA y NoxR, disminuye la producción de esporas y bloquea el desarrollo sexual, nos preguntamos si un incremento en la producción de ERO estimularía el desarrollo de *A. nidulans*; conforme a la hipótesis propuesta por Hansberg y Aguirre en 1990.

Como estrategia experimental, se decidió sobre-expresar un alelo que genera una proteína RacA constitutivamente activa (DARacA). La mutación generada en este trabajo cambia la glicina 18 por valina, con lo que RacA mantiene unido GTP y por tanto se encuentra en su forma activa, siendo capaz de actuar sobre sus posibles efectores, entre ellos la NADPH oxidasa NoxA.

La inducción de DARacA en *A. nidulans* tiene efectos durante el desarrollo asexual, ya que disminuye notablemente el crecimiento radial de la colonia y la esporulación, y parece aumentar la producción del anión superóxido. Un fenotipo similar se describió recientemente en *E. festucae* donde la inducción de DARacA disminuye el crecimiento radial en cultivo e incrementa la producción de ERO (Tanaka et al., 2008).

Durante la germinación la inducción de DARacA generó cambios en el patrón de crecimiento de polar a no polar. Se vió que las esporas que expresan la forma constitutivamente activa de Rac no son capaces de establecer dominancia apical y formar un tubo germinal, sin embargo el proceso de división nuclear parece no estar afectado. Reportes previos indican que durante la germinación el proceso de polarización para la formación del tubo germinal está acoplado a la división nuclear, de manera que debe ocurrir la primera mitosis en las conidias uninucleadas previo a la formación del tubo (Harris, 1999). La inducción de DARacA en conidias parece ser una condición en la que se desacoplan estos procesos.

Som y Kolaparthi (1994) mostraron que la sobre-expresión de una forma constitutivamente activa de RasA durante la germinación inhibe la formación del tubo germinal sin afectar la división nuclear, en un fenotipo similar al presentado por la inducción de DARacA. Probablemente estas dos GTPasas actúan en la misma vía de señalización durante el desarrollo del hongo. En otros sistemas se sabe que Rac actúa río abajo de Ras en múltiples procesos de señalización (Van Aelst y D'Souza-Schorey, 1997); y en 2004 Chen y Dickman, mediante ensayos de doble híbrido, mostraron que existe interacción directa entre Ras y Rac.

En este trabajo se determinó que durante el crecimiento vegetativo, la inducción de DARacA también genera cambios en el patrón de crecimiento de polar a no polar. En condiciones de inducción de DARacA en micelio, las puntas de las hifas pierden polaridad y se tornan hinchadas. Consistente con este hecho, existen reportes en los que la expresión de formas dominante activa o negativa de Rac en otros hongos altera el crecimiento polar (Chen y Dickman, 2004; Tanaka et al., 2008), sin embargo en estos casos las hifas se tornan hinchadas en todo lo largo y no solo en las puntas.

Parece existir una correlación entre la formación del ión superóxido y la actividad de NoxA ya que la expresión de DARacA en un fondo mutante $\Delta noxA$ parece disminuir la producción de anión superóxido. Sin embargo no sucede lo mismo con los cambios en el crecimiento polar generados en las esporas y en el micelio por la expresión de DARacA, ya que estos no dependen de la presencia de NoxA.

Por otro lado, la inducción de DARacA en micelio no parece desencadenar un estrés oxidativo a juzgar por la ausencia de inducción de la Catalasa B o de la fosforilación de

SakA. Sin embargo es posible que aunque se estén produciendo ERO, estas se encuentren localizadas en otros compartimentos celulares o que las ERO se produzcan en niveles bajos de manera que no desencadenan una reacción antioxidante generalizada, como se vio que *noxA* se expresa en niveles bajos durante el crecimiento vegetativo.

El crecimiento polar en los hongos filamentosos requiere del reclutamiento de la maquinaria de desarrollo en sitios específicos de las esporas o de las hifas para la formación del tubo germinal o de ramas laterales, respectivamente (Harris y Momany, 2004), tal es el caso de Rac, que se requiere para la formación de protrusiones de actina.

Mientras que en *E. festucae*, los cambios en el crecimiento polar presentes en mutantes que expresan DARacA se atribuyen a una posible deslocalización de NoxA (Tanaka et al., 2008); nuestro trabajo muestra en *A. nidulans* los cambios de crecimiento polar a isotrópico, tanto en las hifas como en las esporas, no están relacionados con la actividad de NoxA, y probablemente estos cambios se relacionan más con la participación de RacA en la organización del citoesqueleto de actina.

En condiciones de inducción en micelio, DARac-mRFP parece acumularse en las puntas de las hifas donde se produce el cambio de crecimiento polar a no-polar, lo que sugiere que el balance entre las formas de Rac -GDP/-GTP es importante y que el cambio de Rac-GDP a Rac-GTP debe inducirse solo en ciertas condiciones para mantener el patrón de crecimiento polar.

- La desrepresión de DARacA durante el ciclo sexual induce formación de cleistotecios de mayor tamaño.

El mensajero de *noxA* se acumula durante el ciclo sexual, y NoxA es indispensable para la formación de cuerpos fructíferos (Lara-Ortiz et al., 2003). DARacA parece tener un papel en la regulación de NoxA durante el ciclo sexual, ya que su desrepresión durante el ciclo sexual resulta en la formación generalizada de cuerpos fructíferos más grandes que los producidos por una cepa silvestre, mientras que la desrepresión de DARacA en un fondo mutante $\Delta noxA$ no induce la formación de cleistotecios.

Previamente se había visto que la desrepresión del gen *noxA* conduce a un desarrollo sexual prematuro y abundante (Lara-Ortiz et al., 2003), aunque no se determinó el tamaño de los cleistotecios. La presencia de cleistotecios más grandes por la expresión de una forma constitutivamente activa de RacA puede relacionarse con la activación de NoxA. Los cuerpos fructíferos se forman a partir de primordios en las etapas iniciales del ciclo sexual. El primordio se compone de dos tipos de tejido: el tejido ascógeno que da origen a las ascosporas, y el peridio constituido por una red de hifas estériles que rodean al tejido ascógeno y que finalmente da origen a la pared del cleistotecio. Al inicio, el primordio mide aproximadamente 6 μm , en tanto que un cleistotecio maduro mide de 120 a 170 μm (Sohn y Yoon, 2002). Sin embargo en las condiciones experimentales probadas se observó que a los 5 días de inducción del ciclo sexual en una cepa silvestre el tamaño de los cleistotecios maduros se encuentra en un rango de 40 a 140 μm , en tanto que en las mismas condiciones una cepa que expresa la proteína DARacA produce cleistotecios en el rango de 60 a 200 μm . A este respecto resulta importante distinguir si la desrepresión de DARacA durante el ciclo sexual actúa a nivel del desarrollo del tejido ascógeno, del peridio o de ambos.

Nuestros resultados apoyan la teoría de que la generación de ERO a través de la activación de las NADPH oxidasas, juegan un papel importante en procesos de desarrollo y diferenciación celular.

Con base en los resultados y en datos bibliográficos proponemos el siguiente modelo de interacción entre NoxA, NoxR y Rac en las diferentes etapas de desarrollo de *A. nidulans* (Fig 28).

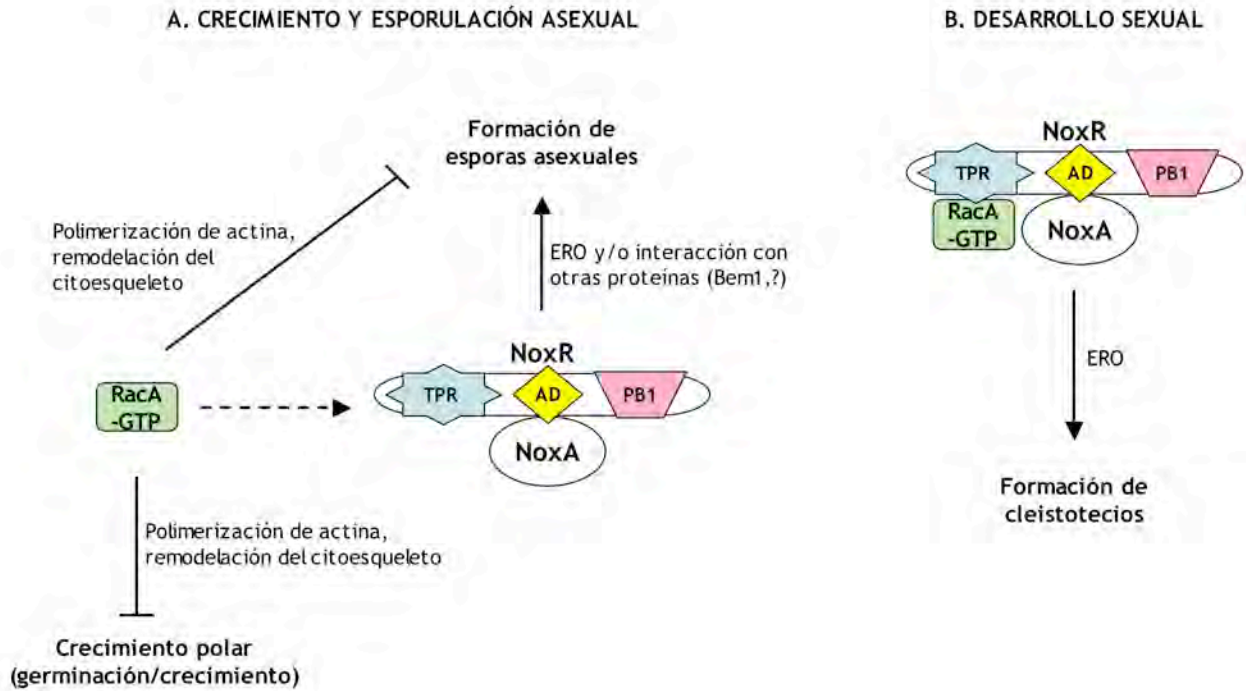


Figura 28. Posible regulación de NoxA durante el desarrollo asexual y sexual de *A. nidulans*. RacA de manera independiente a su papel como posible activador de NoxA, juega un papel importante en el desarrollo asexual, la germinación y el crecimiento. Durante el desarrollo sexual NoxR y RacA actúan como activadores de NoxA.

CONCLUSIONES

1. Las mutantes $\Delta noxA$ y $\Delta noxR$ presentan fenotipos semejantes: ambas muestran defectos en la esporulación asexual, y están impedidas en el desarrollo de sexual en particular en la formación de cuerpos fructíferos o cleistotecios, lo cual sugiere que NoxR es esencial para regular la actividad de NoxA durante el desarrollo de *A. nidulans*.
2. La desrepresión de un forma Dominante Activa de RacA (DARacA) disminuye el crecimiento y la conidiación y parece aumentar la producción de $O_2^{\cdot-}$.
3. La inducción de DARacA en esporas inhibe el establecimiento del crecimiento polar sin afectar la división nuclear.
4. En micelio la inducción de DARacA causa cambios en el patrón de crecimiento de las puntas de las hifas, de polar a isotrópico. La fluorescencia de DARacA-mRFP en las puntas redondeadas de las hifas sugiere la acumulación de DARacA en estas estructuras y su relación con el cambio en el patrón de crecimiento.
5. La inducción de DARacA en micelio no induce la expresión de la Catalasa B ni la fosforilación de la MAPK SakA como respuesta antioxidante, indicando que en estas condiciones NoxA no se activa y por tanto no se alcanza un estado oxidativo.
6. Los efectos en la polaridad generados por la inducción de DARacA durante la germinación de esporas y el crecimiento vegetativo crecimiento son independientes de la función de NoxA, dado que las mutantes dobles $\Delta noxA alcA(p)::racA^{G18V}$ presentan los mismos fenotipos que la mutante sencilla $alcA(p)::racA^{G18V}$.
7. La inducción de DARacA durante el desarrollo sexual parece producir cleistotecios de mayor tamaño de manera generalizada, para lo cual se requiere de NoxA.

PERSPECTIVAS

1. Determinar la localización celular del complejo Nox *in vivo* mediante fusiones de NoxA y NoxR con proteínas fluorescentes, y determinar la localización de DARacA durante el ciclo sexual.
2. Analizar los efectos de la sobreexpresión de DARacA en condiciones de desrepresión de NoxA, por ejemplo en un fondo mutante $\Delta sakA$, en el que se sabe que *noxA* se expresa en etapas tempranas durante la diferenciación sexual lo que conduce a un desarrollo abundante y prematuro de los cleistotecios.
3. Determinar si alteraciones en el balance redox intracelular de ERO, a través de la modificación o eliminación de mecanismos antioxidantes, como catalasas o superóxido dismutasas, causa efectos similares en el desarrollo sexual parecidos a los que produce la desrepresión de DARacA.
4. Mediante el análisis de microarreglos, identificar genes que aumenten o disminuyan su expresión durante el ciclo sexual en respuesta a la inducción de DARacA u otras condiciones que afecten el ciclo sexual, como la carencia de NoxA o NoxR. Si es posible, identificar posibles blancos de las ERO producidas por NoxA durante el ciclo sexual, como factores transcripcionales que se regulen por redox.
5. Establecer las interacciones proteína-proteína entre NoxA, NoxR y RacA, y determinar si la carencia de cualquiera de estas proteínas afecta la localización celular de los otros componentes.
6. Determinar si en condiciones de desrepresión de DARacA durante el ciclo sexual hay un aumento en la producción de ión superóxido, mediante el uso de indicadores como NBT o H₂DCFDA.

REFERENCIAS

- Abo, A., Webb, M.R., Grogan, A. y Segal, A.W. (1994) Activation of NADPH oxidase involves the dissociation of p21rac from its inhibitory GDP/GTP exchange protein (rhoGDI) followed by its translocation to the plasma membrane. *Biochem J* 298 Pt 3: 585-591.
- Adams, T.H., Wieser, J.K. y Yu, J.H. (1998) Asexual sporulation in *Aspergillus nidulans*. *Microbiol Mol Biol Rev* 62: 35-54.
- Adler, V., Yin, Z., Fuchs, S.Y., Benezra, M., Rosario, L., Tew, K.D., Pincus, M.R., Sardana, M., Henderson, C.J., Wolf, C.R., Davis, R.J. y Ronai, Z. (1999) Regulation of JNK signaling by GSTp. *Embo J* 18: 1321-1334.
- Aguirre, J., Rios-Momberg, M., Hewitt, D. y Hansberg, W. (2005) Reactive oxygen species and development in microbial eukaryotes. *Trends Microbiol* 13: 111-118.
- Ameziane-El-Hassani, R., Morand, S., Boucher, J.L., Frapart, Y.M., Apostolou, D., Agnandji, D., Gnidehou, S., Ohayon, R., Noel-Hudson, M.S., Francon, J., Lalaoui, K., Virion, A. y Dupuy, C. (2005) Dual oxidase-2 has an intrinsic Ca²⁺-dependent H₂O₂-generating activity. *J Biol Chem* 280: 30046-30054.
- Arner, E.S. y Holmgren, A. (2000) Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase. *Eur J Biochem* 267: 6102-6109.
- Bae, Y.S., Sung, J.Y., Kim, O.S., Kim, Y.J., Hur, K.C., Kazlauskas, A. y Rhee, S.G. (2000) Platelet-derived growth factor-induced H₂O₂ production requires the activation of phosphatidylinositol 3-kinase. *J Biol Chem* 275: 10527-10531.
- Bailey, C. y Arst, H.N., Jr. (1975) Carbon catabolite repression in *Aspergillus nidulans*. *Eur J Biochem* 51: 573-577.
- Banfi, B., Molnar, G., Maturana, A., Steger, K., Hegedus, B., Demaurex, N. y Krause, K.H. (2001) A Ca²⁺-activated NADPH oxidase in testis, spleen, and lymph nodes. *J Biol Chem* 276: 37594-37601.
- Bergen, L.G. y Morris, N.R. (1983) Kinetics of the nuclear division cycle of *Aspergillus nidulans*. *J Bacteriol* 156: 155-160.
- Bloomfield, G. y Pears, C. (2003) Superoxide signalling required for multicellular development of *Dictyostelium*. *J Cell Sci* 116: 3387-3397.
- Boveris, A., Oshino, N. y Chance, B. (1972) The cellular production of hydrogen peroxide. *Biochem J* 128: 617-630.
- Boyce, K.J., Hynes, M.J. y Andrianopoulos, A. (2003) Control of morphogenesis and actin localization by the *Penicillium marneffeii* RAC homolog. *J Cell Sci* 116: 1249-1260.
- Bustelo, X.R., Sauzeau, V. y Berenjano, I.M. (2007) GTP-binding proteins of the Rho/Rac family: regulation, effectors and functions in vivo. *Bioessays* 29: 356-370.
- Cano-Dominguez, N., Alvarez-Delfin, K., Hansberg, W. y Aguirre, J. (2008) NADPH oxidases NOX-1 and NOX-2 require the regulatory subunit NOR-1 to control cell differentiation and growth in *Neurospora crassa*. *Eukaryot Cell* 7: 1352-1361.
- Casselton, L. y Zolan, M. (2002) The art and design of genetic screens: filamentous fungi. *Nat Rev Genet* 3: 683-697.
- Chen, C. y Dickman, M.B. (2004) Dominant active Rac and dominant negative Rac revert the dominant active Ras phenotype in *Colletotrichum trifolii* by distinct signalling pathways. *Mol Microbiol* 51: 1493-1507.
- Chen, D., Toone, W.M., Mata, J., Lyne, R., Burns, G., Kivinen, K., Brazma, A., Jones, N. y Bahler, J. (2003) Global transcriptional responses of fission yeast to environmental stress. *Mol Biol Cell* 14: 214-229.
- Cheng, G., Cao, Z., Xu, X., van Meir, E.G. y Lambeth, J.D. (2001) Homologs of gp91phox: cloning and tissue expression of Nox3, Nox4, and Nox5. *Gene* 269: 131-140.
- Cheng, G., Ritsick, D. y Lambeth, J.D. (2004) Nox3 regulation by NOXO1, p47phox, and p67phox. *J Biol Chem* 279: 34250-34255.
- Cheng, G., Diebold, B.A., Hughes, Y. y Lambeth, J.D. (2006) Nox1-dependent reactive oxygen generation is regulated by Rac1. *J Biol Chem* 281: 17718-17726.

- Creaser, E.H., Porter, R.L., Britt, K.A., Pateman, J.A. y Doy, C.H. (1985) Purification and preliminary characterization of alcohol dehydrogenase from *Aspergillus nidulans*. *Biochem J* 225: 449-454.
- D'Autreaux, B. y Toledano, M.B. (2007) ROS as signalling molecules: mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8: 813-824.
- Davies, K.J. (2000) Oxidative stress, antioxidant defenses, and damage removal, repair, and replacement systems. *IUBMB Life* 50: 279-289.
- Davies, R.H. y de Serres, F.J. (1970) Genetic and microbiological research techniques for *Neurospora crassa*. *Methods Enzymol* 17: 79-143.
- De Deken, X., Wang, D., Many, M.C., Costagliola, S., Libert, F., Vassart, G., Dumont, J.E. y Miot, F. (2000) Cloning of two human thyroid cDNAs encoding new members of the NADPH oxidase family. *J Biol Chem* 275: 23227-23233.
- Delaunay, A., Pflieger, D., Barrault, M.B., Vinh, J. y Toledano, M.B. (2002) A thiol peroxidase is an H₂O₂ receptor and redox-transducer in gene activation. *Cell* 111: 471-481.
- Diekmann, D., Abo, A., Johnston, C., Segal, A.W. y Hall, A. (1994) Interaction of Rac with p67phox and regulation of phagocytic NADPH oxidase activity. *Science* 265: 531-533.
- Droge, W. (2002) Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 82: 47-95.
- Dumond, H., Danielou, N., Pinto, M. y Bolotin-Fukuhara, M. (2000) A large-scale study of Yap1p-dependent genes in normal aerobic and H₂O₂-stress conditions: the role of Yap1p in cell proliferation control in yeast. *Mol Microbiol* 36: 830-845.
- Edens, W.A., Sharling, L., Cheng, G., Shapira, R., Kinkade, J.M., Lee, T., Edens, H.A., Tang, X., Sullards, C., Flaherty, D.B., Benian, G.M. y Lambeth, J.D. (2001) Tyrosine cross-linking of extracellular matrix is catalyzed by Duox, a multidomain oxidase/oxidoreductase with homology to the phagocyte oxidase subunit gp91phox. *J Cell Biol* 154: 879-891.
- Egan, M.J., Wang, Z.Y., Jones, M.A., Smirnoff, N. y Talbot, N.J. (2007) Generation of reactive oxygen species by fungal NADPH oxidases is required for rice blast disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 11772-11777.
- el Benna, J., Faust, L.P. y Babior, B.M. (1994) The phosphorylation of the respiratory burst oxidase component p47phox during neutrophil activation. Phosphorylation of sites recognized by protein kinase C and by proline-directed kinases. *J Biol Chem* 269: 23431-23436.
- Finan, P., Shimizu, Y., Gout, I., Hsuan, J., Truong, O., Butcher, C., Bennett, P., Waterfield, M.D. y Kellie, S. (1994) An SH3 domain and proline-rich sequence mediate an interaction between two components of the phagocyte NADPH oxidase complex. *J Biol Chem* 269: 13752-13755.
- Finkel, T. (1998) Oxygen radicals and signaling. *Curr Opin Cell Biol* 10: 248-253.
- Finkel, T. (2003) Oxidant signals and oxidative stress. *Curr Opin Cell Biol* 15: 247-254.
- Foreman, J., Demidchik, V., Bothwell, J.H., Mylona, P., Miedema, H., Torres, M.A., Linstead, P., Costa, S., Brownlee, C., Jones, J.D., Davies, J.M. y Dolan, L. (2003) Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulate plant cell growth. *Nature* 422: 442-446.
- Fresno Vara, J.A., Casado, E., de Castro, J., Cejas, P., Belda-Iniesta, C. y Gonzalez-Baron, M. (2004) PI3K/Akt signalling pathway and cancer. *Cancer Treat Rev* 30: 193-204.
- Galagan, J.E., Calvo, S.E., Cuomo, C., Ma, L.J., Wortman, J.R., Batzoglou, S., Lee, S.I., Basturkmen, M., Spevak, C.C., Clutterbuck, J., Kapitonov, V., Jurka, J., Scaccocchio, C., Farman, M., Butler, J., Purcell, S., Harris, S., Braus, G.H., Draht, O., Busch, S., D'Enfert, C., Bouchier, C., Goldman, G.H., Bell-Pedersen, D., Griffiths-Jones, S., Doonan, J.H., Yu, J., Vienken, K., Pain, A., Freitag, M., Selker, E.U., Archer, D.B., Penalva, M.A., Oakley, B.R., Momany, M., Tanaka, T., Kumagai, T., Asai, K., Machida, M., Nierman, W.C., Denning, D.W., Caddick, M., Hynes, M., Paoletti, M., Fischer, R., Miller, B., Dyer, P., Sachs, M.S., Osmani, S.A. y Birren, B.W. (2005) Sequencing of *Aspergillus nidulans* and comparative analysis with *A. fumigatus* and *A. oryzae*. *Nature* 438: 1105-1115.
- Geiszt, M., Kopp, J.B., Varnai, P. y Leto, T.L. (2000) Identification of renox, an NAD(P)H oxidase in kidney. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 8010-8014.
- Georgiou, G. y Masip, L. (2003) Biochemistry. An overoxidation journey with a return ticket. *Science* 300: 592-594.

- Giesbert, S., Schurg, T., Scheele, S. y Tudzynski, P. (2008) The NADPH oxidase Cpnox1 is required for full pathogenicity of the ergot fungus *Claviceps purpurea*. *Mol Plant Pathol* 9: 317-327.
- Gu, Y., Wang, Z. y Yang, Z. (2004) ROP/RAC GTPase: an old new master regulator for plant signaling. *Curr Opin Plant Biol* 7: 527-536.
- Halliwell, B. y Gutteridge, J.M.C. (1999) *Free radicals in biology and medicine*. Oxford; New York: Oxford University Press.
- Halliwell, B. (2006) Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiol* 141: 312-322.
- Hansberg, W. y Aguirre, J. (1990) Hyperoxidant states cause microbial cell differentiation by cell isolation from dioxygen. *J Theor Biol* 142: 201-221.
- Harris, S.D. (1999) Morphogenesis is coordinated with nuclear division in germinating *Aspergillus nidulans* conidiospores. *Microbiology* 145 (Pt 10): 2747-2756.
- Harris, S.D. y Momany, M. (2004) Polarity in filamentous fungi: moving beyond the yeast paradigm. *Fungal Genet Biol* 41: 391-400.
- Heasman, S.J. y Ridley, A.J. (2008) Mammalian Rho GTPases: new insights into their functions from in vivo studies. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9: 690-701.
- Heyworth, P.G., Bohl, B.P., Bokoch, G.M. y Curnutte, J.T. (1994) Rac translocates independently of the neutrophil NADPH oxidase components p47phox and p67phox. Evidence for its interaction with flavocytochrome b558. *J Biol Chem* 269: 30749-30752.
- Hill, T.W. y Kafer, E. (2001) Improved protocols for *Aspergillus* minimal medium: trace element and minimal medium stock solution. *Fungal Genet Newsl.* 48: 20-21.
- Jaffe, A.B. y Hall, A. (2005) Rho GTPases: biochemistry and biology. *Annu Rev Cell Dev Biol* 21: 247-269.
- Jagnandan, D., Church, J.E., Banfi, B., Stuehr, D.J., Marrero, M.B. y Fulton, D.J. (2007) Novel mechanism of activation of NADPH oxidase 5. calcium sensitization via phosphorylation. *J Biol Chem* 282: 6494-6507.
- Kamata, H. y Hirata, H. (1999) Redox regulation of cellular signalling. *Cell Signal* 11: 1-14.
- Kawahara, T., Ritsick, D., Cheng, G. y Lambeth, J.D. (2005) Point mutations in the proline-rich region of p22phox are dominant inhibitors of Nox1- and Nox2-dependent reactive oxygen generation. *J Biol Chem* 280: 31859-31869.
- Kawahara, T. y Lambeth, J.D. (2007) Molecular evolution of Phox-related regulatory subunits for NADPH oxidase enzymes. *BMC Evol Biol* 7: 178.
- 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.
- Kawasaki, L., Sanchez, O., Shiozaki, K. y Aguirre, J. (2002) SakA MAP kinase is involved in stress signal transduction, sexual development and spore viability in *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol* 45: 1153-1163.
- Keller, T., Damude, H.G., Werner, D., Doerner, P., Dixon, R.A. y Lamb, C. (1998) A plant homolog of the neutrophil NADPH oxidase gp91phox subunit gene encodes a plasma membrane protein with Ca²⁺ binding motifs. *Plant Cell* 10: 255-266.
- Kirkinezos, I.G. y Moraes, C.T. (2001) Reactive oxygen species and mitochondrial diseases. *Semin Cell Dev Biol* 12: 449-457.
- Knebel, A., Rahmsdorf, H.J., Ullrich, A. y Herrlich, P. (1996) Dephosphorylation of receptor tyrosine kinases as target of regulation by radiation, oxidants or alkylating agents. *Embo J* 15: 5314-5325.
- Koga, H., Terasawa, H., Nuno, H., Takeshige, K., Inagaki, F. y Sumimoto, H. (1999) Tetratricopeptide repeat (TPR) motifs of p67(phox) participate in interaction with the small GTPase Rac and activation of the phagocyte NADPH oxidase. *J Biol Chem* 274: 25051-25060.
- Kuribayashi, F., Nuno, H., Wakamatsu, K., Tsunawaki, S., Sato, K., Ito, T. y Sumimoto, H. (2002) The adaptor protein p40(phox) as a positive regulator of the superoxide-producing phagocyte oxidase. *Embo J* 21: 6312-6320.

- Lambeth, J.D. (2004) NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. *Nat Rev Immunol* 4: 181-189.
- Lambeth, J.D., Kawahara, T. y Diebold, B. (2007) Regulation of Nox and Duox enzymatic activity and expression. *Free Radic Biol Med* 43: 319-331.
- Lara-Ortiz, T., Riveros-Rosas, H. y Aguirre, J. (2003) Reactive oxygen species generated by microbial NADPH oxidase NoxA regulate sexual development in *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol* 50: 1241-1255.
- Lardy, B., Bof, M., Aubry, L., Paquet, M.H., Morel, F., Satre, M. y Klein, G. (2005) NADPH oxidase homologs are required for normal cell differentiation and morphogenesis in *Dictyostelium discoideum*. *Biochim Biophys Acta* 1744: 199-212.
- Lee, K. y Esselman, W.J. (2002) Inhibition of PTPs by H₂O₂ regulates the activation of distinct MAPK pathways. *Free Radic Biol Med* 33: 1121-1132.
- Leeder, A.C. y Turner, G. (2008) Characterisation of *Aspergillus nidulans* polarisome component BemA. *Fungal Genet Biol* 45: 897-911
- Li, J., Stouffs, M., Serrander, L., Banfi, B., Bettioli, E., Charnay, Y., Steger, K., Krause, K.H. y Jaconi, M.E. (2006) The NADPH oxidase NOX4 drives cardiac differentiation: Role in regulating cardiac transcription factors and MAP kinase activation. *Mol Biol Cell* 17: 3978-3988.
- Mahlert, M., Leveleki, L., Hlubek, A., Sandrock, B. y Bolker, M. (2006) Rac1 and Cdc42 regulate hyphal growth and cytokinesis in the dimorphic fungus *Ustilago maydis*. *Mol Microbiol* 59: 567-578.
- Malagnac, F., Lalucque, H., Lepere, G. y Silar, P. (2004) Two NADPH oxidase isoforms are required for sexual reproduction and ascospore germination in the filamentous fungus *Podospora anserina*. *Fungal Genet Biol* 41: 982-997.
- Marhoul, J.F. (1996) Isolation and characterization of developmental genes in *Aspergillus nidulans*. In *Department of Biology Texas: Texas A&M University*, pp. 136.
- Martindale, J.L. y Holbrook, N.J. (2002) Cellular response to oxidative stress: signaling for suicide and survival. *J Cell Physiol* 192: 1-15.
- Martyn, K.D., Frederick, L.M., von Loehneysen, K., Dinauer, M.C. y Knaus, U.G. (2006) Functional analysis of Nox4 reveals unique characteristics compared to other NADPH oxidases. *Cell Signal* 18: 69-82.
- Meng, T.C., Fukada, T. y Tonks, N.K. (2002) Reversible oxidation and inactivation of protein tyrosine phosphatases in vivo. *Mol Cell* 9: 387-399.
- Millard, T.H., Sharp, S.J. y Machesky, L.M. (2004) Signalling to actin assembly via the WASP (Wiskott-Aldrich syndrome protein)-family proteins and the Arp2/3 complex. *Biochem J* 380: 1-17.
- Moreno, J.C., Bikker, H., Kempers, M.J., van Trotsenburg, A.S., Baas, F., de Vijlder, J.J., Vulsma, T. y Ris-Stalpers, C. (2002) Inactivating mutations in the gene for thyroid oxidase 2 (THOX2) and congenital hypothyroidism. *N Engl J Med* 347: 95-102.
- Morris, N.R., Xiang, X. y Beckwith, S.M. (1995) Nuclear migration advances in fungi. *Trends Cell Biol* 5: 278-282.
- Nayak, T., Szewczyk, E., Oakley, C.E., Osmani, A., Ukil, L., Murray, S.L., Hynes, M.J., Osmani, S.A. y Oakley, B.R. (2006) A versatile and efficient gene-targeting system for *Aspergillus nidulans*. *Genetics* 172: 1557-1566.
- Nguyen, A.N., Lee, A., Place, W. y Shiozaki, K. (2000) Multistep phosphorelay proteins transmit oxidative stress signals to the fission yeast stress-activated protein kinase. *Mol Biol Cell* 11: 1169-1181.
- Paffenholz, R., Bergstrom, R.A., Pasutto, F., Wabnitz, P., Munroe, R.J., Jagla, W., Heinzmann, U., Marquardt, A., Bareiss, A., Laufs, J., Russ, A., Stumm, G., Schimenti, J.C. y Bergstrom, D.E. (2004) Vestibular defects in head-tilt mice result from mutations in Nox3, encoding an NADPH oxidase. *Genes Dev* 18: 486-491.
- Purschwitz, J., Muller, S., Kastner, C., Schoser, M., Haas, H., Espeso, E.A., Atoui, A., Calvo, A.M. y Fischer, R. (2008) Functional and physical interaction of blue- and red-light sensors in *Aspergillus nidulans*. *Curr Biol* 18: 255-259.

- Rhee, S.G. (1999) Redox signaling: hydrogen peroxide as intracellular messenger. *Exp Mol Med* 31: 53-59.
- Rolke, Y. y Tudzynski, P. (2008) The small GTPase Rac and the p21-activated kinase Cla4 in *Claviceps purpurea*: interaction and impact on polarity, development and pathogenicity. *Mol Microbiol* 68: 405-423.
- Saitoh, M., Nishitoh, H., Fujii, M., Takeda, K., Tobiume, K., Sawada, Y., Kawabata, M., Miyazono, K. y Ichijo, H. (1998) Mammalian thioredoxin is a direct inhibitor of apoptosis signal-regulating kinase (ASK) 1. *Embo J* 17: 2596-2606.
- Sambrook, J. y Russel, D.W. (2001) *Molecular cloning: a laboratory manual*. N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sanchez, O., Navarro, R.E. y Aguirre, J. (1998) Increased transformation frequency and tagging of developmental genes in *Aspergillus nidulans* by restriction enzyme-mediated integration (REMI). *Mol Gen Genet* 258: 89-94.
- Sánchez, O. y Aguirre, J. (1996) Efficient transformation of *Aspergillus nidulans* by electroporation of germinated conidia. *Fungal Genet Newsl.* 43: 48-51.
- Sano, M., Fukuda, K., Sato, T., Kawaguchi, H., Suematsu, M., Matsuda, S., Koyasu, S., Matsui, H., Yamauchi-Takahara, K., Harada, M., Saito, Y. y Ogawa, S. (2001) ERK and p38 MAPK, but not NF-kappaB, are critically involved in reactive oxygen species-mediated induction of IL-6 by angiotensin II in cardiac fibroblasts. *Circ Res* 89: 661-669.
- Segmuller, N., Kokkelink, L., Giesbert, S., Odinius, D., van Kan, J. y Tudzynski, P. (2008) NADPH oxidases are involved in differentiation and pathogenicity in *Botrytis cinerea*. *Mol Plant Microbe Interact* 21: 808-819.
- Semighini, C.P. y Harris, S.D. (2008) Regulation of apical dominance in *Aspergillus nidulans* hyphae by reactive oxygen species. *Genetics* 179: 1919-1932.
- Shiozaki, K. y Russell, P. (1995) Cell-cycle control linked to extracellular environment by MAP kinase pathway in fission yeast. *Nature* 378: 739-743.
- Skromne, I., Sanchez, O. y Aguirre, J. (1995) Starvation stress modulates the expression of the *Aspergillus nidulans* brIA regulatory gene. *Microbiology* 141 (Pt 1): 21-28.
- Sohn, K.T. y Yoon, K.S. (2002) Ultrastructural Study on the Cleistothecium Development in *Aspergillus nidulans*. *Mycobiology* 30: 117-127.
- Som, T. y Kolaparthi, V.S. (1994) Developmental decisions in *Aspergillus nidulans* are modulated by Ras activity. *Mol Cell Biol* 14: 5333-5348.
- Suh, Y.A., Arnold, R.S., Lassegue, B., Shi, J., Xu, X., Sorescu, D., Chung, A.B., Griendling, K.K. y Lambeth, J.D. (1999) Cell transformation by the superoxide-generating oxidase Mox1. *Nature* 401: 79-82.
- Sumimoto, H., Miyano, K. y Takeya, R. (2005) Molecular composition and regulation of the Nox family NAD(P)H oxidases. *Biochem Biophys Res Commun* 338: 677-686.
- Sumimoto, H. (2008) Structure, regulation and evolution of Nox-family NADPH oxidases that produce reactive oxygen species. *Febs J* 275: 3249-3277.
- Sundaresan, M., Yu, Z.X., Ferrans, V.J., Irani, K. y Finkel, T. (1995) Requirement for generation of H₂O₂ for platelet-derived growth factor signal transduction. *Science* 270: 296-299.
- Takemoto, D., Tanaka, A. y Scott, B. (2006) A p67Phox-like regulator is recruited to control hyphal branching in a fungal-grass mutualistic symbiosis. *Plant Cell* 18: 2807-2821.
- Takeya, R., Ueno, N., Kami, K., Taura, M., Kohjima, M., Izaki, T., Nuno, H. y Sumimoto, H. (2003) Novel human homologues of p47phox and p67phox participate in activation of superoxide-producing NADPH oxidases. *J Biol Chem* 278: 25234-25246.
- Tanaka, A., Christensen, M.J., Takemoto, D., Park, P. y Scott, B. (2006) Reactive oxygen species play a role in regulating a fungus-perennial ryegrass mutualistic interaction. *Plant Cell* 18: 1052-1066.
- Tanaka, A., Takemoto, D., Hyon, G.S., Park, P. y Scott, B. (2008) NoxA activation by the small GTPase RacA is required to maintain a mutualistic symbiotic association between *Epichloe festucae* and perennial ryegrass. *Mol Microbiol* 68: 1165-1178.
- Thannickal, V.J. y Fanburg, B.L. (2000) Reactive oxygen species in cell signaling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 279: L1005-1028.

- Todd, R.B., Davis, M.A. y Hynes, M.J. (2007) Genetic manipulation of *Aspergillus nidulans*: meiotic progeny for genetic analysis and strain construction. *Nat Protoc* 2: 811-821.
- Toews, M.W., Warmbold, J., Konzack, S., Rischitor, P., Veith, D., Vienken, K., Vinuesa, C., Wei, H. y Fischer, R. (2004) Establishment of mRFP1 as a fluorescent marker in *Aspergillus nidulans* and construction of expression vectors for high-throughput protein tagging using recombination in vitro (GATEWAY). *Curr Genet* 45: 383-389.
- Toker, A. y Cantley, L.C. (1997) Signalling through the lipid products of phosphoinositide-3-OH kinase. *Nature* 387: 673-676.
- Torres, M. y Forman, H.J. (2003) Redox signaling and the MAP kinase pathways. *Biofactors* 17: 287-296.
- Torres, M.A., Dangl, J.L. y Jones, J.D. (2002) Arabidopsis gp91phox homologues AtrbohD and AtrbohF are required for accumulation of reactive oxygen intermediates in the plant defense response. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 517-522.
- Ueno, N., Takeya, R., Miyano, K., Kikuchi, H. y Sumimoto, H. (2005) The NADPH oxidase Nox3 constitutively produces superoxide in a p22phox-dependent manner: its regulation by oxidase organizers and activators. *J Biol Chem* 280: 23328-23339.
- Van Aelst, L. y D'Souza-Schorey, C. (1997) Rho GTPases and signaling networks. *Genes Dev* 11: 2295-2322.
- Vignais, P.V. (2002) The superoxide-generating NADPH oxidase: structural aspects and activation mechanism. *Cell Mol Life Sci* 59: 1428-1459.
- Virag, A., Lee, M.P., Si, H. y Harris, S.D. (2007) Regulation of hyphal morphogenesis by cdc42 and rac1 homologues in *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol* 66: 1579-1596.
- Wang, W., Eddy, R. y Condeelis, J. (2007) The cofilin pathway in breast cancer invasion and metastasis. *Nat Rev Cancer* 7: 429-440.
- Wang, X., McCullough, K.D., Franke, T.F. y Holbrook, N.J. (2000) Epidermal growth factor receptor-dependent Akt activation by oxidative stress enhances cell survival. *J Biol Chem* 275: 14624-14631.
- Waring, R.B., May, G.S. y Morris, N.R. (1989) Characterization of an inducible expression system in *Aspergillus nidulans* using *alcA* and tubulin-coding genes. *Gene* 79: 119-130.
- Wong, H.L., Pinontoan, R., Hayashi, K., Tabata, R., Yaeno, T., Hasegawa, K., Kojima, C., Yoshioka, H., Iba, K., Kawasaki, T. y Shimamoto, K. (2007) Regulation of rice NADPH oxidase by binding of Rac GTPase to its N-terminal extension. *Plant Cell* 19: 4022-4034.
- Yu, J.H., Hamari, Z., Han, K.H., Seo, J.A., Reyes-Dominguez, Y. y Scazzocchio, C. (2004) Double-joint PCR: a PCR-based molecular tool for gene manipulations in filamentous fungi. *Fungal Genet Biol* 41: 973-981.