

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

Modulación de la conidiación cíclica de
Neurospora crassa por oxidantes y
antioxidantes.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

BIÓLOGA

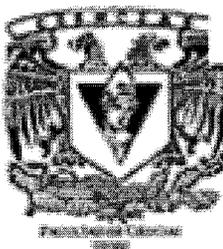
P R E S E N T A

María de Jesús Chávez Canales

Director de Tesis:

Dr. Wilhelm Hansberg Torres

2010





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

ÍNDICE

RESUMEN	6
INTRODUCCIÓN	7
HISTORIA DE LOS CICLOS BIOLÓGICOS	7
EL HONGO <i>NEUROSPORA CRASSA</i> COMO MODELO EXPERIMENTAL	11
<i>Ciclo asexual</i>	13
<i>Ciclo sexual</i>	14
EL RITMO CIRCADIANO DE LA ESPORULACIÓN ASEXUAL EN <i>N. CRASSA</i>	15
LA CEPA <i>BD</i> TIENE UNA MUTACIÓN DOMINANTE NEGATIVA EN <i>RAS-1</i>	20
EL ESTRÉS OXIDANTE Y LA DIFERENCIACIÓN CELULAR EN <i>N. CRASSA</i>	22
HIPÓTESIS	24
OBJETIVOS	24
MATERIALES Y MÉTODOS	25
OBTENCIÓN DE CONIDIOS	25
CULTIVOS EN PISTA EN PRESENCIA DE OXIDANTES Y ANTIOXIDANTES	26
CRUZAS SEXUALES Y OBTENCIÓN DE MUTANTES DOBLES	27
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	28
CRUZAS DE LA CEPA <i>BD</i> CON LAS CEPAS Δ <i>CAT-3</i> , Δ <i>CAT-1</i> , Δ <i>NOX-1</i> Y Δ <i>NOX-2</i>	28
EFECTO DE DIVERSOS ANTIOXIDANTES EN LA CONIDIACIÓN CÍCLICA DE <i>N. CRASSA</i>	31
EL EFECTO DE OXIDANTES EN EL PERIODO DE CONIDIACIÓN DE <i>N. CRASSA</i>	35
CONCLUSIONES	37
BIBLIOGRAFÍA	38

RESUMEN

En los seres vivos existen diferentes tipos de oscilaciones rítmicas que se manifiestan en algunos procesos biológicos tanto fisiológicos como conductuales. La mutante *band* (*bd*) del hongo filamentoso *Neurospora crassa* se ha utilizado desde 1966 como modelo de estudio de una oscilación circadiana, ya que la cepa *bd* alteran el crecimiento y la esporulación asexual con un periodo de 22 horas en la oscuridad. La hipótesis que guía este trabajo es que la diferenciación celular en *N. crassa* y otros microorganismos se da como respuesta a una tensión oxidante. De acuerdo a esta hipótesis, la sucesión de crecimiento y esporulación de la cepa *bd* debe corresponder a una oscilación del estrés oxidante: cuando no hay tensión el hongo crece, cuando hay estrés oxidante la cepa esporula. En concordancia, una cepa sin el gen de la superóxido dismutasa SOD-1, también presenta una conidiación cíclica con un periodo muy semejante al de la cepa *bd*. Recientemente se identificó una mutación puntual en el gen *ras-1* como la causante del ciclo de crecimiento-conidiación de la mutante *bd*. La mutación de esta proteína G cambia una treonina por una isoleucina en la región que interactúa con la proteína GEF, la cual promueve el intercambio de GDP por GTP. Se ha visto que RAS-1 está relacionada con la tensión oxidante y que interactúa con varias vías de transducción de señales que determinan el crecimiento, la patogenicidad y la diferenciación celular en diversos organismos. En este trabajo se analizó la predicción de que las condiciones prooxidantes y antioxidantes alteran el periodo de oscilación de la mutante *bd*: las condiciones oxidantes acortarían el ciclo, mientras que las antioxidantes lo alargarían o lo anularían. Para esto se usaron cepas mutantes carentes de actividades antioxidantes ($\Delta cat-3$, carente de la catalasa CAT-3 y $\Delta cat-1$, sin actividad de la catalasa CAT-1) o prooxidantes ($\Delta nox-1$, sin actividad de la NADPH oxidasa NOX-1) y diferentes sustancias antioxidantes (N-acetil cisteína y prolina) y oxidantes (Paraquat y menadiona). Nuestros resultados muestran que la carencia de la catalasas no afecta el periodo de oscilación. En cambio, la enzima NOX-1 se requiere para mantener una conidiación cíclica robusta. Sin embargo, este efecto podría deberse a que la mutante $\Delta nox-1$ produce menos micelio aéreo. Se observó que el periodo de conidiación de la mutante *bd* se acorta en presencia de Paraquat, el cual incrementa la tensión oxidante celular, mientras que la conidiación cíclica disminuye hasta desaparecer en presencia del antioxidante NAC. Los resultados en este trabajo indican que el ritmo circadiano en *N. crassa* se ve afectado por las condiciones oxidantes celulares.

INTRODUCCIÓN

Historia de los ciclos biológicos

En la naturaleza existen una gran cantidad de ritmos biológicos, los cuales se han documentado desde tiempos muy antiguos en diversos organismos. Estos ritmos pueden controlar una extensa variedad de procesos biológicos, tales como la división celular, la asimilación de nutrientes, la bioluminiscencia e incluso procesos de apareamiento y reproducción. La ritmicidad en los seres vivos parece ser una respuesta a las distintas variaciones cíclicas que hay en nuestro medio ambiente como la temperatura, las mareas, la luz o la disponibilidad de nutrientes.

Todos los organismos muestran actividades fisiológicas, bioquímicas o conductuales cíclicas asociadas a un cambio ambiental, que pueden continuar en condiciones constantes sin ninguna señal o referencia ambiental ya que son endógenas (Aschoff, 1981). Estos ritmos, ampliamente distribuidos filogenéticamente, se han clasificado por diferentes autores de acuerdo a su periodo. Por ejemplo, Halberg en 1965 clasificó los ritmos biológicos basándose en la relación entre el periodo del ritmo biológico y los ciclos geofísicos. Debido a que el periodo de los ritmos en condiciones constantes no es exactamente igual al del ritmo biológico, antepuso el prefijo *circa* (que significa *alrededor de*) a cada uno de los ritmos: los ciclos *circadianos*, que están relacionados con el ciclo de rotación terrestre, ocurriendo diariamente, los ciclos *circamareales* que se producen por la interacción entre la tierra y la luna generando las mareas, los ciclos *circalunares* que se generan por las fases lunares y por último los *circaanuales* generados por el movimiento de translación de la tierra alrededor del sol (Aschoff, 1981). En 1981, Enright clasificó los ritmos biológicos en tres grupos basándose en la frecuencia de su oscilación: ritmos *ultradianos*, que tienen un periodo menor a 19 horas, como la respiración; los ritmos *circadianos* que tienen una duración de entre 19 y 39 horas, como los ciclos de sueño-vigilia y los *ciclos infradianos* que tienen un periodo mayor a 29 horas, como los ciclos reproductivos (Enright, 1981).

Algunas de las primeras observaciones sobre ciclos circadianos se hicieron alrededor del siglo IV A.C., cuando Andróstenes de Tasos (Moore-Ede *et al.*, 1982), un escribano de Alejandro Magno, observó que las hojas de la planta del tamarindo se abrían de día y se plegaban de noche. En 1729 el astrónomo Jean Jacques D'ortous De Mairan (Moore-Ede *et al.*, 1982) utilizó la planta *Mimosa pudica*, la cual se caracteriza por mover sus hojas al ser tocada, para observar que las hojas se abrían o extendían en el día y se movían hacia la luz, mientras que en la noche se cerraban o retraían. De Mairan detectó una de las principales características que distingue a los ciclos biológicos: al colocar una planta en un armario en el que no había cambios de luz y oscuridad, comprobó que estos ritmos

eran producidos de manera endógena, ya que se mantenían en ausencia de la señal de luz externa. Aunque De Mairan también propuso seguir el ritmo de *M. pudica* en hornos a distintas temperaturas, fue Henri-Louis Duhamel du Monceau (Moore-Ede *et al.*, 1982), quién repitió el experimento de De Mairan a diferentes temperaturas y observó que no había ningún cambio en el ritmo, lo cual constituye otro rasgo distintivo de los ritmos circadianos: su relativa independencia de la temperatura externa.

El sueco Carl von Linné, después de observar que los pétalos de algunas plantas se abrían y se cerraban a distintas horas del día, diseñó un jardín que describe en su obra *Philosophia Botanica*, publicada en 1751, al que llamó *horonlogium florum*. En este jardín era posible saber la hora de día con una precisión de más o menos una hora con solo mirar un tipo específico de flor, ya que utilizaba más de una planta como referencia. Linné separó las plantas cuya apertura de pétalos dependía de las condiciones climáticas (Meteorici) de las que se abrían de acuerdo con la longitud del día (Tropici) y las que se abrían y cerraban en tiempos precisos, independientemente de las condiciones climáticas (Aequinoctales). Posteriormente, Darwin, en su obra "El Poder del Movimiento de las Plantas" (Darwin and Darwin, 1900), trata el movimiento diurno de las plantas que abren y cierran sus hojas y pétalos, a lo que llamó "sleep of plants". Después de describir varios experimentos hechos por su hijo Francis y colaboradores, concluyó que los ritmos diarios de los movimientos de las hojas eran propiedades endógenas e inherentes de las plantas, producto de la selección natural, como un mecanismo de protección a la radiación solar. En su libro *Earthworm Book*, publicado en 1881, Darwin también nota la conducta de animales nocturnos y describe experimentos donde la actividad de ciertos gusanos se mantiene en condiciones constantes en la oscuridad.

En los relojes circadianos existen elementos que conforman un asa de retroalimentación negativa a nivel transcripcional y/o traduccional. La primera demostración de este tipo de mecanismos se hizo en neuronas en cultivo de la retina del caracol *Bulla gouldiana*. Se observó que estos cultivos mantienen oscilaciones circadianas en la conductancia membranal por más de dos días (Michel *et al.*, 1993). En mamíferos se ha identificado una pequeña región en el cerebro, llamada el *núcleo supraquiasmático*, en la cual hay un grupo de neuronas que conforman la maquinaria oscilatoria en las ratas (Welsh *et al.*, 1995). Regiones similares también se han identificado en anfibios, aves, reptiles, peces e insectos (Binkley *et al.*, 1978; Cahill, 1996; Dunlap *et al.*, 1999; Plautz *et al.*, 1997; Tosini and Menaker, 1996; Yoo *et al.*, 2004). Algunas líneas celulares mantienen la oscilación en cultivo.

Se ha demostrado que, en algunos casos, estos relojes están compuestos por múltiples osciladores coordinados de diferente manera. En general, en las cianobacterias y en los hongos al menos un oscilador está directamente vinculado con el ambiente, y puede servir como el marcapasos (ver más

adelante) de otros osciladores, a través de un acoplamiento directo o indirecto. Sin embargo, en el hongo filamentoso *Neurospora crassa* existe evidencia de más de un oscilador independiente con actividad de marcapaso (Correa and Bell-Pedersen, 2002; Correa *et al.*, 2003). En organismos multicelulares como los roedores y las aves existen tejidos que no son sincronizados directamente por la luz (Bell-Pedersen *et al.*, 2005). En estos animales existe un sistema centralizado de marcapasos que parece ser esencial para convertir las señales de sincronización por luz en señales río abajo que sincronizan los tejidos periféricos. El sistema circadiano de las aves es uno de los más complejos, ya que posee diferentes marcapasos involucrados en la regulación de tejidos periféricos. Estos marcapasos están presentes en la glándula pineal, la retina y los dos sistemas nerviosos centrales de las aves, el visual y el medial. (Gwinner and Brandstatter, 2001). Por el contrario, en *Drosophila melanogaster* al parecer no existe este marcapasos centralizado, ya que los osciladores en tejidos periféricos pueden ser sincronizados directamente con la luz o con otras señales ambientales, debido a que están compuestos por dos asas de retroalimentación transcripcional entrelazadas entre sí (Glossop *et al.*, 1999; Lee *et al.*, 1999). Los genes así regulados se expresan en tejidos de los tres segmentos corporales: la cabeza, el torax y el abdomen (Hall, 2003). Casi todos estos tejidos muestran expresión rítmica de los genes reloj y por lo tanto contienen osciladores circadianos. Estos osciladores se dividen *grosso modo* en el oscilador central, compuesto por grupos de neuronas en el cerebro que controlan ritmos de actividad locomotora, y por los osciladores periféricos que incluyen a los osciladores en la cabeza, el tórax y el abdomen (Glossop and Hardin, 2002).

La cianobacteria *Synechococcus elongatus*, a pesar de que no cuenta con mecanismos de retroalimentación de transcripción-traducción, muestra ritmos circadianos en la expresión génica. Esto sugiere que las oscilaciones en los procariontes tiene un origen diferente. En efecto, el ciclo de *S. elongatus* se puede reconstruir *in vitro* con el ensamblaje de tres proteínas parecidas a los sistemas de transducción de señales de dos componentes de bacterias. Estas proteínas (KaiA, KaiB y KaiC) funcionan con un ritmo de 22 horas durante varios días, con sólo ATP. Además existe evidencia de que en *S. elongatus* y en otros organismos como *N. crassa*, hay múltiples osciladores que se localizan en una única célula, por lo que no depende de todo el organismo sino que la célula contiene toda la información y la maquinaria necesarias para su funcionamiento (Bell-Pedersen *et al.*, 2005).

Otro organismo pionero en la investigación de los ritmos biológicos fue el alga verde marina *Acetabularia*. Esta alga se caracteriza por ser un organismo unicelular y uninucleado que puede medir hasta 10 cm de largo. *Acetabularia* se utilizó para demostrar que la información genética de los eucariotes está en el núcleo, transplantando partes celulares entre dos especies del mismo género (Hämmerling, 1953). Estas células presentan un ritmo circadiano durante el proceso de fotosíntesis, que incluso se observa en el movimiento de los cloroplastos. Sin embargo, el ritmo no necesita una

regulación transcripcional-traducciona ya que lo controlan unas proteínas que tienen una vida media corta. La degradación de estas proteínas no promueve la síntesis su ARN, sino que los transcritos que codifican a dichas proteínas son de vida media larga, lo que permite su síntesis continua por hasta siete días. Esto indica que la transcripción cíclica no es esencial para la ritmicidad de este organismo (Lakin-Thomas, 2006).

Así pues, aunque en la naturaleza existen muchos fenómenos oscilantes, sólo algunos son considerados ciclos circadianos, ya que deben cumplir con las siguientes características:

- Son mecanismos endógenos que permanecen durante generaciones sin la presencia de referencias ambientales.
- Presentan una oscilación espontánea con un periodo cercano a las 24 horas en condiciones constantes.
- Poseen mecanismos de compensación por temperatura, esto es, que el periodo permanece igual dentro de un intervalo de temperatura.
- Es posible sincronizarlos con señales ambientales, como un pulso de luz.

A pesar de sus diferencias filogenéticas, todos los organismos tienen al menos un oscilador autónomo interno (Bell-Pedersen *et al.*, 2005). Este oscilador circadiano es un sistema de componentes que interactúan para producir un ritmo en un determinado tiempo y aunque puede funcionar de manera auto-sostenida, no puede operar de manera totalmente independiente de otros osciladores especializados. Este tipo de osciladores se llaman “marcapasos”. Los marcapasos son osciladores especializados que operan independientemente de otros osciladores para dirigir una salida o incluso para sincronizar el reloj interno a través de la detección de estímulos ambientales (Bell-Pedersen *et al.*, 2005). Este estímulo es llamado *Zeitgeber*, por su nombre en alemán, que significa “el que da el tiempo”. El *Zeitgeber* más común es la luz, aunque para algunos organismos también puede ser la temperatura o la disponibilidad de los alimentos. Esta propiedad de sincronización es llamada fase relativa. Dado que el *Zeitgeber* más común es la luz, no es sorprendente que, a partir del proceso evolutivo, los sistemas biológicos circadianos hayan desarrollado sistemas de fotorecepción y de fototransducción. La sincronización se observa cuando el periodo del ritmo concuerda con el del *Zeitgeber*, por lo que se cambia la fase del ciclo, lo cual depende tanto de la intensidad como del tiempo de exposición al *Zeitgeber*. Los ritmos se manifiestan en condiciones constantes, es decir sin la presencia de ningún *Zeitgeber*, con un periodo de alrededor de 24 h, en una condición de corrimiento libre, que comprende un intervalo de entre 19 y 30 horas. Al graficar un ritmo, además de observar el periodo, también se observa la medida del nivel de expresión de dicho ritmo. Esa medida es la amplitud, y se mide a partir de la línea media horizontal hacia uno de las crestas o los valles del periodo (Fig. 1).

4° y los 60°C. La mayoría de las especies de hongos tienen una distribución cosmopolita o eurícola, aunque algunas pocas están restringidas a algunos hábitats, es decir son estenócoras (Herrera and Ulloa, 1998). Pueden ser saprobios, parásitos o simbiotes. Los hongos desempeñan una función muy importante en el equilibrio de la naturaleza debido a las simbiosis que forman y a que son los mayores recicladores de materia orgánica. Desde el punto de vista antropocéntrico, los hongos son importantes debido a que producen sustancias útiles para los humanos, como los antibióticos, y porque se utilizan en la producción de alimentos como los quesos, el vino, la cerveza, etc. También existe una gran variedad de hongos comestibles presentes en nuestra dieta. Sin embargo, los hongos también pueden ser dañinos para el hombre, ya que debido a su gran capacidad colonizadora pueden ser plagas en cultivos agrícolas o ser causantes de diversas enfermedades (Herrera and Ulloa, 1998).

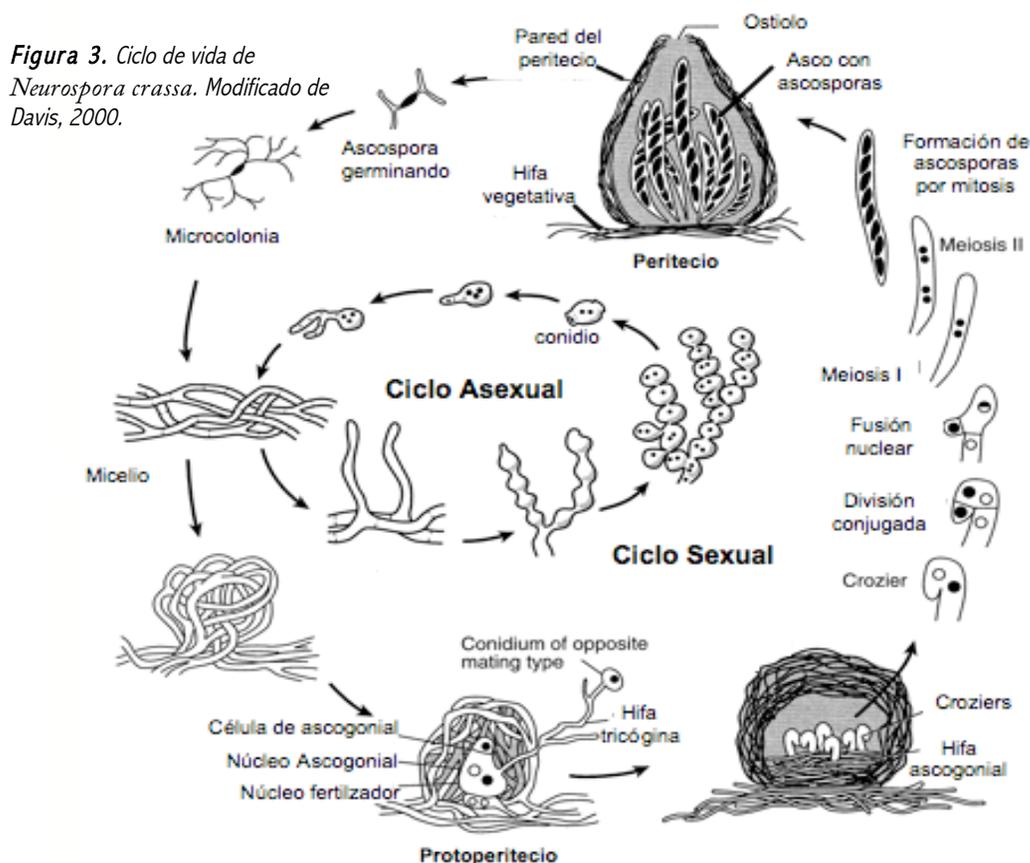
Neurospora crassa, uno de los hongos más estudiados, pertenece al subreino Dikarya, phylum Ascomycota, subphylum Pezizomycotina, subclase Sordariomycotidae (Hibbett *et al.*, 2007). Los ascomicetos, que representan aproximadamente el 64% de los hongos hasta ahora descritos, se caracterizan porque en su reproducción sexual producen una estructura con forma de saco llamada asco. En la naturaleza, *N. crassa* crece sobre vegetales, particularmente en vegetales quemados como el bagazo de la caña de azúcar, y ha sido identificado como uno de los primeros colonizadores después de un incendio forestal (Fig. 2) (Hibbett *et al.*, 2007; Perkins, 1991).

Figura 2. *Neurospora crassa* es uno de los primeros colonizadores de los bosques después de un incendio. En esta imagen se observa creciendo en un tronco de madera. Tomado de FGSC, Kansas, USA.



N. crassa se ha utilizado ampliamente como un organismo eucariota modelo para el estudio de diversos procesos biológicos fundamentales, tales como la regulación genética, la regulación bioquímica, la fisiología, la biología molecular y celular, y más recientemente, la biología del desarrollo, la fotobiología, la cronobiología, la ecología y la evolución. Debido a su ciclo de vida rápido y a la generación de grandes cantidades de biomasa, es relativamente fácil realizar un análisis bioquímico, y su ciclo sexual permite el análisis genético clásico y molecular. De hecho, los primeros trabajos realizados en *N. crassa* fueron realizados por genetistas para ilustrar la segregación y la recombinación meiótica, ya que en su estado vegetativo es un organismo haploide y se pueden separar con facilidad los 4 productos de la meiosis. Esto permitió que en 1936 se publicara el primer mapa genético de un organismo, un mapa de seis puntos del cromosoma sexual (Lindergren, 1936). Posteriormente, George W. Beadle y

Edgard L. Tatum obtuvieron el premio Nobel por sus trabajos en *N. crassa*, que permitieron vincular la genética y la bioquímica al proponer la hipótesis “un gen, una enzima” (Beadle and Tatum, 1941). Actualmente se cuenta con la secuencia genómica completa y anotada, siendo el primer hongo filamentoso en haber sido secuenciado. Su genoma está constituido por 39.2 Mb (mega bases), con una predicción de aproximadamente 9,829 genes, de los cuáles sólo para 1,100 se conoce su función. El 40% de los genes de *N. crassa* no tienen homólogo aparente en ningún otro organismo. El que su genoma esté secuenciado ha permitido la generación y uso de una gran cantidad de herramientas, tales como los microarreglos genéticos para el análisis global de la transcripción, así como una gran colección de mutantes generadas por mutagénesis clásica o mediante la eliminación sistemática de sus genes (Galagan *et al.*, 2003).



Ciclo asexual

La fase vegetativa es haploide y está constituida por un micelio formado por hifas multinucleadas con una pared celular de quitina. Las hifas tienen un crecimiento apical y están divididas por septos abiertos que permiten el flujo del citoplasma y de los organelos celulares. Dicho flujo ocurre sólo hacia la punta de la hifa en donde ocurre el crecimiento. La fusión entre las hifas genera una red llamada micelio (Hickey *et al.*, 2002). Dicha fusión promueve la formación de heterocariones en el

que diferentes genomas pueden contribuir al metabolismo de un solo micelio. Cuando el micelio cultivado en líquido se expone al aire, se observan tres transiciones morfogénicas precedida cada una de ellas por un estado hiperoxidante. El primer estado diferenciado es la adhesión de las hifas expuestas al aire, el segundo es la aparición de manera sincrónica de un micelio hidrofóbico que crece hacia la fase aérea, llamado micelio aéreo. En el tercer estado se forman las esporas por constricción y septación de las hifas aéreas. A estas esporas asexuales se llaman macroconidios y pueden tener de 4 a 10 núcleos (Springer, 1993). La macroconidación también está controlada por diferentes señales endógenas y ambientales como la luz o la privación de nutrientes. Existen otros dos tipos de esporas asexuales: los microconidios, que son estructuras diferenciadas de microconidióforos o incluso directamente de las hifas vegetativas, y los artroconidos, que son fragmentos de hifas que se separan del micelio al cerrarse el septo y formarse un doble septo (Fig. 3).

Ciclo sexual

N. crassa es un hongo heterotálico, esto es, tiene dos tipos sexuales: a y A. Cualquiera de los dos sexos puede funcionar como componente femenino (receptor) o masculino (donador) durante la reproducción sexual, pero la fertilización sólo ocurre entre cepas de distinto tipo sexual. El ciclo sexual se favorece cuando hay una limitación de nitrógeno en el medio. La cepa que crece en el medio con bajo nitrógeno y que funcionará como receptora, comienza a diferenciar un agregado de hifas que dará origen al protoperitecio. De esta estructura emerge una hifa femenina especializada llamada tricógino, la cual crece quimiotrópicamente hacia la célula masculina, generalmente una espora asexual, para fusionarse con ella. Este proceso está dirigido por feromonas producidas por ambas cepas. Un núcleo de la célula masculina migra hacia el protoperitecio para fertilizarlo. Un protoperitecio fertilizado tiene una serie de cambios que conducen a la formación de un cuerpo fructífero con forma de botella llamado peritecio, dentro del cual se desarrollan los sacos o ascas. Como resultado de la meiosis se obtienen las esporas sexuales llamadas ascosporas. Una mitosis posterior produce 4 pares de ascosporas hermanas multinucleadas, ordenadas linealmente dentro del asca (Fig. 3). El apareamiento termina con un peritecio con aproximadamente 200 ascosporas, las cuales son expulsadas por presión hidrostática hacia el exterior y salen por una abertura apical llamada ostiolo. Las ascosporas tienen un gran contenido de melanina en sus paredes, lo que les da un color negro. Estas esporas son muy resistentes a condiciones adversas en el medio, tales como la desecación. La germinación se produce después de ser activadas por un choque de calor, lo cual da lugar a la producción del micelio vegetativo. Es por esta razón que *Neurospora* es uno de los primeros colonizadores en áreas de bosque incendiadas, ya que el calor producido activa las ascosporas y permite su germinación.

El ritmo circadiano de la esporulación asexual en *N. crassa*

En 1966 se describió una cepa de *N. crassa* llamada Timex, la cual exhibía una conidiación rítmica cuando crecía en medio sólido (Fig. 4). Esta conidiación cíclica presentaba todos los criterios de un ritmo circadiano, ya que su periodo era de 22.7 horas a 25°C, era independiente de la temperatura en un intervalo de 18 a 35 °C, el ritmo continuaba en la oscuridad por un mínimo de 14 días sin debilitarse y la fase del ciclo podía ser alterada mediante un pulso de luz (Sargent *et al.*, 1966). Además de que se compensaba con la temperatura, el periodo de la conidiación cíclica también se compensaba con los nutrientes, ya que el periodo se mantenía en diferentes fuentes de carbono y de nitrógeno a pesar de crecer a diferentes tasas de crecimiento (Loros and Feldman, 1986a). Esta cepa Timex contenía dos mutaciones en locus distintos. La primera tenía una deficiencia en una invertasa y la segunda se denominó *band* (*bd*), ya que ésta era la responsable de la conidiación cíclica (Sargent, 1969). Se obtuvo una cepa con sólo la mutación *bd*. Desde entonces, la cepa *bd* se ha utilizado ampliamente como modelo de los ritmos biológicos, debido a su fácil manipulación, su reproducibilidad y su homología con otros sistemas circadianos.

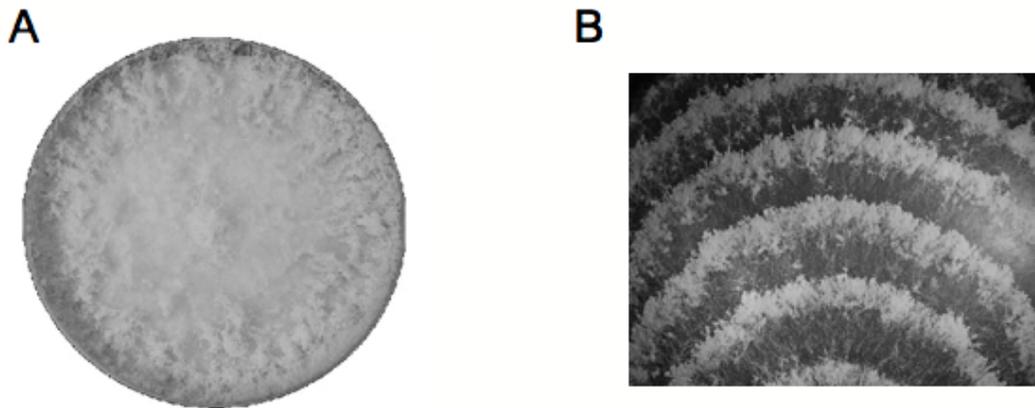


Figura 4. **A.** La cepa silvestre creciendo en una caja de Petri. **B.** Fragmento de una cepa *bd* creciendo en una caja de Petri. La cepa silvestre crece de manera homogénea, y la conidiación se produce principalmente en los bordes de la caja. A diferencia de la cepa silvestre, la cepa *bd* genera ciclos de crecimiento (zonas oscuras) y conidiación (bandas claras). Fotografías tomadas del FGSC, Kansas, USA.

En *Neurospora* la luz tiene efectos sobre el ciclo circadiano, el desarrollo, la conidiación y la respuesta antioxidante. Esta última se ve reflejada en los procesos de carotenogénesis (Corrochano, 2007) y en la producción de algunas enzimas antioxidantes como la catalasa-3 (Michan *et al.*, 2002; Michan *et al.*, 2003). La respuesta sólo se da con la luz azul debido a la presencia de varios receptores que pueden captar este tipo de luz (Galagan *et al.*, 2003) y no con la luz roja, a pesar de que *Neurospora* tiene dos genes que codifican para fitocromo (Froehlich *et al.*, 2005). Uno de estos receptores a la luz azul es el complejo transcripcional White collar (WCC), formado por las proteínas white collar-1 y white collar-2. Estas proteínas se identificaron al aislar mutantes en los genes white

collar-1 y white-collar-2, las cuales no expresaban carotenos durante el crecimiento pero sí durante la conidiación, por lo que presentaban un “cuello blanco”, y de ahí el nombre de los genes (Crosthwaite *et al.*, 1997; Degli-Innocenti and Russo, 1984; Liu *et al.*, 2003). Estas mutantes son consideradas ciegas a la luz, ya que no presentan ninguna respuesta a la luz, como lo es la síntesis de los carotenos inducida con la luz; aunque sí producen carotenos durante la conidiación. Esto indica que existen al menos dos señales distintas para la síntesis de los carotenos, o una misma señal pero generada o percibida por diferentes componentes celulares.

La proteína WC-1 contiene tres dominios PAS (Pern-Art-Sim) (He *et al.*, 2002) caracterizados por modular las respuestas a la tensión oxidante, al potencial redox y/o a la luz (Crosson *et al.*, 2003). Estos dominios se clasifican en A, B y C. El dominio PAS-A pertenece a una clase especializada de dominios LOV (light, oxygen and Voltage) y se han identificado como receptores de luz azul, principalmente en plantas (Crosson *et al.*, 2003). Estos dominios pueden unir ATP y flavinas, lo que se ha comprobado al purificar una parte de la proteína WC-1 que tiene unido el dinucleótido de flavina-adenina (FAD) como cofactor. Se cree que la fotoactivación de WC-1 involucra la formación de un aducto entre una cisteína conservada en el dominio LOV y el FAD, que al momento de percibir la luz es oxidado, permitiendo la activación del complejo (Ballario *et al.*, 1998; He *et al.*, 2002; He and Liu, 2005a; He *et al.*, 2005; Linden *et al.*, 1997). El dominio LOV de WC-1 sirve tanto como receptor de la luz azul y como regulador de la actividad del complejo heteromérico formado por WC-1 y por WC-2 (el WCC) que es unido por los tres dominios PAS (Ballario *et al.*, 1998; Cheng *et al.*, 2003; He *et al.*, 2002; Talora *et al.*, 1999). El dominio PAS-B es necesario para la función de WC-1, sin embargo no está muy claro su papel. El dominio PAS-C también se requiere para la interacción entre WC-1 y WC-2 al momento de formar el complejo WCC. El WCC funciona como un factor transcripcional nuclear debido a que WC-1 contiene una señal de localización nuclear (NLS) y un dominio de unión al DNA del tipo dedos de zinc tipo GATA, el cual se localiza río abajo de los dominios PAS (Brunner and Kaldi, 2008; Cheng *et al.*, 2003; Talora *et al.*, 1999). Este dominio de unión al DNA se requiere para la función del WCC en el reloj circadiano durante la oscuridad constante, pero no para la inducción de los genes con la luz (Cheng *et al.*, 2003). La proteína WC-2 contiene sólo un dominio PAS que es esencial para la formación del complejo WCC al unirse con WC-1. WC-2 también contiene una posible señal de localización nuclear y un dominio de unión al DNA tipo GATA con dedos de zinc (Cheng *et al.*, 2002; Crosthwaite *et al.*, 1997; Linden and Macino, 1997). WC-2 es mucho más abundante que WC-1 y sus niveles se mantienen prácticamente constantes, siendo WC-1 el factor limitante para la formación del complejo, ya que los niveles del ARNm de *wc-1* son oscilatorios. El WCC es el principal activador transcripcional de todos los genes inducidos con la luz, como *frq* (frequency), *vd* (vivid) y *cat-3* (catalasa-3) y otros inducidos durante el ciclo circadiano (Froehlich *et al.*, 2003a; Froehlich *et al.*, 2003b; Lewis *et al.*, 2002). La actividad de este

complejo se induce con la luz (Froehlich *et al.*, 2002; Lewis *et al.*, 2002) y es inhibida a través de su fosforilación (Schafmeier *et al.*, 2005b).

La proteína frequency (FRQ) es una proteína ácida globular de 900 aminoácidos que se encuentra desplegada en el citoplasma. Las mutaciones en *frq* que alteran el periodo de la conidiación cíclica de la cepa *bd* se han clasificado en mutaciones de periodo largo (mayor a 22 horas) y de periodo corto (menor a 22 horas). Dichas mutaciones no sólo afectan el periodo sino también la compensación con la temperatura. También alteran la reducción de un citocromo y el flujo de electrones en membranas mitocondriales purificadas de dichas mutantes iluminadas con luz azul (Borgeson and Bowman, 1990). La mutante nula, Δfrq es arrítmica ya que muestra un ciclo remanente pero anormal.

La síntesis de FRQ se regula a través de un asa de retroalimentación negativa, en la que la proteína reprime su propia síntesis. Tanto el ARN mensajero de FRQ (*frq*) como la proteína FRQ oscilan en la oscuridad y se ponen en fase con la luz. El gen *frq* se induce con la luz y en la luz continua permanece encendido. En la oscuridad *frq* comienza a decaer, seguido por una disminución en los niveles de FRQ, ya que la proteína es ubiquitinada para su degradación. Al disminuir FRQ y llegar a su nivel más bajo, comienza nuevamente la transcripción de *frq* y FRQ comienza a ser sintetizada nuevamente a partir de este mensaje. Mientras FRQ va aumentando, el ARNm de *frq* comienza a decaer hasta que al llegar al punto más alto, FRQ inhibe la síntesis de *frq*, reiniciándose así el ciclo.

La proteína vivid (VVD) se ha identificado como otro fotoreceptor en *N. crassa* (Schwerdtfeger and Linden, 2003). Al igual que WC-1, VVD tiene un dominio conservado tipo LOV, que al percibir la luz induce un cambio conformacional y su dimerización (Zoltowski *et al.*, 2007, Cheng *et al.*, 2003; Zoltowski and Crane, 2008). VVD está involucrada en procesos celulares inducidos por la luz, ya que el gen *vvd* se induce por luz, seguido por la síntesis de la proteína VVD, y en la oscuridad no se observa ni el ARNm ni la proteína. De igual manera se ha visto que VVD es importante para la adaptación a la luz. Cuando la mutante $\Delta vvd-1$ crece en la luz constante, se observa la presencia de un color naranja brillante en el micelio. Esto se debe a que en este fondo genético, WC-1 se encuentra constitutivamente activo, lo que lleva a la sobreinducción de genes involucrados en la respuesta a la luz como los de síntesis de carotenos (Heintzen *et al.*, 2001; Shrode *et al.*, 2001). VVD actúa, en condiciones normales, compensando los efectos de la temperatura en la conidiación (Hunt *et al.*, 2007).

La regulación de los componentes de la oscilación de *Neurospora* está controlada por asas de retroalimentación negativas y positivas, tanto transcripcionales como traduccionales interconectadas entre sí (Fig. 5). Los niveles de expresión de FRQ, VVD, WC-1 y WC-2 son interdependientes,

llevando a una expresión regulada de los componentes de la oscilación. En condiciones de sincronización y de oscuridad, el WCC muestra un ritmo diario en su actividad, lo cual activa a genes llamados *ccg* (clock controlled genes) (Lewis *et al.*, 2002). Algunos de estos *ccg* están involucrados en la regulación transcripcional y pueden regular a su vez otros *ccg* en un segundo nivel (Correa *et al.*, 2003). Sin embargo, no todos los *ccg* están relacionados con funciones del ritmo circadiano. Tanto *frq* como *vvd* están controlados directamente por el WCC y a su vez son inhibidores del complejo WCC, lo cual forma asas de retroalimentación negativas (Froehlich *et al.*, 2003b; Shrode *et al.*, 2001). Tanto *frq* como *vvd* se expresan durante la exposición a la luz, pero sólo *frq* es detectado cuando el hongo está creciendo en la oscuridad. FRQ es el regulador mayor del WCC en la oscuridad y en condiciones de sincronización con ciclos de luz-oscuridad, mientras que VVD sólo contribuye a reprimir el incremento del WCC en la luz (Elvin *et al.*, 2005; Schafmeier *et al.*, 2005a; Schafmeier *et al.*, 2006). El WCC se localiza predominantemente en el núcleo, debido a su señal NLS. La actividad del WCC depende de su estado de fosforilación, siendo la forma hipofosforilada más activa que la hiperfosforilada (Schafmeier *et al.*, 2005a; Schafmeier *et al.*, 2006). Durante la noche tardía y en la mañana cuando predomina la forma hipofosforilada del WCC, su capacidad de unirse al promotor de *frq* aumenta (Belden *et al.*, 2007). La transcripción de *frq* se activa gradualmente y los niveles del ARNm alcanzan un pico alrededor de la tarde y el valor máximo de los niveles de FRQ se observa alrededor de 6 horas después y se encuentra tanto en el núcleo como en el citosol (Aronson *et al.*, 1994; Garceau *et al.*, 1997; Mellow *et al.*, 2001). FRQ promueve la fosforilación del WCC (Schafmeier *et al.*, 2005a) y de esta manera las cantidades subestequiométricas de FRQ progresivamente van inactivando el exceso de WCC, generando una gran *poza* de factor transcripcional inactivado. La inactivación del WCC depende de la actividad continua de FRQ así como de la fosforilación de FRQ, que es antagonizada por las fosfatasas PP1 y PP2A (Yang *et al.*, 2004) y de la reactivación del WCC. FRQ forma un complejo, que tiene una vida media corta, ya sea con la cinasa de caseína I (CK-1a) (Gorl *et al.*, 2001; He *et al.*, 2006) o con la II (CK-II) (He *et al.*, 2006; Yang *et al.*, 2004) y esta asociación es necesaria para la hiperfosforilación de FRQ y para la inactivación del WCC. WCC también se inactiva cuando es fosforilado a través de la cinasa dependiente de AMP cíclico (PKA) (Huang *et al.*, 2007) y la cinasa dependiente de calcio/calmodulina CAMK-1 (Yang *et al.*, 2001). Otra proteína que regula la actividad de WCC es la proteína cinasa C (PKC), la cual regula al complejo de manera dependiente de la luz (Franchi *et al.*, 2005) (Fig. 5).

Tanto WC-1 y WC-2 representan los elementos positivos principales del asa de retroalimentación. En la oscuridad el heterodímero WCC reconoce la secuencia LRE (Light response element) del promotor de *frq* activando su transcripción (Crosthwaite *et al.*, 1997; Dunlap and Loros, 2004; Froehlich *et al.*, 2003b). Por otro lado, FRQ y FRH (helicasa de ARN que interactúa con FRQ), son los elementos negativos principales en el asa de retroalimentación, ya que reprimen la transcripción de *frq* por la

inhibición del WCC (Aronson *et al.*, 1994; Cheng *et al.*, 2005). Esto se debe a la formación de un complejo entre FRQ y la FRH, que inhibe la actividad de WCC al promover su fosforilación y consecuentemente la represión de la transcripción de *frq* (Cheng *et al.*, 2005; Crosthwaite *et al.*, 1997; He and Liu, 2005b; He *et al.*, 2006)

El asa negativa central está interconectada con el asa positiva en la cual FRQ promueve la acumulación del WCC y éste promueve la síntesis del ARNm de *wc-1* y *wc-2* (Fig. 5) (Brunner and Kaldi, 2008; Cheng *et al.*, 2003; Schafmeier *et al.*, 2006). Las funciones contrastantes de FRQ en las asas positivas y negativas están coordinadas de manera espacial y temporal (Schafmeier *et al.*, 2006). Como resultado de la interconexión de las asas de retroalimentación positivas y negativas, la abundancia del ARN de *frq* oscila de manera circadiana. El resultado de la acumulación de FRQ lleva a un ritmo robusto diario de la actividad del WCC. El WCC activa la transcripción y la expresión circadiana de un gran número de *ccg* directa o indirectamente (Vitalini *et al.*, 2006). Se conoce una gran variedad de *ccg*, los cuales se han clasificado en genes de la mañana o genes de la tarde. Además, otros *ccg* se expresan en otras fases del ciclo, en particular algunos genes involucrados en la conidiación pueden expresarse en el pico de la tarde/noche (Brunner and Kaldi, 2008; Dunlap and Loros, 2006; Jones *et al.*, 2007; Vitalini *et al.*, 2006).

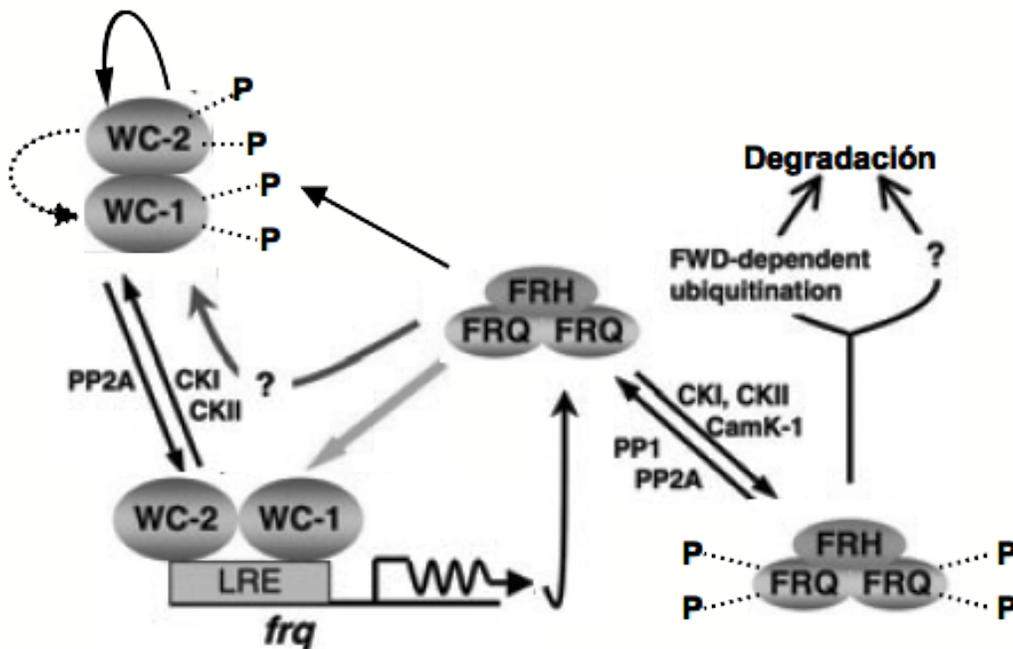


Figura 5. Interacciones de los principales componentes del reloj de *N. crassa*. El complejo transcripcional White-collar (WCC) está formado por las proteínas WC-1 y WC-2. Este complejo promueve su propia síntesis y se une a los elementos de respuesta a la luz (LRE) en el promotor de *frq* y demás genes con estos elementos, promoviendo su transcripción. El WCC es inactivado al ser fosforilado por las cinasas CK-I y CK-II. El complejo FRQ-FRH promueve la fosforilación de WCC y, por lo tanto, su inhibición. Las proteínas CKI, CKII y CamK-1 fosforilan al complejo FRQ-FRH para su posterior degradación. De manera contraria, la PP1 y la PP2A desfosforilan a este complejo, promoviendo su actividad. Las líneas punteadas indican la inhibición de las proteínas, y las sólidas indican la promoción de la expresión. Esquema tomado de (Brunner and Kaldi, 2008).

La cepa *bd* tiene una mutación dominante negativa en *ras-1*

La conidiación cíclica de la cepa *bd* también se puede observar en la cepa silvestre cuando se somete a ciertas condiciones de estrés o cuando se hace crecer con ciclos de luz-oscuridad. La mutación permite que se manifieste visiblemente un ciclo endógeno y no afecta directamente la oscilación interna de *N. crassa*. La mutación *bd* mapea entre los marcadores genéticos *met-5* (9%) y *nit-3* (19%), de manera similar a *ras-1*, una GTPasa pequeña que también mapea entre *met-5* (5.6%) y *nit-3* (7.1%). Al transformar una cepa silvestre con el gen *ras-1* amplificado por PCR a partir del DNA genómico de la cepa *bd*, la cepa resultante (MR08) se comportó de la misma manera que la cepa *bd*, por lo que se demostró que la mutación *bd* correspondía a una mutación en *ras-1* (Ríos-Momberg y Hansberg, datos por publicar). Al secuenciar el gen *ras-1^{bd}* se encontró una mutación puntual que cambia la treonina 79 por una isoleucina. Esta mutación está ubicada en la región “switch II”, que permite el intercambio de GDP por GTP al ser un sitio adyacente al que se une una proteína intercambiadora de guanosina (GEF). Al mismo tiempo otros investigadores utilizando un análisis genómico de polimorfismos en un solo nucleótido (SNP) determinaron la misma mutación en el gen *ras-1* (Belden *et al.*, 2007).

Las proteínas RAS (Rats Sarcoma) llamadas así porque se identificaron en el sarcoma de rata (Boguski and McCormick, 1993), son proteínas G (proteínas que unen nucleótidos de guanina) monoméricas pequeñas (~21 KDa). Las proteínas RAS forman una superfamilia de GTPasas que incluyen a más de 150 proteínas que están presentes en los animales, en los hongos y en las plantas. Esta superfamilia se dividió en las subfamilias Ras, Rho, Rab, Ran y Arf, dependiendo de sus propiedades (Wennerberg *et al.*, 2005). En la subfamilia Ras se incluyen los genes *ras*. A la subfamilia Rho pertenecen los genes *rho*, *rac* y *cdc-42* que están relacionadas con la organización de la actina y del citoesqueleto, la expresión génica e incluso la apoptosis.

Las GTPasas tienen dos conformaciones principales: una conformación en la que tienen unido GTP y otra en la que tienen unido GDP. La unión de GTP en RAS produce la forma activa, que dispara una señal que puede estar involucrada en la formación o la disolución de algunos complejos proteicos. La unión de GDP y GTP ocurre con la misma afinidad. Debido a su actividad intrínseca de GTPasa, RAS hace un ciclo de intercambio entre nucleótidos de guanina y su hidrólisis. Las proteínas RAS tienen al GDP unido debido a su alta afinidad por el nucleótido y se encuentran en la forma inactiva (Chang and Philips, 2006). La actividad de GTPasa se incrementa cuando las proteínas activadoras de GTPasas (GAP) se unen a RAS. La actividad de las GAP se regula a su vez mediante varios mecanismos como interacciones proteína-proteína, interacciones con fosfolípidos, fosforilaciones reguladas por cinasas

y fosfatasa, translocaciones subcelulares y degradación proteolítica (Bernards and Settleman, 2004; Chang and Philips, 2006). Las GEF son proteínas intercambiadoras de nucleótidos que promueven el intercambio de GDP por GTP y por lo tanto activan las proteínas RAS. La unión con una GEF promueve un cambio conformacional en RAS que abre el compartimiento de unión al nucleótido, permitiendo el intercambio en el sitio de unión del GDP por el GTP presente en el citoplasma y en mayor cantidad que el GDP (Vetter and Wittinghofer, 2001). Existen otras proteínas que son inhibidores de la disociación del nucleótido de guanosina (GDI) (Chant and Stowers, 1995).

Las GTPasas participan en una gran variedad de procesos. Algunos de éstos son el control del crecimiento, el crecimiento polar, la apoptosis, la traducción, el transporte de vesículas, la organización del citoesqueleto, el transporte nuclear, etc. (Chant and Stowers, 1995). En los genomas de hongos se han encontrado proteínas de la superfamilia de RAS y se ha encontrado que juegan un papel importante en el crecimiento celular, en la morfogénesis y en la patogenicidad (Boguski and McCormick, 1993; Chang and Philips, 2006; Chant and Stowers, 1995; Chen *et al.*, 2006; Memmott *et al.*, 2002; Scott and Eaton, 2008).

En el genoma de *N. crassa* existen dos genes que codifican para proteínas RAS: *ras-1* y *ras-2*. *ras-2* codifica para una proteína de 229 aminoácidos que mapea en el mismo sitio que *smco-7* (por semicolonial-7). La mutante nula en este gen muestra un crecimiento muy lento de las hifas. Produce 50 veces menos conidios que la cepa silvestre y tiene defectos en la síntesis de la pared celular (Kana-uchi *et al.*, 1997). *ras-1* parece ser un gen esencial en *N. crassa*, ya que no se ha logrado obtener mutantes con la eliminación total de este gen (Belden *et al.*, 2007). Sin embargo, la comparación de la mutante *ras-1^{bd}* con alelos dominantes negativos o dominantes activos, sugiere que *ras-1^{bd}* podría resultar en un aumento en el intercambio de GDP por GTP (activación), parecido al de la mutante negativa, pero sin cambio en la actividad de GTPasa. En la cepa *bd* se ha observado que hay un aumento en la expresión de los genes regulados con la luz, lo que sugiere que el gen *white-collar-1* es un blanco de la señalización por RAS. Así, la mutación *ras-1^{bd}* actúa como un amplificador que hace evidente la oscilación endógena sin alterar el mecanismo molecular. Esta amplificación de la oscilación es posible que se origine por un aumento en la transcripción de algunos genes reguladores de la conidiación como *wc-1*, *fluffy* o *vivid*, pero sin alterar su ritmicidad (Belden *et al.*, 2007).

El estrés oxidante y la diferenciación celular en *N. crassa*

Se ha propuesto que la diferenciación celular en diferentes microorganismos eucariontes es una respuesta al estrés oxidante (Aguirre *et al.*, 2005; Hansberg and Aguirre, 1990; Scott and Eaton, 2008). El proceso de reproducción asexual (conidiación) en *N. crassa* involucra tres transiciones morfológicas, cada una precedida por un estado hiperoxidante. (Toledo and Hansberg, 1990; Toledo *et al.*, 1991; Toledo *et al.*, 1994; Toledo *et al.*, 1995). En cada una de estas transiciones se detecta la oxidación tanto de enzimas específicas como de proteínas totales (Aguirre and Hansberg, 1986; Aguirre *et al.*, 1989; Lledias *et al.*, 1998; Michan *et al.*, 2002; Toledo and Hansberg, 1990), la disminución en el poder reductor intracelular (Toledo *et al.*, 1991; Toledo *et al.*, 1995), la excreción del disulfuro del glutatión (Toledo *et al.*, 1991), la inducción de los carotenos (Hansberg, et al sin publicar), la inducción de las catalasas 1 y 3 (Michan *et al.*, 2002), y la generación de especies reactivas del oxígeno (ERO) detectadas por quimioluminiscencia (Hansberg *et al.*, 1993). Dicha generación de ERO es dependiente del O₂ e inhibida por algunos antioxidantes (Hansberg *et al.*, 1993).

De acuerdo con esta hipótesis la transición entre un estado no diferenciado y otro diferenciado, ambos estados estables, ocurre a través de un estado transitorio inestable en el que la generación de ERO sobrepasa la capacidad antioxidante de la célula. Este estado hiperoxidante se caracteriza por un acentuado desbalance redox, la oxidación y la degradación de proteínas oxidadas y la inactivación por oxidación de diferentes enzimas. Este estado de desequilibrio llevaría a tres posibles respuestas (Hansberg *et al.*, 1993):

1. La célula se adapta a la condición oxidante al compensar dicha condición con una fuente de poder reductor y regresa al estado estable de crecimiento.
2. La célula se diferencia aislándose del oxígeno ambiental.
3. La célula muere al no diferenciarse o adaptarse al estado hiperoxidante. Este evento permitiría que otras células logren adaptarse o diferenciarse

La transición de un estado hiperoxidado a uno no oxidado ocurre a través del proceso de la germinación, el cual se caracteriza por romper el aislamiento , desarrollando un estado hiperoxidante inestable que se compensa con el poder reductor adquirido por la utilización de los nutrientes. Los niveles de las ERO son el resultado del equilibrio entre la velocidad de generación en la mitocondria y por enzimas oxidantes y el ritmo de descomposición de las ERO por enzimas antioxidantes y por otros mecanismos antioxidantes.

Una predicción derivada de esta hipótesis es que la inactivación o eliminación de enzimas antioxidantes, como las catalasas, debería incrementar la diferenciación. Las catalasas son enzimas encargadas de descomponer el peróxido de hidrógeno y utilizan una molécula de H_2O_2 como donadora de electrones para reducir a otra molécula de H_2O_2 y producir H_2O y O_2 . Las catalasas están presentes en todos los organismos; poseen un origen monofilético y están agrupadas en tres diferentes clados (Klotz and Loewen, 2003). *N. crassa* contiene 3 catalasas monofuncionales: CAT-1, CAT-3 y CAT-4, aunque también tiene una catalasa bifuncional con actividad de catalasa-peroxidasa, llamada CAT-2 (Galagan *et al.*, 2003; Peraza and Hansberg, 2002). La catalasa-1 se encuentra principalmente acumulada en los conidios y está asociada con condiciones de no crecimiento de las células (Michan *et al.*, 2002). En cambio, la catalasa-3 está asociada con el crecimiento y la diferenciación de las células. Además, la catalasa-3 es una enzima que se induce tanto con la luz como con diferentes condiciones oxidantes. Las mutantes nulas en esta enzima muestran un incremento en la formación de micelio aéreo y una mayor producción de conidios (Michan *et al.*, 2002; Michan *et al.*, 2003). Por otro lado las mutantes sin CAT-2 presentan una mayor conidiación sumergida (Peraza and Hansberg, datos no publicados) La catalasa-4 es una catalasa pequeña que contiene una etiqueta de localización peroxisomal, pero no ha sido detectada *in vivo* aún.

Una segunda predicción de la hipótesis es que la mutación de enzimas prooxidantes, como las oxidasas del NADPH (NOX), debe disminuir o eliminar la diferenciación celular. Las NOX se encargan de producir especies reactivas de oxígeno. Se ha visto que estas enzimas tienen funciones en la respuesta inmune y en algunos procesos de diferenciación celular en diversos eucariotas (Aguirre *et al.*, 2005; Cano-Dominguez *et al.*, 2008; Egan *et al.*, 2007; Lara-Ortiz *et al.*, 2003). Las NOX de los hongos se han clasificado en tres subfamilias. Dos de ellas tienen mucha similitud con la NOX2 de humanos, conocida también como gp91phox, y la tercera es similar a la NOX dependiente de calcio en humanos (NOX5) y a miembros de familia Rboh en las plantas. Sin embargo, las NOX están ausentes en las levaduras y en algunos basidiomicetos. Se ha reportado que diferentes isoformas de las NOX son necesarias para la diferenciación de los cuerpos fructíferos (diferenciación sexual) (Lara-Ortiz *et al.*, 2003, Cano-Dominguez *et al.*, 2008), la germinación de las esporas sexuales (Cano-Dominguez *et al.*, 2008; Malagnac *et al.*, 2004), el crecimiento de las hifas (Cano-Dominguez *et al.*, 2008) y la interacción entre algunos hongos y plantas (Egan *et al.*, 2007). *N. crassa* tiene dos enzimas NOX: NOX-1 y NOX-2. El gen *nox-1* se expresa en las primeras 14 horas de crecimiento en medio líquido y en el ciclo sexual durante la formación de las estructuras sexuales femeninas o protoperitecios. Este gen es esencial para el desarrollo sexual (Cano-Dominguez *et al.*, 2008). *nox-2* también se expresa durante la fase estacionaria en crecimiento líquido y la mutante $\Delta nox-2$ produce ascosporas incapaces de germinar (Cano-Dominguez *et al.*, 2008).

Una evidencia de que la conidiación cíclica se debe a un estado oxidante cíclico es que la cepa silvestre, cuando crece a concentraciones altas de algunos oxidantes, tiene un ciclo de crecimiento y conidiación parecido al de la cepa *bd* (Belden *et al.*, 2007). Asimismo, una mutante en la enzima antioxidante superóxido dismutasa-1 (SOD-1), que cataliza la dismutación del ión superóxido en oxígeno y peróxido de hidrógeno, presenta una conidiación cíclica.

HIPÓTESIS

En este trabajo proponemos que la conidiación cíclica de la cepa *bd* es reflejo de un estado hiperoxidante cíclico. La generación de ERO por arriba de la capacidad celular para contender con ellas desencadenaría la conidiación, lo cual implica también la producción de antioxidantes, como las catalasas y los carotenos. Los niveles de FRQ aumentan en este punto (Borgeson and Bowman, 1990) y FRQ podría también tener una función de antioxidante. Este modelo generaría un asa de retroalimentación negativa en la que la producción de ERO es rápida, induciendo la conidiación, mientras que la síntesis de antioxidantes y de FRQ es más lenta. Esta lenta adaptación del organismo permitiría nuevamente el crecimiento hasta alcanzar un nuevo estado hiperoxidante y la reiniciación del ciclo.

OBJETIVOS

El objetivo general de este trabajo es analizar si diferentes condiciones oxidantes y antioxidantes alteran el periodo del ritmo circadiano de la cepa *bd* al modificar los niveles de ERO celulares, esperando que condiciones oxidantes adelanten el ciclo al aumentar el estado hiperoxidante celular y aceleren la diferenciación celular (conidiación), y que antioxidantes lo atrasen o lo anulen al disminuir la velocidad de producción de las ERO, evitando o postergando la conidiación.

Objetivos particulares

- Para aumentar el estrés oxidante endógeno de la cepa *bd* con sustancias oxidantes como el Paraquat y la menadiona y realizar cruces de esta cepa con cepas carentes de las enzimas antioxidantes catalasa 1 y 3 para generar mutantes dobles, *bd;Δcat-1* y *bd;Δcat-3*, respectivamente.
- Eliminar o reducir el posible estrés oxidante ocasionado por el alelo *ras-1^{bd}* de la cepa *bd* con los compuestos antioxidantes N-acetil cisteína, prolina e histidina y una doble mutante carente de la actividad prooxidante de la enzima oxidasa-1 del NADPH (*bd;Δnox-1*).

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de conidios

Para la obtención de conidios de cada una de las cepas se inocularon 1×10^6 conidios de las cepas utilizadas (Tabla 1) en matraces de 1L que contenían 200 mL de medio Vogel con 1.5% de sacarosa y 2% de agar (Davis and de Serres, 1970). Después de cultivar por 3 días en la oscuridad a 30° C, se incubaron en la luz constante a la misma temperatura, durante 2 días. Los conidios se colectaron con agua fría estéril y se lavaron 5 veces con agua fría estéril centrifugando a 8,000 rpm. Se hicieron alícuotas de 1.5 mL, las cuales se congelaron a -80°C para su utilización posterior.

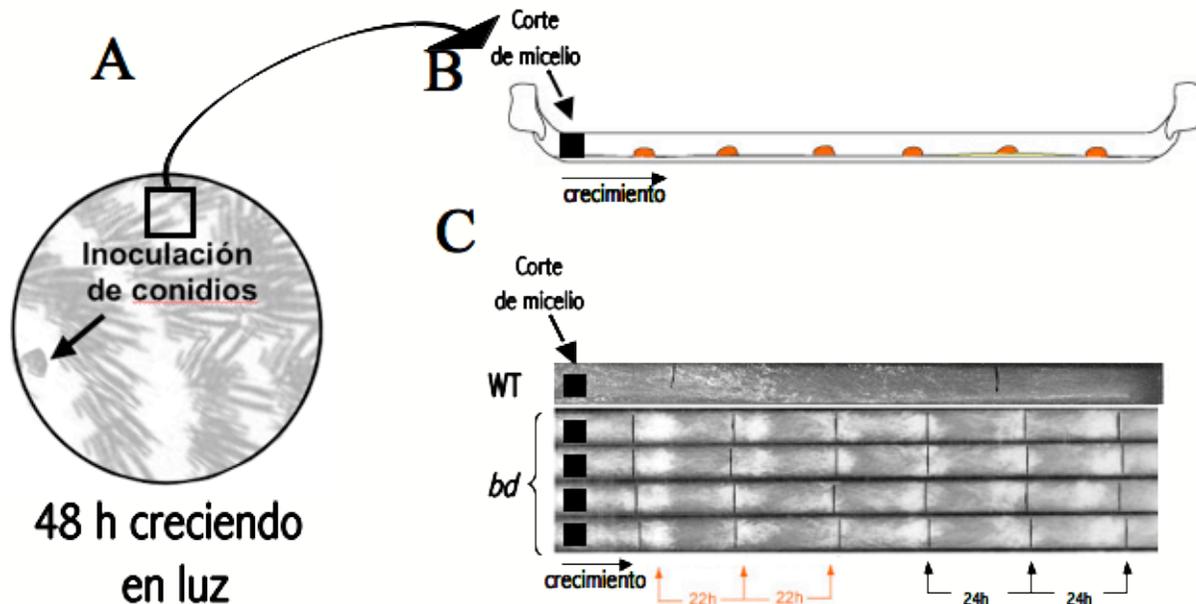
CEPA	PROCEDENCIA
<i>Δsod-1</i> sexo a (FGSC #11215)	Fungal Genetics Stock Center, Kansas, EUA
<i>bd</i> , sexo A (FGSC #1858)	Fungal Genetics Stock Center, Kansas, EUA
<i>bd</i> , sexo a (FGSC #1859)	Fungal Genetics Stock Center, Kansas, EUA
<i>Δnox-1</i> , H10.1 sexo A	Cano-Domínguez, N., <i>et. al.</i> 2008
<i>Δcat-1</i> , sexo a (FGSC #11257)	Fungal Genetics Stock Center, Kansas, EUA
<i>Δcat-1</i> , sexo A (FGSC #11258)	Fungal Genetics Stock Center, Kansas, EUA
<i>Δcat-3</i> , sexo a (FGSC #11201)	Fungal Genetics Stock Center, Kansas, EUA
<i>Δcat-3</i> , sexo A (FGSC #11202)	Fungal Genetics Stock Center, Kansas, EUA
<i>bd;Δnox-1</i>	Esta tesis. Progenie de la cruce de la cepa H10.1 (<i>Δnox-1</i>) con la cepa <i>bd</i>
<i>bd;Δcat-1</i>	Esta tesis. Progenie de la cruce de la cepa <i>Δcat-1</i> con la cepa <i>bd</i>
<i>bd;Δcat-3</i>	Esta tesis. Progenie de la cruce de la cepa <i>Δcat-3</i> con la cepa <i>bd</i>

Tabla 1. Cepas de *Neurospora crassa* utilizadas en este trabajo.

Cultivos en pista en presencia de oxidantes y antioxidantes

Para medir el periodo de los cultivos se inocularon cajas de Petri con medio que contenían sales de Vogel 1X adicionadas con 50 ng/mL de biotina, glucosa al 0.05%, arginina al 0.17% y agar al 2%. 1×10^6 conidios de cada cepa se cultivaron a 25°C en la luz constante por 48 horas. Al cabo de ese tiempo se tomó un corte del frente de la colonia usando, como sacabocado, la parte posterior de una pipeta Pasteur estéril. Con la rodaja se inoculó medio sólido. Los cultivos circadianos en pista se hicieron vertiendo medio en tubos de cristal abiertos en cada uno de los lados y cubiertos con gasa, o también charolas de plástico con 10 carriles que se cubrieron con cristal y papel aluminio en los bordes (cultivos en pista). Los cultivos en pistas se incubaron en la luz durante 2 días a 25°C y posteriormente se cambiaron a la oscuridad constante a 25°C. Cada 24 horas a partir del tiempo de la inoculación de los cultivos se marcó el frente de la colonia en cada una de las pistas, utilizando una luz roja de seguridad (Fig. 6). El periodo se determinó al cabo de 4-6 días para cada pista de cada condición ($n = 4$ a 24) con base en la distancia entre las líneas y la distancia entre el centro de cada banda de conidiación. El cultivo previo se realizó debido a que los conidios de la cepa *bd* no germinan en presencia de Paraquat, sin embargo, una vez germinados, el micelio pierde esta sensibilidad y puede crecer en presencia de este antioxidante (Ríos- Momberg, datos sin publicar).

Figura 6. Procedimiento con el que se hacen los cultivos en pista. **A.** Se inoculó una caja de Petri con una gota de conidios. Al cabo de 48 horas, se cortó un fragmento del micelio del frente de la colonia con el que se inocularon los medios en pista (**B** y **C**). **B.** Vista lateral de un cultivo en pista. En el borde izquierdo se coloca el corte de micelio que ha crecido en la caja de Petri. Las protuberancias ejemplifican las bandas de conidiación. **C.** Vista aérea de los cultivos en pista. En el primer carril se observa el crecimiento de la cepa silvestre en aproximadamente 2 días. Los siguientes 4 carriles son de la cepa *bd* creciendo 6 días. La cepa *bd* crece menos que la cepa silvestre. Las marcas sobre cada uno de los carriles indican intervalos de 24 h, y las bandas de conidiación ocurren cada 22 h.



Cruzas sexuales y obtención de mutantes dobles

Se inocularon 1×10^6 conidios de la cepa receptora en el centro de las cajas de Petri con medio sintético de cruzas (Davis and de Serres, 1970) y se incubaron a 25°C con luz constante. Al cabo de 7 días de crecimiento, los cultivos se fertilizaron con una suspensión de conidios de la cepa donadora del sexo contrario (A o a). Se continuó el crecimiento en las mismas condiciones de temperatura y de luz. Después de 14 días se recuperaron las ascosporas expulsadas. Debido a que las cepas mutantes *Δnox-1* son estériles como cepas receptoras porque no forman protoperitecios (Cano-Dominguez *et al.*, 2008) sólo se utilizaron como cepas donadoras. En las mutantes *Δcat-1*, *Δcat-3* y *Δnox-1*, los genes correspondientes se eliminaron utilizando el gen *hph*, el cual confiere resistencia al antibiótico higromicina, así la presencia de las mutaciones se puede identificar mediante la resistencia a dicho antibiótico. Las ascosporas de las distintas cruzas se colectaron de la tapa de la caja de Petri utilizando agua fría estéril y posteriormente se activaron mediante un choque térmico de 45 minutos a 60°C. Se sembraron 100 ascosporas con una asa de vidrio en medio con sales de Vogel 1x, sorbosa al 2%, glucosa y fructosa al 0.05% cada una y 150 μg/mL de higromicina (Sigma #H-7772). Después de 48 h de crecimiento en la oscuridad a 30°C, se cortaron las colonias que tenían forma redonda y con una ascospora negra en el centro, y se transfirieron a tubos de 15 mL con medio sólido Vogel-sacarosa 1.5% y 150 μg/mL de higromicina. Los tubos se incubaron 3 días en la oscuridad y 2 días en luz constante a 30°C. Después de la selección con higromicina, las cepas se sembraron en cultivos en pista con medio para ver el ritmo de conidiación y así seleccionar las cepas con la mutación *bd*.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Cruzas de la cepa *bd* con las cepas $\Delta cat-3$, $\Delta cat-1$, $\Delta nox-1$ y $\Delta nox-2$

Dado que la ausencia de la catalasa-3 tiene efectos en la diferenciación (Michan *et al.*, 2003), decidimos estudiar el efecto de esta enzima sobre el ritmo circadiano de la mutante *bd*. Una estrategia para modificar el nivel de estrés oxidante de esta cepa fue hacer dobles mutantes de la cepa *bd* con mutantes nulas en genes antioxidantes (genes de catalasa *cat-1* y *cat-3*) o prooxidantes (*nox-1*).

Una de las maneras para determinar la función de una enzima en un organismo es cancelar el gen que codifica para dicha enzima y observar el fenotipo resultante. Actualmente existe un proyecto dedicado a la cancelación de cada uno los genes de *Nrutospora crassa*. En este trabajo utilizamos mutantes carentes de la catalasa-1 y de la catalasa-3, que se generaron en ese proyecto, para realizar las cruzas con una cepa *bd* de sexo contrario. Las mutantes del proyecto geonómico de *N. crassa* se obtuvieron del Fungal Genetics Stock Center (FGSC, Kansas, EUA) y para su construcción se utilizó un método de recombinación homóloga en el que se construye un cassette de interrupción con el gen que otorga resistencia a la higromicina, flanqueado en sus extremos 5' y 3' por aproximadamente 1000 pares de bases ubicadas en los extremos 5' y 3' del ORF (marco de lectura abierto del gen) a interrumpir. Por un evento de doble recombinación homóloga, el gen de *N. crassa* que se desea interrumpir es reemplazado por el cassette de interrupción, permitiendo la selección de las mutantes en presencia del antibiótico higromicina. Las mutantes carentes de catalasa 1 ($\Delta cat-1$, cepa FGSC #11257) y de catalasa 3 ($\Delta cat-3$; cepa FGSC #11201) se cruzaron con las cepa *bd* del sexo contrario (FGSC #1858), y la progenie se seleccionó primero por su resistencia a la higromicina como indicación de la presencia de la mutación. Posteriormente las cepas resistentes se colocaron en pistas para determinar la presencia de la mutación *bd* mediante la manifestación de la conidiación cíclica. Utilizando los dos criterios de selección, se obtuvieron 4 cepas mutantes *bd*; $\Delta cat-3$ y 3 cepas *bd*; $\Delta cat-1$. La ausencia de los genes *cat-1* o *cat-3* se confirmó realizando una electroforesis en geles nativos de poliacrilamida para observar la actividad de catalasa (Fig. 7). La proteína total purificadas del micelio inducido por Paraquat para observar la ausencia de catalasa-3, o de proteína extraída de conidios siguiendo el procedimiento de Michán, et al (Michan *et al.*, 2003). Con base en esta selección se trabajó con una cepa *bd*; $\Delta cat-1$ y una *bd*; $\Delta cat-3$ (Tabla 1).

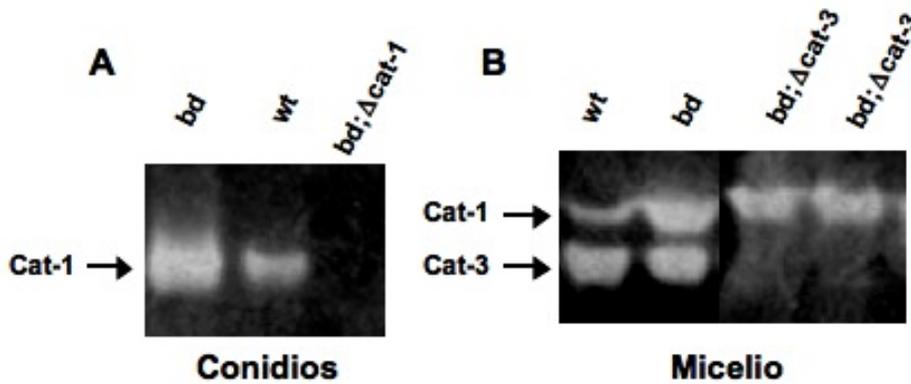


Figura 7: Las posibles mutantes dobles de *bd;Δcat-1* y *bd;Δcat-3* no presentan actividad de la catalasa-1 ni de la catalasa-3 respectivamente, indicando que son dobles mutantes. **A** y **B.** Zimogramas de actividad de catalasa con 30 μ g de extracto de proteínas de conidios (**A**) y 30 μ g de extracto de proteínas de micelio inducido con PQ, luz y HS después de crecer 18 h (**B**).

Al analizar las mutantes *bd;Δcat-1* en cultivos en pista para registrar el periodo de la conidiación cíclica, se observó que tenían el mismo periodo de 22.4 hrs. que la mutante *bd* y una tasa de crecimiento igual al de la cepa *bd* (Fig. 8). Se realizaron tres experimentos independientes en el que cada uno contenía 3 muestras de cada una de las cepas, obteniendo los mismos resultados. La figura 8 muestra un experimento representativo. Este resultado indica que la carencia de catalasa-1 no altera ninguno de los parámetros de la conidiación cíclica de la mutante *bd*. Esto puede estar relacionado con el hecho de que la catalasa-1 se encuentra principalmente en los conidios asexuales y en el micelio sólo durante la fase estacionaria del desarrollo (Michan *et al.*, 2002). Además, la ausencia de esta catalasa no tiene efectos directos en la diferenciación asexual de *N. crassa*.

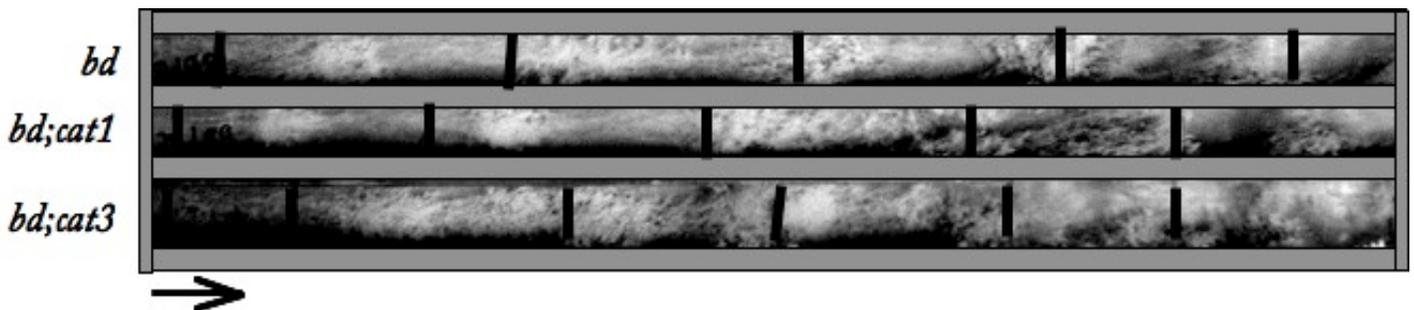


Figura 8. A. Cultivos en pista en los que se observa que la falta de actividad de catalasa 1 ó 3 en la mutante *bd* no altera el periodo de conidiación de esta cepa. La flecha indica la dirección de crecimiento de los cultivos. Las líneas verticales son las marcas hechas cada 24 h, utilizadas como la referencia para obtener el periodo. **B.** Procedimiento de selección y periodo de la progenie de las cruces *bd* X Δ *cat-1* o *bd* X Δ *cat-3*. Se indica la presencia (✓) o ausencia (X) de los fenotipos en las distintas cepas utilizadas.

	Resistencia a higromicina	Bandeo	Periodo
<i>bd</i>	X	✓	22.5 \pm 0.43 h
Δ <i>cat-1</i>	✓	X	Sin bandeo
Δ <i>cat-3</i>	✓	✓	Sin bandeo
<i>bd;cat-3</i> (4)	✓	✓	22.8 \pm 0.75
<i>bd;cat;1</i> (2)	✓	✓	22.4 \pm 0.34

Las mutantes dobles *bd;Δcat-3* también mostraron un periodo de 22.8 horas en promedio y un crecimiento igual al de la cepa *bd* (Fig. 8). Sin embargo, las bandas de conidiación fueron más robustas que las de la cepa *bd*. Este fenotipo es consistente con el hecho de que la falta de catalasa 3 produce un incremento en la cantidad de micelio aéreo y de la conidiación (Michan *et al.*, 2003). Este fenotipo sugiere que el posible incremento en la cantidad de ERO intracelulares, debido a la falta de CAT-3, tiene efectos en la manifestación del ciclo (conidiación), pero no en su periodo.

Debido al efecto que tienen las NOX sobre la diferenciación celular, tanto en *N. crassa* como en otros hongos (Cano-Dominguez *et al.*, 2008; Lara-Ortiz *et al.*, 2003; Malagnac *et al.*, 2004), y de manera contraria a las catalasas, se generaron dobles mutantes de la cepa *bd* con una cepa carente de la enzima oxidante *NOX-1* para observar el efecto de esta enzima sobre la oscilación de la cepa *bd*. Para obtener las mutantes dobles *bd;Δnox-1*, se utilizaron las mutantes generadas por Cano Domínguez *et al.* (Cano-Dominguez *et al.*, 2008), quienes utilizaron el método de Pratt y Aramayo (Pratt and Aramayo, 2002) para reemplazar el gen *nox-1* por el de resistencia a la higromicina. Las mutantes *Δnox-1* no producen cuerpos fructíferos sexuales, ya que no forman protoperitecios, lo cual se observa cuando estas cepas actúan como cepa receptora. Así, las cruza se realizaron entre las cepas *bd* (FGSC #1859) y la cepa H10.1 (Cano-Dominguez *et al.*, 2008), utilizando a la *bd* como cepa receptora y a las cepas *Δnox-1* como donadoras. Las ascosporas de esta crusa se seleccionaron primero por la resistencia a higromicina y posteriormente se colocaron en pistas para seleccionar la posible presencia de la mutación *bd*. De esta selección se utilizaron 3 cepas mutantes (A08, A07 y A25-1) las cuales tenían las dos mutaciones y con las que se trabajó (fig. 9). Otro de los fenotipos de las mutantes *Δnox-1* es una menor producción de micelio aéreo y de conidios, así como la disminución del crecimiento apical (Cano-Dominguez *et al.*, 2008). Debido a que no se puede obtener progenie viable de las mutantes *Δnox-2*, solamente analizamos el papel de la NOX-1 en la conidiación cíclica.

Los resultados en la figura 9 muestran que a pesar de la menor conidiación debida a la mutación *Δnox-*, sí fue posible identificar progenie de la crusa *bd X Δnox-1* que muestra una conidiación. Se probó la sensibilidad de los conidios al Paraquat, ya que la cepa *bd* no puede germinar en Paraquat, pero el micelio sí puede crecer en Paraquat. Sin embargo, la deficiente conidiación hizo difícil obtener el periodo de la oscilación. Esto indica que una reducción en la producción de ERO debido a la falta de NOX-1 no afecta el ciclo rítmico de conidiación de la cepa *bd*, pero sí hace menos evidente el ciclo de conidiación.

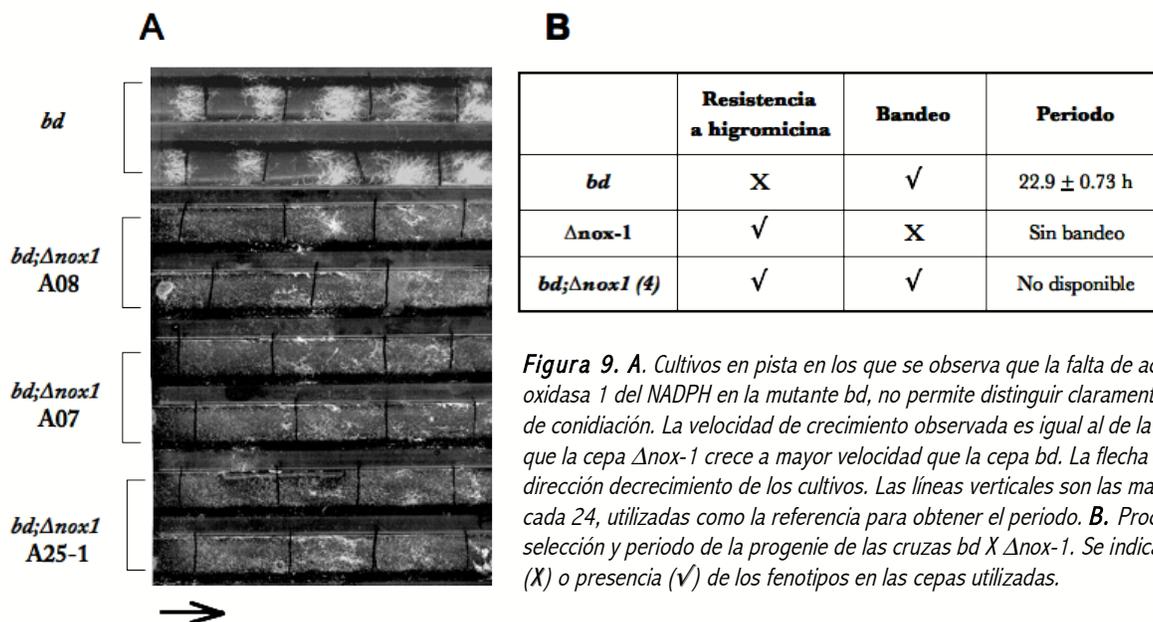


Figura 9. **A.** Cultivos en pista en los que se observa que la falta de actividad de la oxidasa 1 del NADPH en la mutante *bd*, no permite distinguir claramente las bandas de conidiación. La velocidad de crecimiento observada es igual al de la cepa *bd*, ya que la cepa Δ nox-1 crece a mayor velocidad que la cepa *bd*. La flecha indica la dirección decrecimiento de los cultivos. Las líneas verticales son las marcas hecha cada 24, utilizadas como la referencia para obtener el periodo. **B.** Procedimiento de selección y periodo de la progenie de las cruza *bd* X Δ nox-1. Se indican la ausencia (X) o presencia (✓) de los fenotipos en las cepas utilizadas.

Efecto de diversos antioxidantes en la conidiación cíclica de *N. crassa*

En este trabajo se utilizaron diferentes sustancias antioxidantes que se han probado antes en diferentes organismos. Uno de estos antioxidantes es el iminoácido prolina, el cual ha sido caracterizado como un antioxidante por el grupo de Dickman y sus colaboradores (Chen *et al.*, 2006; Krishnan *et al.*, 2008; Memmott *et al.*, 2002). Este grupo reportó que mutantes que expresan una proteína Ras constitutivamente activa en *Colletotrichum trifolii*, el hongo causante de la antracosis de la alfalfa, muestran un aumento en la producción de ERO intracelulares y distintos fenotipos dependiendo del medio de cultivo en el que se encuentren. En medios con bajas concentraciones de nutrientes, las mutantes pierden la capacidad de infectar al hospedero. Sin embargo, este fenotipo se suprime en presencia de 1.6 mM de prolina (Memmott *et al.*, 2002). El mismo grupo utilizó la prolina para reducir las ERO producidas por una mutante predominantemente activa en otra GTPasa llamada Cdc-42 en *Colletotrichum trifolii* (Chen *et al.*, 2006). La disminución del estrés oxidante con la prolina requiere la amina secundaria del anillo de pirrolidina involucrado en la preservación del ambiente que la rodea (Krishnan *et al.*, 2008). De igual manera en la línea celular de células embrionarias humanas renales (Human Embryonic Kidney cells 293) HEK 293 la prolina evita la apoptosis del 70% de las células en concentraciones de 1 mM (Krishnan *et al.*, 2008). Decidimos utilizar prolina en una curva de 1.0 a 10 mM en cultivos en pista de *N. crassa*. Como se ve en la figura 10, no se observó ningún cambio en la velocidad del crecimiento ni en el periodo de la conidiación cíclica de la cepa *bd* (Fig. 10). Sin embargo, en otros estudios se observó que la prolina puede disminuir los niveles de H₂O₂

pero no puede neutralizar las ERO producidas por generadores de superóxido como la menadiona o el Paraquat (Memcott *et al.*, 2002). Es posible que esta incapacidad antioxidante de la prolina pueda explicar la falta de efecto incluso a altas concentraciones.

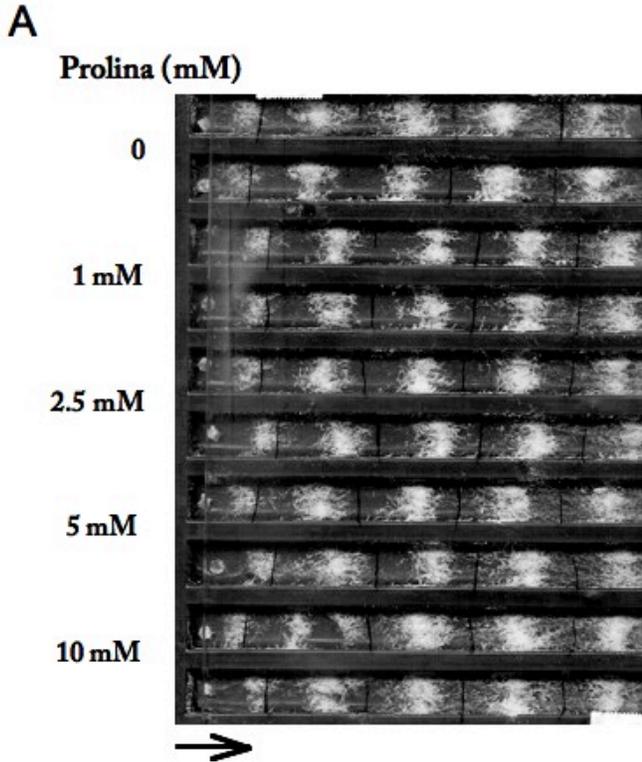


Figura 10.A. La prolina como antioxidante, no tiene ningún efecto sobre el periodo de la conidiación rítmica de la cepa *bd*, al crecer incluso a altas concentraciones. La flecha indica la dirección del crecimiento y las líneas verticales indican 24 h entre cada una de ellas. Se muestra un experimento representativo. **B.** Periodo de la cepa *bd* creciendo en distintas concentraciones de prolina.

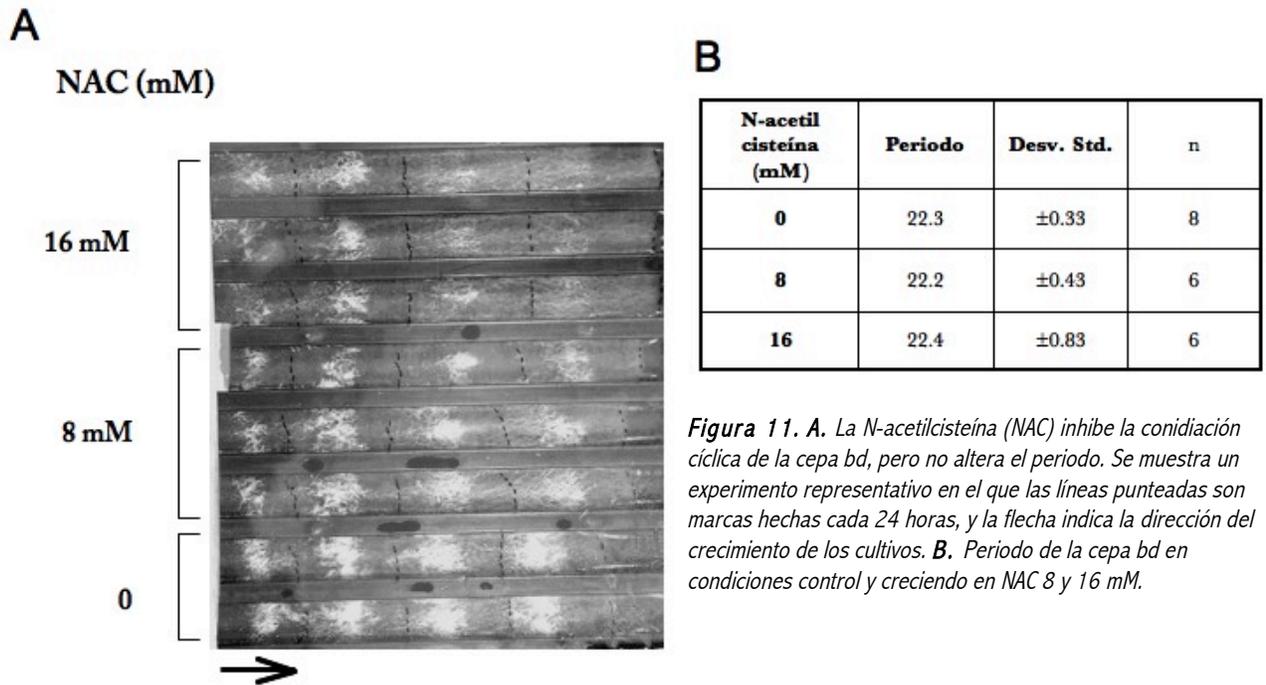
B

Prolina (mM)	Periodo	Desv. Std.	n
0	22.3	±0.25	6
1	22.6	±0.53	4
2.5	22.4	± 0.47	4
5	22.5	± 0.61	4
10	22.2	± 0.39	4

Otro antioxidante utilizado fue la N-acetil cisteína (NAC). Los aminoácidos que como la NAC contienen un grupo tiol tienen propiedades antioxidantes, ya que actúan como donadores de electrones, favoreciendo las reacciones de óxido-reducción. El NAC contiene una actividad redox y la nucleofilicidad de su grupo tiol le permite una acción directa a través de reacciones de transhidrogenización con otras parejas redox de tioles.

El glutatión, GSH (Glutamato-Cisteína-Glicina), es el antioxidante predominante en el citoplasma de las células. El glutatión es un tripéptido sintetizado a partir de la unión del ácido glutámico con la cisteína y posteriormente con una glicina. El glutatión puede atrapar el peroxinitrito y los radicales hidroxilo y a través de la glutatión peroxidasa convertir el peróxido de hidrógeno en agua. Una molécula de GS se combina rápidamente con otro radical igual y se neutraliza formando GSSG. El GSSG se convierte nuevamente en GSH por acción de la reductasa del glutatión dependiente del NADPH. El glutatión de igual manera puede generar un radical de vitamina C, el cual a su vez genera

un radical de vitamina E y un GSH, promoviendo una cadena antioxidante.



Se utilizó NAC en concentraciones de 8 mM y 16 mM. En 8 mM se observó un aumento en el crecimiento de la cepa *bd* (Fig. 11) y una disminución en la intensidad de las bandas de conidiación, lo cual es un reflejo de la cantidad de conidios producidas en cada banda. En concentraciones de NAC de 16 mM las bandas de conidiación desaparecieron casi por completo desde el 3^{er} ciclo. Sin embargo, los tres primeros ciclos mantienen un periodo de aproximadamente 22 h. En este caso se obtuvo una desviación estándar mayor debido a que sólo se pudieron registrar los tres ciclos y las bandas son más dispersas. Cuando se llevó a cabo un experimento similar usando la cepa Δ *sod-1*, las bandas de conidiación desaparecieron desde concentraciones de 4 mM (Fig. 12).

El hecho de que las bandas de conidiación de la cepa *bd* desaparezcan en presencia de NAC, sugiere que ocurren como una respuesta a un estrés oxidante cíclico que puede ser abatido por el NAC. El efecto del NAC también se vio reflejado en el crecimiento de la cepa *bd*, ya que ésta mostró un incremento en su tasa de crecimiento, a tal grado que crece casi como la cepa silvestre. Esto aunado al hecho de que el antioxidante NAC suprime la conidiación de una mutante incapaz de eliminar eficientemente el superóxido (Δ *sod-1*) muestra sin lugar a duda que el estado redox intracelular está relacionado con el ritmo circadiano en *N. crassa*.

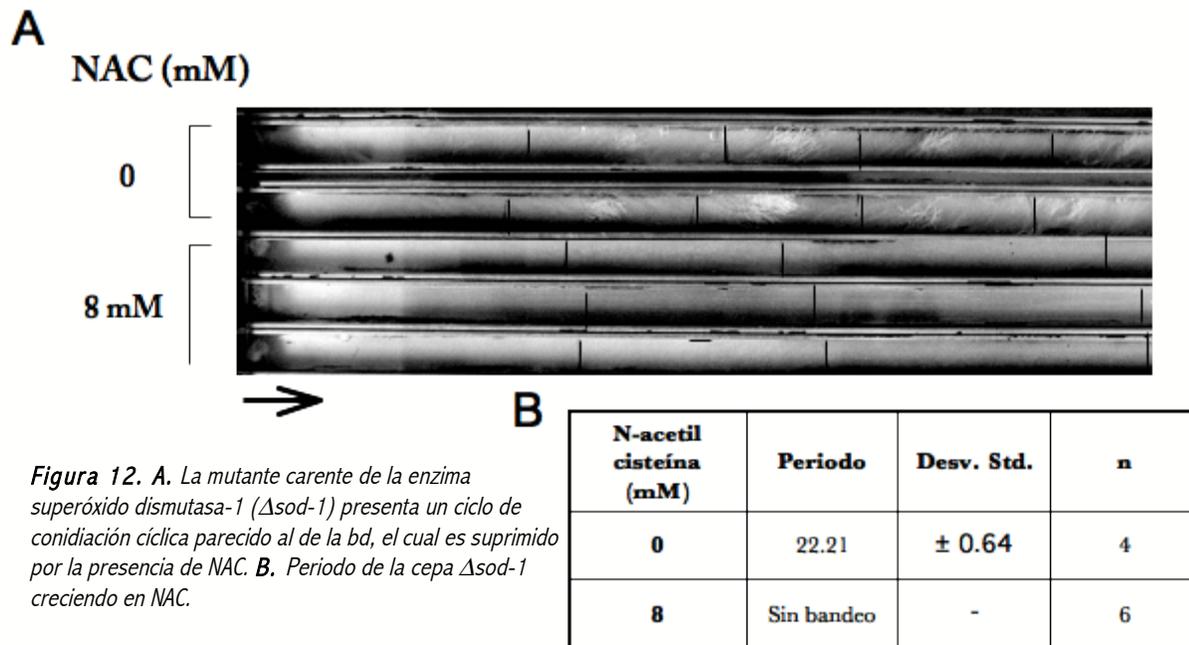


Figura 12. A. La mutante carente de la enzima superóxido dismutasa-1 (Δ sod-1) presenta un ciclo de conidiación cíclica parecido al de la *bd*, el cual es suprimido por la presencia de NAC. **B.** Periodo de la cepa Δ sod-1 creciendo en NAC.

Otro compuesto utilizado fue la histidina, el cual es capaz de eliminar el oxígeno en singulete. La máxima concentración de histidina que se utilizó fue de 30 mM. A esta concentración se observó una disminución en el periodo de casi 2 horas (Fig. 13). En principio, estos resultados son contrarios a lo esperado y a los resultados obtenidos con el NAC y el Paraquat (ver mas adelante).

Sin embargo, la histidina tiene un efecto citotóxico a estas concentraciones ya que une metales, principalmente el hierro y atrapa al peróxido. Dicha unión de la histidina con el hierro puede generar radicales hidroxilo a través de la reacción de Fenton, por lo que este efecto oxidante intracelular puede disminuir el periodo de conidiación cíclica en la cepa *bd* creciendo a altas concentraciones de histidina (Schubert and Wilmer, 1991; Sestili *et al.*, 1995).

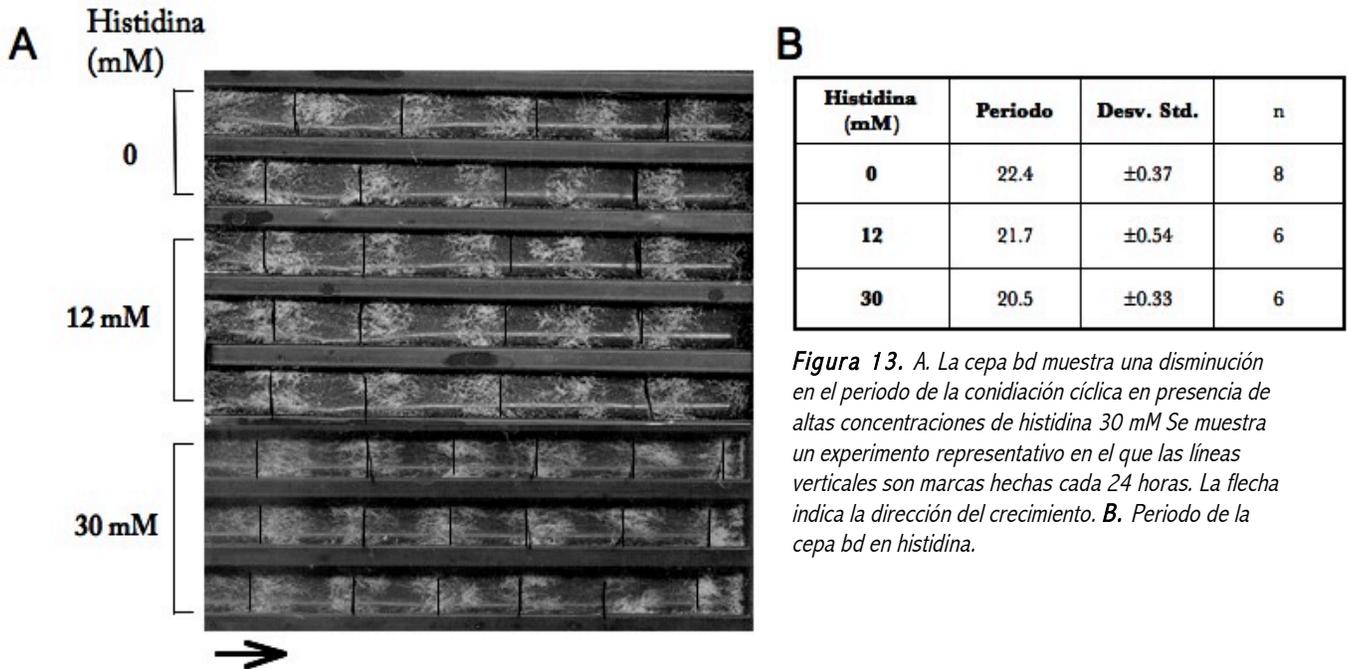
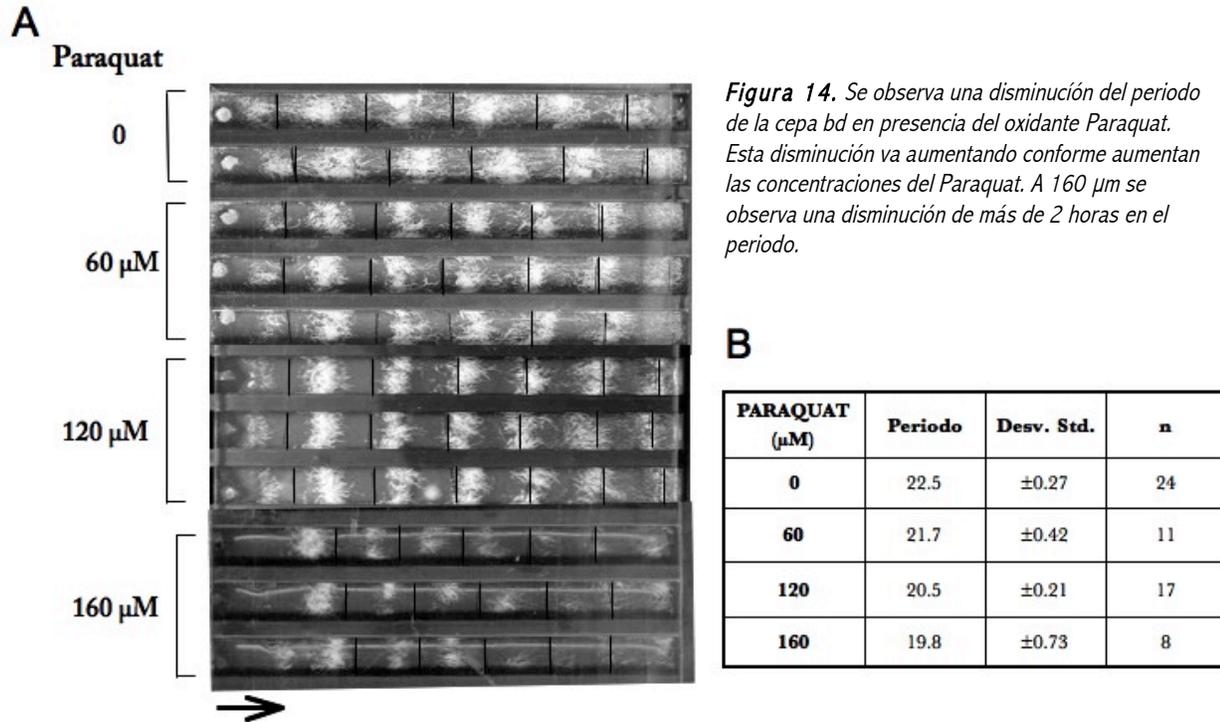


Figura 13. A. La cepa *bd* muestra una disminución en el periodo de la conidiación cíclica en presencia de altas concentraciones de histidina 30 mM. Se muestra un experimento representativo en el que las líneas verticales son marcas hechas cada 24 horas. La flecha indica la dirección del crecimiento. B. Periodo de la cepa *bd* en histidina.

El efecto de oxidantes en el periodo de conidiación de *N. crassa*

Se utilizaron dos oxidantes para evaluar su efecto en el periodo de la cepa *bd*. El primero fue el Paraquat (PQ), el cual es un herbicida que causa daño en los tejidos por la generación de superóxido a través de la reducción del oxígeno molecular en una reacción catalizada por el complejo I del sistema respiratorio. Se realizaron cultivos en pista utilizando medio adicionado con PQ en concentraciones de 60, 120 y 160 μM . Se realizaron 3 experimentos independientes cada uno con 6 muestras de la cepa *bd* en PQ y 4 muestras en medio sin PQ. El periodo resultante en una concentración de 60 μM fue de 21.7 h, mientras que en 120 y 160 μM fue de solo 20.5 y 19.8 h respectivamente (Fig. 14). Este resultado sugiere que el radical superóxido causa una reducción en el periodo del ritmo circadiano de la cepa *bd*. De acuerdo con nuestra hipótesis de trabajo, una reducción en el periodo indica la inducción de un estrés oxidante prematuro. Este resultado es congruente con el hecho de que la ausencia de la enzima SOD-1 induce la expresión de una conidiación cíclica. En resumen, un nivel elevado de superóxido, causado por la presencia del PQ o por la ausencia de la SOD-1, tiene efectos sobre la conidiación cíclica, lo cual apoya nuestra hipótesis de trabajo.



Otro oxidante utilizado fue la menadiona, que al igual que el Paraquat incrementa los niveles de superóxido, pero a través de una vía diferente. La evidencia actual indica que la menadiona desvía electrones de la cadena de transporte mitocondrial hacia el O_2 . Se realizaron cultivos en pista utilizando medio para ciclo circadiano adicionados con menadiona 60 y 120 μM . Sin embargo, los resultados no fueron concluyentes debido a que a estas concentraciones se afectó el crecimiento y las bandas de conidiación no se observaron definitivamente, por lo que las desviaciones estándar fueron mayores a 1.3 horas.

CONCLUSIONES

La ausencia, de la catalasa-1 o de la catalasa-3, no afecta el periodo de la conidiación cíclica de la cepa *bd* de *N. crassa*.

Una reducción en la producción de las ERO debido a la falta de la NOX-1 no afecta el ciclo rítmico de conidiación de la cepa *bd*, pero sí lo hace menos evidente.

A pesar de que la prolina se ha identificado como un antioxidante que contiene con las ERO generadas por las proteínas G pequeñas de la familia RAS activas constitutivamente, no fue capaz de cambiar el periodo de conidiación de la cepa *bd*, incluso a concentraciones altas de dicho iminoácido.

Sin embargo, el estado redox intracelular determina la manifestación del ciclo de conidiación en *N. crassa*. Esto debido a que una disminución en el estrés oxidante dado por la presencia del NAC se refleja en un incremento de la tasa de crecimiento, y en la desaparición de las bandas de conidiación de la cepa *bd*. Esto, aunado al hecho de que el antioxidante NAC suprime la conidiación de una mutante incapaz de eliminar el superóxido (Δ sod-1), es consistente con la hipótesis de que el estrés oxidante celular está relacionado con los componentes del reloj circadiano o que incluso lo regulan.

La presencia de histidina, usada como antioxidante, causó una reducción de 2 horas en el periodo de conidiación de la cepa *bd*, lo cual se puede deber a un efecto oxidante indirecto.

Se encontró que altos niveles de superóxido, causados por la presencia del Paraquat, disminuyen el periodo de la conidiación cíclica de la cepa *bd*.

De acuerdo con nuestra hipótesis de trabajo, una reducción en el periodo de la conidiación indica la inducción de un estrés oxidante prematuro. Los resultados en este trabajo apoyan la hipótesis de que el estado redox intracelular determina la manifestación del ciclo de conidiación de *N. crassa*. A pesar de que no se observaron efectos en el periodo de conidiación por la ausencia de las enzimas CAT-1 o CAT-3 o por la presencia de prolina y de que no se logró determinar el periodo en la mutante *bd* carente de la enzima NOX-1, sí se observó una clara relación del radical superóxido, generado ya sea con el PQ o a través de la ausencia de la enzima SOD-1 sobre la manifestación del periodo de *N. crassa*. Este estado oxidante puede reducirse por el antioxidante NAC tanto en la mutante *bd* como en la mutante *sod-1*, lo que indica que la manifestación del ciclo circadiano en *N. crassa* posiblemente se genera por un estado hiperoxidante cíclico.

BIBLIOGRAFÍA

- Aguirre, J., and Hansberg, W. (1986) Oxidation of *Neurospora crassa* glutamine synthetase. *J. Bacteriol.* **166**: 1040-1045.
- Aguirre, J., Rodriguez, R., and Hansberg, W. (1989) Oxidation of *Neurospora crassa* NADP-specific glutamate dehydrogenase by activated oxygen species. *J. Bacteriol.* **171**: 6243-6250.
- Aguirre, J., Rios-Momberg, M., Hewitt, D., and Hansberg, W. (2005) Reactive oxygen species and development in microbial eukaryotes. *Trends in Microbiology* **13**: 111-118.
- Aronson, B.D., Johnson, K.A., Loros, J.J., and Dunlap, J.C. (1994) Circadian clock locus frequency: protein encoded by a single open reading frame defines period length and temperature compensation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**: 7683-7687.
- Aschoff, J.A. (1981) *Survey in Biological Rhythms. En Handbook of Behavioral Neurobiology Biological Rhythms. Vol. 4.* New York. : Plenum Press. .
- Ballario, P., Talora, C., Galli, D., Linden, H., and Macino, G. (1998) Roles in dimerization and blue light photoresponse of the PAS and LOV domains of *Neurospora crassa* white collar proteins. *Molecular Microbiology* **29**: 719-729.
- Beadle, G.W., and Tatum, E.L. (1941) Genetic Control of Biochemical Reactions in *Neurospora*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **27**: 499-506.
- Belden, W.J., Larrondo, L.F., Froehlich, A.C., Shi, M., Chen, C.H., Loros, J.J., and Dunlap, J.C. (2007) The band mutation in *Neurospora crassa* is a dominant allele of ras-1 implicating RAS signaling in circadian output. *Genes Dev* **21**: 1494-1505.
- Bell-Pedersen, D., Cassone, V.M., Earnest, D.J., Golden, S.S., Hardin, P.E., Thomas, T.L., and Zoran, M.J. (2005) Circadian rhythms from multiple oscillators: lessons from diverse organisms. *Nat Rev Genet* **6**: 544-556.
- Bernards, A., and Settleman, J. (2004) GAP control: regulating the regulators of small GTPases. *Trends Cell Biol* **14**: 377-385.
- Binkley, S.A., Riebman, J.B., and Reilly, K.B. (1978) The pineal gland: a biological clock in vitro. *Science* **202**: 1198-1120.
- Boguski, M.S., and McCormick, F. (1993) Proteins regulating Ras and its relatives. *Nature* **366**: 643-654.
- Borgeson, C.E., and Bowman, B.J. (1990) Mutations that affect circadian rhythms in *Neurospora crassa* can alter the reduction of cytochromes by blue light. *J Biol Rhythms* **5**: 291-301.
- Brunner, M., and Kaldi, K. (2008) Interlocked feedback loops of the circadian clock of *Neurospora crassa*. *Mol Microbiol* **68**: 255-262.
- Cahill, G.M. (1996) Circadian regulation of melatonin production in cultured zebrafish pineal and retina. *Brain Res* **708**: 177-181.
- Cano-Dominguez, N., Alvarez-Delfin, K., Hansberg, W., and 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.
- Chang, E.C., and Philips, M.R. (2006) Spatial segregation of Ras signaling: new evidence from fission yeast. *Cell Cycle* **5**: 1936-1939.
- Chant, J., and Stowers, L. (1995) GTPase cascades choreographing cellular behavior: movement, morphogenesis, and more. *Cell* **81**: 1-4.

- Chen, C., Ha, Y.S., Min, J.Y., Memmott, S.D., and Dickman, M.B. (2006) Cdc42 is required for proper growth and development in the fungal pathogen *Colletotrichum trifolii*. *Eukaryot Cell* **5**: 155-166.
- Cheng, P., Yang, Y., Gardner, K.H., and Liu, Y. (2002) PAS domain-mediated WC-1/WC-2 interaction is essential for maintaining the steady-state level of WC-1 and the function of both proteins in circadian clock and light responses of *Neurospora*. *Mol Cell Biol* **22**: 517-524.
- Cheng, P., Yang, Y., Wang, L., He, Q., and Liu, Y. (2003) WHITE COLLAR-1, a multifunctional neurospora protein involved in the circadian feedback loops, light sensing, and transcription repression of *wc-2*. *J Biol Chem* **278**: 3801-3808.
- Cheng, P., He, Q., He, Q., Wang, L., and Liu, Y. (2005) Regulation of the *Neurospora* circadian clock by an RNA helicase. *Genes Dev* **19**: 234-241.
- Correa, A., and Bell-Pedersen, D. (2002) Distinct signaling pathways from the circadian clock participate in regulation of rhythmic conidiospore development in *Neurospora crassa*. *Eukaryotic Cell* **1**: 273-280.
- Correa, A., Lewis, Z.A., Greene, A.V., March, I.J., Gomer, R.H., and Bell-Pedersen, D. (2003) Multiple oscillators regulate circadian gene expression in *Neurospora*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**: 13597-13602.
- Corrochano, L.M. (2007) Fungal photoreceptors: sensory molecules for fungal development and behaviour. *Photochem Photobiol Sci* **6**: 725-736.
- Crosson, S., Rajagopal, S., and Moffat, K. (2003) The LOV domain family: photoresponsive signaling modules coupled to diverse output domains. *Biochemistry* **42**: 2-10.
- Crosthwaite, S.K., Dunlap, J.C., and Loros, J.J. (1997) *Neurospora wc-1* and *wc-2*: transcription, photoresponses, and the origins of circadian rhythmicity. *Science* **276**: 763-769.
- Darwin, C., and Darwin, F. (1900) *The power of movement in plants*. New York,: D. Appleton and company.
- Davis, R.H., and de Serres, F.J. (1970) Genetic and microbiological research techniques for *Neurospora crassa*. *Methods in Enzymology* **17A**: 79-143.
- Degli-Innocenti, F., and Russo, V.E. (1984) Isolation of new white collar mutants of *Neurospora crassa* and studies on their behavior in the blue light-induced formation of protoperithecia. *Journal of Bacteriology* **159**: 757-761.
- Dunlap, J.C., Loros, J.J., Liu, Y., and Crosthwaite, S.K. (1999) Eukaryotic circadian systems: cycles in common. *Genes Cells* **4**: 1-10.
- Dunlap, J.C., and Loros, J.J. (2004) The neurospora circadian system. *J Biol Rhythms* **19**: 414-424.
- Dunlap, J.C., and Loros, J.J. (2006) How fungi keep time: circadian system in *Neurospora* and other fungi. *Curr Opin Microbiol* **9**: 579-587.
- Egan, M.J., Wang, Z.Y., Jones, M.A., Smirnoff, N., and 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.
- Elvin, M., Loros, J.J., Dunlap, J.C., and Heintzen, C. (2005) The PAS/LOV protein VIVID supports a rapidly dampened daytime oscillator that facilitates entrainment of the *Neurospora* circadian clock. *Genes Dev.* **19**: 2593-2605.
- Enright, J.T. (1981) *Methodology. En Handbook of Behavioral Neurobiology Biological Rhythms. Vol. 4*. New York. : Plenum Press. .

- Franchi, L., Fulci, V., and Macino, G. (2005) Protein kinase C modulates light responses in *Neurospora* by regulating the blue light photoreceptor WC-1. *Mol Microbiol* **56**: 334-345.
- Froehlich, A.C., Liu, Y., Loros, J.J., and Dunlap, J.C. (2002) White Collar-1, a circadian blue light photoreceptor, binding to the frequency promoter. *Science* **297**: 815-819.
- Froehlich, A.C., Loros, J.J., and Dunlap, J.C. (2003a) Rhythmic binding of a WHITE COLLAR-containing complex to the frequency promoter is inhibited by FREQUENCY. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**: 5914-5919.
- Froehlich, A.C., Pogue, A., Lee, K., Denault, D.L., Colot, H., Nowrousian, M., Loros, J.J., and Dunlap, J.C. (2003b) The molecular workings of the *Neurospora* biological clock. *Novartis Foundation Symposium* **253**: 184-198.
- Froehlich, A.C., Noh, B., Vierstra, R.D., Loros, J., and Dunlap, J.C. (2005) Genetic and molecular analysis of phytochromes from the filamentous fungus *Neurospora crassa*. *Eukaryotic Cell* **4**: 2140-2152.
- Galagan, J.E., Calvo, S.E., Borkovich, K.A., Selker, E.U., Read, N.D., Jaffe, D., FitzHugh, W., Ma, L.J., Smirnov, S., Purcell, S., Rehman, B., Elkins, T., Engels, R., Wang, S., Nielsen, C.B., Butler, J., Endrizzi, M., Qui, D., Ianakiev, P., Bell-Pedersen, D., Nelson, M.A., Werner-Washburne, M., Selitrennikoff, C.P., Kinsey, J.A., Braun, E.L., Zelter, A., Schulte, U., Kothe, G.O., Jedd, G., Mewes, W., Staben, C., Marcotte, E., Greenberg, D., Roy, A., Foley, K., Naylor, J., Stange-Thomann, N., Barrett, R., Gnerre, S., Kamal, M., Kamvysselis, M., Mauceli, E., Bielke, C., Rudd, S., Frishman, D., Krystofova, S., Rasmussen, C., Metzenberg, R.L., Perkins, D.D., Kroken, S., Cogoni, C., Macino, G., Catcheside, D., Li, W., Pratt, R.J., Osmani, S.A., DeSouza, C.P., Glass, L., Orbach, M.J., Berglund, J.A., Voelker, R., Yarden, O., Plamann, M., Seiler, S., Dunlap, J.C., Radford, A., Aramayo, R., Natvig, D.O., Alex, L.A., Mannhaupt, G., Ebbole, D.J., Freitag, M., Paulsen, I., Sachs, M.S., Lander, E.S., Nusbaum, C., and Birren, B. (2003) The genome sequence of the filamentous fungus *Neurospora crassa*. *Nature* **422**: 859-868.
- Garceau, N.Y., Liu, Y., Loros, J.J., and Dunlap, J.C. (1997) Alternative initiation of translation and time-specific phosphorylation yield multiple forms of the essential clock protein FREQUENCY. *Cell* **89**: 469-476.
- Glossop, N.R., Lyons, L.C., and Hardin, P.E. (1999) Interlocked feedback loops within the *Drosophila* circadian oscillator. *Science* **286**: 766-768.
- Glossop, N.R., and Hardin, P.E. (2002) Central and peripheral circadian oscillator mechanisms in flies and mammals. *J Cell Sci* **115**: 3369-3377.
- Gorl, M., Mellow, M., Huttner, B., Johnson, J., Roenneberg, T., and Brunner, M. (2001) A PEST-like element in FREQUENCY determines the length of the circadian period in *Neurospora crassa*. *EMBO Journal* **20**: 7074-7084.
- Gwinner, E., and Brandstätter, R. (2001) Complex bird clocks. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **356**: 1801-1810.
- Hall, J.C. (2003) Genetics and molecular biology of rhythms in *Drosophila* and other insects. *Adv Genet* **48**: 1-280.
- Hämmerling, J. (1953) Nucleo-cytoplasmic Relationships in the Development of *Acetabularia*. *Journal of International Review of Cytology* **2**: 475-498.
- Hansberg, W., and Aguirre, J. (1990) Hyperoxidant states cause microbial cell differentiation by cell isolation from dioxygen. *J Theor Biol* **142**: 201-221.

- Hansberg, W., de Groot, H., and Sies, H. (1993) Reactive oxygen species associated with cell differentiation in *Neurospora crassa*. *Free Radic Biol Med* **14**: 287-293.
- Hawksworth, D.L. (2001) The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited. *Mycol. Res.* **105**: 1422-1432.
- He, Q., Cheng, P., Yang, Y., Wang, L., Gardner, K.H., and Liu, Y. (2002) White collar-1, a DNA binding transcription factor and a light sensor. *Science* **297**: 840-843.
- He, Q., and Liu, Y. (2005a) Molecular mechanism of light responses in *Neurospora*: from light-induced transcription to photoadaptation. *Genes Dev* **19**: 2888-2899.
- He, Q., and Liu, Y. (2005b) Degradation of the *Neurospora* circadian clock protein FREQUENCY through the ubiquitin-proteasome pathway. *Biochem Soc Trans* **33**: 953-956.
- He, Q., Shu, H., Cheng, P., Chen, S., Wang, L., and Liu, Y. (2005) Light-independent phosphorylation of WHITE COLLAR-1 regulates its function in the *Neurospora* circadian negative feedback loop. *J Biol Chem* **280**: 17526-17532.
- He, Q., Cha, J., He, Q., Lee, H.C., Yang, Y., and Liu, Y. (2006) CKI and CKII mediate the FREQUENCY-dependent phosphorylation of the WHITE COLLAR complex to close the *Neurospora* circadian negative feedback loop. *Genes Dev* **20**: 2552-2565.
- Heintzen, C., Loros, J.J., and Dunlap, J.C. (2001) The PAS protein VIVID defines a clock-associated feedback loop that represses light input, modulates gating, and regulates clock resetting. *Cell* **104**: 453-464.
- Herrera, T., and Ulloa, M. (1998) *El Reino de los Hongos. Micología básica y aplicada*. México: FCE, UNAM
- Hibbett, D.S., Binder, M., Bischoff, J.F., Blackwell, M., Cannon, P.F., Eriksson, O.E., Huhndorf, S., James, T., Kirk, P.M., Lücking, R., Thorsten Lumbsch, H., Lutzoni, F., Matheny, P.B., McLaughlin, D.J., Powell, M.J., Redhead, S., Schoch, C.L., Spatafora, J.W., Stalpers, J.A., Vilgalys, R., Aime, M.C., Aptroot, A., Bauer, R., Begerow, D., Benny, G.L., Castlebury, L.A., Crous, P.W., Dai, Y.-C., Gams, W., Geiser, D.M., Griffith, G.W., Gueidan, C., Hawksworth, D.L., Hestmark, G., Hosaka, K., Humber, R.A., Hyde, K.D., Ironside, J.E., Kiljalg, U., Kurtzman, C.P., Larsson, K.-H., Lichtwardt, R., Longcore, J., Miadlikowska, J., Miller, A., Moncalvo, J.-M., Mozley-Standridge, S., Oberwinkler, F., Parmasto, E., Reeb, V., Rogers, J.D., Roux, C., Ryvarden, L., Sampaio, J.P., Schiffer, A., Sugiyama, J., Thorn, R.G., Tibell, L., Untereiner, W.A., Walker, C., Wang, Z., Weir, A., Weiss, M., White, M.M., Winka, K., Yao, Y.-J., and Zhang, N. (2007) A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycological Research* **111**: 509-547.
- Hickey, P.C., Jacobson, D., Read, N.D., and Louise Glass, N.L. (2002) Live-cell imaging of vegetative hyphal fusion in *Neurospora crassa*. *Fungal Genet Biol* **37**: 109-119.
- Huang, G., Chen, S., Li, S., Cha, J., Long, C., Li, L., He, Q., and Liu, Y. (2007) Protein kinase A and casein kinases mediate sequential phosphorylation events in the circadian negative feedback loop. *Genes Dev* **21**: 3283-3295.
- Hunt, S.M., Elvin, M., Crosthwaite, S.K., and Heintzen, C. (2007) The PAS/LOV protein VIVID controls temperature compensation of circadian clock phase and development in *Neurospora crassa*. *Genes Dev* **21**: 1964-1974.
- Jones, C.A., Greer-Phillips, S.E., and Borkovich, K.A. (2007) The response regulator RRG-1 functions upstream of a mitogen-activated protein kinase pathway impacting asexual development, female fertility, osmotic stress, and fungicide resistance in *Neurospora crassa*. *Mol Biol Cell* **18**: 2123-2136.
- Kana-uchi, A., Yamashiro, C.T., Tanabe, S., and Murayama, T. (1997) A ras homologue of *Neurospora crassa* regulates morphology. *Mol Gen Genet* **254**: 427-432.

- Klotz, M.G., and Loewen, P.C. (2003) The molecular evolution of catalatic hydroperoxidases: evidence for multiple lateral transfer of genes between prokaryota and from bacteria into eukaryota. *Mol Biol Evol* **20**: 1098-1112.
- Krishnan, N., Dickman, M.B., and Becker, D.F. (2008) Proline modulates the intracellular redox environment and protects mammalian cells against oxidative stress. *Free Radic Biol Med* **44**: 671-681.
- Lakin-Thomas, P.L. (2006) Transcriptional feedback oscillators: maybe, maybe not. *J Biol Rhythms* **21**: 83-92.
- Lara-Ortiz, T., Riveros-Rosas, H., and Aguirre, J. (2003) Reactive oxygen species generated by microbial NADPH oxidase NoxA regulate sexual development in *Aspergillus nidulans*. *Molecular Microbiology* **50**: 1241-1255.
- Lee, C., Bae, K., and Edery, I. (1999) PER and TIM inhibit the DNA binding activity of a *Drosophila* CLOCK-CYC/dBMAL1 heterodimer without disrupting formation of the heterodimer: a basis for circadian transcription. *Mol Cell Biol* **19**: 5316-5325.
- Lewis, Z.A., Correa, A., Schwerdtfeger, C., Link, K.L., Xie, X., Gomer, R.H., Thomas, T., Ebbole, D.J., and Bell-Pedersen, D. (2002) Overexpression of White Collar-1 (WC-1) activates circadian clock-associated genes, but is not sufficient to induce most light-regulated gene expression in *Neurospora crassa*. *Molecular Microbiology* **45**: 917-931.
- Linden, H., and Macino, G. (1997) White collar 2, a partner in blue-light signal transduction, controlling expression of light-regulated genes in *Neurospora crassa*. *The EMBO Journal* **16**: 98-109.
- Linden, H., Rodriguez-Franco, M., and Macino, G. (1997) Mutants of *Neurospora crassa* defective in regulation of blue light perception. *Molecular and General Genetics MGG* **254**: 111-118.
- Lindergren, C.C. (1936) A six point map of the sex chromosome of *Neurospora crassa*. *J Genet* **32**: 243-256.
- Liu, Y., He, Q., and Cheng, P. (2003) Photoreception in *Neurospora*: a tale of two White Collar proteins. *Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS)* **60**: 2131-2138.
- Lledias, F., Rangel, P., and Hansberg, W. (1998) Oxidation of catalase by singlet oxygen. *J Biol Chem* **273**: 10630-10637.
- Loros, J.J., and Feldman, J.F. (1986a) Loss of temperature compensation of circadian period length in the *frq-9* mutant of *Neurospora crassa*. *Journal of Biological Rhythms* **1**: 187-198.
- Loros, J.J., and Feldman, J.F. (1986b) Loss of temperature compensation of circadian period length in the *frq-9* mutant of *Neurospora crassa*. *J Biol Rhythms* **1**: 187-198.
- Malagnac, F., Lalucque, H., Lepere, G., and Silar, P. (2004) Two NADPH oxidase isoforms are required for sexual reproduction and ascospore germination in the filamentous fungus *Podospora anserina*. *Fungal Genetics and Biology* **41**: 982-997.
- Memmott, S.D., Ha, Y.S., and Dickman, M.B. (2002) Proline reverses the abnormal phenotypes of *Colletotrichum trifolii* associated with expression of endogenous constitutively active Ras. *Appl Environ Microbiol* **68**: 1647-1651.
- Merrow, M., Franchi, L., Dragovic, Z., Gori, M., Johnson, J., Brunner, M., Macino, G., and Roenneberg, T. (2001) Circadian regulation of the light input pathway in *Neurospora crassa*. *The EMBO Journal* **20**: 307-315.

- Michan, S., Lledias, F., Baldwin, J.D., Natvig, D.O., and Hansberg, W. (2002) Regulation and oxidation of two large monofunctional catalases. *Free Radical Biology and Medicine* **33**: 521-532.
- Michan, S., Lledias, F., and Hansberg, W. (2003) Asexual development is increased in *Neurospora crassa* cat-3-null mutant strains. *Eukaryotic Cell* **2**: 798-808.
- Michel, S., Geusz, M.E., Zaritsky, J.J., and Block, G.D. (1993) Circadian rhythm in membrane conductance expressed in isolated neurons. *Science* **259**: 239-241.
- Moore-Ede, M.C., F. M. Sulzmann, and Fuller., C.A. (1982) *The Clocks That Time Us*. Mass, USA: Harvard University Press, Cambridge.
- Peraza, L., and Hansberg, W. (2002) *Neurospora crassa* catalases, singlet oxygen and cell differentiation. *Biol Chem* **383**: 569-575.
- Perkins, D.D. (1991) The first published scientific study of *Neurospora*, including a description of photoinduction of carotenoids. *Fungal Genet News* **38**: 64-65.
- Plautz, J.D., Kaneko, M., Hall, J.C., and Kay, S.A. (1997) Independent photoreceptive circadian clocks throughout *Drosophila*. *Science* **278**: 1632-1635.
- Pratt, R.J., and Aramayo, R. (2002) Improving the efficiency of gene replacements in *Neurospora crassa*: a first step towards a large-scale functional genomics project. *Fungal Genet Biol* **37**: 56-71.
- Sargent, M.L., Briggs, W.R., and Woodward, D.O. (1966) Circadian nature of a rhythm expressed by an invertaseless strain of *Neurospora crassa*. *Plant Physiology* **41**: 1343-1349.
- Sargent, M.L. (1969) Effects of antibiotics on growth and periodicity of rhythmic strain. *Neurospora Newsletter* **15**: 17.
- Schafmeier, T., Haase, A., Kaldi, K., Scholz, J., Fuchs, M., and Brunner, M. (2005a) Transcriptional feedback of *Neurospora* circadian clock gene by phosphorylation-dependent inactivation of its transcription factor. *Cell* **122**: 235-246.
- Schafmeier, T., Haase, A., Kaldi, K., Scholz, J., Fuchs, M., and Brunner, M. (2005b) Transcriptional feedback of *Neurospora* circadian clock gene by phosphorylation-dependent inactivation of its transcription factor. *Cell* **122**: 235-246.
- Schafmeier, T., Kaldi, K., Diernfellner, A., Mohr, C., and Brunner, M. (2006) Phosphorylation-dependent maturation of *Neurospora* circadian clock protein from a nuclear repressor toward a cytoplasmic activator. *Genes Dev.* **20**: 297-306.
- Schubert, J., and Wilmer, J.W. (1991) Does hydrogen peroxide exist "free" in biological systems? *Free Radic Biol Med* **11**: 545-555.
- Schwerdtfeger, C., and Linden, H. (2003) VIVID is a flavoprotein and serves as a fungal blue light photoreceptor for photoadaptation. *The EMBO Journal* **22**: 4846-4855.
- Scott, B., and Eaton, C.J. (2008) Role of reactive oxygen species in fungal cellular differentiations. *Curr Opin Microbiol* **11**: 488-493.
- Sestili, P., Cattabeni, F., and Cantoni, O. (1995) The L-histidine-mediated enhancement of hydrogen peroxide-induced DNA double strand breakage and cytotoxicity does not involve metabolic processes. *Biochem Pharmacol* **50**: 1823-1830.
- Shrode, L.B., Lewis, Z.A., White, L.D., Bell-Pedersen, D., and Ebbole, D.J. (2001) *vvd* is required for light adaptation of conidiation-specific genes of *Neurospora crassa*, but not circadian conidiation. *Fungal Genetics and Biology* **32**: 169-181.
- Springer, M.L. (1993) Genetic control of fungal differentiation: the three sporulation pathways of *Neurospora crassa*. *Bioessays* **15**: 365-374.
- Talora, C., Franchi, L., Linden, H., Ballario, P., and Macino, G. (1999) Role of a white collar-1-white collar-2 complex in blue-light signal transduction. *Embo J* **18**: 4961-4968.

- Toledo, I., and Hansberg, W. (1990) Protein oxidation related to morphogenesis in *Neurospora crassa*. *Experimental mycology* **14** (2): 184-189.
- Toledo, I., Noronha-Dutra, A.A., and Hansberg, W. (1991) Loss of NAD(P)-reducing power and glutathione disulfide excretion at the start of induction of aerial growth in *Neurospora crassa*. *J Bacteriol* **173**: 3243-3249.
- Toledo, I., Aguirre, J., and Hansberg, W. (1994) Enzyme inactivation related to a hyperoxidant state during conidiation of *Neurospora crassa*. *Microbiology* **140** (Pt 9): 2391-2397.
- Toledo, I., Rangel, P., and Hansberg, W. (1995) Redox imbalance at the start of each morphogenetic step of *Neurospora crassa* conidiation. *Arch Biochem Biophys* **319**: 519-524.
- Tosini, G., and Menaker, M. (1996) Circadian rhythms in cultured mammalian retina. *Science* **272**: 419-421.
- Vetter, I.R., and Wittinghofer, A. (2001) The guanine nucleotide-binding switch in three dimensions. *Science* **294**: 1299-1304.
- Vitalini, M.W., de Paula, R.M., Park, W.D., and Bell-Pedersen, D. (2006) The rhythms of life: circadian output pathways in *Neurospora*. *J Biol Rhythms* **21**: 432-444.
- Welsh, D.K., Logothetis, D.E., Meister, M., and Reppert, S.M. (1995) Individual neurons dissociated from rat suprachiasmatic nucleus express independently phased circadian firing rhythms. *Neuron* **14**: 697-706.
- Wennerberg, K., Rossman, K.L., and Der, C.J. (2005) The Ras superfamily at a glance. *J Cell Sci* **118**: 843-846.
- Yang, Y., Cheng, P., Zhi, G., and Liu, Y. (2001) Identification of a calcium/calmodulin-dependent protein kinase that phosphorylates the *Neurospora* circadian clock protein FREQUENCY. *J Biol Chem* **276**: 41064-41072.
- Yang, Y., He, Q., Cheng, P., Wrage, P., Yarden, O., and Liu, Y. (2004) Distinct roles for PP1 and PP2A in the *Neurospora* circadian clock. *Genes and Development* **18**: 255-260.
- Yoo, S.H., Yamazaki, S., Lowrey, P.L., Shimomura, K., Ko, C.H., Buhr, E.D., Slepka, S.M., Hong, H.K., Oh, W.J., Yoo, O.J., Menaker, M., and Takahashi, J.S. (2004) PERIOD2::LUCIFERASE real-time reporting of circadian dynamics reveals persistent circadian oscillations in mouse peripheral tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 5339-5346.
- Zoltowski, B.D., Schwerdtfeger, C., Widom, J., Loros, J.J., Bilwes, A.M., Dunlap, J.C., and Crane, B.R. (2007) Conformational switching in the fungal light sensor Vivid. *Science* **316**: 1054-1057.
- Zoltowski, B.D., and Crane, B.R. (2008) Light activation of the LOV protein vivid generates a rapidly exchanging dimer. *Biochemistry* **47**: 7012-7019.