



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE CIENCIAS

EL PAPEL DE LA PROBABLE REDUCTASA FÉRRICA  
AN\_8683 EN EL CRECIMIENTO Y LA DIFERENCIACIÓN  
CELULAR EN EL HONGO *Aspergillus nidulans*

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A :

TADEO DE JESÚS PÉREZ COVARRUBIAS

TUTOR: DR. JESÚS AGUIRRE LINARES



FACULTAD DE CIENCIAS  
UNAM

2014



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.

## Hoja de Datos de Jurado

### 1. Datos del alumno

Pérez  
Covarrubias  
Tadeo de Jesús  
55 89 26 01  
Universidad Nacional Autónoma de  
México  
Facultad de Ciencias  
Biología  
306143818

### 2. Datos del tutor

Dr.  
Jesús  
Aguirre  
Linares

### 3. Datos del sinodal 1

Dr.  
Julio Eduardo Roque  
Morán  
Andrade

### 4. Datos del sinodal 2

Dr.  
Víctor Manuel  
Valdés  
López

### 5. Datos del sinodal 3

M. en C.  
Guadalupe  
Vidal  
Gaona

### 6. Datos del sinodal 4

Dr.  
Alfonso Miguel  
Torre  
Blanco

### 7. Datos del trabajo escrito.

El papel de la probable reductasa férrica AN\_8683  
en el crecimiento y la diferenciación celular en el hongo  
*Aspergillus nidulans*

82 pp.

2014

Este trabajo se realizó en el laboratorio 107 oriente bajo la dirección del Dr. Jesús Aguirre Linares, en el Departamento de Biología Celular y Desarrollo del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Agradezco el apoyo técnico de la Biol. Alma Olivia Sánchez González durante la realización de este trabajo. Agradezco el apoyo técnico del Dr. Fernando Lara Rojas durante la realización de este trabajo. Agradezco el apoyo técnico del Biol. Rafael Jaimes Arroyo durante la realización de este trabajo. Agradezco al Biol. José Antonio Contreras Chijate por el apoyo en los análisis estadísticos y bioinformáticos. Agradezco a Fabián Márquez González por su asistencia en el laboratorio.

Este trabajo fue posible gracias a los donativos 153256 de CONACYT e IN207913 de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico-UNAM (PAPIIT-UNAM) y el donativo en colaboración DFG-CONACYT Alemania-México 75306.

Se agradece a la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular por los servicios prestados, mismos que permitieron que este trabajo se llevara a cabo.

A mis padres:  
María Esther Covarrubias Guerrero y Cándido Pérez Martínez  
por su apoyo a lo largo de mi formación.

A mi tío:  
José Luis Covarrubias Guerrero  
por su apoyo constante y sus enseñanzas.

A mi hermana:  
Carmen Pérez Covarrubias

A mi pequeña:  
Ana Luisa Arredondo Ortega

## Agradecimientos

A mis padres, por darme la oportunidad de llegar a cumplir esta meta y su ejemplo de responsabilidad que me han dado a lo largo de mi vida.

A mi tío José Luis Covarrubias, por sus consejos, apoyo y sus enseñanzas.

A Ana Luisa Ortega, por el cariño y amor sincero.

Al Dr. Adolfo Gerardo Navarro Sigüenza por impulsarme a conseguir mis metas en esta etapa de mi vida.

Al Dr. Héctor Quezada Pablo, por haberme aceptado en su laboratorio y ayudarme a dar mis primeros pasos en el mundo experimental.

Al Dr. Jesús Aguirre por darme la oportunidad de trabajar en su laboratorio.

A los miembros del jurado: Dr. Julio Morán Andrade, Dr. Víctor Valdés López, M. en C. Guadalupe Vidal Gaona y Dr. Alfonso Miguel Torre Blanco, por dedicar parte de su tiempo en la revisión de este trabajo.

A la Biol. Olivia Sánchez, porque aparte de mantener el balance entre el bien y el mal en el laboratorio proporciona ricas mandarinas, pepinillos y chocolates.

A mis grandes amigos Raymundo Sandoval Avilés, Héctor Márquez Pérez y Diego Rosas Hernández, por su compañía y enseñanzas gatunas, gruñonas y churrientas.

A mis amigos de la facultad Juan Carlos, Alan, Sergio, Fernanda Ayhllon, Mayra Itzel, Giovanni Hazel, Giovanni Montiel, Brenda Pérez, Mariana Pineda y todos aquellos que me faltó nombrar, gracias por todos los momentos buenos, que compartimos como estudiantes de biología.

A mis compañeros y amigos del laboratorio 107 oriente: Jenny Arratia, Fernando Lara, Nallely Cano, Rafael Jaimes, Ariann Mendoza, Sol Hernández, César Ismael, Ignacio Agustín Silent, José Antonio, Fabián Márquez, Minerva Igrein, Ana Karen Angoa y Dora Alicia, por el apoyo, las sugerencias, correcciones, enseñanzas y los buenos ratos dentro y fuera del lab.

## Índice

RESUMEN .....	viii
INTRODUCCIÓN.....	1
1.1-Aspectos generales.....	1
1.2- Mecanismos antioxidantes.....	2
1.3-Mecanismos pro-oxidantes.....	2
1.4-El papel de las ERO en la diferenciación celular.....	3
2.-Las NADPH oxidasas (NOX).....	5
2.1- Nox en células no fagocíticas.....	12
2.2-NOX en las plantas.....	15
2.3- Las NOX en los hongos.....	17
3.-La importancia del hierro y el cobre en los sistemas biológicos.....	20
3.1-Mecanismos de captura de hierro.....	21
3.2- Las reductasas de hierro (FRE) en los hongos.....	22
3.4-La proteína Yno1 y su papel como NOX.....	25
4.- <i>Aspergillus nidulans</i> como modelo de estudio.....	26
HIPÓTESIS .....	31
OBJETIVO GENERAL.....	31
OBJETIVOS PARTICULARES.....	31
MATERIALES Y MÉTODOS.....	32
RESULTADOS.....	40
1.-El gen AN_8683 de <i>A. nidulans</i> codifica para una proteína con posible actividad de NADPH oxidasa.....	40
2.- Eliminación del gen An_8683 mediante la técnica de PCRs sobrelapadas (Double Joint PCR).....	51
3.-La eliminación del gen AN_8683 afecta la conidiación.....	54
4.-Las cepas $\Delta$ AN_8683 generan más cleistotecios.....	56
DISCUSIÓN.....	58
CONCLUSIONES.....	64
PERSPECTIVAS.....	65
REFERENCIAS.....	66

## ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
C-	Extremo carboxilo terminal
ERO	Especies Reactivas del Oxígeno
FAD	Flavín adenín dinucleótido
FRE	Reductasa férrica
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrógeno
HO <sub>2</sub>	Radical hidroxilo
MM	Medio Mínimo
N-	Extremo amino terminal
NADPH	Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato
NOX	NADPH Oxidasa
O <sub>2</sub> <sup>·-</sup>	Superóxido
ORF	Marco abierto de lectura
Redox	Óxido-reducción
RIA	Asimilación de hierro por reducción
RBOH	Homólogos de la oxidasa de la explosión respiratoria
SOD	Superóxido dismutasa

## RESUMEN

Las ERO (especies reactivas del oxígeno) son derivados del oxígeno molecular ( $O_2$ ) más reactivas que éste en su estado basal. En los seres vivos, las ERO se producen como resultado de procesos metabólicos (respiración) y estímulos ambientales (radiación UV), conformando un sistema pro-oxidante. Para mantener un balance redox (óxido-reducción), los organismos generan respuestas antioxidantes tanto enzimáticas (catalasas, superóxido dismutasa, tioredoxinas, entre otros), así como no enzimáticas (tocoferoles, carotenos, vitamina A y ubiquinoles por ejemplo). Las ERO pueden producir daño en el ADN, proteínas, lípidos y otros componentes celulares. Sin embargo, se ha propuesto que en los hongos y otros organismos eucariontes la diferenciación celular ocurre como una respuesta a un estado hiperoxidante y se piensa que ciertas ERO funcionan como segundos mensajeros. Las enzimas NADPH oxidasas (NOX), producen el anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) a partir de la oxidación del NADPH. Las NOX participan en distintas funciones celulares, tales como la inmunidad, la transducción de señales, el transporte de iones, la proliferación y la diferenciación celular, en animales, plantas y hongos. En hongos se ha demostrado que las NOX juegan un papel importante durante el desarrollo. En el hongo *Neurospora crassa* hay dos NADPH oxidasas, NOX-1 y NOX2. Las mutantes carentes de NOX-1 tienen un desarrollo asexual disminuido, una reducción del crecimiento de las hifas y son estériles. Las mutantes sin NOX-2 producen ascosporas incapaces de germinar. *Aspergillus nidulans*, posee una sola NOX, NoxA, y las mutantes deficientes en NoxA son incapaces de generar cuerpos fructíferos sexuales (cleistotecios). Recientemente se ha descrito una nueva proteína NOX en *Saccharomyces cerevisiae* (YNO1), la cual

era considerada una reductasa férrica. El gen *AN\_8683* de *A. nidulans* codifica para una proteína que muestra cierta similitud con YNO1 y cuya función se desconoce. En el presente trabajo llevamos a cabo comparaciones de secuencia entre las proteínas YNO1, AN\_8683 y proteínas homólogas de otros hongos. Nuestro análisis sugirió que AN\_8683 podría pertenecer a la nueva familia de NOX definida por YNO1, por lo cual decidimos generar cepas mutantes carentes del gen AN\_8683 y caracterizarlas con respecto a su crecimiento y diferenciación celular. En contraste con las mutantes  $\Delta noxA$ , las mutantes  $\Delta AN_8683$  son capaces de diferenciar cleistotecios normales. Sin embargo, al igual que éstas, muestran una conidiación menor que una cepa silvestre. Una mutante doble  $\Delta noxA \Delta AN_8683$  presenta una conidiación aún menor que la de las mutantes sencillas, indicando que ambas proteínas contribuyen de manera independiente a la conidiación. Dado que la conidiación reducida de las mutantes sencillas y dobles no se ve exacerbada en un medio carente de hierro, proponemos que ni NoxA ni AN\_8683 participan en la asimilación de este metal. Nuestros resultados apoyan la hipótesis de que AN\_8683 corresponde a una NOX y no a una reductasa de hierro y justifican una mayor investigación sobre las funciones de esta proteína

## INTRODUCCIÓN

### 1.- Las especies Reactivas del Oxígeno

#### 1.-Aspectos generales

Todos los organismos aerobios utilizan el oxígeno molecular ( $O_2$ ) como aceptor final de electrones en la fosforilación oxidativa para producir energía en forma de ATP; sin embargo, al mismo tiempo deben enfrentar los efectos tóxicos que esto genera, como es la producción de distintas especies reactivas del oxígeno (ERO). Las ERO, son derivados del  $O_2$  que son más reactivos que éste en su estado basal de triplete (Hansberg, 2002).

Las ERO se pueden generar tanto por la excitación del  $O_2$ , formando oxígeno atómico ( $O$ ), oxígeno en singulete ( $^1O_2$ ) y ozono ( $O_3$ ), así como por su reducción parcial en agua ( $H_2O$ ) que produce el radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y el radical hidroxilo ( $HO\cdot$ ) (Fig. 1) (B. Halliwell & Gutteridge, 1986). En seres vivos las ERO se producen como resultado de procesos metabólicos (respiración) y estímulos ambientales (radiación UV), conformando un sistema pro-oxidante. Para mantener un balance redox (óxido-reducción), los organismos generan respuestas antioxidantes tanto enzimáticas (catalasas, superóxido dismutasa, tioredoxinas, entre otros), como no enzimáticas (tocoferoles, carotenos, vitamina A y ubiquinoles por ejemplo) (Sies, 1985, 1986, 1991).

Cuando las ERO sobrepasan el sistema celular de defensa antioxidante, debido a un alto nivel de ERO o a una baja capacidad del mecanismo antioxidante se produce el estrés oxidativo (Sies, 1985). El estrés oxidativo produce daños directos o indirectos mediados por las ERO en ácidos nucleicos, proteínas, y lípidos (B. G. Halliwell, J.M.C., 1999) y ha sido implicado en carcinogénesis (Trachootham, Alexandre, & Huang,

2009), neurodegeneración (Kozubowski, Larson, & Tatchell, 2005; Read, Goryachev, & Lichius, 2012), arterosclerosis, diabetes (Paravicini & Touyz, 2006) y envejecimiento (Haigis & Yankner, 2010).

### 1.1- Mecanismos antioxidantes

Los organismos aerobios han desarrollado sistemas de defensa antioxidante. Halliwell & Gutteridge (1989) definen a los antioxidantes como “cualquier sustancia que cuando está presente en bajas concentraciones en comparación con un sustrato oxidable, significativamente retarda o inhibe la oxidación de ese sustrato”. Esta definición incluye compuestos tanto enzimáticos como no enzimáticos. Así, la diversidad de antioxidantes se empareja con la de pro-oxidantes (Sies, 1991).

Los compuestos antioxidantes no enzimáticos actúan interceptando los oxidantes y desactivándolos al reaccionar directamente con éstos. Pueden ser sintetizados por los organismos o adquiridos mediante su dieta, por ejemplo la vitamina A, la vitamina C, la vitamina E, el ácido úrico, los fenoles, los tocoferoles, los carotenos, y los ubiquinoles (Sies, 1997). Entre las enzimas que previenen el daño causado por las ERO se encuentran la superóxido dismutasa (SOD), las catalasas (CAT) y las peroxidasas (PX), como la glutatión peroxidasa (GPx) y las peroxirredoxinas (Prx) (Davies, 2000). Estos mecanismos antioxidantes no actúan de forma aislada, sino al parecer lo hacen de manera cooperativa y tienden a presentarse en forma de reacciones secuenciales (Fig. 1) (Kamata & Hirata, 1999).

### 1.2-Mecanismos pro-oxidantes

El sistema pro-oxidante está conformado por procesos metabólicos y estímulos ambientales. Algunos de los estímulos ambientales que producen ERO son los distintos tipos de radiación, como los rayos X, que generan HO·, así como la luz

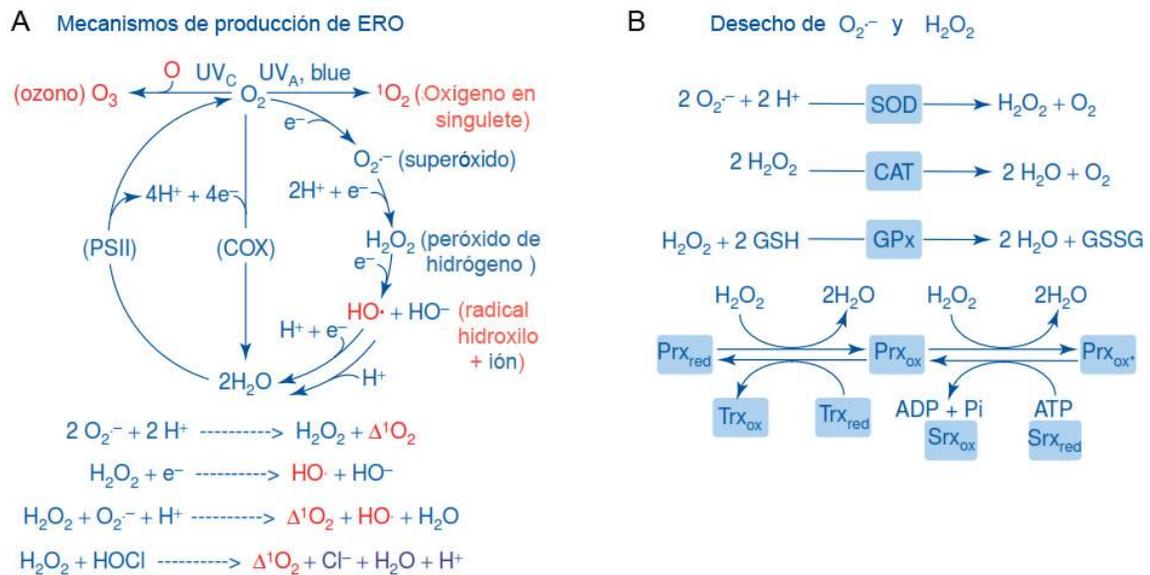
ultravioleta (UV) que produce estados electrónicos excitados con la formación subsecuente de diversos radicales, aunque también el ultrasonido y las microondas podrían generarlas (Sies, 1997).

Dentro de los procesos metabólicos que producen ERO, la principal fuente de éstas es la respiración. En la mitocondria se produce  $O_2^-$  en los complejos I (NADH deshidrogenasa) y III (ubiquinona-citocromo *c* reductasa) de la cadena respiratoria, cuando hay fugas de electrones que no reducen el  $O_2$  hasta  $H_2O$  (B. Halliwell & Gutteridge, 1986). Sin embargo, también se genera  $O_2^-$  por la acción de algunas enzimas, entre las cuales se encuentran la xantina oxidasa, la NADPH oxidasa (NOX) y el citocromo  $P_{450}$  (B. Halliwell, 1989).

### 1.3-El papel de las ERO en la diferenciación celular

Además de las alteraciones y enfermedades con las que se ha relacionado a las ERO, también se les ha asignado un papel importante durante la diferenciación celular. En 1990, Hansberg y Aguirre propusieron que la diferenciación celular en los microorganismos es una respuesta a un estado hiperoxidante. Durante la diferenciación ocurre un incremento transitorio en los niveles de ERO más allá de la capacidad celular para neutralizarlas. El estrés oxidativo se ha asociado con la detención del crecimiento y a una disminución del metabolismo primario, así como al aumento de componentes del mecanismo antioxidante. Esto permite la adaptación de la célula a los cambios y la disminución de los oxidantes intracelulares. En el hongo filamentoso *Neurospora crassa*, al inicio de cada etapa morfogénica hay una sobreproducción de ERO por arriba de la capacidad celular para contender con ellas, lo que genera un estado hiperoxidante. Esto sugiere que la diferenciación celular se da como respuesta a una producción transitoria de ERO en etapas discretas del desarrollo (revisado en Aguirre et al., 2005).

Los efectos positivos de la carencia de enzimas antioxidantes en la diferenciación asexual de los hongos, y el reciente descubrimiento del papel esencial de las enzimas NOX en la diferenciación sexual, es consistente con el papel fundamental de las ERO en la diferenciación celular (Cano-Dominguez, Alvarez-Delfin, Hansberg, & Aguirre, 2008; Finkel, 2003; Lara-Ortiz et al., 2003).

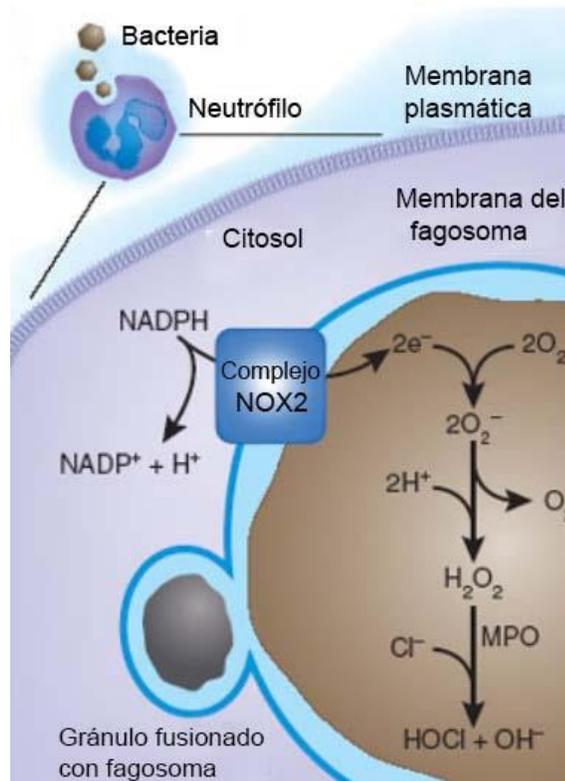


**Fig 1. Mecanismos de producción de ERO y de eliminación del superóxido y peróxido de hidrógeno. A)** Las ERO se pueden producir por excitación ( $O_3$ ,  $^1O_2$ ,  $^1O_2$ ) o por reducción ( $O_2^{\cdot -}$ ,  $H_2O_2$ ,  $HO \cdot$ ) del  $O_2$ . Las especies en rojo son más reactivas. El  $O_2$  se genera por el fotosistema II (PSII) en las plantas y es reducido por la citocromo oxidasa de la cadena respiratoria (COX). El superóxido sólo reacciona consigo mismo, con óxido nítrico y con otros radicales. El peróxido de hidrógeno reacciona con las cisteínas y los centros hierro-azufre de ciertas proteínas. No obstante, tanto el superóxido como el peróxido de hidrógeno pueden formar espontáneamente oxígeno en singulete y radical hidroxilo, que son mucho más reactivos. Se muestran las principales reacciones del oxígeno en singulete y el peróxido de hidrógeno. **B)** El superóxido es dismutado por la superóxido dismutasa (SOD). El peróxido de hidrógeno es descompuesto por las catalasas (CAT), las peroxidasas, como la glutatión peroxidasa (GPx) y por las peroxirredoxinas (Prx). El grupo tiol de una cisteína sensible en Prx se oxida en Cys-ácido sulfénico ( $Prx_{ox}$ ) y es reducido por una tiorredoxina reducida ( $Trx_{red}$ ). La Cys-ácido sulfénico en  $Prx_{ox}$  puede ser oxidada por peróxido de hidrógeno a Cys-ácido sulfínico; el cual es reducido nuevamente a Cys-ácido sulfénico por la sulfirredoxina reducida ( $Sr_{x_{red}}$ ) y ATP (Coates, Jahn, & Weetman, 1982) (Figura modificada de Aguirre *et al.*, 2005)

## 2.-Las NADPH oxidasas (NOX)

Las NADPH oxidasas (NOX), son enzimas que catalizan la producción de superóxido a partir del  $O_2$  y el NADPH (Ago, Nunoi, Ito, & Sumimoto, 1999). La NOX más estudiada ha sido la NOX2, presente en las células fagocíticas del sistema inmune. Las células fagocíticas están compuestas por neutrófilos, eosinófilos, monocitos y macrófagos (Batot, Martel, Capdeville, Wientjes, & Morel, 1995; Segal, Garcia, Goldstone, Cross, & Jones, 1981) que se activan cuando hay una infección. Este arsenal móvil busca y destruye a los microorganismos invasores al atraparlos en vacuolas fagocíticas y someterlos a diversos compuestos tóxicos y enzimas degradativas (Rossi & Zatti, 1964). La fagocitosis, así como una gran variedad de estímulos artificiales, inducen la “explosión respiratoria” (Baldrige & Gerard, 1933). Este proceso está mediado por la NOX2 que es la responsable de producir superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ). El superóxido es una de las armas del sistema fagocítico ya que actúa como precursor de la síntesis de muchos compuestos bactericidas, así como elevando el pH interno de la vacuola mediante la “absorción” de protones. Esto crea un ambiente favorable para la actividad de enzimas proteolíticas que son liberadas dentro de la vacuola a través de gránulos citoplásmicos (Fig. 2) (B. Halliwell & Gutteridge, 1984). La deficiencia de actividad de NOX2 provoca una condición genética hereditaria, llamada enfermedad granulomatosa crónica (CGD). En ésta el paciente desprovisto de la ayuda de los fagocitos, cae víctima de infecciones bacterianas y fúngicas frecuentes (Shatwell & Segal, 1996).

La síntesis de  $O_2^{\cdot-}$  requiere el transporte de electrones del NADPH en el citoplasma, a través de la pared luminal al  $O_2$ . Esto se lleva a cabo por el complejo NOX, que es una cadena de transporte de electrones que reside en estado inactivo en la membrana plasmática, y que tras la invaginación de la membrana para formar la vesícula fagocítica se activa y bombea electrones hacia el lumen (Shatwell & Segal, 1996).



**Fig 2. Generación de ERO en el fagosoma de neutrófilos al ingerir una bacteria.** La NADPH oxidasa (NOX2) se activa en la membrana del fagosoma, y los electrones se transportan del NADPH a través de la membrana hacia el  $O_2$ , para generar  $O_2^-$ , que es dismutado a  $H_2O_2$ . La desgranulación libera (junto con otras proteínas) mieloperoxidasa (MPO), que genera ácido hipocloroso (HOCl). La carga acidifica el citoplasma y alcaliniza al fagosoma (Figura modificada de Roos & Winterbourn, 2002).

Este sistema de transporte de electrones que genera superóxido ( $O_2^-$ ) está conformado por el flavocitocromo *b* membranal, tres elementos citoplasmáticos ( $p67^{phox}$ ,  $p47^{phox}$  y  $p40^{phox}$ ), y una proteína G de bajo peso molecular (*rac1* ó *rac2*) (Vignais, 2002).

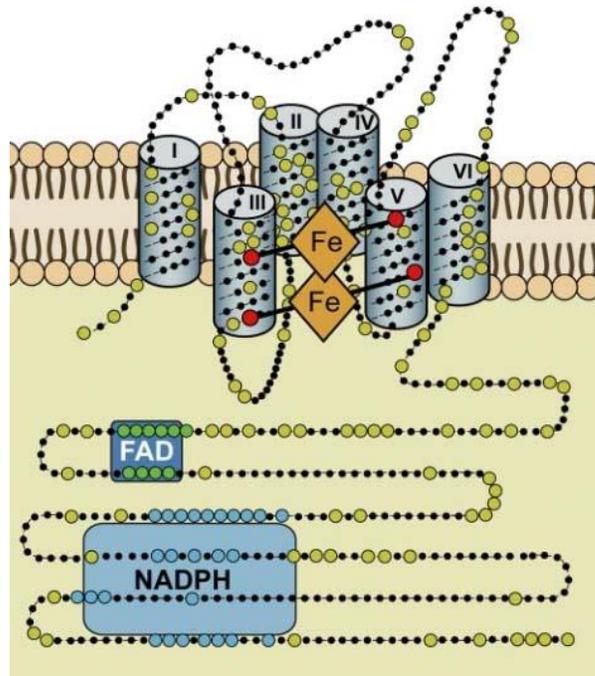
El elemento estructural principal es el flavocitocromo unido a membrana, conocido como *b<sub>558</sub>* ó *b-245*, el cual está incorporado en la membrana de la vacuola fagocítica. El flavocitocromo es un heterodímero  $\alpha_1\beta_1$  (Wallach & Segal, 1996). La subunidad  $\beta$  es la más grande y es conocida como  $gp91^{phox}$ , (*gp* por glicoproteína; 91 por su peso molecular estimado y *phox* por “phagocyte oxidase”). En la nueva terminología,

gp91<sup>phox</sup> es llamado NOX2. La subunidad  $\alpha$  es más pequeña y es conocida como p22<sup>phox</sup> (Wallach & Segal, 1997).

NOX2 es una proteína altamente glicosilada (Harper, Chaplin, & Segal, 1985), conformada por 570 aminoácidos con una masa molecular de 65 kDa (Royer-Pokora et al., 1986). Debido a que no ha sido cristalizada se han realizado análisis de hidropatía que indican un extremo amino (N-) y carboxilo (C-) terminal citosólicos así como seis hélices  $\alpha$  transmembranales. La glicosilación se da en residuos de Asparagina (N<sup>131</sup>, N<sup>148</sup> y N<sup>239</sup>) ubicados en las hélices  $\alpha$  II y III (Wallach & Segal, 1997). Esta cadena de carbohidratos está conformada de *N*-acetilglucosamina y galactosa principalmente, aunque también contiene fructosa, manosa y glucosa (Harper et al., 1985). En el extremo C- hay dominios de unión a NADPH y FAD (Segal et al., 1992). En las hélices transmembranales también existen cuatro residuos de histidina que están absolutamente conservados en todas las NOX conocidas (Kawahara & Lambeth, 2007), ubicados en las hélices  $\alpha$  III y V y que proveen los ligandos citosólico (H<sup>101</sup> y H<sup>209</sup>) y no citosólico (H<sup>115</sup> y H<sup>222</sup>) para dos grupos hemo no idénticos del tipo *b* (Andrew R. Cross, Rae, & Curnutte, 1995; Finegold, Shatwell, Segal, Klausner, & Dancis, 1996). Esta subunidad es el principal componente estructural del flavocitocromo *b*<sub>558</sub>, ya que contiene todos los elementos de la cadena de transporte de electrones desde el NADPH hacia el O<sub>2</sub> (Fig. 3) (Segal et al., 1992).

La subunidad pequeña del flavocitocromo *b*<sub>558</sub>, llamada p22<sup>phox</sup> o subunidad  $\alpha$ . Posee 195 aminoácidos y tiene dos hélices  $\alpha$  transmembranales conectadas por un pequeño bucle extracelular. Sus extremos N- y C- terminal son citosólicos (Zhu et al., 2006) y posee una región rica en prolina (PRR), involucrada en la unión con p47<sup>phox</sup> (DeLeo et al., 1995).

NOX2 se asocia constitutivamente con p22<sup>phox</sup> (NOX2/p22<sup>phox</sup>), ya que en ausencia de ésta, NOX2 es inestable. La activación de NOX2 requiere el transporte de la subunidad



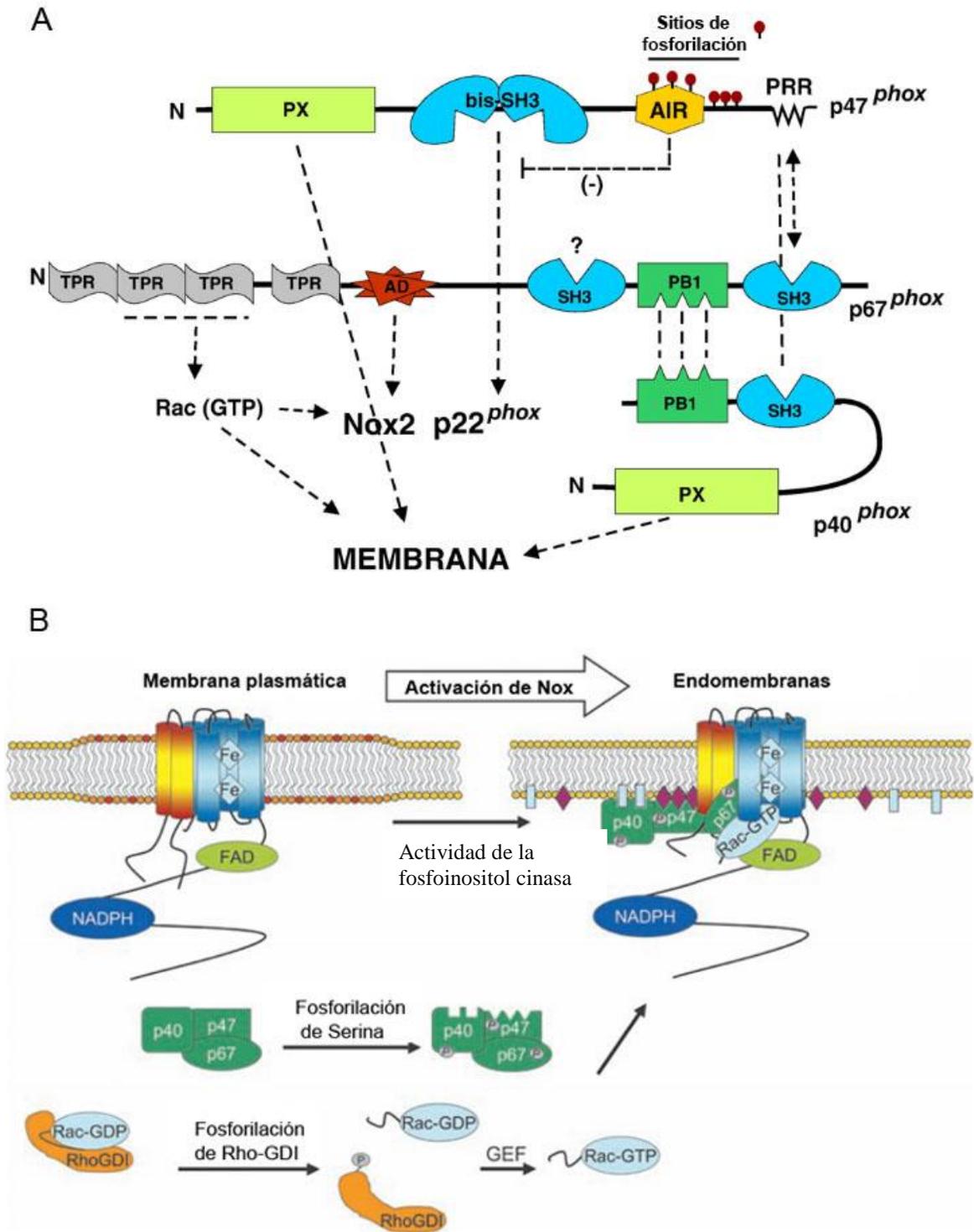
**Fig 3. Estructura de gp91<sup>phox</sup>/Nox2.** En el extremo amino-terminal la subunidad gp91<sup>phox</sup> tiene seis dominios transmembranales (representados por cilindros). Los dominios transmembranales III y V contienen un par de histidinas cada uno, que coordinan a dos grupos hemo del tipo *b* no simétricos. En el extremo carboxilo-terminal existen dominios de unión a FAD y NADPH. Se ha propuesto que las NOX son transportadoras de electrones individuales, pasándolos del NADPH al FAD, al primer hemo, al segundo hemo y finalmente al O<sub>2</sub>. Los círculos agrandados representan aminoácidos conservados en las NOX1, NOX2, NOX3 y NOX4 humanas (Figura modificada de Bedard & Krause, 2007).

citoplasmática oxidasa (p40<sup>phox</sup>, p47<sup>phox</sup> y p67<sup>phox</sup>) hacia el complejo NOX2/p22<sup>phox</sup> (Fig. 4) (Dinauer, Pierce, Bruns, Curnutte, & Orkin, 1990). Cuando las células se activan, la proteína citoplasmática p47<sup>phox</sup> se fosforila. p47<sup>phox</sup> actúa como adaptador-regulador entre los componentes citoplasmáticos y los de membrana, por esto ha sido llamada la “subunidad organizadora” (Vignais, 2002). p47<sup>phox</sup> posee dominios de homología Src 3 (SH3) en tándem (*bis*-SH3), que en el estado inactivo se unen a una región autoinhibitoria (AIR), previniendo que el dominio *bis*-SH3 se una a la región PRR de p22<sup>phox</sup> (Ago et al., 1999; Rotrosen & Leto, 1990). Cuando el sistema se activa por ejemplo, en respuesta a ésteres de forbol, los residuos de serina del dominio AIR son fosforilados por PKC, liberando el dominio *bis*-SH3, lo cual que permite la unión de p47<sup>phox</sup> a p22<sup>phox</sup> (Groemping, Lapouge, Smerdon, & Rittinger, 2003). p47<sup>phox</sup> también

posee un dominio PX, que le permite unirse a las cabezas de fosfatidinositol presentes en la membrana (Ago et al., 2001). Cuando p47<sup>phox</sup> se localiza en la membrana y se une a p22<sup>phox</sup>, recluta a la subunidad pequeña p40<sup>phox</sup>. p40<sup>phox</sup> se une mediante su dominio Phox/Bem 1 (PB1) al dominio PB1 de p67<sup>phox</sup> y facilita el ensamblaje del complejo p67<sup>phox</sup>-p47<sup>phox</sup> (Wilson, Gill, Perisic, Quinn, & Williams, 2003). p67<sup>phox</sup> y p47<sup>phox</sup> se unen por sus extremos carboxilo terminal en el dominio PRR que se encuentra en p47<sup>phox</sup> y el dominio SH3 que se encuentra en el carboxilo terminal de p67<sup>phox</sup> (Kami, Takeya, Sumimoto, & Kohda, 2002). Una vez en la membrana, p67<sup>phox</sup> la “subunidad activadora” y NOX2 interactúan (Han, Freeman, Lee, Motalebi, & Lambeth, 1998).

El último componente del sistema es una GTPasa de bajo peso molecular que puede ser Rac1 ó Rac2. En el citoplasma Rac se encuentra unida a GDP (Rac-GDP) y al complejo inhibidor de la disociación de GDP para Rho (RhoGDI) (Schalk et al., 1996). Cuando los neutrófilos se activan, Rac-GDP se separa del complejo RhoGDI, debido a una fosforilación de GDI, lo que permite que se exponga a factores intercambiadores de nucleótidos de guanina (GEFs), que catalizan la formación de Rac-GTP (Knaus, Heyworth, Evans, Curnutte, & Bokoch, 1991). Rac-GTP interactúa con NOX2 mediante un mecanismo de dos pasos que involucra una interacción directa con NOX2 (Diebold & Bokoch, 2001), seguida de una interacción con p67<sup>phox</sup>. Rac-GTP se transloca en la membrana donde interactúa con los motivos repetidos conocidos como regiones tetratricopéptidas (TPR) que se encuentran en la región amino terminal de p67<sup>phox</sup> (Koga et al., 1999). p67<sup>phox</sup> posee un dominio de activación (AD), que es regulado conformacionalmente por la unión de Rac (Sarfstein et al., 2004), activando la transferencia de electrones del NADPH al FAD. La transferencia subsecuente de electrones a través de los 2 grupos hemo permite la reducción del O<sub>2</sub> para formar O<sub>2</sub><sup>-</sup> (Fig. 4)(Nisimoto, Motalebi, Han, & Lambeth, 1999)

En el primer paso, los electrones son transferidos del NADPH al FAD, proceso regulado por la activación de p67<sup>phox</sup>. En el segundo paso, un electrón es transferido del flavín reducido FADH<sub>2</sub> al hierro del hemo citosólico. El hierro del hemo sólo



**Fig 4. Modelo de la activación de NOX en células fagocíticas. A)** Subunidades reguladoras de NOX2. Se muestran los dominios que son requeridos para la activación de NOX2 y con flechas se indican los dominios o componentes que interactúan entre sí. Abreviaturas: AD, dominio de activación; TPR, regiones tetratricopéptidas; SH3 dominio de homología Scr; *bis*-SH3 se refiere a los dominios SH3 en tándem que actúan como un solo dominio; PX, dominio *phox*; PB1, dominio descrito originalmente en p47<sup>phox</sup> y Bem1p; AIR región autoinhibitoria. **B)** Ensamblaje del complejo NOX. La NADPH Oxidasa de

fagocitos fue la primera NOX identificada y ha sido la más estudiada. Se expresa altamente en granulocitos y monocitos/macrófagos y contribuye a la eliminación de patógenos. En estado basal, NOX2 (proteína azul con los seis dominios transmembranales) y p22<sup>phox</sup> (proteína amarilla/roja con dos dominios transmembranales) se encuentran en la membrana, coestabilizándose mutuamente. Las subunidades p40<sup>phox</sup>, p47<sup>phox</sup> y p67<sup>phox</sup> se encuentran formando un complejo citosólico. Rac se encuentra en su estado inactivo (Rac-GDP asociado a RhoGDI). Cuando RhoGDI se fosforila, se disocia de Rac y se cataliza la formación del complejo Rac-GTP. Rac1 ó Rac2 se mueven a la membrana, donde interactúa con Nox2. Cuando p40<sup>phox</sup>, p47<sup>phox</sup> y/o p67<sup>phox</sup> se fosforilan, estas subunidades son reclutadas al complejo Nox. Cuando el complejo está completo, inicia la producción de O<sub>2</sub><sup>-</sup> una vez que el NADPH se une al dominio citoplásmico de NOX2. Los electrones se transfieren al FAD, que también se une en el dominio citoplasmático. El FAD transfiere secuencialmente los electrones al complejo NOX, donde pasan a través de los dos grupos hemo transmembranales, siendo finalmente transferidos al O<sub>2</sub> luminal (Modificado de Lambeth, J. D. et al. 2007; Oakley, et al., 2009)

puede aceptar un electrón, por lo que el hemo citosólico debe donar su electrón al hemo no citosólico antes de que el segundo electrón pueda ser aceptado por el flavín parcialmente reducido (FADH). El O<sub>2</sub> se une al hemo no citosólico produciendo O<sub>2</sub><sup>-</sup> (Doussiere, Gaillard, & Vignais, 1996).

Una vez que el O<sub>2</sub><sup>-</sup> ha sido generado, la enzima SOD lo convierte en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Se ha sugerido que el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> proveniente de O<sub>2</sub><sup>-</sup> es un producto de la actividad de NOX (Geiszt & Leto, 2004). El H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> también puede ser empleado por la mieloperoxidasa (MPO), que produce potentes bactericidas, con la consiguiente inactivación de diversos patógenos (Klebanoff, 2005). El O<sub>2</sub><sup>-</sup> y el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> también pueden ser transformados mediante vías no enzimáticas, produciendo radicales libres altamente reactivos. El hierro puede interactuar con el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y producir radical hidroxilo mediante la reacción de Fenton (El-Benna, Dang, Gougerot-Pocidaló, & Elbim, 2005). El H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> puede reaccionar con el O<sub>2</sub><sup>-</sup> produciendo radical hidroxilo y oxígeno en singulete (MacManus-Spencer & McNeill, 2005), o con ácido hipocloroso produciendo oxígeno en singulete y cloraminas (El-Benna et al., 2005).

Sin embargo las NOX no sólo realizan funciones inmunológicas, también han sido relacionadas con la transducción de señales, el transporte de iones, la proliferación y la diferenciación celular, en animales, plantas y hongos (Aguirre & Lambeth, 2010; Finkel, 2003; Foreman et al., 2003; Kwak et al., 2003; Lambeth, 2004).

## 2.1- NOX en células no fagocíticas

Además de las células inmunes, gran variedad de células producen pequeñas cantidades de ERO, como los fibroblastos, los adipocitos, diversos epitelios, los osteoclastos y el músculo liso (A. R. Cross & Jones, 1991). Inicialmente se asumía que estas ERO provenían de la respiración. Sin embargo, al agregar inhibidores de la explosión respiratoria desaparecía esta producción de ERO (Jones et al., 1996), por lo que se inició la búsqueda de homólogos de NOX2 en células no fagocíticas (Emmendorffer et al., 1993).

El primer homólogo de NOX2 detectado fue NOX1. NOX1 está conformada por 564 aminoácidos y comparte una identidad de 56% con NOX2. NOX1 se expresa abundantemente en células no fagocíticas como las del músculo liso, epitelio del colon, endotelio, útero, próstata (Suh et al., 1999), placenta (Cui, Brockman, Campos, & Myatt, 2006), osteoclasto (N. K. Lee et al., 2005) y en las de la médula espinal (M. T. Fischer et al., 2012). Nox1 genera bajas cantidades de  $O_2^{\cdot-}$  (Suh et al., 1999) y  $H_2O_2$  (Emmendorffer et al., 1993). Al igual que Nox2, requiere de otras proteínas para activarse: NOXO1 (proteína organizadora de Nox 1) que es homóloga de p47<sup>phox</sup>, NOXA1 (proteína activadora de Nox 1) homóloga de p67<sup>phox</sup> (Takeya et al., 2003) y la GTPasa Rac1 (Fig. 5) (Ueyama, Geiszt, & Leto, 2006). A diferencia de p47<sup>phox</sup>, NOXO1 carece del dominio AIR, por lo que NOXO1 se colocaliza con el complejo Nox1/p22<sup>phox</sup> cerca de la membrana (Cheng & Lambeth, 2004). NOXO1 posee los dominios *bis*-SH3 y PRR. El dominio *bis*-SH3 de NOXO1 se une al extremo PRR (Yamamoto, Kami, Takeya, & Sumimoto, 2007). Cuando esta interacción es interrumpida, el dominio PRR de NOXO1 se une al de p22<sup>phox</sup>. NOXA1 no posee los aminoácidos necesarios en su dominio PB1 para poder unirse a p40<sup>phox</sup>, por lo tanto no pueden interactuar. Esto hace que la actividad de Nox1 sea independiente de p40<sup>phox</sup> (Takeya et al., 2003).

NOX3 se detectó en 2000 por Kikuchi et al. Consiste de 568 aminoácidos y muestra una identidad del 58% con NOX2 (Kikuchi, Hikage, Miyashita, & Fukumoto, 2000).

NOX3 se encuentra en varios tejidos fetales, como el riñón, hígado, pulmón y el bazo (Banfi et al., 2004). La actividad de Nox3 también está regulada por p22<sup>phox</sup>, NOXO1 y Rac1 (Ueyama et al., 2006) y en animales no se requiere de NOXA1 (Fig. 5) (Cheng, Ritsick, & Lambeth, 2004). NOX3 juega un papel crucial en el desarrollo del oído interno de los ratones, ya que se requiere para la formación de las otoconias, que son pequeñas estructuras mineralizadas necesarias para la percepción del balance y la gravedad (Paffenholz et al., 2004)

NOX4 tiene 578 aminoácidos y comparte un 39% de identidad con NOX2. NOX4 fue identificada inicialmente en riñón, tanto en el adulto como fetal, por lo que recibió el nombre de “renox” (Geiszt, Kopp, Varnai, & Leto, 2000). Sin embargo también ha sido detectada en células endoteliales vasculares (Ago et al., 2004), células de músculo liso (Ellmark, Dusting, Fui, Guzzo-Pernell, & Drummond, 2005), osteoclastos (S. Yang, Zhang, Ries, & Key, 2004), células troncales hematopoyéticas (Piccoli et al., 2005), fibroblastos (Dhaunsi, Paintlia, Kaur, & Turner, 2004), queratinocitos (Chamulitrat et al., 2004), melanocitos (Brar et al., 2002), neuronas (Vallet et al., 2005), placenta, ovario, corazón y páncreas (Kawahara, Quinn, & Lambeth, 2007). A diferencia de las demás NOX, NOX4 está constitutivamente activa y sólo depende de p22<sup>phox</sup>, aunque se ha propuesto que Rac1 podría requerirse durante su activación (Fig. 5) (Clempus et al., 2007). Además NOX4 podía producir H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en lugar de O<sub>2</sub><sup>-</sup>, debido a que se ha detectado H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> experimentalmente, sin embargo la detección de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> podría deberse a la dismutación rápida del O<sub>2</sub><sup>-</sup> por los organelos adyacentes (Chen, Kirber, Xiao, Yang, & Keaney, 2008; Martyn, Frederick, von Loehneysen, Dinauer, & Knaus, 2006).

NOX5 fue detectada en 2001 por dos grupos distintos a partir de cADN (ADN complementario) (Banfi et al., 2001; Cheng et al., 2001). NOX5 es la NOX menos parecida a NOX2, con sólo 27% de identidad. Está conformada por 737 aminoácidos y se encuentra en estómago (Salles et al., 2005), tejidos linfoides humanos, testículos, bazo (Banfi et al., 2001), músculo liso, médula ósea, placenta, ovario, útero y varios tejidos fetales (Cheng et al., 2001). Se ha probado que NOX5 participa en la

proliferación celular endotelial, la migración y la angiogénesis, así como durante el daño oxidativo en arterosclerosis (Schulz & Munzel, 2008). A diferencia de las demás NOX, la actividad de NOX5 está regulada por la cantidad de calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) intracelular y no requiere las subunidades citosólicas ni a p22<sup>phox</sup>, ya que cuenta en su sitio N-terminal con un dominio tipo calmodulina que está conformado por cuatro motivos EF-hand que se unen a  $\text{Ca}^{2+}$  (Fig. 5) (Banfi et al., 2001). Altos niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  pueden producir un exceso de ERO (BelAiba et al., 2007). A diferencia de *nox1-4* y *duox1/2*, el gen de *nox5* no se encuentra en roedores (Si et al., 2007).

Las DUOX se llamaron inicialmente “oxidases tiroideas” debido a que se identificaron en la tiroides (De Deken et al., 2000; Dupuy et al., 1999). DUOX1 y -2, también conocidos como NOX6 y NOX7, están relacionados con la producción de la hormona tiroidea, que requiere  $\text{H}_2\text{O}_2$  para su síntesis. Las mutaciones en DUOX están relacionadas con el hipotiroidismo congénito (Maruo et al., 2008). Sin embargo DUOX1 también se ha detectado en pulmón (Forteza, Salathe, Miot, Forteza, & Conner, 2005) y en próstata (D. T. Wang et al., 2005) mientras que DUOX2 se ha encontrado en glándulas salivales (Geiszt, Witta, Baffi, Lekstrom, & Leto, 2003), el tracto gastrointestinal, incluyendo duodeno, colon y ciego (El Hassani et al., 2005) y en pulmón (Forteza et al., 2005). Al igual que la NOX5, las DUOX están reguladas directamente por  $\text{Ca}^{2+}$ . Las DUOX (DUOX1 y DUOX2) tienen siete dominios transmembranales. La característica de esta subfamilia es que hacia el extremo N-terminal poseen un dominio de peroxidasa y dos motivos EF-hands. El extremo C-terminal es citosólico, mientras que el extremo N-terminal es extracelular (Fig. 5). Las DUOX comparten ~50% de identidad con NOX2 (De Deken et al., 2000). El dominio de peroxidasa de las DUOX carece de aminoácidos esenciales para la función de peroxidasa por lo que su función como peroxidasa es cuestionada (Daiyasu & Toh, 2000). Al igual que las demás NOX, las DUOX producen  $\text{O}_2^-$ . Sin embargo rápidamente es dismutado en  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Ameziane-El-Hassani et al., 2005; Nakamura, Ohtaki, Makino, Tanaka, & Ishimura, 1989)

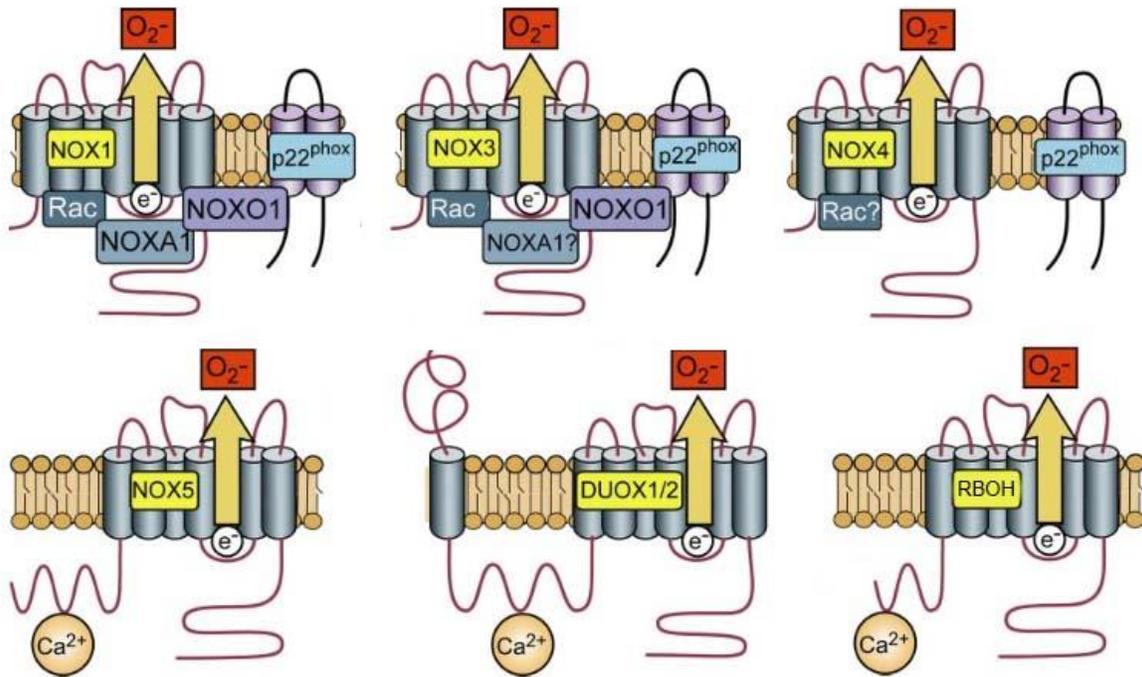
Actualmente la familia NOX/DUOX consiste de siete miembros: NOX1-NOX5 y DUOX1 y DUOX2 (Suh et al., 1999). Todos los miembros de la familia Nox/Duox contienen el dominio de las seis hélices  $\alpha$  transmembranales con unión a dos grupos hemo tipo *b*, y un dominio de unión a FAD y NADPH que constituyen el “Dominio Nox”. Nox5 y Duox1/2 son reguladas por calcio mediante sus motivos EF-hand. Las demás NOX, Nox1-4, requieren p22<sup>phox</sup> para su actividad y Nox1-3 requieren además, de subunidades *Phox* adicionales (Fig.5) (Kawahara et al., 2007).

Evolutivamente las NOX se pueden clasificar en 3 subgrupos: el grupo de NOX2, el grupo de las DUOX y el grupo de NOX5. En el grupo de NOX2 se encuentran las Nox más parecidas a NOX2, que son Nox1, Nox2, Nox3 y Nox4. El segundo grupo está compuesto de las DUOX, estas enzimas tienen 3 veces el tamaño de la NOX2 (180kDa) y tienen dos dominios extras, un dominio con homología al de peroxidasa en el N-terminal y dos motivos EF-hand centrales, involucrados en la unión a calcio. La NOX5 forma el último subgrupo, siendo la NOX de mamífero menos parecida a NOX2 (Lambeth, 2002).

## 2.2-NOX en las plantas

A mediados de los 90 se identificaron homólogos de NOX2 en plantas terrestres, y fueron llamados homólogos de la oxidasa de la explosión respiratoria (RBOH) (Overmyer, Brosche, & Kangasjarvi, 2003). El primer homólogo se identificó en arroz (Groom et al., 1996) desde entonces se han identificado en diversas plantas, como en tabaco (Yoshioka et al., 2003), el jitomate (Bagnaresi, Basso, & Pupillo, 1997; Sagi et al., 2004) y la papa (Yoshioka et al., 2001). Cualquier especie de planta tiene varios genes *rboh*; por ejemplo en *Arabidopsis thaliana* se han reportado 10 (Keller et al., 1998), lo que sugiere múltiples funciones y ubicaciones de éstos en la planta (Aguirre & Lambeth, 2010).

Las RBOHs comparten las regiones de unión a FAD y NADPH y los seis dominios transmembranales característicos de las NOX (Segal et al., 1992). Además, todas las NOX de plantas tienen dos EF-hands hacia la región N-, por lo que son homólogas de NOX5 (Fig.5). Al igual que NOX5, las RBOHs no requieren de otras subunidades



**Fig 5. Activación y modelo estructural de las isoformas de las NOX.** Los cilindros representan las seis hélices  $\alpha$  transmembranales que comparten todas las NOX. Las DUOX1/2 poseen una hélice  $\alpha$  transmembranal extra, seguida por un dominio N-terminal externo, homólogo al de peroxidasa. El  $Ca^{2+}$  (representado por círculos), se une a los dominios EF-hand presentes en Nox5, DUOX 1/2 y RboH. Aun cuando su estructura y función enzimática es similar, las enzimas de la familia NOX difiere en sus mecanismos de activación. La actividad de NOX1 requiere p22<sup>phox</sup>, NOXO1, NOXA1y Rac. NOX3 requiere p22<sup>phox</sup>, NOXO1 y Rac y el requerimiento de NOXA1 depende de cada especie. Nox4 sólo requiere de p22<sup>phox</sup>. NOX5, DUOX 1/2 y RBOH son activadas por  $Ca^{2+}$  y al parecer no requieren subunidades para su actividad (Figura modificada de Bedard & Krause, 2007)

reguladoras para su actividad, ya que están reguladas principalmente por  $Ca^{2+}$ , pero también se ha visto que pueden ser reguladas por fosforilaciones, (AtrbohD en *A. thaliana*) (Ogasawara et al., 2008) o por la acción directa o indirecta de Rac (OsRac1 en arroz) (Ono et al., 2001).

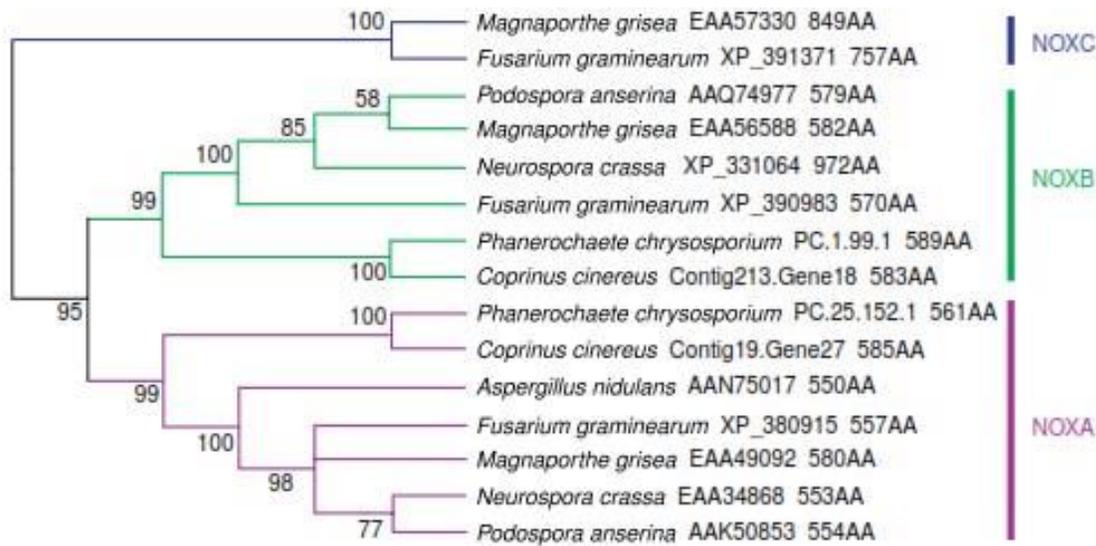
Se han atribuido diversas funciones a los homólogos de NOX en plantas, incluyendo la defensa ante organismos patógenos (Torres et al., 2002), la producción de ERO en respuesta a heridas (Sagi et al., 2004), la cerradura de las células estomatales (Kwak et al., 2003) y el desarrollo de las raíces (Foreman et al., 2003).

### 2.3- Las NOX en los hongos

En los hongos existen tres subfamilias distintas de NOX,: NoxA (Nox1), NoxB (Nox2), que son homólogas de NOX2 de humanos y NoxC, la cual contiene dominios de unión a calcio (EF-hands) y es más parecida a la Nox5 de mamíferos y a las Rbohs de plantas (Fig. 6) (Aguirre, Rios-Momberg, Hewitt, & Hansberg, 2005). Inicialmente se propuso que las NOX estaban relacionadas con la multicelularidad (Lalucque & Silar, 2003). Sin embargo recientemente ha sido identificada la primera enzima parecida a Nox en levadura, llamada Yno1, lo cual pone en duda este concepto (Rinnerthaler et al., 2012).

En los hongos las NOX están involucradas en una gran variedad de funciones. El primer homólogo de NOX detectado en los hongos fue NoxA de *Aspergillus nidulans*, que es homóloga a la NOX2 de mamíferos. Las mutantes en noxA están bloqueadas en el desarrollo sexual (no producen cleistotecios) (Lara-Ortiz et al., 2003), y muestran una menor producción de conidias (desarrollo asexual) que una cepa silvestre (resultados no publicados). Posteriormente se detectaron homólogos de NoxA en *Podospora anserina* (Malagnac, Lalucque, Lepere, & Silar, 2004) y *Neurospora crassa* (Cano-Dominguez et al., 2008). En el caso de *N. crassa* las cepas carentes de la enzima *Nox-1* no pueden desarrollar peritecios (ciclo sexual bloqueado). También muestran un menor crecimiento radial, una menor producción de micelio aéreo y conidias (Cano-Dominguez et al., 2008) y son incapaces de llevar a cabo la fusión celular mediada por tubos de anastomosis (CATs) (Read et al., 2012; Roca, Weichert, Siegmund, Tudzynski, & Fleissner, 2012). Sin embargo, a diferencia de *A. nidulans*, estos hongos poseen una Nox adicional, NoxB que es indispensable para la germinación de las ascosporas (Cano-Dominguez et al., 2008; Malagnac et al., 2004). *P.*

*anserina* posee una tercera NOX, NoxC, sin embargo no se sabe cuál es su función (Brun, Malagnac, Bidard, Lalucque, & Silar, 2009). En *Botrytis cinerea*, *Sclerotinia sclerotiorum* y *Claviceps purpurea*, se ha visto que NoxA y NoxB, son necesarias para la formación del esclerocio, que es la base del desarrollo de los cuerpos fructíferos (D. Buttermann, datos no publicados; Kim, Chen, Kabbage, & Dickman, 2011; Segmuller et al., 2008).



**Fig 6. Filogenia de las NADPH oxidasas presentes en los hongos.** La presencia de homólogos de NoxA en los hongos definió 3 nuevas subfamilias de este tipo de enzimas, NOXA, NOXB y NOXC. (Figura modificada de Aguirre, J. et al., 2005).

En los hongos patógenos *B. cinerea*, *P. anserina* y *Magnaporthe oryzae* las NOX están involucradas en la diferenciación de estructuras específicas llamadas apresorios, que son esenciales para la penetración de la planta hospedera o de las paredes de celulosa (Braus, 2002; Dagdas et al., 2012). *B. cinerea* posee dos NOX; NoxA y NoxB. NoxA se requiere para la dispersión del hongo dentro de la planta, mientras que las cepas carentes de NoxB forman apresorios no funcionales (Siegmund, Heller, van Kann, & Tudzynski, 2013). En *M. oryzae* se han descrito tres NOX, Nox1, Nox2 y Nox3. Las mutantes que carecen de Nox1 o Nox2 forman apresorios defectuosos, incapaces de penetrar a las plantas (Egan, Wang, Jones, Smirnoff, & Talbot, 2007). Se ha propuesto

que el principal papel de las NOX en la virulencia es la generación espaciotemporal de picos de ERO, necesarios para la diferenciación de los apresorios y la penetración de las hifas (Tudzynski, Heller, & Siegmund, 2012). Aunque el mecanismo exacto de cómo las ERO producidas por las NOX están orquestando dicha diferenciación es desconocido, Dagdas et al., (2012) han propuesto que las NOX regulan la diferenciación celular al estar interactuando directamente con el citoesqueleto de la misma manera que ocurre en los mamíferos (Brown & Griendling, 2009).

En los hongos que no forman apresorio, como en el fitoparásito *C. purpurea*, las NOX no son necesarias para la penetración del tejido del hospedero. Nox1 se requiere para la colonización del tejido del hospedero y Nox2 para controlar la infección (D. Buttermann, datos no publicados). Por otro lado el hongo endofítico *Epichloë festucae* posee dos NOX; NoxA y NoxB. NoxA es necesaria para el crecimiento endofítico asintomático, mientras que NoxB no tiene una función evidente (Tanaka, Christensen, Takemoto, Park, & Scott, 2006).

En el hongo *Trichoderma harzianum*, que es utilizado como agente de biocontrol, se ha descrito una NOX (Nox1), la cual está relacionada con una sobreproducción de ERO que sobre regula los genes con actividad de quitinasa, proteasa y celulasa (Montero-Barrientos, Hermosa, Cardoza, Gutierrez, & Monte, 2011). En el patógeno oportunista, *Alternaria alternata*, se han descrito dos NOX, NoxA y NoxB. Las cepas carentes de ambas proteínas presentan una menor acumulación celular de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. También se ha visto que las mutantes sencillas en algunos de estos genes, son más sensibles al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (S. L. Yang & Chung, 2013) y producen más esporas por área que una cepa silvestre. Únicamente NoxB está relacionada con la patogenicidad, ya que la carencia de esta enzima provoca que el hongo no pueda penetrar la pared de las plantas (Morita et al., 2013).

### 3.-La importancia del hierro y el cobre en los sistemas biológicos

Los seres vivos requieren ciertos elementos esenciales en cantidades ínfimas, conocidos como “elementos traza”. Dentro de los elementos traza, el Selenio (Se) y los metales Manganeseo (Mn), Hierro (Fe), Cobre (Cu) y Zinc (Zn), tienen una relevancia biológica especial porque participan en las reacciones redox en los biosistemas (Fraga, 2005).

El hierro es un elemento traza indispensable para todos los eucariontes y la mayoría de los procariontes. Es el segundo metal más abundante, después del aluminio, y el cuarto más abundante en la corteza terrestre (Crichton & Pierre, 2001). No obstante, la biodisponibilidad del hierro puede ser extremadamente baja, debido a que como elemento de transición, el hierro puede adoptar dos formas iónicas, la forma reducida (ferrosa,  $\text{Fe}^{2+}$ ) y la forma oxidada (férrica,  $\text{Fe}^{3+}$ ) (Crichton & Pierre, 2001; Sigel & Sigel, 1998). Los organismos sólo pueden aprovechar el  $\text{Fe}^{2+}$  y la baja biodisponibilidad de hierro se debe a que es rápidamente oxidado en el ambiente aerobio a su forma férrica, que es poco soluble en agua y forma precipitados (oxihidróxidos) (Sigel & Sigel, 1998). La capacidad para aceptar o donar electrones convierte al hierro en el principal mediador redox (óxido-reducción) en biología. Por ejemplo, incorporado en centros hierro-azufre (grupos hemo), el hierro se requiere para procesos celulares fundamentales, como el ciclo de los ácidos tricarbónicos, la detoxificación las ERO, y la biosíntesis de aminoácidos, desoxirribonucleótidos y esteroides (Blatzer, Binder, & Haas, 2011).

De manera similar al hierro, el cobre posee dos estados de oxidación biológicamente importantes; el oxidado ( $\text{Cu}^{2+}$ ) y el reducido ( $\text{Cu}^{1+}$ ) (Crichton & Pierre, 2001), siendo el estado oxidado muy insoluble y por lo tanto no biodisponible (Lesuisse, Casteras-Simon, & Labbe, 1996). El cobre sirve como cofactor para muchas enzimas debido a su adecuado potencial redox (óxido-reducción). Las proteínas de cobre están ampliamente distribuidas en los organismos vivos, con dos funciones principales, la

transferencia de electrones y la activación y transporte de dioxígeno (Kaim & Rall, 1996).

El hierro y el cobre son nutrientes esenciales para casi todos los organismos. Sin embargo, en altas cantidades, estos nutrientes son tóxicos debido a la reacción de Fenton, que se produce cuando el  $H_2O_2$  acepta un electrón desapareado, por ejemplo, de un metal de transición como el  $Fe^{2+}$  o el  $Cu^+$ , entonces se fragmenta y forma el radical hidroxilo ( $HO\cdot$ ) y el ión hidroxilo ( $HO^-$ ) (Crichton & Pierre, 2001; B. Halliwell & Gutteridge, 1984).

### 3.1-Mecanismos de captura de hierro

Los organismos han desarrollado diversas soluciones al problema de la captura y reducción del hierro. En los hongos se han caracterizado cuatro mecanismos distintos para la captura de hierro a nivel molecular: el mediado por sideróforos (Neilands, 1981, 1983), la asimilación de hierro por reducción (RIA) (Marschner & Römheld, 1995), la captura de grupos hemo (Foster, 2002; Santos et al., 2003) y la captura directa de  $Fe^{2+}$  (R. Hassett, Dix, Eide, & Kosman, 2000).

El mecanismo mediado por sideróforos inicia cuando la célula detecta poco hierro en el medio. Los sideróforos son quelantes de hierro de alta afinidad y cuando la célula detecta poco hierro en el medio excreta los sideróforos que se unen a  $Fe^{3+}$  (Neilands, 1981, 1983). Este complejo hierro-sideróforo es reconocido por receptores específicos de membrana que permiten su movimiento transmembranal, internalizándolo en la célula. La reducción del hierro ocurre intracelularmente (Neilands, 1984). Muchos microorganismos sintetizan uno o varios tipos de sideróforos, que tienen la capacidad de capturar el hierro selectivamente de entre una gran cantidad de sideróforos secretados por otras especies de bacterias y hongos (xenosideróforos). *S. cerevisiae* no puede producir sideróforos, sin embargo puede

utilizar los producidos por otros organismos (Dancis, Roman, Anderson, Hinnebusch, & Klausner, 1992).

Otro mecanismo que emplean los hongos para capturar hierro es la RIA (Marschner & Römheld, 1995), en el que el  $\text{Fe}^{3+}$  es reducido a  $\text{Fe}^{2+}$  mediante proteínas ancladas a la membrana conocidas como reductasas férricas (FRE). Una vez que el hierro ha sido reducido, es reoxidado e importado intracelularmente por permeasas con alta afinidad por el hierro, como el sistema Fet3/Ftr1 o es transportado directamente por el transportador de baja afinidad Fet4 (R. Hassett & Kosman, 1995; R. F. Hassett, Yuan, & Kosman, 1998).

La captura de grupos hemo se da en organismos patógenos, como *Candida albicans* (Foster, 2002) e *Histoplasma capsulatum* (Santos et al., 2003), mediante el uso directo de hemoproteínas del hospedero al unirse a receptores de la superficie celular, seguida por la extracción del hierro y su internalización al citoplasma (Haas, Eisendle, & Turgeon, 2008). La captura directa de  $\text{Fe}^{2+}$  únicamente ha sido estudiada en *S. cerevisiae*, este sistema tiene una afinidad baja y no es específico para  $\text{Fe}^{2+}$  ya que internaliza otros metales, como cobre y zinc (R. Hassett et al., 2000).

### 3.2- Las reductasas de hierro (FRE) en los hongos

En la levadura de *S. cerevisiae*, la captura de hierro se realiza principalmente mediante la RIA (Kosman, 2003), empleando proteínas membranales conocidas como reductasas férricas (FREs), también llamadas reductasas integrales de membrana (IMR) o metalorreductasas (MR) (Dancis, Klausner, Hinnebusch, & Barriocanal, 1990).

Las FRE son homólogas a las NADPH oxidasas de hongos, lo que indica un origen común (Dancis et al., 1992). *S. cerevisiae* posee ocho posibles FRE llamadas Fre1-8 (De Freitas et al., 2004; Georgatsou, Mavrogiannis, Fragiadakis, & Alexandraki, 1997; Martins et al., 1998). Fre1 es homólogo a gp91<sup>phox</sup> (Nox2). Es una proteína de 79 kDa,

tiene siete hélices transmembranales, posee los motivos de unión al FAD y NADPH (Shatwell, Dancis, Cross, Klausner, & Segal, 1996), así como los cuatro residuos de histidina que coordinan dos grupos hemos del tipo *b*, de manera similar a las NOX (Dancis et al., 1992). Sin embargo, mientras que el transporte de electrones de las NOX reduce al O<sub>2</sub> (Shatwell & Segal, 1996), las FREs reducen Fe<sup>3+</sup> o Cu<sup>2+</sup> (Dancis et al., 1992; Martins et al., 1998). Los genes *fre* de *S. cerevisiae* codifican para proteínas membranales con masas moleculares de entre 70 y 80 kDa. FRE2 comparte 25% de identidad de sus aminoácidos con FRE1 (Dancis et al., 1990; Dancis et al., 1992), mientras que las FRE3-6 muestran 76%, 57%, 38% y 36% de identidad con FRE2, respectivamente. FRE7 codifica para la proteína más pequeña (629 aa) y con la menor identidad (21%) respecto a FRE1 y FRE2 (Martins et al., 1998).

Las FRE1-4 están involucradas en la asimilación del hierro por reducción (RIA). FRE1 y FRE2 son responsables la mayor parte de la actividad de reductasa férrica de la superficie celular, y se requieren para el crecimiento en medio con bajas concentraciones de Fe<sup>3+</sup>. También pueden catalizar la liberación de hierro de una gran cantidad de sideróforos además son reductasas de cobre, convirtiendo al Cu<sup>2+</sup> en Cu<sup>1+</sup>. FRE3 y FRE4 pueden catalizar la asimilación de hierro a partir de sideróforos de hidroxamato y del ácido rodotorúlico respectivamente (Georgatsou et al., 1997). FRE6 se localiza en la membrana vacuolar, donde actúa transportando hierro y cobre reducidos de la vacuola al citosol (Singh, Kaur, & Kosman, 2007), mientras que FRE8 es importante en la homeostasis del hierro, ya que las mutantes en esta enzima no pueden crecer en limitación de hierro y tienen deficiencias en la respiración (De Freitas et al., 2004). Las funciones de FRE5 y FRE7 se desconocen (Blatzer et al., 2011). La expresión de los genes que codifican FRE1-6 y FRE8 se induce mediante la limitación de hierro. *fre1* también se induce mediante la limitación de cobre, mientras que *fre7* se induce exclusivamente por la privación de Cobre (Yun, Bauler, Moore, Klebba, & Philpott, 2001).

En el comensal humano *Candida albicans*, patógeno oportunista causante de la candidosis, han sido detectadas 12 secuencias con similitud a las FRE de *S. cerevisiae*

y sólo han sido caracterizadas 2; CFL1 y CFL95. CFL1 es regulado negativamente por hierro y cobre y puede reducir ambos metales. CFL1 también puede rescatar el fenotipo de una cepa *Δfre1* de *S. cerevisiae* (Hammacott, Williams, & Cashmore, 2000). *Cfl95* se expresa en condiciones bajas de hierro (Knight, Lesuisse, Stearman, Klausner, & Dancis, 2002). En *Cryptococcus neoformans*, otro patógeno oportunista causante de la meningitis, se han detectado 6 secuencias similares a reductasas férricas (Blatzer et al., 2011). Sin embargo, sólo se ha caracterizado FRE1, que reduce tanto hierro como cobre (Nyhus & Jacobson, 1999). En la levadura de fisión *Schizosaccharomyces pombe* existen dos FRE (Grissa, Bidard, Grognet, Grossetete, & Silar, 2010), pero sólo ha sido caracterizada Frp1, que está implicada en el transporte y reducción del hierro, y el importe de cobre (Roman, Dancis, Anderson, & Klausner, 1993).

A diferencia de las NOX en los hongos filamentosos las FREs han sido poco estudiadas. Por ejemplo, en el hongo filamentoso *Fusarium verticillioides* han sido detectadas 19 genes para FRE, sin embargo, ninguna ha sido caracterizado (Grissa et al., 2010). En *Aspergillus fumigatus* existen 15 FREs, de las que sólo 1 ha sido caracterizada recientemente, la denominada Freb que al igual que las FRE de *S. cerevisiae*, está involucrada en el mecanismo de la RIA. Freb se expresa en bajas condiciones de hierro y está relacionada con la homeostasis de este elemento (Blatzer et al., 2011).

El hongo causante del carbón del maíz, *Ustilago maydis* comúnmente conocido como huitlacoche, codifica para seis posibles FRE (Blatzer et al., 2011), aunque sólo se sabe que 1 de éstas, Fer9, es regulada por hierro (Eichhorn et al., 2006). En el patógeno oportunista *Rhizopus oryzae*, responsable de ~70% de los casos de mucormicosis, se han detectado 3 genes para reductasas férricas y ninguno ha sido caracterizado (Ibrahim, Spellberg, Walsh, & Kontoyiannis, 2012).

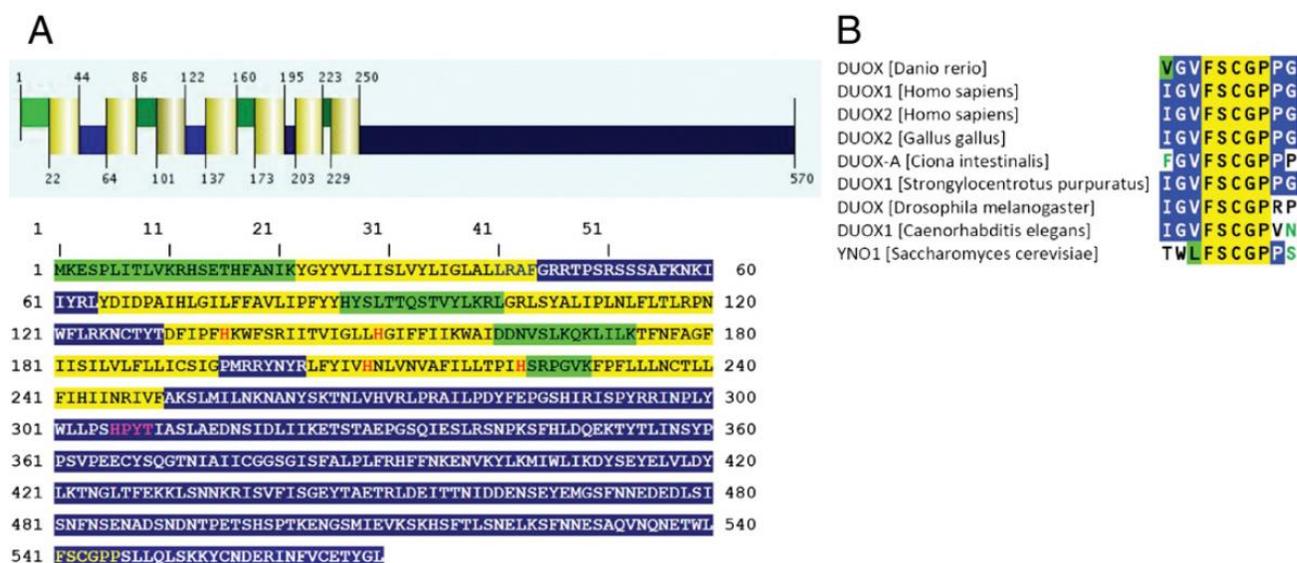
En el genoma de *Aspergillus nidulans* existen 9 secuencias que podrían codificar proteínas con función de FRE (Blatzer et al., 2011). Sin embargo sólo se ha descrito a FreA, como involucrada en la homeostasis de hierro (Oberegger et al., 2002).

### 3.4-La proteína Yno1 y su papel como NOX

Inicialmente YGL160w (Yno1) fue identificado como el ortólogo más distante de Fre1 y Fre2, con menos del 20% de identidad y posteriormente fue ubicada en la familia de FRE8 (Martins et al., 1998; Yun et al., 2001), debido a que parecía no tener función de FRE, ya que su expresión no estaba regulada por la limitación de hierro o de cobre en el medio (Georgatsou & Alexandraki, 1999; Martins et al., 1998). Sin embargo, en 2012, Rinnerthaler *et-al.*, encontraron evidencia de que YGL160w codifica para una enzima con actividad de NOX. Mediante análisis bioinformáticos (BLAST de posición específica iterada) en comparación con la NOX5 de humanos, encontraron que su secuencia comparte una similitud de 32.1% (16.6% de identidad) pero a diferencia de ésta, carece de las EF-hands (manos de calcio) características de la NOX5 de humano. No obstante, posee los sitios de unión a FAD y NADPH así como las cuatro histidinas que coordinan al grupo hemo. Además el sitio de unión a NADPH del dominio FNR tiene una gran identidad con las proteínas DUOX de diversos organismos. Yno1 se localiza en la membrana del retículo endoplásmico, debido a que utilizando una fusión de GFP en el extremo carboxilo de Yno1 se detectó una señal perinuclear, además esta señal colocalizó con la señal del marcador de retículo endoplásmico (RFP-HDEL). Yno1 carece de actividad de FRE, debido a que al sobreexpresarla no hay una acumulación significativa de hierro en las células y produce  $O_2^-$  ya que se clonaron los ocho genes FRE de levadura y el de YNO1 en un promotor inducible y se midieron los niveles de  $O_2^-$  mediante la oxidación de dihidroetidio (DHE), únicamente la cepa transformada con YNO1 mostró un incremento de la oxidación del DHE con respecto a la cepa silvestre. Para corroborar esto se realizó resonancia electrónica de spin (ESR) usando como trampa de spin 5-dietoxifosforil-5-metil-1-pirrolina-N-óxido (DEPMPO), que es específico para detectar  $O_2^-$ .

Las células que sobreexpresan YNO1 produjeron una fuerte señal característica del anión  $O_2^-$ . Además Yno1 regula la formación de los cables de actina (citoesqueleto) de la célula, ya que las cepas carentes del gen YNO1 son hipersensibles a la wiskostatina

(50  $\mu\text{M}$ ) (que previene la nucleación de los cables de actina) y la latrunculina B (20  $\mu\text{M}$ ) (inhibe la elongación de los cables de actina), lo que es reversible al agregar  $\text{H}_2\text{O}_2$ , que en la célula podría provenir de la dismutación del  $\text{O}_2^-$  generado por Yno1 (Rinnerthaler et al., 2012).



**Fig 7. Análisis bioinformático de la proteína YNO1 (YGL160W) como una posible NOX. A)** Predicción de la estructura secundaria de YNO1 obtenida con el algoritmo de predicción transmembranal de Philius (Reynolds et al., 2008). Las hélices transmembranales están marcadas en amarillo, las regiones luminales, que residen presuntamente en el lumen del retículo endoplásmico están marcadas en verde; y las regiones citoplásmicas están marcadas en azul. Los cuatro residuos de histidina conservados son responsables de coordinar a los dos grupos hemo están indicados con letras rojas. El sitio de unión a NADPH es indicado con letras amarillas y el sitio de unión a FAD con letras moradas **B)** Alineamiento del sitio de unión a NADPH del dominio FNR de YNO1 contra el de proteínas DUOX de otros organismos, la secuencia “FSCGP” es específica para las proteínas DUOX y para YNO1. (Figura modificada de Rinnerthaler, et al., 2012).

#### 4.- *Aspergillus nidulans* como modelo de estudio

*Aspergillus spp.* es un género de hongos filamentosos (ascomicetos) estrictamente aerobios, ubicuos en la naturaleza, con cerca de 200 millones de años de evolución. De entre las 185 especies de *Aspergillus*, la mayoría tienen un alto impacto en la sociedad y la salud humana, incluyendo 20 especies patógenas de humanos y especies

usadas en la industria alimenticia y de producción de enzimas (Timberlake & Marshall, 1989). Dentro del género *Aspergillus*, *A. nidulans* tiene un papel central como organismo modelo, ya que a diferencia de la mayoría de *Aspergillus*, *A. nidulans* posee un ciclo sexual bien caracterizado y por lo tanto, un sistema genético bien establecido (Galagan et al., 2005). *A. nidulans* (teleomorfo *Emericella nidulans*) es un hongo ascomiceto que pertenece a la clase *Eurotiomycetes* y al orden *Eurotiales* (Rittenour, Si, & Harris, 2009). La investigación en *A. nidulans* ha contribuido en el entendimiento de un amplio rango de procesos biológicos, incluyendo descubrimientos fundamentales en la acción y recombinación genética (Kafer, 1958, 1961), el descubrimiento del ciclo parasexual (Pontecorvo, Roper, Hemmons, Macdonald, & Bufton, 1953), el desarrollo de las esporas (Adams, Boylan, & Timberlake, 1988; Clutterbuck, 1969; Mirabito, Adams, & Timberlake, 1989; Timberlake, 1990), el ciclo celular (B. R. Oakley & Morris, 1981; Osmani, Engle, Doonan, & Morris, 1988; Osmani & Mirabito, 2004; Osmani, Pu, & Morris, 1988; Xiang, Zuo, Efimov, & Morris, 1999), la polaridad celular (Momany, 2002), la reparación del ADN (Goldman & Kafer, 2004), el metabolismo y su control (Brambl, 2004), el metabolismo secundario (Yu & Keller, 2005), la señalización (Hicks, Yu, Keller, & Adams, 1997) y el control del pH (Arst & Penalva, 2003; Penalva & Arst, 2004).

*A. nidulans* posee 8 cromosomas, así como un detallado mapa genético (Clutterbuck, 1969). Su genoma es relativamente pequeño (30 Mb) y se encuentra disponible a través del Broad Institute (<http://www.broad.mit.edu/annotation/fungi/aspergillus>) (Galagan et al., 2005).

Como modelo de estudio la levadura de la cerveza *S. cerevisiae* no es representativa de los hongos filamentosos, como los del género *Aspergillus*, ya que es un organismo unicelular. En cambio, *A. nidulans* es un organismo pluricelular, crece como hifas filamentosas vegetativas haploides a partir de esporas asexuales (conidias uninucleadas, ciclo asexual) o sexuales (ascosporas binucleadas, ciclo sexual). Además, las hifas vegetativas provenientes de dos individuos pueden fusionarse para formar un heterocarión, y los núcleos dentro de un homocarión o heterocarión

pueden fusionarse para formar un diploide (ciclo parasexual) (Todd, Davis, & Hynes, 2007).

El desarrollo asexual (conidiación) se caracteriza por la formación de una estructura especializada llamada conidióforo, en respuesta a diversos factores ambientales como la exposición al aire (Adams, Wieser, & Yu, 1998; Clutterbuck, 1969; Timberlake & Clutterbuck, 1994), la privación de nutrientes (Skromne, Sanchez, & Aguirre, 1995), o la presencia de señales químicas propias (B. N. Lee & Adams, 1996; Marquez-Fernandez et al., 2007; Seo, Guan, & Yu, 2003; Soid-Raggi, Sanchez, & Aguirre, 2006; Tsitsigiannis & Keller, 2007). El desarrollo del conidióforo inicia con la diferenciación de una célula, denominada célula pie, de la que emerge el conidióforo (Fig. 8) (Pontecorvo et al., 1953). Al final del tallo se forma una vesícula, en donde se llevan a cabo múltiples divisiones nucleares (Adams & Yu, 1998), en un proceso semejante al de la gemación, para formar las métulas (Clutterbuck, 1969; Mims, Richardson, & Timberlake, 1988; Oliver, 1972). En cada métula se producen otras gemaciones que originan de dos a tres células uninucleadas llamadas fiálides (R. Fischer & Timberlake, 1995; Pontecorvo et al., 1953). Las fiálides son las células productoras de esporas, éstas generan grandes cadenas de conidias, a través de gemaciones sucesivas (Clutterbuck, 1969; Mims et al., 1988).

En un medio sólido, aproximadamente 50 horas después de la germinación de las conidias inicia el desarrollo sexual (Braus, 2002), en respuesta a diversos estímulos ambientales como la privación de aire (Axelrod, Gealt, & Pastusho.M, 1973; Clutterbuck, 1969) y la abundancia de nutrientes en el medio (Zonneveld, 1975). El proceso implica la producción de presuntas células nodrizas, llamadas células Hülle (Ellis, Don, & Alexopoulos, 1973), y la formación de estructuras multicelulares, pigmentadas y redondas llamadas cleistotecios, los cuales contienen las esporas sexuales (ascosporas) dentro de bolsas llamadas ascas (Fig. 8). Los cleistotecios pueden contener de 1000 (Pöggelker, 2006) a más de 10000 ascosporas (Pontecorvo et al., 1953), dependiendo si son producto de la autofecundación o de la cruce de dos cepas distintas.

Los cleistotecios en desarrollo contienen hifas ascógenas, que darán lugar a las ascas. Las ascas se forman a partir de uncínulos (croziers), los cuales son formados por la división simultánea de los dos núcleos de la célula terminal de una hifa ascógena (Elliott, 1960). El crozier está compuesto de la célula de la punta (uninucleada), la célula penúltima (binucleada) y la célula basal (uninucleada).

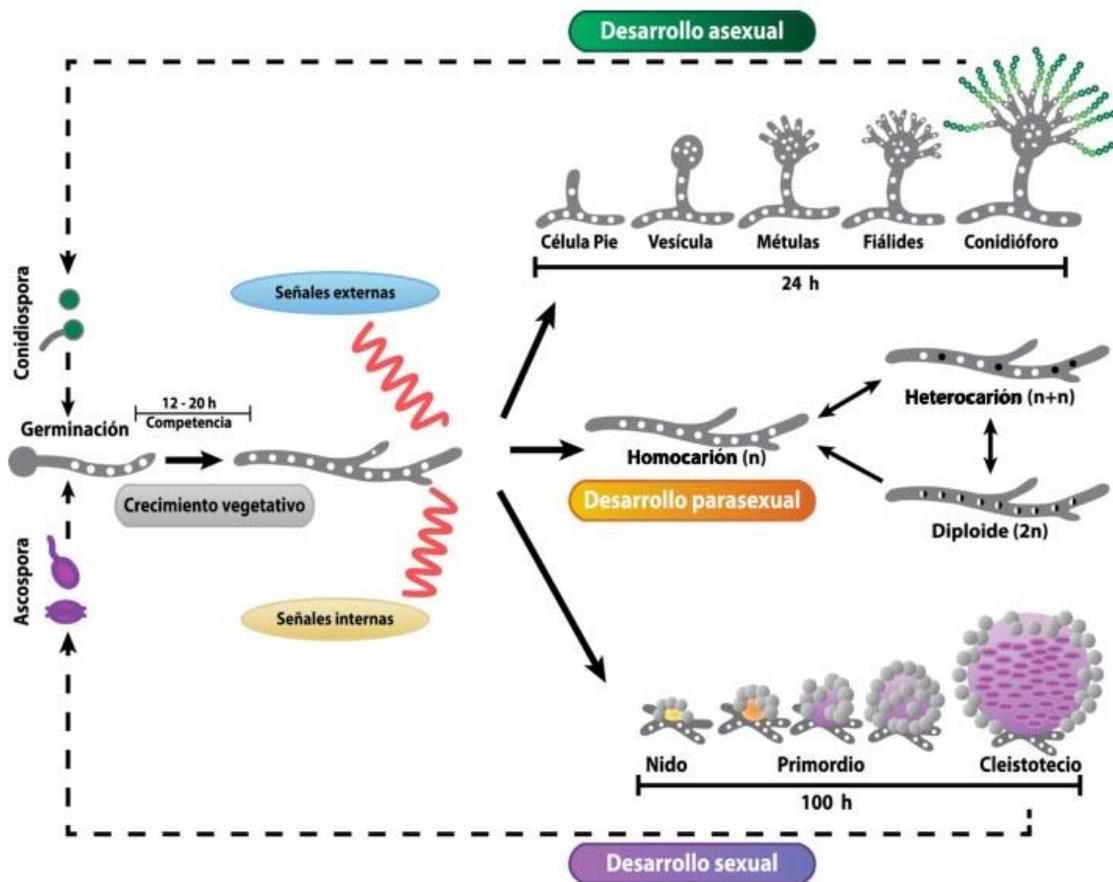
La asca se forma por un alargamiento de la penúltima célula, que está acompañado por la fusión de sus dos núcleos para formar un cigoto diploide transitorio que inmediatamente sufre meiosis. Los cuatro núcleos producidos por la meiosis se dividen mitóticamente, generando ocho núcleos, cada uno de los cuales está incluido en una de las ocho ascosporas rojo-oscuras de cada asca. El núcleo de cada ascospora sufre una división mitótica sencilla produciendo ascosporas maduras binucleadas (Braus, 2002). La punta y las células basales se fusionan para generar un segundo crozier y el proceso se repite.

El ciclo parasexual es una característica importante de las hifas vegetativas. Éste inicia cuando las hifas provenientes de una cepa o de dos cepas distintas, se encuentran en la superficie del medio (Fig. 8). Como consecuencia de la fusión de hifas genéticamente diferentes, se originan hifas que contienen núcleos de dos tipos diferentes (heterocarión)(Pontecorvo et al., 1953). Cuando un heterocarión forma conidióforos, la vesícula puede tener núcleos de más de un tipo, sin embargo las fiálides son uninucleadas, por lo que todas las conidias en una cadena tendrán una misma clase de núcleo, no obstante, diferentes cadenas pueden tener distintos tipos de núcleos. Cuando los núcleos de un heterocarión se fusionan se forman diploides estables (Pontecorvo et al., 1953; Roper, 1952)

El ciclo sexual de *A. nidulans* permite realizar análisis genéticos convencionales mediante el análisis de la progenie meiótica, mientras que los heterocariones y diploides resultantes del ciclo parasexual (Todd et al., 2007), pueden usarse para

análisis de complementación, dominancia (Pontecorvo et al., 1953), y de herencia citoplásmica (Gunatilleke, Scazzocchio, & Arst, 1975; Rowlands & Turner, 1973).

La coexistencia de un ciclo sexual, asexual y parasexual en un mismo organismo convierten a *A. nidulans* en un organismo modelo popular en el que se pueden realizar una gran cantidad de ensayos de genética y biología molecular (Pöggelker, 2006).



**Fig 8. Ciclo de vida de *Aspergillus nidulans*.** La germinación de las esporas (asexuales o sexuales) da lugar al crecimiento vegetativo y la formación del micelio. Dependiendo de las señales externas, dicho micelio puede diferenciarse hacia el desarrollo asexual, sexual o bien el desarrollo parasexual. En presencia de nutrientes las esporas sexuales (en morado) o asexuales (en verde), germinan y forman un tubo germinal que crece apicalmente hasta formar un conjunto de células tubulares o hifas multinucleadas (círculos blancos), colectivamente llamado micelio. Cuando el micelio se expone al aire, ocurre primero la diferenciación asexual, que culmina con la formación de conidióforos con múltiples esporas o conidias uninucleadas. Después del ciclo asexual suele ocurrir el ciclo sexual, el cual se caracteriza primero por la aparición de las células Hülle, y la formación del cleistotecio en donde se producen las ascosporas. El desarrollo parasexual es una fase donde se fusionan dos micelios diferentes y se forma un micelio heterocariótico, el cual contiene 2 tipos de núcleos diferentes (círculos blancos y grises). Los núcleos en un heterocarión se pueden fusionar y formar un diploide. Tanto el micelio heterocariótico como el micelio diploide pueden continuar con el desarrollo asexual y sexual (Figura modificada de Bayram y Braus, 2011).

## HIPÓTESIS

Proponemos que el gen *AN\_8683* codifica para una enzima con actividad de NADPH oxidasa (NOX) y no para una reductasa férrica, por lo cual su eliminación no debe afectar el crecimiento de *A. nidulans* en bajas concentraciones de hierro y sí causar defectos en la diferenciación celular de este hongo.

## OBJETIVO GENERAL

Evaluar el papel de la proteína *AN\_8683* como posible reductasa férrica mediante la eliminación del gen correspondiente y la caracterización de las mutantes en cuanto a su crecimiento en bajo fierro y a su diferenciación celular.

## OBJETIVOS PARTICULARES

- Llevar a cabo un análisis bioinformático de la proteína AN\_8683.
- Generar cepas de *A. nidulans* carentes del gen  $\Delta AN_8683$  y a partir de éstas, generar mutantes dobles carentes de los genes *AN\_8683* y *noxA*, el cual codifica para la NADPH oxidasa NoxA.
- Evaluación del desarrollo asexual en las mutantes doble y sencilla
- Evaluación del desarrollo sexual y asexual en las mutantes dobles y sencillas, en concentraciones de bajo y alto hierro.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Cepas, medios de cultivo y condiciones de crecimiento de *Aspergillus nidulans*

Las cepas de *Aspergillus nidulans* se crecieron en medio mínimo (Hill, 2001) con glucosa al 1% más los suplementos requeridos para cada cepa; los medios sólidos se prepararon con agar al 1.25% y se incubaron a 37°C. Los medios de cultivo y el material usado se esterilizaron a 121°C por 15 minutos. Las cepas utilizadas en este trabajo se enlistan en la tabla 1.

**Tabla 1 .** Cepas de *A. nidulans* empleadas en este trabajo

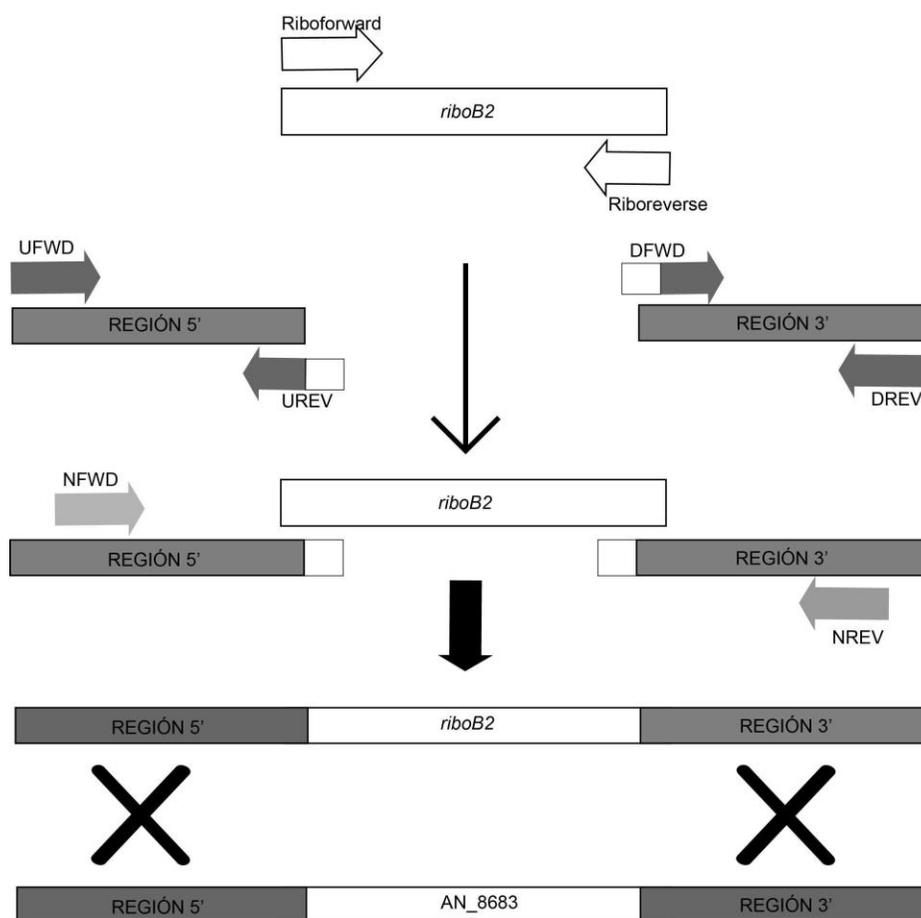
Nombre	Genotipo	Origen
<b>11035</b>	<i>pyrG89; pyroA4; riboB2; ΔnkuA::argB; veA1</i>	M. Hynes y col.; Nayak <i>et-al.</i> , 2006
<b>TTP1</b>	<i>pyrG89; pyroA4; ΔAN_8683::riboB2; ΔnkuA::argB; veA1</i>	Este trabajo, 11035 transformada con el producto de PCR riboB2
<b>CLK43</b>	<i>pabaA1, yA2</i>	Kawasaki et al., 2002
<b>CTP1</b>	<i>pabaA1, yA2; ΔAN_8683::riboB2; nkuA+; veA1</i>	Este trabajo, progenie de CLK43 x TTP1
<b>CAH4</b>	<i>pabaA1, yA2; ΔnoxA::AfpYrG; veA1</i>	Tesis de maestría A. Hernández., 2010
<b>CTP2</b>	<i>pabaA1, yA2; ΔnoxA::AfpYrG; veA1; ΔAN_8683::riboB2; nkuA+; veA1</i>	Este trabajo, progenie de CAH4 x TTP1

### Eliminación del gen *AN\_8683*

Para obtener las construcciones para la eliminación del gen *AN\_8683*, se utilizó la técnica de PCR sobrelapados (DJ PCR) descrita por Yu *et-al.*, 2004 . Se amplificó 1 kb río arriba del ORF usando los primers UFWD y UREV (Tabla 2), así como 1 kb río abajo empleando los primers DFWD y DREV. El gen *riboB2* de *A. fumigatus* como

marcador selectivo, se amplificó con los primers Riboforward y Riboreverse. En una nueva PCR se generó el producto de fusión empleando las tres secuencias amplificadas anteriormente y los primers anidados (NFWD y NREV) a 94°C por 3 min seguido de 35 ciclos a 94°C, 30s, 55°C, 45s, 72°C, 4 min. Finalmente la reacción se mantuvo a 72°C por 7 min.

El producto final se utilizó para transformar por electroporación (Sanchez, Navarro, & Aguirre, 1998; Sánchez, 1996) la cepa 11035 (Tabla 1). Todas las transformantes obtenidas se analizaron por hibridación tipo Southern blot.



**Fig 9. Estrategia de eliminación de genes mediante la técnica de Double Joint PCR.** Se amplificó mediante reacciones independientes de PCR 1kb río arriba (UFWD y UREV) y 1kb río abajo (DFWD y DREV) del ORF del gen AN\_8683. Se amplificó también la secuencia codificante para el marcador

selectivo *riboB2* (Primers Riboforward y Riboreverse). En una nueva PCR se generó el producto de fusión empleando los tres fragmentos amplificados anteriormente y los primers anidados en los extremos 5' y 3' (NFWD y NREV). La construcción conteniendo el marcador de selección reemplaza al gen seleccionado mediante un evento de doble recombinación homóloga.

### **Transformación de *A. nidulans* por electroporación de esporas**

Se sembraron 10 placas con medio mínimo más suplementos (piridoxina, riboflavina, uridina y uracilo) de la cepa 11035 y se incubaron a 37°C durante 7 días. Pasado este tiempo se rasparon las cajas con solución Tween 80 al 0.1 % con una varilla triangular. Después de raspar la primera caja esta suspensión se pasó a la segunda caja y así sucesivamente. La suspensión de todas las cajas se recolectó en 2 tubos falcon estériles de 12 ml. Las esporas se concentraron centrifugando los tubos durante 5 minutos a 6000 rpm, el sobrenadante se desechó y se agregaron 12 ml de agua estéril en cada tubo. Las esporas se resuspendieron con una pipeta Pasteur y la solución se concentró en un tubo Falcon. Se centrifugó durante 5 minutos y se decantó el sobrenadante. Se agregaron 12 ml de agua estéril, se resuspendieron las esporas y se volvió a centrifugar, esto se repitió 5 veces. Finalmente se resuspendieron las esporas en 2 ml de agua y se cuantificaron las esporas en una cámara de Neubauer. Se inocularon  $1 \times 10^7$  esporas en medio mínimo líquido más los suplementos (piridoxina, riboflavina, uridina y uracilo) y se incubaron en agitación (100 rpm) a 37°C por dos horas. Las esporas se concentraron en 2 botellas de propileno de 250 ml y se centrifugaron a 6000 rpm durante 10 minutos a 4° C. Se decantó el sobrenadante dejando aproximadamente 50 ml de medio para evitar la pérdida de esporas. Para lavar las esporas se agregaron 200 ml de agua estéril fría a cada frasco resuspendiendo las esporas y centrifugando. Esto se realizó dos veces. Después se decantó lo más posible de agua y se agregaron 12.5 ml de buffer de pretratamiento frío (100 ml YED, HEPES 20mM, pH ajustado a 8 con Tris 100mM) a cada tubo (total 25 ml). Se resuspendieron las esporas y se incubaron en agitación (100 rpm) a 30°C durante 1 hora. Posteriormente se centrifugaron los frascos y se retiró el sobrenadante cuidadosamente con ayuda de una pipeta Pasteur. Finalmente se agregó 1ml de buffer de electroporación frío (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 270 mM Sacarosa, 1mM de acetato de litio, esterilizar por autoclave) a cada botella (2.5 ml si son dos

matraces), se resuspendieron bien las esporas con la pipeta Pasteur y se distribuyeron en tubos de 1.5 ml con alícuotas de 200  $\mu$ l y se congelaron a -20°C.

Para electroporar se descongelaron las células electrocompetentes y se hicieron alícuotas de 50  $\mu$ l de células electrocompetentes más 10  $\mu$ l de ADN del producto final del Double Joint. Para el control negativo se usaron 50  $\mu$ l de células electrocompetentes más 10  $\mu$ l de agua estéril. Esto se mezcló muy bien con la pipeta evitando hacer burbujas y se incubaron en hielo por 15 minutos. La solución se pasó a una celda de electroporación "0.2 cm cuvette". Las condiciones de electroporación fueron 1.0kV, 400 $\Omega$  y 2.5 $\mu$ F en el Gene Pulser II y el Controlador Pulser II (Bio-Rad, Hercules, CA). Después de la electroporación, se agregó 1 ml de medio YEG frío a la celda, se resuspendió bien y se pasó a tubos estériles de 10 ml. Los tubos se incubaron a 30°C por 1.5h a 100rpm. Al fin, cada tubo se plaqueó con ayuda de un asa de vidrio en tres placas con medio mínimo sin el marcador selectivo (piridoxina, uridina y uracilo). Se dejó que secan y se incubaron a 37°C.

### **Generación de cepas isogénicas**

Con el fin de obtener las cepas  $\Delta AN_{8683}$  en un fondo genético similar (*pabaA1, yA2*; es decir con conidias amarillas y auxótrofas para el ácido para-aminobenzóico o PABA), se realizaron cruza sexuales con una cepa silvestre CLK43. Para comprobar que la cepa fuera mutante en el gen *AN\_8683* se realizó una PCR diagnóstica empleando los oligos NFWD y Ribo reverse (Tabla 2), que amplifican una banda de 2.8 kb. Asimismo, para identificar la presencia del gen silvestre *nkuA* se realizó una PCR empleando los oligos 5Dig-nkuA y 3Dig-nkuA (Tabla 2). Sólo en las cepas con el gen silvestre *nkuA* se amplificó un producto de 2078 pdb.

Para obtener las cepas carentes los genes  $\Delta AN_{8683}$  y  $\Delta noxA$  se realizaron cruza sexuales de la cepa CTP1 con cepas CAH4. Se colectaron 6 cleistotecios producto de esta cruza que se limpiaron al rodarlos con la ayuda de una aguja de disección en una

placa gruesa de medio mínimo. Cada cleistotecio se reventó en un tubo eppendorf con 1 ml en agua estéril. Se plaquearon 35 µl de cada tubo en medio mínimo más suplementos (PABA). Se seleccionaron los cleistotecios híbridos, es decir, aquellos en los que las colonias de la progenie presentaban conidias verdes y amarillas. De estas placas con colonias verdes y amarillas se picaron colonias individuales amarillas con ayuda de un palillo de madera, con el objetivo de realizar un tamizaje genético. Las conidias obtenidas con el palillo se sembraron en Medio mínimo y medio mínimo más suplementos (PABA). Las colonias que crecieron en medio mínimo se descartaron. Las colonias que crecieron en medio PABA se plaquearon para colonia aislada con el objetivo de obtener colonias provenientes de 1 espora. Esto se realizó dos veces. Finalmente se sembraron a confluencia y se incubaron a 37°C durante 5 días, al término de los cuales se tomaron conidias de estas placas y se inocularon en medio mínimo para obtener ADN. Para comprobar que la cepa fuera mutante en el gen *AN\_8683* se realizó una PCR diagnóstica usando los oligos NFWD y Ribo reverse (Tabla 2), que amplifican una banda de 2.8 kb. Para comprobar la delección del gen *noxA*, se emplearon los oligos NoxA5for y pyrGreverse (Tabla 2), que amplifican una banda de 2.9kb. Al igual que en las mutantes sencillas, para corroborar la presencia del gen silvestre *nkuA* se emplearon los oligos 5Dig-nkuA y 3Dig-nkuA (Tabla 2) que amplifican un producto de 2078 pdb en las cepas que poseen este gen. De la progenie se obtuvo 1 posible candidata que fue comprobada mediante PCR diagnósticas.

### **Extracción de ADN**

Se emplearon conidias de las diferentes cepas transformantes así como de una cepa silvestre, las cuales se inocularon en aproximadamente 30 ml de MM con sus respectivos suplementos. Se incubaron durante 12 horas a 37°C sin agitación. La película de micelio se colectó y se secó en papel absorbente, posteriormente se congeló en nitrógeno líquido. El micelio congelado se secó al vacío durante cuatro horas, para posteriormente pulverizarlo. Al micelio pulverizado se le adicionó 800 µl de buffer de extracción (50 mM de EDTA y 0.2% de SDS) y se calentaron por 45 minutos a 68°C. Posteriormente los tubos se retiraron del calentamiento y se

centrifugaron a 12000 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente. El sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo y se le adicionó 200  $\mu$ l de fenol-cloroformo. Esta mezcla se agitó vigorosamente en el vórtex hasta que el contenido se puso lechoso. Nuevamente se centrifugó por 10 minutos a 12000 rpm y se recuperó la fase superior (acuosa) en un nuevo tubo, donde se le agregó 600  $\mu$ l de isopropanol y se mezcló por cuidadosamente. Después se centrifugó a 12000 rpm durante 10 minutos y se decantó el sobrenadante. El botón se lavó con 800  $\mu$ l de etanol al 70% y se centrifugó a 12000 rpm por 5 minutos. Se decantó el sobrenadante y el botón se secó 5 minutos sobre una toallita de papel y 5 minutos a 55°C. Finalmente se resuspendió el ADN en 80  $\mu$ l de buffer TE y se disolvió calentando el tubo 1 hora a 68°C. La pureza y concentración del DNA obtenido se estimó mediante electroforesis de agarosa.

### **Cuantificación del número de esporas/cm<sup>2</sup>**

Se inocularon  $1 \times 10^4$  conidias de cada cepa en el centro de placas con medio mínimo más suplementos (PABA), y se incubaron a 37°C por 5 días, al término de los cuales se determinó el diámetro y el área de cada colonia. Cada colonia se raspó con una varilla triangular y una solución estéril de Tween al 0.1%. El total de las esporas colectadas de cada colonia se re suspendió en 10ml de la solución de Tween en tubos Falcon de 50ml. Se agitó vigorosamente cada tubo con el vórtex y las esporas se lavaron tres veces centrifugándolas por 5 minutos a 5000 rpm y decantando el sobrenadante. Los pellets de esporas se resuspendieron en 2 ml de agua y se cuantificó el número de esporas/ml usando una cámara de Neubauer. Con el dato del área se realizó el cálculo del número de esporas/cm<sup>2</sup>.

### **Cuantificación del número de cleistotecios/cm<sup>2</sup>**

Se inocularon  $1 \times 10^5$  conidiosporas en 4 ml de medio mínimo (MM) con glucosa al 2% y 0.625% de agar suave (DIFCO) más suplementos (PABA), el cual estaba pre-incubado a  $\approx 42^\circ\text{C}$ . Se agitaron inmediatamente por vórtex y se vertieron sobre cajas

Petri pre-incubadas a 37°C y que contenían 20 ml de medio mínimo (2% de glucosa y 1.25% de agar DIFCO más suplementos). Posteriormente se incubaron 12 horas, al cabo de las cuales se sellaron con cinta adhesiva con el propósito de limitar el oxígeno e inducir el ciclo sexual. Para determinar el número de cleistotecios, se tomaron muestras con un sacabocado de 0.5 cm de diámetro cada 72 h a partir del tercer día después de haber sellado la caja como se reportó anteriormente (Kawasaki et al., 2002).

**Tabla 2.** Oligonucleótidos empleados en este trabajo

<b>Nombre</b>	<b>Secuencia (5' -&gt; 3')</b>
<b>UFWD</b>	TCCTCTTACGTCTCCTCCGT
<b>UREV</b>	AGACTCCTGAACGGCCTCTTGATTTCGCGTAGGGTTCGAA
<b>DFWD</b>	TTCTGCAGCGCAAACGTTCTACTCCCAAGGGCTTCGTTTT
<b>DREV</b>	GAGGCTTAATCAAGACGTGT
<b>NFWD</b>	GTGCACTGAAAGAAATCG
<b>NREV</b>	CGTTACTGTTTCGCGTCTT
<b>Riboforward</b>	CTGGCTCGTTTGATCACATGG
<b>Riboreverse</b>	GCGCTGCAGAACCGTTACATG
<b>NoxA5 for</b>	GCTGGGGTCGAGTGGAACG
<b>pyrGreverse</b>	GTCTGAGAGGAGGCACTGATGC
<b>5Dig-nkuA</b>	GATGCTGTCCTTTTTGCC
<b>3Dig-nkuA</b>	TACCCAGAGCGCGATAC

### **Hibridación tipo Southern Blot**

Se digirieron aproximadamente 10 µg de ADN con las enzimas de restricción requeridas y RNasa (10 µg/ml) durante toda la noche a temperatura ambiente. Se separaron mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1%. El gel se incubó en una solución de HCl 0.25N a temperatura ambiente por 15 minutos con agitación. Se realizaron tres lavados con agua y se desnaturalizó en una solución NaCl 1.5 M y NaOH 0.5 M por 30 minutos con agitación. Nuevamente se realizaron tres lavados con agua y

el gel se neutralizó en una solución Tris-HCl 0.5 M (pH 7.2) y NaCl 1.5M por 30 minutos a temperatura ambiente y con agitación. EL gel se transfirió durante toda la noche a una membrana de nylon Hybond-N conforme al protocolo de (Sambrook, 2001). El ADN se fijó a la membrana al exponerla 5 minutos a luz UV. La membrana se pre-hibridó en una botella de vidrio a 65°C durante dos horas en solución de hibridación con ADN de esperma de salmón 0.1 mg/ml y se hibridó con la sonda marcada radiactivamente en solución de hibridación nueva. Las sondas se marcaron empleando el kit Rediprimer™ II Random Primer Labelling System (GE Healthcare) según las especificaciones del fabricante. La hibridación se realizó a 65°C durante toda la noche. Posteriormente la membrana se sometió a un lavado con solución SSC 1X, SDS 0.1% durante 45 minutos a 65 °C; y a un segundo lavado con solución SSC 0.1X y SDS 0.1% durante 45 minutos más. La membrana se expuso a un cassette de revelado, el cual se reveló mediante el uso del escáner Typhoon™ FLA 9500 biomolecular imager (GE Healthcare), el cual es sensible a sondas radioactivas.

### **Análisis filogenético**

Las secuencias de aminoácidos se alinearon con MUSCLE (Edgar, 2004) en el programa SeaView (versión 4.4.0) (Gouy et al., 2010). El alineamiento resultante se editó en el programa BioEdit (Hall, 1999), con el objeto de eliminar las regiones poco conservadas, dejando únicamente el dominio FRD (Pfam: PF01794) y el dominio NOX\_DUOX (Cdd: CD06186) (Marchler-Bauer et al., 2013) y el dominio FNR (Pfam: PF08030) (Finn et al., 2010). Con el alineamiento resultante se realizó un árbol filogenético en el programa SeaView (Gouy et al., 2010) mediante PhyML (Guindon et al., 2010) utilizando el modelo evolutivo WAG (Whelan & Goldman, 2001; Z. Yang, 1994). La probabilidad fue maximizada al optimizar la topología del árbol y la longitud de las ramas. El soporte interno de las ramas se evaluó mediante 1000 repeticiones de bootstrap. La topología del árbol se optimizó mediante Nearest Neighbor Interchange (NNI) (Desper & Gascuel, 2002). Y BioNJ (Gascuel, 1997a). El código de color del árbol se realizó con el programa FigTree (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>).

## RESULTADOS

1.-El gen AN\_8683 de *A. nidulans* codifica para una proteína con posible actividad de NADPH oxidasa

Con el objetivo de encontrar en *A. nidulans* proteínas ortólogas de una nueva familia de NOX, representada por Yno1 en *S. cerevisiae* (Rinnerthaler et al., 2012), se realizó un análisis tipo blast con la secuencia de aminoácidos Yno1 en la base de datos del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sutils/blink.cgi?pid=6321278>). Este análisis nos permitió identificar tres genes, que ordenados de menor a mayor *e-value* (probabilidad de que la similitud se deba al azar) son: AN8683, AN10893 y AN4906. Por esta razón, seleccionamos a AN\_8683 como posible ortólogo de Yno1 (Fig. 10). El gen AN8683 se localiza en el cromosoma III de *A. nidulans* (AspGD, 2011) y la proteína que codifica es de 801 aminoácidos (91.4 kDa). Como se observa en la figura 11A y B, la proteína AN\_8683 tiene características comunes con las NOX y las FRE: posee cuatro histidinas conservadas que participarían en la unión de dos grupos hemo no idénticos del tipo *b* (Dominio FRD) (Andrew R. Cross et al., 1995; Finegold et al., 1996; Lambeth, Kawahara, & Diebold, 2007), así como secuencias involucradas en la unión al FAD y NADPH, que se encuentran hacia el extremo C-terminal (Dominios NOX\_DUOX y FNR) (Segal et al., 1992).

De acuerdo con un análisis reciente sobre la relación filogenética entre las FRE y las NOX, se encontró que la presencia de tres aminoácidos (H\_TG) puede diferenciar una enzima tipo NOX de una FRE. De acuerdo con la posición en la secuencia de NOX2 de humano, estos aminoácidos son: H-119, T-178 y G-179 (Zhang *et-al*, 2013). En la figura 11A se muestra un alineamiento entre las proteínas Yno1, AN8683, NoxA de *A. nidulans* y NOX5 de humanos. Indicados con un cuadro amarillo, se muestra que estos aminoácidos están conservados en NoxA y NOX5. En cambio, Yno1 y AN8683 poseen una F en lugar de H y solamente AN8683 muestra los aminoácidos TG, mientras que estos corresponden a VG en Yno1. De acuerdo con estos resultados, tanto AN8683 como Yno1 solo cumplen parcialmente con la presencia de los aminoácidos H\_TG, a

Yno1	MKESPIITL---V-----KRESETHFANIKYGYVLIISLVYI---IGLALL	41
AN8683	NLPWDYVTT---LVKRNIFPSDTPWGDA---VLEBRQRDSWSKAGKYGRGWVYFSLVLLAIATAIRFY	62
AN10893	MNHMKIARHGSIDMDMEAHSGLPWLDSPVMLHSSRA---DMC-----KITPEQCAYRR	50
AN4906	NASTLIFMS---LVGH-SL-----AA---DLERRHGDPFWAALNDDLARYSLIAG---CFAACM	52

Yno1	RAFGRR-----TES-----	50
AN8683	HTWGDRVRIPIHKEKPCQAGSHSPQDEYELPSAATDSSTLFPAPQGSHTK---QQQSS-VST--	121
AN10893	GHWRYWYE-DEHYALNTV-----YF-----LCATVVEVAHVASR---YAPAR-VRR--	94
AN4906	YMKMWFRIAPMRRLASFS-----N-----ERCQNYVPAHPTLAKIKKHIVYAPLFRNRHR	105

Yno1	-----RSSSAFKNKIYRLYDI-----DPAHIGIIL-E---FAVLIPEYYHYS	89
AN8683	-----VAPLNNAIPLARWIFYRSLPEVRVVGKYRIVFPPLGASATILAAII-EVTLYCFVPCHLIYS-S	182
AN10893	-----SSLWQKCTAAGRFIYRGRFIPGVGYW---AGSAGVAALIAVGVV-EFFAMTLGPRPYWP-N	152
AN4906	EFQLSRAVNMGLPSRF-----HTFII-VGIIAMNITLCCVTVPYKSE-P	148

Yno1	LT---TQSTVYLKRIIGRIS-YALIFLNIIFITIFENWFL-RKNCTYDFIPEKWFSRITVIGLIE	150
AN8683	IR---VGSPPAIARAGLA-VAMIPWIVAMSRANFISMITCIGHERLNVHRWAGYICLFLSLVH	244
AN10893	TDTVNFGGSPFIATRIGMA-VALLRFVLVIGKRNLYSALTCVPHERLQIFHHWTSYANFVLALVE	218
AN4906	DS---V-AGVILSRIGVMATVNLIIHIVLLAG-RNNPLITLQVYDITYNIHRWLARIVVCEPIAE	209

Dominio FRD

Yno1	GIEFIKWAIDDNVSL-RCKLI--LKTENEVGFHISILVFLFICSIGEMRFRYNYRIFVYVHNLVNV	214
AN8683	TVEFYITPIWEHGMLEIYCLMLTPHIYVYGTGAAALVPLVFLCHSLPILRNCMYELFLKHLPPVSM	311
AN10893	TEEFIVYINISKGQMVSY--E-WK--GSVVYVIGVVALVAQANLTFMSLPTIRNRYEYEFKATHFLIAI	280
AN4906	TEFWIIPKQSQMGWEATSCSEA--HSTFICSGLLIGTCAFVALLVHSPSAVVRHAEYETFLHIIAFAV	274

Yno1	AFILLTPHESRPG-VKPEELILNCTELFHIINRIVFAK-----SIMILN-KNA--NYSKTNIVH	270
AN8683	IFVAMLEWHTKNYLSSAPYIWTVAIVLVSIVVRIQYLNWNTNPLRLSFMIC--EDSALTVLPQNAVK	376
AN10893	LEILFFFHCDFRLTSIYFIAAGSYIFSLITSLVRTH-----LINCR-HTATLSVLECGLLIC	338
AN4906	IAPAYLWHELDGR-NAQNELLAAILIWAERFARLIIIVYR-----NVGCRATTAVVEALEGDAMR	334

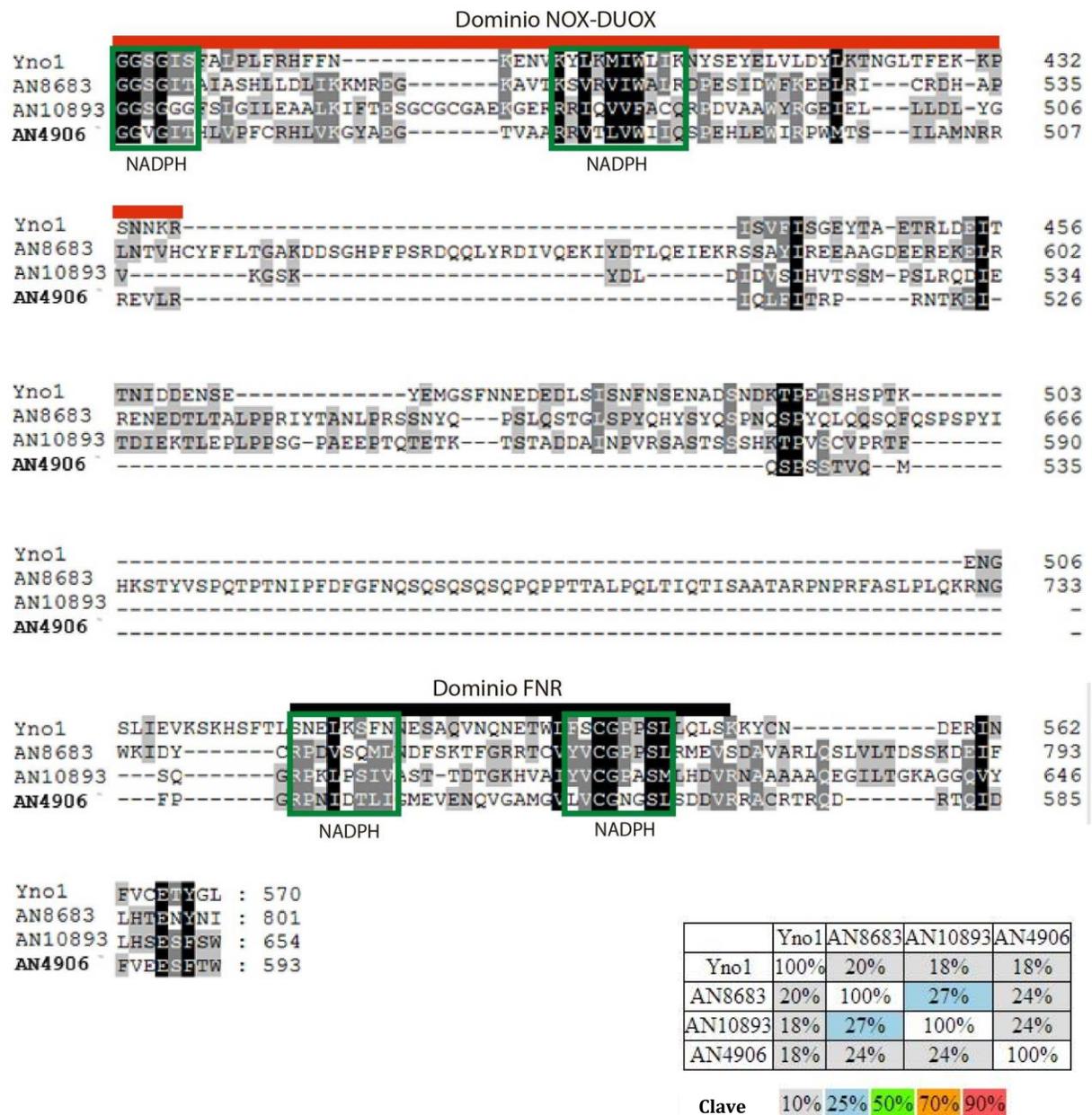
Dominio NOX-DUOX

Yno1	VLEIRAILPDYEEPGSHIRISPYRRINFI---YWLLP-HPYTIAS-IA-EENSIDL-IKETSTAE	330
AN8683	VIVPTQ---MRWKPGCYVYIR---MPGV---AEFQHPFTIAS-LCSNIFPSE-----	419
AN10893	LRIFTI---LSWKPGQHVFIR---FTGICQSVGLHSLTHPFTICS-TP-EDIQSL-----	385
AN4906	ITIKLS-REWAFEPGQHMVLY---IPAI---GWWTS-HPFSIGWSDA-ELVMGDEKSLPVSSRDV	390

FAD

Yno1	PGSQIESLRNPKSFHID-----Q-EKTYMLINSYEPSVPE-ECYSQGTNIAIIC	378
AN8683	YGE-----EYRIIALVFRFRGFTRNILRKSVEYGE-FKWTAELEGPYGGR-RQMAAEDDVIFFA	479
AN10893	--K-----RANMVFYVPPKKGITGRFA-KLASRKE-GFTQIVLLEGPYGGIGMGALERSSEVLIIS	443
AN4906	YGP-----QKTIISLLVRRRTGFTDKIFQRAVSAVDCKVSLTAFAGEPYGSIH--SMDSYGSVILFA	450

FAD



**Fig 10. El gen AN\_8683 de *Aspergillus nidulans* es el homólogo más parecido a YNO1.** Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de la NOX atípica Yno1 de levadura (Rinnerthaler et al., 2012), con AN\_8683, AN10893 y AN4906. Los aminoácidos conservados en todas las proteínas están sombreados. Los dominios FRD, NOX-DUOX y FNR están indicados por líneas. Las histidinas conservadas candidatas para la ligación de los grupos hemo están indicadas con cabezas de flecha. Los dominios putativos de unión al FAD y NADPH se muestran enmarcados. Los tres aminoácidos que se ha propuesto que definen a las NOX están encerrados en cuadros amarillos. El alineamiento se realizó con el programa T-COFFEE (<http://tcoffee.vital-it.ch/>) y se refinó con el programa GeneDoc (<http://www.psc.edu/biomed/genedoc>). Al final de cada alineamiento se muestra el cuadro de porcentajes de identidad correspondiente.

pesar de que existe buena evidencia experimental de que Yno1 posee actividad de NOX (Rinnerthaler et al., 2012).

Como parte del mismo análisis, comparamos Yno1 y AN8683 con FRE7 (Martins et al., 1998) y FreA (Oberegger et al., 2002) de *S. cerevisiae* y *A. nidulans*, respectivamente. Como puede verse en la Fig. 11B, todas las proteínas tienen una F en lugar de la H correspondiente a la H-119 en NOX2, excepto FreA que posee una V. Con respecto al dipéptido TG conservado en las NOX, este sólo está presente en AN8683, indicando que por este criterio, es posible distinguir a AN8683 de otras proteínas identificadas experimentalmente como FRE.

En resumen, nuestros resultados indican que la proteína AN8683 de *A. nidulans* cumple parcialmente con el criterio que se ha propuesto recientemente como diagnóstico de las proteínas NOX (Zhang *et-al*, 2013), lo cual justifica la búsqueda de proteínas homólogas a AN8683 en otros hongos, así como el análisis experimental de dicha proteína.

Para detectar otras proteínas semejantes a Yno1 y AN8683 en otros hongos, tanto Ascomicetos como Basidiomicetos, se llevó a cabo un análisis tipo Blast usando la secuencia de aminoácidos de YNO1 y AN8683 contra el genoma de los hongos antes mencionados. Las proteínas identificadas se alinearon utilizando el algoritmo MUSCLE (Edgar, 2004), el cual realiza un análisis local y global de las secuencias de aminoácidos, utilizando el programa SeaView (Gouy et al., 2010). El alineamiento se editó en BioEdit (Hall, 1999) dejando únicamente los dominios FRD, NOX\_DUOX y FNR. Con el alineamiento editado se construyó un árbol filogenético en SeaView usando el modelo evolutivo para proteínas globulares llamado WAG (Whelan & Goldman, 2001). El árbol obtenido, que se muestra en la figura 12A, sugiere que existen al menos cuatro grupos de proteínas: el grupo de las NOX (compuesto por NOXA, NOXB y NOXC), un pequeño grupo que sólo incluye a Yno1 y FRE8, lo cual llama la atención porque FRE8 es importante para crecer en limitación de hierro (De Freitas et al., 2004), el grupo de las FRE y un grupo que hemos denominado Fre/Nox, de

acuerdo con la nomenclatura de Zhang et al. (2013). Este análisis, también colocó a FRE7 en el grupo de las FRE/NOX, lo cual resulta inesperado, ya que el gene *fre7* parece codificar para una FRE que se induce exclusivamente por la privación de Cobre (Yun et al., 2001).

Un alineamiento de los dominios FRD y FNR de todas las proteínas que en el árbol filogenético se identificaron como FreNox se muestra en la Fig. 12B se observa que los aminoácidos correspondientes a NOX2 T-178 y G-179, están conservados en todas las proteínas. Sin embargo, el sitio de unión a NADPH del dominio FNR está poco conservado entre estas proteínas. Con este análisis se pudo identificar a AN10893 en *A. nidulans*, como una segunda proteína con posibles características del grupo de las FRE/NOX (Zhang, Krause, Xenarios, Soldati, & Boeckmann, 2013).

**A**

AN8683	MLPWDYVITLTKRINFPSDTPWGDAVLEERQRDSWSKAGKYGRGWVYFSLVLLAIA	56
Yno1	MKESPLITL-VKR---HSETHF-----ANIKYGYVLIISLVYLIGL	38
NoxA	MGRYPLKSY-FA-----	11
NOX5	MENLTI STA-HW-LTAPAPRPRPR-----RPRQLTR-AYW-----HNH	35

AN8683	TAIRFYHTWGDRVRIA THKEKPQAGSHSPQDEYELPSAATDSSTTLFFPAQGSLHT	112
Yno1	ALLR---AFGR-----TPS---RSSSAFKNKI-----IYR-	63
NoxA	PSKLEFFYTFWGAHIAIF-----AYGWYHQ	36
NOX5	RSQLECLATYAGLHVLI F-----GLA----	56

AN8683	KQQQSSVSTVAPINNAIALARWIFYRSLPEVRVGKYRIVFPSLGASAIILAALIFV	168
Yno1	---LYDIDPAIHIG-ILFFAVLI-----	82
NoxA	A---KSEPLSPLN-VLSYSVVI-----	54
NOX5	---ASAHR-DLGASVMV-----	69

AN8683	TLYCFVPQPLYY-SSIRVGSPPLAIRAGMLAVAMIPWIVAMSTRANFISMLTGI GH	223
Yno1	-----PFYHYSLTTQSTVYLKRLGRISYALIPLNIFLTLRPNWFRL-KNCTY	129
NoxA	-----SRGAGLVLT-----VDGTLILPFCR-NLVRFLRPK--L--RWIPL	90
NOX5	-----AKGCGQCLN-----FDCSEI AVLMLR-RCLTWLRATWLA--QVILPL	107

**Dominio FRD**

AN8683	ERLNVIHRWAGYICLFLSLVHTVFFYITPIWEHGM----LEIYQLYLTPHIY----	271
Yno1	TDFIPPHWFSRITITVIGLLHGIFFIKWAIDNV----SLKQKLILKTFNF----	177
NoxA	DENIWEHQQVAATLVFTILHVAAPHVNFYNIERKQLRPETALQ-----IHYA	138
NOX5	DQNIQEHQLMGYVVVGLSLVHTVPHVNEVLQAQAEASPFQFWELLITTRPGIGWV	163



AN8683	---VYGTGLAALVPLVFLCIHSLPILRN-CMYEELFKLHLPVSMIFVAMIFWHTKN	323
Yno1	-----VGFILSILVLELLICSIGPMRR-YNRYLFYIVHNLVNAEILITPIHSRP	226
NoxA	Q-PAGVICHVMIFCMMMLMYTTAHHRIHQ-QSFEIFWYTHHLFIPFLI-GLYTHATG	191
NOX5	HGSASPHGVALLLLLLLMFICSSSCIRRSRGHFEVFWYTHLSYLLVWL-LIIFHGPN	218



AN8683	-YFS-----SWAYTWSVAILVLSYVVRIGYLNWNTNPLR	356
Yno1	-GVK-----EPELLNCTLFIHIINRIVF-----A	251
NoxA	CFVRDSAEPYSPFAGERFWKHCIGYQGWREL VAGFFYLCER-IWREI-----R	239
NOX5	-E-----KRWLLVPGIIFLEKATGAV-----S	241

**Dominio NOX-DUOX**

AN8683	LSFMIGEDSAITVLEQNAVKVTV--ETQ---MRWIKPGQYVYLR----MPGVAFHC	402
Yno1	KSLMILNK-NANYSKTNLVHVRV--ERAILPDYFEPGSHIRISPYRRINPLYWLLP	304
NoxA	ALRETEI-VKVRHFDAMEIQFRK-PG---FKYKPGQWLFIQ-----VFEVSNTQ	285
NOX5	RMAAVCI-MEVNLLPSKVTHLILKREPF---FHYRPGDYLYIN-----IPTIARYE	288

AN8683 MHPFTIASLCSNIFPSEYGEERYD-----LALVFRPFRG 436  
 Yno1 SHPYTIASIAEDINSIDLI-----IKETST 328  
 NoxA VHPFTITISCPFDLYVSIHVRCVGDFFTRALGDALGCGPAQARDLEGLDPMGMYEVA 340  
 NOX5 VHPFTISSAPEQKFTIWIWHIRSQGQWTNRLYESFKA-----SDPLGRGSKR 334

FAD FAD

Dominio NOX-DUOX

AN8683 FTRNVL-RKQVE-----YGPFKTWTAFLEGPYGMRRCVAAFDDVIFVIFAGG 481  
 Yno1 AEPGSG-IESLRSNPKS-----PHLDQEKTYTLINSYBPSVFECCYSQGTNIAIICGG 380  
 NoxA LQNGQQM-----PKLRVDGPGYCAPAEDVFENEI AVLIGTC 375  
 NOX5 LRSVVTMRKSORSSKGSEILLEKHKFCNIKCYLDGPGYGTETRRIFASEH AVLIGAG 390

NADPH

AN8683 SGITAIASHLLDIKKMREGK-----AVTRKSVFVIWALRDPESI 520  
 Yno1 SGISFAIDFRHFF-----NK-----ENVKYLRVIWLIKNYSEY 414  
 NoxA LGVTPWASIIKNTWHLRA-SPDP-----PRRLRVEFIWVCKDITSP 416  
 NOX5 HGITPFASTIIQSI MYRHQKRHTCCPSCQHSWIEGVQDNMKLHRVFIWINRDRQSR 446

NADPH NADPH

AN8683 DWEKEELRICR---DHAPLNTVHCYFFLTGAKDDSGHPFPRDQQLYRDIVQEKIV 573  
 Yno1 ELVLDYIKTNGLTFEKKPSNN----- 435  
 NoxA EWFQALLSSLEA-----QSASDAAY 436  
 NOX5 EWEVSLITKLEM-----DQAEEAQY 466

AN8683 DTLQEIEKRSAYIREEAAGDEEREKELRRENEDTLTALPPRIYTANLPRSSNYQP 629  
 Yno1 -----KRISVVISGEYTA-ETRLDEITTNIIDE----- 462  
 NoxA Q-----GVSEF----- 442  
 NOX5 -----GRF----- 469

AN8683 SLQSTGLSPYQHSYQSPNQSPYCLQQSQFCSPSPYIHKSTYVSPQTPTNIPFDG 685  
 Yno1 -----NSEYEMGSFNNEDEDLISISNENENA-----DSNDKTPETSH-- 499  
 NoxA -----IRIHIYLTQRL-----DCITTTNTIYLN-- 464  
 NOX5 -----LELHMYMISAL-----GRNDMKAIGLQMA 493

AN8683 FNQSQSQSQSQPCPPTTALPQLTIQTISAAARPNRPFASLPLQKRNGWKIDYCRE 741  
 Yno1 -----SPTKENGSLIEV-----KSRH-----SPTLS 520  
 NoxA -----SVGQELDPLTEL-----KSRH-----NEGRE 485  
 NOX5 LLL---LANKEKKDSITGL-----QTRT-----QPCRE 518

NADPH

Dominio FNR

AN8683 EVSQMLN-----DFSKTFGRRTCVYVCGPPSLRMEVSDAVARLQSLVL 784  
 Yno1 NELKSFNN-----ESAQVNQNETVLFSCGPPSLQLLSRK----- 554  
 NoxA DEKRLFTAMRNLQDQSYMRLHTHSRTEICVYFCGENVAARQIKAAA-----S 534  
 NOX5 DWSKVFQKV-----AAEKKGKVQVFECCSEALAKVLRG----- 551

NADPH

AN8683 T-DSSKDEIFLHTENYNI : 801  
 Yno1 --YCNDERINEVCEITYGL : 570  
 NoxA SASTNEVKFKFKW-EHFX : 551  
 NOX5 --HCEKFGFRFFQ-E-NF : 565

	AN8683	Yno1	NoxA	NOX5
AN8683	100%	21%	17%	19%
Yno1	21%	100%	13%	15%
NoxA	17%	13%	100%	29%
NOX5	19%	15%	29%	100%

Clave 10% 25% 50% 70% 90%

**B**

AN8683 MIPWDYVTTLVKRINFPSTP---WGDAVLEERQRDSWSKA-GKYCRGWVYFS---IV 51  
 Yno1 MKES-ELITTV-----KRRHSETHFAN-IKYGYVLIIS---LV 33  
 FRE7 MIEERDIN-LSNGIHCIADIHSELYARLKESQAATPWVYQ-KQYGKFVTYFV---AV 53  
 FreA MGVD-ILPPGQ-----ERQRHVHPPMNIALATPIFALAGGFLI 37

AN8683 LLAIA--TATREYHTWGDVRVRIAIHKEKPGAGSHSPQDEYELPSAATDSSTLLEFFAQ 107  
 Yno1 YLIGL-ALLRAEGR-----RIP----- 49  
 FRE7 LIFLSLIKKLAEMYY--D-----SSEELPEK 78  
 FreA LIFVGR--LAI RMRHH--LRLRAVL-----RND-DQTEETNR- 68

AN8683 GSLHTKQQQSSVSTVAPLNNAIALARWIFYRSLPEVRVGGYRIVFPISLGASATILAL 165  
 Yno1 -----SRSSAFKNKIYRLYDID-P-----AIHLG-- 74  
 FRE7 KNS---PTTPSVFLARIMTKLVAFNRYICYRKFTL-IFSYLGIPTSVGTFLVVMATT 132  
 FreA -----NGFMA-WTNRHVFYAPLFGARHSRELRIGRAHMGTVPRIETLILALY 115

AN8683 IFVTLYCFVPCQLIYS-SIRVGSPLAIRAGMLAVAMIPWIVAMSTRANFISMITGIG 222  
 Yno1 --I-LFAVLIPFYHYSLTTCSTVYLKRLGRISYALIPLNIFLTLRENWFL-RKNCT 128  
 FRE7 IYTLIYCFVPHFYRP-CAGFGSPPLSVRAGIMASLVPFVFLSGKINVIGWLVGLS 189  
 FreA IAINFAFVCLVDWWE-DYQEKLYQVKYAGCHLAVMNTBGLVLAAARNNPLIPLIGIS 172

Dominio FRD

AN8683 HERLNVIHRWAGYICFLSTVHTVFFYITPIWSHCMLEIYQYLTPHIYVYGTGLAAL 280  
 Yno1 YTDFIPFHRWFSR IITVIGLLHGIFFLIKWAIDDNVSLKQKILKTFNF---VGFIIIS 183  
 FRE7 YEKINIVHGWASILCLFFSWVHVIFRQARHGGYERMHQRWKASDMWR--SGVPPI 245  
 FreA EDTENLPHRWVGRVIVGATIHMSAVIAGLIAHGFETTHIWEVPEFI--WGMIAL 228

AN8683 VPLVFLICIEHSLPIIRNCMYELFKLHLFVSMIFVAMLFWHTRKNYLSSWAYLWSTVAIL 338  
 Yno1 ILVLELLICSIGEMRRYNYRLEYIVHNVNVAIFILLTPHISRPGVKFP-FLLLNCTLL 240  
 FRE7 LELNLIWSSLEPARRHEYEIFLQLHWILAVGFYISLFYHVYPEINSHMYLVATIVVW 303  
 FreA FGFILIPICVSLRHAFFEVEFLHLVALAVMSFVGLWYHLR-GLEQQNVVLGTHLW 285

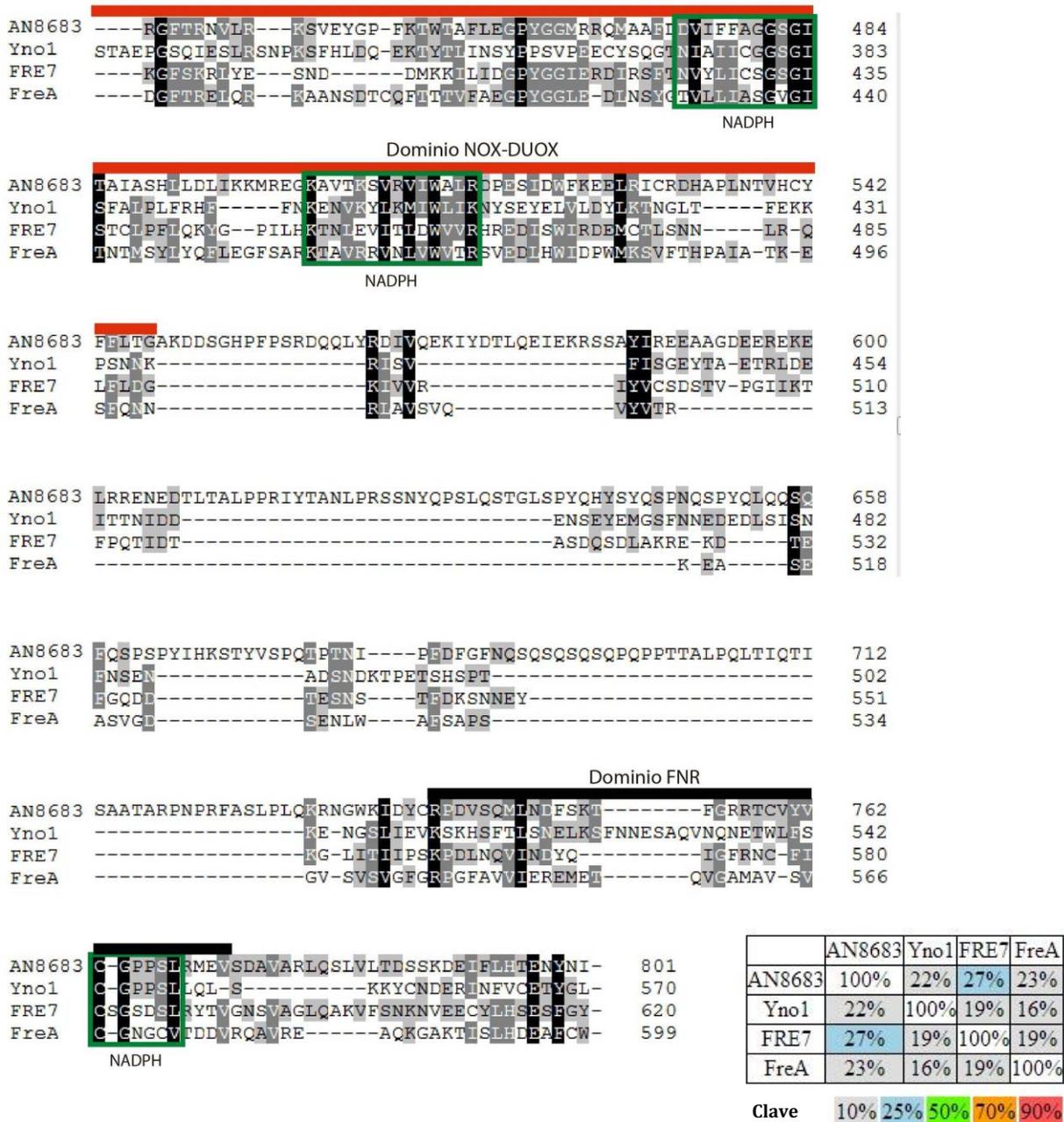
AN8683 VLSYVVRIGYLNNTNPLRLSEMIGE-DSAITVLPQAVKVTVP---TQMRWKPGQYVY 392  
 Yno1 FIIHINRIVEFAK-----SLMILNKNANYS--KTNLVHVRLPRAILPDYFEPGSHIR 289  
 FRE7 FAQLFYRLAVKGLRPRG-SEMAST-IANVSIVGEGCVELIVKD--VEMAYSPGQHIF 357  
 FreA GLERVTRVASLVRNVGK-Q---RT-VADFELLPGNVIRATVTL-ARTGEFRAGQHY 337

Dominio NOX-DUOX

AN8683 IRM-----EGVAFFQHPFTIASLCSNDFP--SEYGEE-----YRILALVFRFPF 434  
 Yno1 ISPYRRINELYWLPSPHYTIASLAED-----NSIDLIIKET 326  
 FRE7 VRT-----IDKG IISHPFSIFESAKYP-----GGIKMLIRAQ 390  
 FreA IYV-----ESVGLWTSHPFSVAVTSTEEVSVDSDSNESFKMLLDRKPQT IISFLIKRE 390

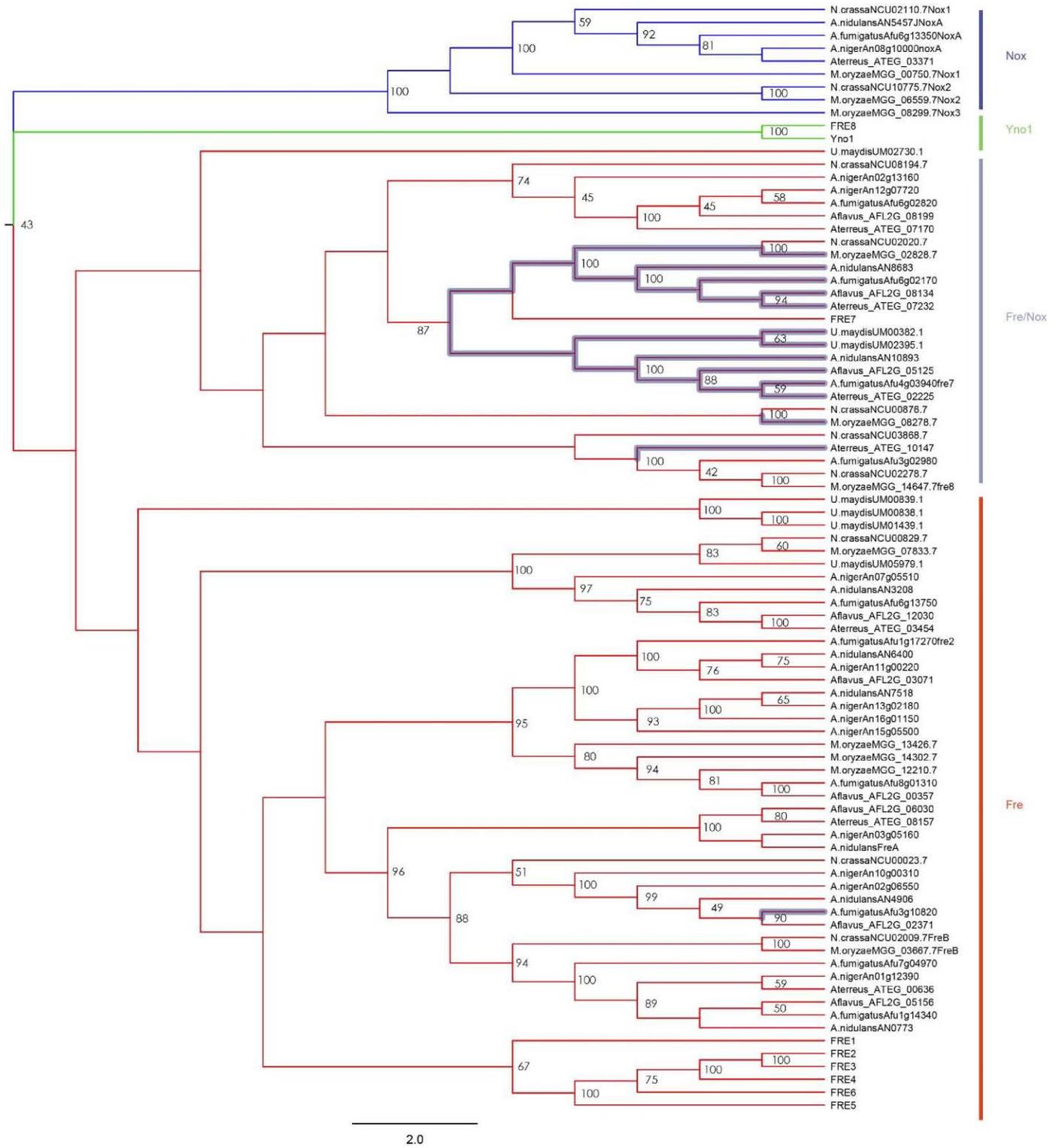
FAD

FAD



**Fig 11. El gen AN\_8683 de *Aspergillus nidulans* codifica para una proteína con similitud a las NADPH oxidasas. A)** La secuencia de aminoácidos de AN\_8683 se alineó con la NOX atípica Yno1 de levadura (Rinnerthaler et al., 2012), NoxA de *Aspergillus nidulans* (Lara-Ortiz, Riveros-Rosas, & Aguirre, 2003) y Nox5 de humano (Banfi et al., 2001; Cheng, Cao, Xu, van Meir, & Lambeth, 2001). **B)** Alineamiento de los aminoácidos de AN\_8683 con Yno1 (Rinnerthaler et al., 2012) y Fre7 de levadura (Martins, Jensen, Simon, Keller, & Winge, 1998) y FreA de *A. nidulans* (Oberegger et al., 2002). Los aminoácidos conservados en todas las proteínas están sombreados. Los dominios FRD, NOX-DUOX y FNR están indicadas por líneas. Las histidinas conservadas candidatas para la ligación de los grupos hemo están indicadas con cabezas de flecha. Los dominios putativos de unión al FAD y NADPH se muestran enmarcados. Los tres aminoácidos que se ha propuesto que definen a las NOX están encerrados en cuadros morados. El alineamiento se realizó con el programa T-COFFEE (<http://tcoffee.vital-it.ch/>) y se refinó con el programa GeneDoc (<http://www.psc.edu/biomed/genedoc>). Al final de cada alineamiento se muestra el cuadro de porcentajes de identidad correspondiente.

A





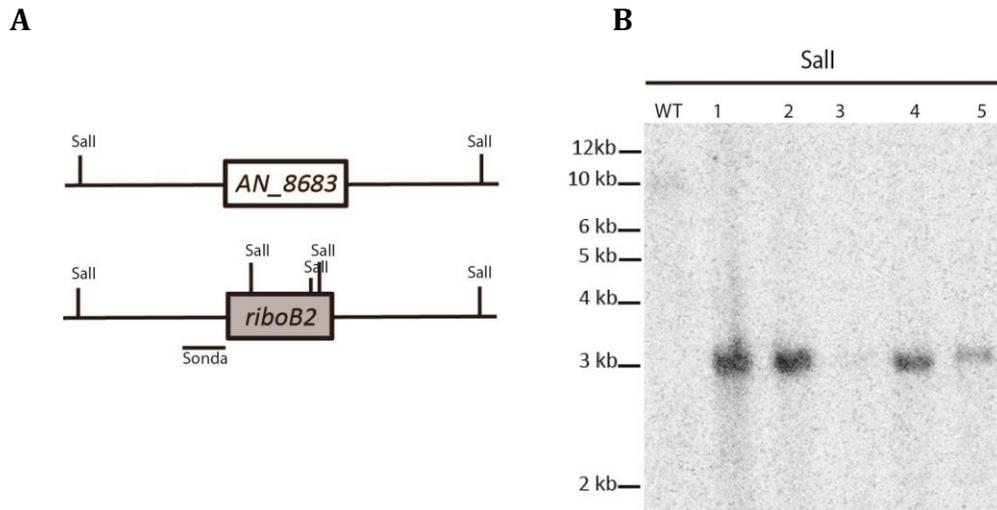
**Fig 12. Los hongos poseen proteínas conservadas del grupo FRE/NOX (preNOX).** **A)** Las proteínas más parecidas a Yno1 y AN8683 se alinearon con el programa SeaView (Gouy, Guindon, & Gascuel, 2010) usando MUSCLE (Edgar, 2004). El árbol se construyó usando el método de máxima verosimilitud con el algoritmo PhyML (Guindon et al., 2010) con el modelo WAG. Los números en las ramas son valores de 1000 repeticiones de bootstrap realizadas con el algoritmo de BioNeighbor Joining (BioNJ) (Gascuel, 1997b). Sólo se muestran valores mayores a 40. La topología del árbol se optimizó mediante el algoritmo del intercambio del vecino más cercano (Nearest neighbour Interchange, NNI). El árbol se coloreó con el programa FigTree (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>). Las proteínas se indican con el número de acceso en las bases de datos AGD (*A. nidulans*, *A. niger*, *A. terreus*, *A. flavus*, *A. fumigatus*) la FGI (*N. crassa*, *U. maydis*, *M. oryzae*) y la SGD (*S. cerevisiae*). Las ramas en azul corresponden a las proteínas que en las posiciones correspondiente a los aminoácidos H\_GT, que de acuerdo a Zhang et al (2013) definen a las NOX, en este grupo corresponden a F\_GT. **B)** Alineamiento de los dominios de las proteínas del grupo preNOX. Se muestran los dominios FRD y FNR de las enzimas identificadas pertenecientes al grupo preNOX. Los aminoácidos conservados en todas las proteínas están sombreados. Las histidinas conservadas candidatas para la ligación de los grupos hemo están indicadas con cabezas de flecha. La posición correspondiente a los aminoácidos H\_GT, que de acuerdo a Zhang et al (2013) definen a las NOX, en este grupo corresponden a F\_GT y están encerrados en cuadros amarillos. El sitio de unión al NADPH está encerrado en verde. El alineamiento se realizó con el programa T-COFFEE (<http://tcoffee.vital-it.ch/>) y se refinó con el programa BioEdit (Hall, 1999).

## 2.- Eliminación del gen An\_8683 mediante la técnica de PCRs sobrelapadas (Double Joint PCR)

Para eliminar el gen *AN\_8683*, se generó una construcción empleando la técnica de PCRs sobrelapadas (DJ PCR) (Yu et al., 2004). Se amplificaron mediante PCRs independientes, fragmentos de aproximadamente 1 kb río arriba y río abajo de la secuencia codificante del gen; así como el marcador de selección *riboB2* de *A. fumigatus* (C. E. Oakley, Weil, Kretz, & Oakley, 1987). Mediante otra PCR se obtuvo el producto de fusión que se usó para transformar *A. nidulans*, esperando que por un evento de doble recombinación homóloga se reemplazara el gen silvestre por el marcador de selección.

La transformación con dicha construcción se realizó mediante la electroporación de esporas electrocompetentes de la cepa 11035 (Tabla 1). Esta cepa tiene reemplazado el gen *nkuA* por el marcador de selección *argB2*, lo que favorece la recombinación homóloga en eventos de integración de ADN (Nayak et al., 2006). Se obtuvieron 5 transformantes que fueron confirmadas mediante hibridación tipo Southern Blot. Todas las transformantes obtenidas presentaron el evento deseado, aunque en

algunas transformantes la banda es un poco tenue (Fig. 13B). Esto confirmó que en estas mutantes el marcador *riboB2* reemplazó al gen *AN\_8683*. Se decidió trabajar con la transformante 1, a la que se le nombró TTP1 (Tabla 1).

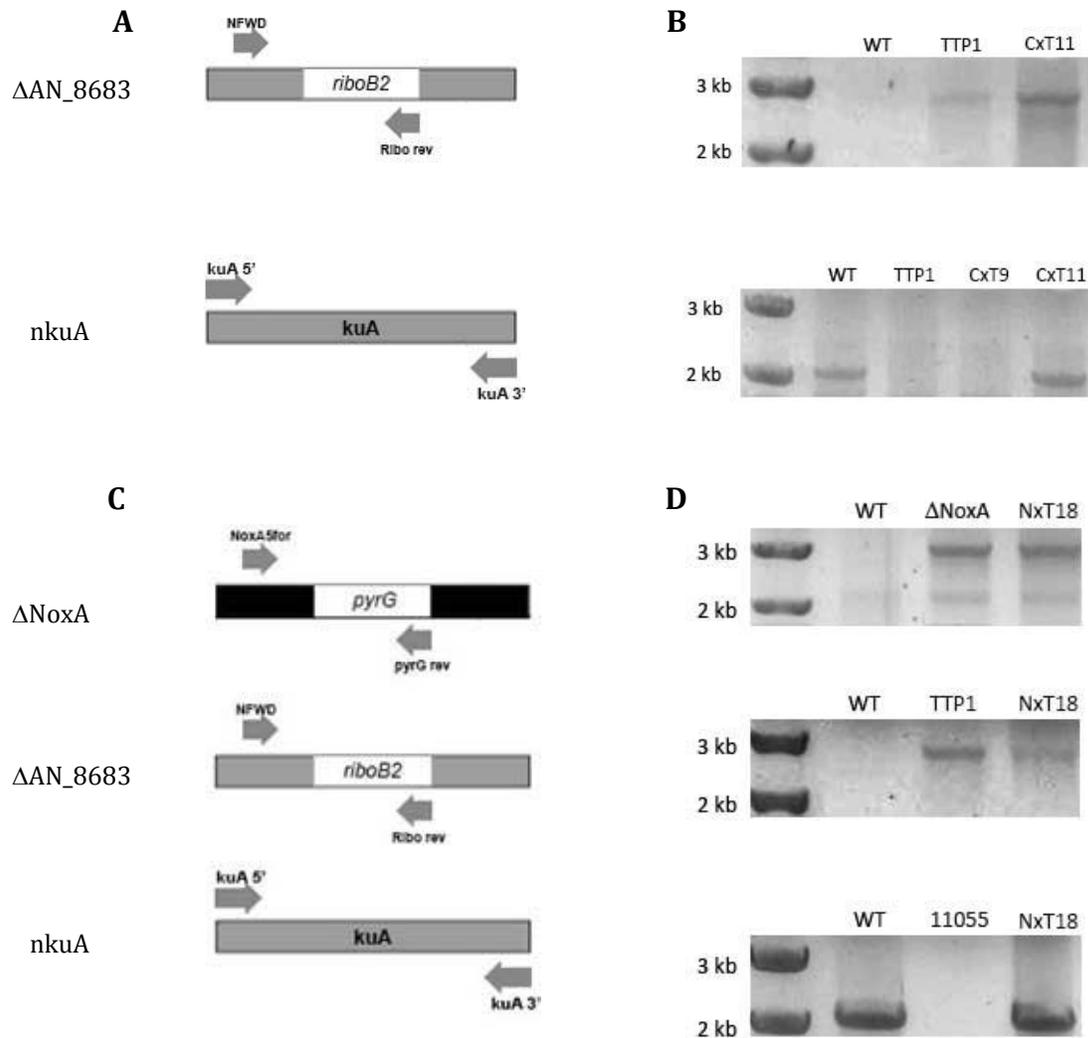


**Fig 13. Eliminación del gen *AN\_8683*.** **A)** La construcción generada mediante PCR para eliminar el gen *AN\_8683*, que contiene el gen *riboB2* como marcador selectivo, se usó para transformar la cepa 11035 de *A. nidulans*. El ADN de las cepas transformantes y de la cepa silvestre se digirió con la enzima *Sall* y se usó para la hibridación tipo Southern con la sonda indicada. **B)** El patrón de digestión de la cepa silvestre corresponde a una banda de 10 kb, mientras que la mutante  $\Delta AN_8683$  genera una banda de 3 kb. El ADN de las cepas 1 a 5 corresponde a transformantes de la cepa 11035; todas las transformantes muestran el evento esperado y de estas cepas se seleccionó de manera arbitraria a la transformante 1 a la cual se denominó TTP1.

Con el propósito de obtener las cepas  $\Delta AN_8683$  en un fondo isogénico se realizaron cruces sexuales de la mutante TTP1 con cepas silvestres en el gen *AN\_8683*. De esta progenie se obtuvo una posible candidata  $\Delta AN_8683$ , llamada CTP1, para comprobar que la cepa fuera mutante en el gen *AN\_8683* se realizó una PCR diagnóstica usando los oligos NFWD y Riboreverse (Tabla 2), que amplifican una banda de 2.8 kb (Fig. 14A y B).

La cepa 11035 carece del gen *nkuA*, que codifica una proteína con actividad recombinasa, lo que favorece la recombinación homóloga. La delección de este gen consiste en su reemplazo por el gen *argB*. Carecer de este gen no es conveniente a

largo plazo debido a que podrían fijarse mutaciones no deseadas (Nayak et al., 2006), por lo que para identificar que la cepa CTP1 contiene el gen silvestre *nkuA* se realizó



**Fig 14. Obtención de cepas isogénicas auxótrofas a PABA y con el gen silvestre *nkuA*.** A) Comprobación de la cepa  $\Delta AN_{8683}$ . PCRs diagnósticas empleando los oligos NFW y Riboreverse, para confirmar las mutación  $\Delta AN_{8683}$  y los oligos 5Dig-*nkuA* y 3Dig-*nkuA*, para comprobar la presencia del gen silvestre *nkuA* en la cepas obtenidas de la cruce CLK43xTTP1 (CxT). **B)** Sólo una cepa mostró el patrón de bandas deseado, CxT11 que fue denominada CTP1. Se utilizó ADN de la cepa silvestre CLK43 (WT), como control negativo y ADN de la cepa TTP1 como control positivo. **C)** Comprobación de la cepa  $\Delta NoxA \Delta AN_{8683}$  en fondo silvestre *nkuA*. PCRs diagnósticas con los oligos noxA5for-pyrGreverse, para confirmar la delección del gen *noxA*; NFW-riboreverse, para confirmar la eliminación del gen  $AN_{8683}$  y 5Dig-*nkuA* y 3Dig-*nkuA* para comprobar la presencia del gen silvestre *nkuA* en cepas obtenidas de la cruce  $\Delta NoxA$ xTTP1 (NxT) **D)** Únicamente la cepa NxT18 mostró el patrón de bandas deseado y se denominó CTP2. Se utilizó ADN de la cepa silvestre CLK43 (WT), como control negativo y como controles positivos ADN de la cepa CAH4 y TTP1, respectivamente.

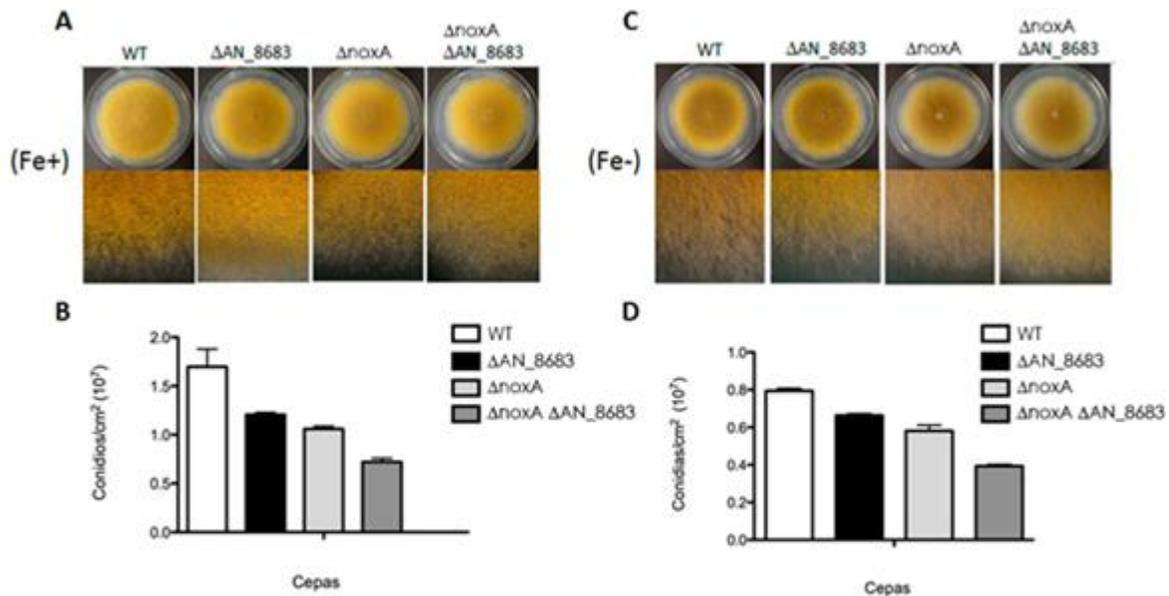
PCR diagnóstica con los oligos 5Dig-nkuA y 3Dig-nkuA (Tabla 2) que amplifican una banda de 2078 pdb (Fig. 14A y B).

Debido a que en *Aspergillus nidulans*, se había reportado previamente una enzima NOX (NoxA) la cual es esencial para el desarrollo sexual (Lara-Ortiz et al., 2003), se realizaron cruza sexuales de la mutante TTP1 con cepas mutantes en el gen *noxA*, ya que si el gen *AN\_8683* codificará para una proteína con actividad de NOX nos interesó saber cómo se comportaría una cepa carente de ambas proteínas. De la progenie se obtuvo 1 posible candidata que fue comprobada mediante PCR diagnóstica empleando los oligos NoxA5for y pyrGreverse (Tabla 2), que amplifican una banda de 2.9kb (Fig. 14C y D). Al igual que en las mutantes sencillas, para corroborar la presencia del gen silvestre *nkuA* se emplearon los oligos 5Dig-nkuA y 3Dig-nkuA (Tabla 2) que amplifican un producto de 2078 pdb en las cepas que poseen este gen. De la progenie se obtuvo 1 posible candidata que fue comprobada mediante PCR diagnóstica (Fig. 14D).

### 3.-La eliminación del gen *AN\_8683* afecta la conidiación

Se ha descrito que la delección en el gen *noxA* produce severos efectos en la conidiación, ya que la reduce en aproximadamente 50% con respecto a una cepa silvestre (Becerril y Aguirre, datos no publicados). Debido a que el gen *AN\_8683* podría codificar para una proteína con actividad de NOX decidimos cuantificar la producción de esporas en la cepa carente del gen *AN\_8683*. Como se puede apreciar en la figura 15A, el borde de las colonias de las cepas carentes de uno ( $\Delta noxA$  ó  $\Delta AN_8683$ ) o ambos genes ( $\Delta noxA \Delta AN_8683$ ) es distinto al de una cepa silvestre, lo que a simple vista da la impresión de que carecer de alguna de estas dos proteínas reduce la conidiación. Para comprobar esto se realizó la cuantificación total de conidias en todas las cepas (Fig. 15B). Debido a que el gen *AN\_8683* podría codificar para una proteína con actividad de FRE, decidimos realizar la cuantificación de crecimiento y esporulación asexual en ausencia (Fe-) y presencia (Fe+) de hierro. En

las Figuras 15C y 15D se puede apreciar que la carencia de hierro no afecta el crecimiento radial de ninguna de las cepas, pero si tiene un efecto negativo en la esporulación tanto en la cepa silvestre como en las mutantes. Sin embargo, las mutantes  $\Delta AN\_8683$  (CTP1) y  $\Delta noxA$  (CAH4) mostraron una conidiación menor que la de la cepa silvestre tanto en presencia como en ausencia de hierro en el medio.

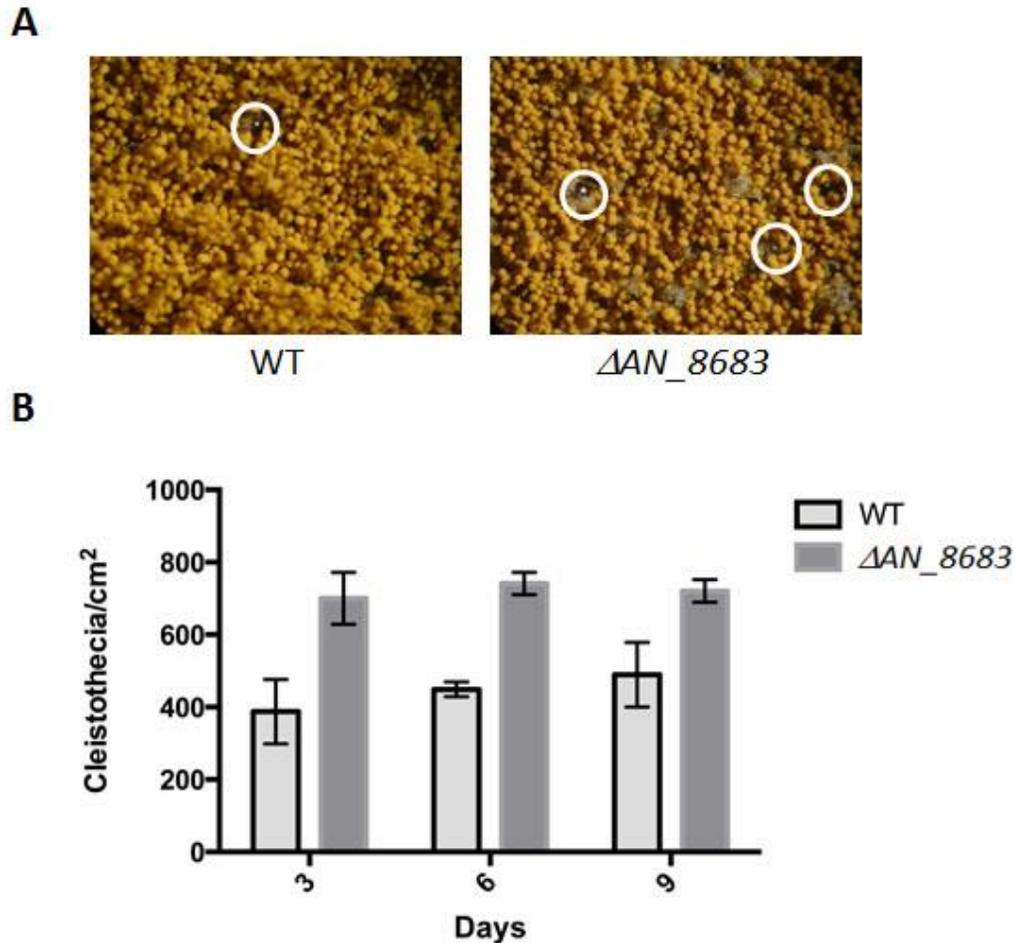


**Fig 15. La posible reductasa de hierro *AN\_8683* y la NADPH oxidasa *NoxA* regulan la conidiación.** **A), C)** En los paneles superiores, se inocularon esporas ( $1 \times 10^5$ ) de las cepas CLK43 (WT), CAH4 ( $\Delta noxA$ ), CTP1 ( $\Delta AN\_8683$ ) y CTP2 ( $\Delta noxA \Delta AN\_8683$ ) en el centro de cajas Petri con medio mínimo (con hierro) y en medio Pontecorvo (sin hierro) y se incubaron a 37°C por 5 días. **B), D)** Cuantificación de esporas totales de las cepas mostradas en **A)** y **C)**. Se calculó el área de las colonias y se obtuvo la cantidad de esporas/cm<sup>2</sup>. Se muestra el promedio de cuatro experimentos independientes, las barras indican la desviación estándar.

Notablemente, en ambas condiciones el defecto en la conidiación se vio incrementado en la doble mutante. Por un lado, estos resultados indican que la proteína AN\_8683 no se requiere para crecer en condiciones de limitación de hierro. Por otro lado, los resultados también indican que tanto AN\_8683 como NoxA se requieren para conidiar normalmente y que ambas proteínas contribuyen a la conidiación de manera independiente.

#### 4.-Las cepas $\Delta AN_{8683}$ generan más cleistotecios

Se ha reportado que una cepa carente del gen *noxA* está bloqueada en el desarrollo sexual (Lara-Ortiz et al., 2003), por lo tanto decidimos seguir el desarrollo sexual en las cepas carentes del gen  $\Delta AN_{8683}$  o de ambos genes ( $\Delta noxA \Delta AN_{8683}$ ).



**Fig 16. La delección de la posible reductasa férrica  $AN_{8683}$  causa una exacerbación del desarrollo sexual.** (A) Las cepas CLK43 (WT) y CTP1 ( $\Delta AN_{8683}$ ) se indujeron sexualmente en placas a confluencia como se reportó previamente (Kawasaki, Sanchez, Shiozaki, & Aguirre, 2002). Las fotografías se tomaron después de nueve días de inducción. Bajo estas condiciones la mutante  $\Delta AN_{8683}$  produce más células Hülle y cleistotecios que una cepa silvestre (WT) (B). Las cepas CLK43 (WT) y CTP1 ( $\Delta AN_{8683}$ ) se indujeron sexualmente como en (A) y se tomaron muestras cada 72h (ver Material y Métodos). El número total de cleistotecios por área se contó en microscopio estereoscópico y se calculó el número de cleistotecios por cm<sup>2</sup> como reporta (Kawasaki et al., 2002). Los datos muestran el promedio de tres experimentos independientes; las barras indican la desviación estándar.

La mutante carente de ambos genes ( $\Delta noxA \Delta AN\_8683$ ) resultó incapaz de generar cleistotecios, es decir, se comporta como una cepa sin el gen *noxA* (datos no mostrados). Sin embargo, como se puede observar en la figura 16A, la cepa  $\Delta AN\_8683$  parecía generar más cleistotecios que una cepa silvestre, por lo que procedimos a realizar la cuantificación de éstos. Como se puede observar en la Fig. 16B, la delección del gen *AN\_8683* provoca una clara exacerbación del ciclo sexual, indicando que NoxA y AN\_8683 regulan de manera opuesta la diferenciación sexual en *A. nidulans*.

## DISCUSIÓN

En los hongos las NADPH oxidasas (NOX) son esenciales para el desarrollo sexual (Aguirre et al., 2005; Cano-Dominguez et al., 2008; Lara-Ortiz et al., 2003; Malagnac et al., 2004; Tudzynski et al., 2012). Las NOX y las FRE son proteínas homólogas que comparten dominios (M. Wang et al., 1997), por lo que es difícil diferenciarlas estructuralmente. Sin embargo, diversos análisis filogenéticos (Aguirre et al., 2005; Kawahara et al., 2007) han indicado que los hongos poseen 3 subfamilias de NOX (NOXA-C). Esta visión se modificó recientemente cuando se reportó que la proteína Yno1 de levadura tiene actividad de NOX (Rinnerthaler et al., 2012). Anteriormente Yno1 se consideró una FRE y se colocó en la familia de FRE8 (Blatzer et al., 2011; Grissa et al., 2010). Sin embargo, YNO1 parecía no tener actividad de FRE, debido a que no se expresaba en condiciones de bajo hierro o cobre (Martins et al., 1998; Yun et al., 2001).

Estos resultados nos llevaron a buscar homólogos de Yno1 en *A. nidulans* ya que hasta ahora se ha considerado que los hongos del género *Aspergillus* poseen una sola enzima NOX (Lara-Ortiz et al., 2003). Inicialmente, nuestro análisis bioinformático identificó a la proteína AN\_8683 como posible homóloga de Yno1 en *A. nidulans*. Sin embargo, una comparación más detallada entre Yno1 y AN\_8683 muestra diferencias importantes entre ambas proteínas:

1. Recientemente se propuso que las enzimas NOX poseen 3 aminoácidos conservados que no están presentes en las FRE (Zhang et al., 2013). Estos aminoácidos, de acuerdo con su posición en la estructura primaria de NOX2, son H-119, T-178 y G-179 (H\_TG; indicados en cuadros amarillos las figuras 11A y B). En efecto, éstos aminoácidos están presentes en NoxA de *A. nidulans* y Nox5 de humano (Fig. 11A) y están poco conservados en FreA de *A. nidulans*, Yno1 y Fre7 de *S. cerevisiae* (Fig. 11B). Ni Yno1, ni AN\_8683 cumplen con esta regla. En Yno1 los aminoácidos correspondientes son F\_VG, mientras que en AN\_8683 estos son F\_TG. Sin embargo, el hecho de que dos de

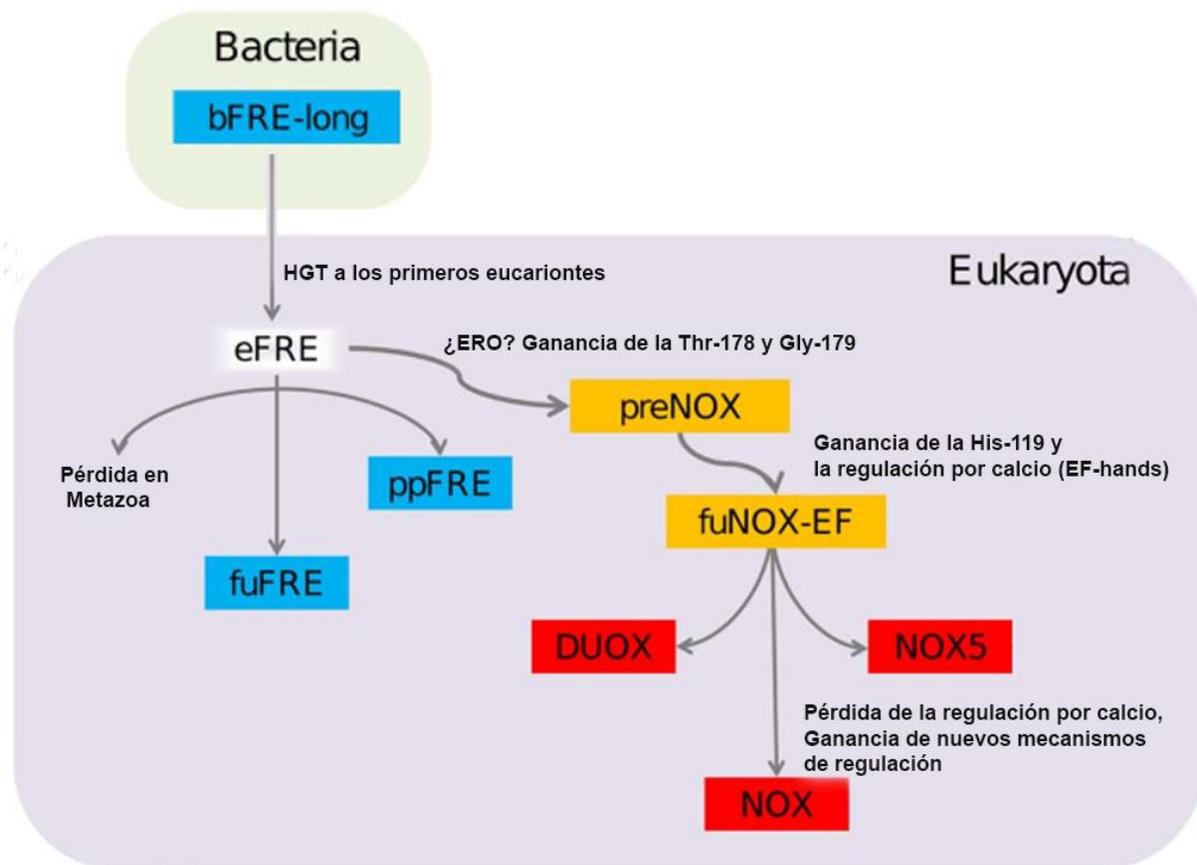
los tres aminoácidos conservados en las NOX estén presentes en AN\_8683 (Fig. 11A) sugiere que esta proteína podría tener actividad de NOX, a pesar de que la histidina 119 está substituido por una fenilalanina en AN\_8683. Se ha propuesto que en las proteínas mioglobina y hemoglobina, que contienen grupos hemo involucrados en el transporte de oxígeno, esta histidina estabiliza la unión del oxígeno (Olson et al., 1988). En las NOX la histidina 119 podría estabilizar el ligando del grupo hemo proximal, debido a que este aminoácido está muy conservado en la mayoría de los homólogos del grupo NOX (Zhang et al., 2013). Sin embargo, la NOXC de *D. discoideum*, carece de esta histidina y en su lugar posee un residuo de triptófano (Lardy et al., 2005) que, siendo también un aminoácido aromático, podría llevar a cabo una función similar. Es posible carácter aromático de la fenilalanina presente en Yno1 y AN\_8683, permitan llevar a cabo una función similar a la H-119 presente en las NOX, aunque con distinta afinidad y capacidad para producir superóxido.

2. Por otra parte, se ha reportado que el sitio de unión al NADPH del dominio FNR de Yno1 [FSCGPPS] es más parecido al de las proteínas DUOX que al de las FRE (Fig. 11 A y B) (Rinnerthaler et al., 2012). Sin embargo, en AN\_8683 este sitio de unión al NADPH [VYVCGPPS] se alinea mejor con el de las proteínas NOX, como se observa en la figura 11A. De acuerdo con este criterio, AN\_8683 es más parecida a una NOX que Yno1.

3. Se ha reportado que el número de aminoácidos intermedios entre las histidinas que coordinan los grupos hemo está muy conservado en animales, algas, plantas y hongos. El primer par de Histidinas tiene una separación de 13 aminoácidos, tanto en NOX como en FRE (Fig. 11A y B). Sin embargo, el número de residuos entre el segundo par de Histidinas varía entre proteínas, ya que en las FRE hay 13 aminoácidos (Fig. 11B), mientras que en las NOX sólo hay 12 (Fig. 11A) (Sumimoto, 2008). En este aspecto, Yno1 y AN\_8683 tienen una separación de 13 aminoácidos. De acuerdo con esto, tanto Yno1 como AN\_8683 tienen mayor similitud con las FRE que con la NOX (Fig. 11A).

Zhang y colaboradores (2013) han propuesto que en la base de la divergencia evolutiva del grupo NOX, surgió un tipo de proteínas con características de FRE y NOX,

es decir FRE con actividad de NOX. De acuerdo con esto, las FRE bacterianas pasaron a los eucariontes mediante transferencia horizontal de genes y posteriormente divergieron originando por un lado las FRE de hongos, protistas y plantas, y por otro hubo una ganancia de la Thr-178 y la Gly-179, que probablemente son necesarias para la producción de ERO, originando el grupo de las enzimas preNOX (Fig. 17), del que más tarde se originaría el grupo NOX.



**Fig 17. Modelo propuesto para explicar la historia evolutiva de las NOX.** Las FRE bacterianas (bFRE) pasaron mediante un evento de transferencia horizontal génica (HGT) a los eucariontes (eFRE), originando por un lado, las FRE de hongos (fuFRE) y las FRE de plantas y protistas (ppFRE), y por otro lado el grupo de las preNOX, al adquirir la Thr-178 y la Gly-179. De este grupo divergieron las NOX de hongos (fuNOX-EF) y posteriormente las NOX de mamíferos (Modificado de Zhang., et-al 2013).

De acuerdo con este análisis y la identificación de la proteína AN\_8683 como una posible NOX en *A. nidulans*, nos interesó examinar la presencia de este tipo de proteínas en otros hongos Ascomycetos y Basidiomicetos. Nuestro análisis filogenético (Fig. 12A) mostró la presencia de cuatro clados principales. Los clados de las NOX e YNO1/FRE8 se diferencian claramente del resto. Mientras que hay evidencia experimental de que Yno1 produce ERO (Rinnerthaler et al., 2012); sobre FRE8 sólo se sabe que es importante para crecer en limitación de hierro (De Freitas et al., 2004).

El clado de las proteínas FRE está dividido en dos grupos. El primer grupo, que hemos nombrado Fre/Nox, está conformado por proteínas que contienen dos de los aminoácidos que supuestamente caracterizan a las NOX, es decir, el dipéptido TG. Estas proteínas carecen de la His-119 (Fig. 12B) y la mayoría contiene en esa posición aminoácidos aromáticos que podría estar supliendo la función de la histidina. Además, las proteínas de este grupo tienen el sitio de unión a NADPH del dominio FNR muy conservado entre ellas y como se había visto en la figura 11A, más parecido al de las NOX. Este grupo incluye a FRE7, que es una reductasa férrica exclusiva de cobre (Yun et al., 2001). Es de notar que *Ustilago maydis* posee 3 proteínas del grupo FRE/NOX, ya que al igual que *S. cerevisiae*, este hongo carece de NOX canónicas. Sin embargo *M. oryzae* que tiene 3 NOX canónicas también posee 3 proteínas del grupo FRE/NOX (Fig. 12A).

*A. nidulans* posee una segunda proteína del grupo FRE/NOX, la llamada AN\_10893, que muestra una identidad de 27% con respecto a AN\_8683 (Fig. 10).

En el segundo grupo de este clado se encuentran las FRE canónicas involucradas en la RIA, que únicamente conservan la Gly-179 (datos no mostrados). Las FRE1-6 de levadura se localizan en este grupo (Fig. 12A).

En resumen, este análisis indica la existencia de cuatro tipos de proteínas, las NOX canónicas que producen  $O_2^-$ , las NOX similares a YNO1 que parecen producir  $O_2^-$ , las FRE con los aminoácidos X\_TG, donde X es un aminoácido aromático, que podrían

producir ERO y las FRE canónicas que reducen metales para su posterior internalización celular. Determinar si el grupo de las FRE/NOX posee actividad de NOX requiere de un análisis experimental de estas proteínas.

Nuestros resultados experimentales mostraron que el gen *AN\_8683* no se requiere para crecer en bajo hierro, lo cual sugeriría que este no codifica para una FRE. Sin embargo, existen 9 genes FRE en el genoma de *A. nidulans*, por lo que es posible que la inactivación de uno solo no tuviese efectos notables en la asimilación del hierro.

A favor de que *AN\_8683* codifique para una NOX está el hecho de que su eliminación haya causado una disminución en la conidiación, ya que este es un fenotipo observado en las mutantes que carecen de la NOX NoxA. Es interesante que una cepa carente de ambos genes  $\Delta noxA\Delta AN_8683$  produce aún menos conidias que las cepas carentes de *noxA* o *AN\_8683*, lo cual indica que las actividades de NoxA y *AN\_8683* contribuyen de manera independiente a la conidiación en *A. nidulans*.

La disminución en la conidiación en las mutantes *noxA* y  $\Delta AN_8683$  podría relacionarse con resultados reportados recientemente en *M. oryzae* (Ryder et al., 2013). En este hongo patógeno de plantas, las NOX se requieren para formar un anillo de septina, un componente del citoesqueleto celular. Este anillo se forma en la región del apresorio, a partir de la cual se genera una hifa muy delgada que penetra la epidermis de la planta huésped. *A. nidulans* posee 5 septinas diferentes y se ha reportado que durante la conidiogénesis de *A. nidulans* la septina AspB es esencial. La carencia del gen *aspB* produce un amplio rango de fenotipos anormales en los conidióforos que resultan en pequeñas cadenas de conidias y por lo tanto en una menor conidiación (Hernandez-Rodriguez, Hastings, & Momany, 2012; Momany & Hamer, 1997; Westfall & Momany, 2002). Es posible que tanto NoxA como *AN\_8683* contribuyan a la conidiación a través de la formación de anillos de septina.

Contrario a lo observado durante la conidiación, la eliminación de *noxA* y *AN\_8683* tuvo efectos opuestos en el desarrollo sexual. Mientras que la eliminación del gen

*noxA* bloquea el desarrollo sexual (Lara-Ortiz et al., 2003), la cepa  $\Delta AN\_8683$  mostró una exacerbación del ciclo sexual, produciendo una mayor cantidad de cleistotecios en comparación con una cepa silvestre (Fig. 16) y una mutante doble ( $\Delta noxA \Delta AN\_8683$ ) fue incapaz de producir cleistotecios (datos no mostrados). Se sabe que la sobreexpresión de *noxA* causa una producción prematura y alta de cleistotecios (Lara-Ortiz et al., 2003). Una posibilidad a explorar es que la carencia de *AN\_8683* cause una sobreexpresión de *noxA*.

Desconocemos cómo es que el gen *AN\_8683* podría estar regulando el desarrollo asexual y sexual en *A. nidulans*. Las FRE, también podrían tener papeles importantes durante el desarrollo. En *N. crassa* se ha visto que durante la conidiación, cinco genes que codifican posibles proteínas FRE se sobreexpresan durante las primeras 3 horas de crecimiento, y uno de los genes disminuye su expresión durante la conidiación (Grissa et al., 2010). En *P. anserina* se ha reportado que los genes *nox* no se regulan significativamente durante la maduración de las estructuras sexuales (peritecios) y el crecimiento vegetativo (Brun et al., 2009). En cambio, la expresión de algunas FRE se modifica durante el desarrollo del hongo, específicamente durante el crecimiento vegetativo y el desarrollo sexual (formación del peritecio) (Grissa et al., 2010). Finalmente, en *P. anserina* la expresión de tres genes FRE se ve incrementada en una cepa  $\Delta nox1$ , la cual degrada celulosa más eficientemente y produce una mayor cantidad de ERO que una cepa silvestre (Brun et al., 2009; Malagnac et al., 2004). Estos resultados muestran que es necesario profundizar en el análisis de la proteína *AN\_8683* antes de poder concluir que esta posee actividad de NOX. De cualquier forma, las funciones de *AN\_8683* en la conidiación y el ciclo sexual hacen interesante su estudio *per se*.

## CONCLUSIONES

La secuencia de las proteínas codificada por los genes *AN\_8683* y *AN\_10893* poseen dos de tres aminoácidos conservados en las enzimas preNOX y ausentes en las FRE, además de una mayor similitud con las NOX verdaderas en los sitios de unión al NADPH y FAD, lo cual sugiere que estas 2 proteínas tengan actividad de NOX.

Las mutantes carentes del gen *AN\_8683* no están afectadas en el crecimiento radial, aún en condiciones de bajo hierro, pero sí en la conidiación, debido a que producen menos conidias que una cepa silvestre. La producción de conidias en una cepa  $\Delta noxA\Delta AN_8683$  es menor a la de una cepa  $\Delta AN_8683$ . La actividad de *AN\_8683* y *noxA* en el desarrollo vegetativo es aditivo.

*AN\_8683* también juega un papel importante en el desarrollo sexual de *A. nidulans* mediante un mecanismo que desconocemos, debido a que las cepas mutantes  $\Delta AN_8683$  presentan un incremento de cleistotecios con respecto a una cepa silvestre.

## PERSPECTIVAS

- Generar una mutante  $\Delta AN_{10893}$ , caracterizarla y cruzarla con una cepa  $\Delta AN_{8683} \Delta noxA$  para obtener mutantes triples y caracterizar su crecimiento y desarrollo.
- Substituir el ORF de NoxA por el de AN\_8683 y determinar si esta última puede suplir la función de NoxA en la diferenciación sexual.
- Medir la expresión de AN\_8683 durante el desarrollo vegetativo y la diferenciación sexual.
- Determinar la localización de AN\_8683 mediante fusiones con la proteína fluorescente kmRFP.
- Generar mutantes puntuales de NoxA y AN\_8683
- Determinar detalladamente la morfología de los conidióforos de las mutantes  $\Delta noxA$  y  $\Delta AN_{8683}$  sencillas y dobles en distintos estadios del desarrollo.
- Medir la cantidad de ERO producidas por las mutantes  $\Delta AN_{8683}$  y  $\Delta noxA$   $\Delta AN_{8683}$

## REFERENCIAS

- Adams, T. H., Boylan, M. T., & Timberlake, W. E. (1988). Brla Is Necessary and Sufficient to Direct Conidiophore Development in *Aspergillus-Nidulans*. *Cell*, 54(3), 353-362. doi: Doi 10.1016/0092-8674(88)90198-5
- Adams, T. H., Wieser, J. K., & Yu, J. H. (1998). Asexual sporulation in *Aspergillus nidulans*. *Microbiol Mol Biol Rev*, 62(1), 35-54.
- Adams, T. H., & Yu, J. H. (1998). Coordinate control of secondary metabolite production and asexual sporulation in *Aspergillus nidulans*. *Curr Opin Microbiol*, 1(6), 674-677.
- Ago, T., Kitazono, T., Ooboshi, H., Iyama, T., Han, Y. H., Takada, J., . . . Iida, M. (2004). Nox4 as the major catalytic component of an endothelial NAD(P)H oxidase. *Circulation*, 109(2), 227-233. doi: Doi 10.1161/01.Cir.0000105680.92873.70
- Ago, T., Nunoi, H., Ito, T., & Sumimoto, H. (1999). Mechanism for phosphorylation-induced activation of the phagocyte NADPH oxidase protein p47(phox). Triple replacement of serines 303, 304, and 328 with aspartates disrupts the SH3 domain-mediated intramolecular interaction in p47(phox), thereby activating the oxidase. *J Biol Chem*, 274(47), 33644-33653.
- Ago, T., Takeya, R., Hiroaki, H., Kuribayashi, F., Ito, T., Kohda, D., & Sumimoto, H. (2001). The PX domain as a novel phosphoinositide-binding module. *Biochem Biophys Res Commun*, 287(3), 733-738. doi: DOI 10.1006/bbrc.2001.5629
- Aguirre, J., & Lambeth, J. D. (2010). Nox enzymes from fungus to fly to fish and what they tell us about Nox function in mammals. *Free Radic Biol Med*, 49(9), 1342-1353. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2010.07.027
- Aguirre, J., Rios-Momberg, M., Hewitt, D., & Hansberg, W. (2005). Reactive oxygen species and development in microbial eukaryotes. *Trends Microbiol*, 13(3), 111-118. doi: 10.1016/j.tim.2005.01.007
- Ameziane-El-Hassani, R., Morand, S., Boucher, J. L., Frapart, Y. M., Apostolou, D., Agnandji, D., . . . Dupuy, C. (2005). Dual oxidase-2 has an intrinsic Ca<sup>2+</sup>-dependent H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-generating activity. *Journal of Biological Chemistry*, 280(34), 30046-30054. doi: DOI 10.1074/jbc.M500516200
- Arst, H. N., & Penalva, M. A. (2003). pH regulation in *Aspergillus* and parallels with higher eukaryotic regulatory systems. *Trends Genet*, 19(4), 224-231.
- Axelrod, D. E., Gealt, M., & Pastusho, M. (1973). Gene Control of Developmental Competence in *Aspergillus-Nidulans*. *Dev Biol*, 34(1), 9-15. doi: Doi 10.1016/0012-1606(73)90335-7
- Bagnaresi, P., Basso, B., & Pupillo, P. (1997). The NADH-dependent Fe(3+)-chelate reductases of tomato roots. *Planta*, 202(4), 427-434.
- Baldridge, C. W., & Gerard, R. W. (1933). The extra respiration of phagocytosis. *American Journal of Physiology*, 103(1), 235-236.
- Banfi, B., Malgrange, B., Knisz, J., Steger, K., Dubois-Dauphin, M., & Krause, K. H. (2004). NOX3, a superoxide-generating NADPH oxidase of the inner ear. *J Biol Chem*, 279(44), 46065-46072. doi: 10.1074/jbc.M403046200
- Banfi, B., Molnar, G., Maturana, A., Steger, K., Hegedus, B., Demaux, N., & Krause, K. H. (2001). A Ca(2+)-activated NADPH oxidase in testis, spleen, and lymph nodes. *J Biol Chem*, 276(40), 37594-37601. doi: 10.1074/jbc.M103034200

- Batot, G., Martel, C., Capdeville, N., Wientjes, F., & Morel, F. (1995). Characterization of neutrophil NADPH oxidase activity reconstituted in a cell-free assay using specific monoclonal antibodies raised against cytochrome b558. *Eur J Biochem*, *234*(1), 208-215.
- Bayram, O., & Braus, G. H. (2012). Coordination of secondary metabolism and development in fungi: the velvet family of regulatory proteins. *FEMS Microbiol Rev*, *36*(1), 1-24. doi: 10.1111/j.1574-6976.2011.00285.x
- BelAiba, R. S., Djordjevic, T., Petry, A., Diemer, K., Bonello, S., Banfi, B., . . . Gorlach, A. (2007). NOX5 variants are functionally active in endothelial cells. *Free Radic Biol Med*, *42*(4), 446-459. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2006.10.054
- Blatzer, M., Binder, U., & Haas, H. (2011). The metalloredutase FreB is involved in adaptation of *Aspergillus fumigatus* to iron starvation. *Fungal Genet Biol*, *48*(11), 1027-1033. doi: 10.1016/j.fgb.2011.07.009
- Brambl, R. M., G. A. (2004). A comprehensive treatise on Fungi as experimental systems for basic and applied research *The mycota* (Vol. II). Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.
- Brar, S. S., Kennedy, T. P., Sturrock, A. B., Huecksteadt, T. P., Quinn, M. T., Whorton, A. R., & Hoidal, J. R. (2002). An NAD(P)H oxidase regulates growth and transcription in melanoma cells. *Am J Physiol Cell Physiol*, *282*(6), C1212-1224. doi: 10.1152/ajpcell.00496.2001
- Braus, G. H. K., S.; Eckert, S. E. (2002). Sexual Development in Ascomycetes fruit body formation of *Aspergillus nidulans*. In H. D. Osiewacz (Ed.), *Molecular Biology of Fungal Development* (pp. 223-252). 270 Madison Avenue, New York: CRC Press.
- Brown, D. I., & Griendling, K. K. (2009). Nox proteins in signal transduction. *Free Radic Biol Med*, *47*(9), 1239-1253. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2009.07.023
- Brun, S., Malagnac, F., Bidard, F., Lalucque, H., & Silar, P. (2009). Functions and regulation of the Nox family in the filamentous fungus *Podospora anserina*: a new role in cellulose degradation. *Mol Microbiol*, *74*(2), 480-496. doi: 10.1111/j.1365-2958.2009.06878.x
- Cano-Dominguez, N., Alvarez-Delfin, K., Hansberg, W., & 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*(8), 1352-1361. doi: 10.1128/EC.00137-08
- Clempus, R. E., Sorescu, D., Dikalova, A. E., Pounkova, L., Jo, P., Sorescu, G. P., . . . Griendling, K. K. (2007). Nox4 is required for maintenance of the differentiated vascular smooth muscle cell phenotype. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*, *27*(1), 42-48. doi: Doi 10.1161/01.Atv.0000251500.94478.18
- Clutterbuck, A. J. (1969). A mutational analysis of conidial development in *Aspergillus nidulans*. *Genetics*, *63*(2), 317-327.
- Coates, J., Jahn, U., & Weetman, D. F. (1982). The existence of a new subtype of alpha-adrenoceptor on the rat anococcygeus is revealed by SGD 101/75 and phenoxybenzamine. *Br J Pharmacol*, *75*(3), 549-552.
- Crichton, R. R., & Pierre, J. L. (2001). Old iron, young copper: from Mars to Venus. *Biometals*, *14*(2), 99-112.
- Cross, A. R., & Jones, O. T. (1991). Enzymic mechanisms of superoxide production. *Biochim Biophys Acta*, *1057*(3), 281-298.

- Cross, A. R., Rae, J., & Curnutte, J. T. (1995). Cytochrome b of the Neutrophil Superoxide-generating System Contains Two Nonidentical Hemes: POTENTIOMETRIC STUDIES OF A MUTANT FORM OF gp91. *Journal of Biological Chemistry*, 270(29), 17075-17077. doi: 10.1074/jbc.270.29.17075
- Cui, X. L., Brockman, D., Campos, B., & Myatt, L. (2006). Expression of NADPH oxidase isoform 1 (Nox1) in human placenta: involvement in preeclampsia. *Placenta*, 27(4-5), 422-431. doi: 10.1016/j.placenta.2005.04.004
- Chamulitrat, W., Stremmel, W., Kawahara, T., Rokutan, K., Fujii, H., Wingler, K., . . . Schmidt, R. (2004). A constitutive NADPH oxidase-like system containing gp91phox homologs in human keratinocytes. *J Invest Dermatol*, 122(4), 1000-1009. doi: 10.1111/j.0022-202X.2004.22410.x
- Chen, K., Kirber, M. T., Xiao, H., Yang, Y., & Keane, J. F., Jr. (2008). Regulation of ROS signal transduction by NADPH oxidase 4 localization. *J Cell Biol*, 181(7), 1129-1139. doi: 10.1083/jcb.200709049
- Cheng, G., Cao, Z., Xu, X., van Meir, E. G., & Lambeth, J. D. (2001). Homologs of gp91phox: cloning and tissue expression of Nox3, Nox4, and Nox5. *Gene*, 269(1-2), 131-140.
- Cheng, G., & Lambeth, J. D. (2004). NOXO1, regulation of lipid binding, localization, and activation of Nox1 by the Phox homology (PX) domain. *J Biol Chem*, 279(6), 4737-4742. doi: 10.1074/jbc.M305968200
- Cheng, G., Ritsick, D., & Lambeth, J. D. (2004). Nox3 regulation by NOXO1, p47phox, and p67phox. *J Biol Chem*, 279(33), 34250-34255. doi: 10.1074/jbc.M400660200
- Dagdas, Y. F., Yoshino, K., Dagdas, G., Ryder, L. S., Bielska, E., Steinberg, G., & Talbot, N. J. (2012). Septin-mediated plant cell invasion by the rice blast fungus, *Magnaporthe oryzae*. *Science*, 336(6088), 1590-1595. doi: 10.1126/science.1222934
- Daiyasu, H., & Toh, H. (2000). Molecular evolution of the myeloperoxidase family. *J Mol Evol*, 51(5), 433-445.
- Dancis, A., Klausner, R. D., Hinnebusch, A. G., & Barriocanal, J. G. (1990). Genetic evidence that ferric reductase is required for iron uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, 10(5), 2294-2301.
- Dancis, A., Roman, D. G., Anderson, G. J., Hinnebusch, A. G., & Klausner, R. D. (1992). Ferric reductase of *Saccharomyces cerevisiae*: molecular characterization, role in iron uptake, and transcriptional control by iron. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89(9), 3869-3873.
- Davies, K. J. (2000). An overview of oxidative stress. *IUBMB Life*, 50(4-5), 241-244. doi: 10.1080/713803723
- De Deken, X., Wang, D., Many, M. C., Costagliola, S., Libert, F., Vassart, G., . . . Miot, F. (2000). Cloning of two human thyroid cDNAs encoding new members of the NADPH oxidase family. *J Biol Chem*, 275(30), 23227-23233. doi: 10.1074/jbc.M000916200
- De Freitas, J. M., Kim, J. H., Poynton, H., Su, T., Wintz, H., Fox, T., . . . Vulpe, C. (2004). Exploratory and confirmatory gene expression profiling of mac1Delta. *J Biol Chem*, 279(6), 4450-4458. doi: 10.1074/jbc.M212308200

- DeLeo, F. R., Nauseef, W. M., Jesaitis, A. J., Burritt, J. B., Clark, R. A., & Quinn, M. T. (1995). A domain of p47phox that interacts with human neutrophil flavocytochrome b558. *J Biol Chem*, *270*(44), 26246-26251.
- Desper, R., & Gascuel, O. (2002). Fast and accurate phylogeny reconstruction algorithms based on the minimum-evolution principle. *J Comput Biol*, *9*(5), 687-705. doi: 10.1089/106652702761034136
- Dhaunsi, G. S., Paintlia, M. K., Kaur, J., & Turner, R. B. (2004). NADPH oxidase in human lung fibroblasts. *J Biomed Sci*, *11*(5), 617-622. doi: 10.1159/000079674
- Diebold, B. A., & Bokoch, G. M. (2001). Molecular basis for Rac2 regulation of phagocyte NADPH oxidase. *Nat Immunol*, *2*(3), 211-215. doi: 10.1038/85259
- Dinauer, M. C., Pierce, E. A., Bruns, G. A., Curnutte, J. T., & Orkin, S. H. (1990). Human neutrophil cytochrome b light chain (p22-phox). Gene structure, chromosomal location, and mutations in cytochrome-negative autosomal recessive chronic granulomatous disease. *J Clin Invest*, *86*(5), 1729-1737. doi: 10.1172/JCI114898
- Doussiere, J., Gaillard, J., & Vignais, P. V. (1996). Electron transfer across the O<sub>2</sub>-generating flavocytochrome b of neutrophils. Evidence for a transition from a low-spin state to a high-spin state of the heme iron component. *Biochemistry*, *35*(41), 13400-13410. doi: 10.1021/bi960916b
- Dupuy, C., Ohayon, R., Valent, A., Noel-Hudson, M. S., Deme, D., & Virion, A. (1999). Purification of a novel flavoprotein involved in the thyroid NADPH oxidase. Cloning of the porcine and human cdnas. *J Biol Chem*, *274*(52), 37265-37269.
- Edgar, R. C. (2004). MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res*, *32*(5), 1792-1797. doi: 10.1093/nar/gkh340
- Egan, M. J., Wang, Z. Y., Jones, M. A., Smirnov, N., & 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*(28), 11772-11777. doi: 10.1073/pnas.0700574104
- Eichhorn, H., Lessing, F., Winterberg, B., Schirawski, J., Kamper, J., Muller, P., & Kahmann, R. (2006). A ferroxidation/permeation iron uptake system is required for virulence in *Ustilago maydis*. *Plant Cell*, *18*(11), 3332-3345. doi: 10.1105/tpc.106.043588
- El-Benna, J., Dang, P. M., Gougerot-Pocidalo, M. A., & Elbim, C. (2005). Phagocyte NADPH oxidase: a multicomponent enzyme essential for host defenses. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*, *53*(3), 199-206.
- El Hassani, R. A., Benfares, N., Caillou, B., Talbot, M., Sabourin, J. C., Belotte, V., . . . Dupuy, C. (2005). Dual oxidase2 is expressed all along the digestive tract. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, *288*(5), G933-942. doi: 10.1152/ajpgi.00198.2004
- Elliott, C. G. (1960). The Cytology of *Aspergillus-Nidulans*. *Genet Res*, *1*(3), 462-&
- Ellis, T. T., Don, R. R., & Alexopoulos, C. J. (1973). Hülle Cell Development in *Emericella nidulans*. *Mycologia*, *65*(5), 1028-1035. doi: 10.2307/3758285
- Ellmark, S. H. M., Disting, G. J., Fui, M. N. T., Guzzo-Pernell, N., & Drummond, G. R. (2005). The contribution of Nox4 to NADPH oxidase activity in mouse vascular

- smooth muscle. *Cardiovascular Research*, 65(2), 495-504. doi: DOI 10.1016/j.cardiores.2004.10.026
- Emmendorffer, A., Roesler, J., Elsner, J., Raeder, E., Lohmann-Matthes, M. L., & Meier, B. (1993). Production of oxygen radicals by fibroblasts and neutrophils from a patient with x-linked chronic granulomatous disease. *Eur J Haematol*, 51(4), 223-227.
- Finegold, A. A., Shatwell, K. P., Segal, A. W., Klausner, R. D., & Dancis, A. (1996). Intramembrane bis-heme motif for transmembrane electron transport conserved in a yeast iron reductase and the human NADPH oxidase. *J Biol Chem*, 271(49), 31021-31024.
- Finkel, T. (2003). Oxidant signals and oxidative stress. *Curr Opin Cell Biol*, 15(2), 247-254.
- Finn, R. D., Mistry, J., Tate, J., Coghill, P., Heger, A., Pollington, J. E., . . . Bateman, A. (2010). The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Res*, 38(Database issue), D211-222. doi: 10.1093/nar/gkp985
- Fischer, M. T., Sharma, R., Lim, J. L., Haider, L., Frischer, J. M., Drexhage, J., . . . Lassmann, H. (2012). NADPH oxidase expression in active multiple sclerosis lesions in relation to oxidative tissue damage and mitochondrial injury. *Brain*, 135(Pt 3), 886-899. doi: 10.1093/brain/aws012
- Fischer, R., & Timberlake, W. E. (1995). *Aspergillus nidulans* *apsA* (anucleate primary sterigmata) encodes a coiled-coil protein required for nuclear positioning and completion of asexual development. *J Cell Biol*, 128(4), 485-498.
- Foreman, J., Demidchik, V., Bothwell, J. H., Mylona, P., Miedema, H., Torres, M. A., . . . Dolan, L. (2003). Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulate plant cell growth. *Nature*, 422(6930), 442-446. doi: 10.1038/nature01485
- Forteza, R., Salathe, M., Miot, F., Forteza, R., & Conner, G. E. (2005). Regulated hydrogen peroxide production by duox in human airway epithelial cells. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 32(5), 462-469. doi: DOI 10.1165/rcmb.2004-03020C
- Foster, L. A. A. (2002). Utilization and cell-surface binding of hemin by *Histoplasma capsulatum*. *Canadian Journal of Microbiology*, 48(5), 437-442. doi: Doi 10.1139/W02-037
- Fraga, C. G. (2005). Relevance, essentiality and toxicity of trace elements in human health. *Mol Aspects Med*, 26(4-5), 235-244. doi: 10.1016/j.mam.2005.07.013
- Galagan, J. E., Calvo, S. E., Cuomo, C., Ma, L. J., Wortman, J. R., Batzoglou, S., . . . Birren, B. W. (2005). Sequencing of *Aspergillus nidulans* and comparative analysis with *A. fumigatus* and *A. oryzae*. *Nature*, 438(7071), 1105-1115. doi: 10.1038/nature04341
- Gascuel, O. (1997a). BIONJ: An improved version of the NJ algorithm based on a simple model of sequence data. *Mol Biol Evol*, 14(7), 685-695.
- Gascuel, O. (1997b). BIONJ: an improved version of the NJ algorithm based on a simple model of sequence data. *Mol Biol Evol*, 14(7), 685-695.
- Geiszt, M., Kopp, J. B., Varnai, P., & Leto, T. L. (2000). Identification of renox, an NAD(P)H oxidase in kidney. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(14), 8010-8014. doi: 10.1073/pnas.130135897

- Geiszt, M., & Leto, T. L. (2004). The Nox family of NAD(P)H oxidases: host defense and beyond. *J Biol Chem*, 279(50), 51715-51718. doi: 10.1074/jbc.R400024200
- Geiszt, M., Witta, J., Baffi, J., Lekstrom, K., & Leto, T. L. (2003). Dual oxidases represent novel hydrogen peroxide sources supporting mucosal surface host defense. *FASEB J*, 17(11), 1502-1504. doi: 10.1096/fj.02-1104fje
- Georgatsou, E., & Alexandraki, D. (1999). Regulated expression of the *Saccharomyces cerevisiae* Fre1p/Fre2p Fe/Cu reductase related genes. *Yeast*, 15(7), 573-584. doi: 10.1002/(SICI)1097-0061(199905)15:7<573::AID-YEA404>3.0.CO;2-7
- Georgatsou, E., Mavrogiannis, L. A., Fragiadakis, G. S., & Alexandraki, D. (1997). The yeast Fre1p/Fre2p cupric reductases facilitate copper uptake and are regulated by the copper-modulated Mac1p activator. *J Biol Chem*, 272(21), 13786-13792.
- Goldman, G. H., & Kafer, E. (2004). *Aspergillus nidulans* as a model system to characterize the DNA damage response in eukaryotes. *Fungal Genetics and Biology*, 41(4), 428-442. doi: DOI 10.1016/j.fgb.2003.12.001
- Gouy, M., Guindon, S., & Gascuel, O. (2010). SeaView version 4: A multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. *Mol Biol Evol*, 27(2), 221-224. doi: 10.1093/molbev/msp259
- Grissa, I., Bidard, F., Grognet, P., Grossetete, S., & Silar, P. (2010). The Nox/Ferric reductase/Ferric reductase-like families of Eumycetes. *Fungal Biol*, 114(9), 766-777. doi: 10.1016/j.funbio.2010.07.002
- Groemping, Y., Lapouge, K., Smerdon, S. J., & Rittinger, K. (2003). Molecular basis of phosphorylation-induced activation of the NADPH oxidase. *Cell*, 113(3), 343-355.
- Groom, Q. J., Torres, M. A., Fordham-Skelton, A. P., Hammond-Kosack, K. E., Robinson, N. J., & Jones, J. D. (1996). rbohA, a rice homologue of the mammalian gp91phox respiratory burst oxidase gene. *Plant J*, 10(3), 515-522.
- Guindon, S., Dufayard, J. F., Lefort, V., Anisimova, M., Hordijk, W., & Gascuel, O. (2010). New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. *Systematic Biology*, 59(3), 307-321. doi: 10.1093/sysbio/syq010
- Gunatilleke, I. A. U. N., Scazzocchio, C., & Arst, H. N. (1975). Cytoplasmic and Nuclear Mutations to Chloramphenicol Resistance in *Aspergillus-Nidulans*. *Molecular & General Genetics*, 137(3), 269-276. doi: Doi 10.1007/Bf00333022
- Haas, H., Eisendle, M., & Turgeon, B. G. (2008). Siderophores in fungal physiology and virulence. *Annu Rev Phytopathol*, 46, 149-187. doi: 10.1146/annurev.phyto.45.062806.094338
- Haigis, M. C., & Yankner, B. A. (2010). The aging stress response. *Molecular Cell*, 40(2), 333-344. doi: 10.1016/j.molcel.2010.10.002
- Hall, T. A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41, 95-98. doi: citeulike-article-id:691774
- Halliwell, B. (1989). Superoxide, iron, vascular endothelium and reperfusion injury. *Free Radic Res Commun*, 5(6), 315-318.
- Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. (1984). Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem J*, 219(1), 1-14.

- Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. (1986). Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: some problems and concepts. *Arch Biochem Biophys*, 246(2), 501-514.
- Halliwell, B. G., J.M.C. (1999). *Free radicals in biology and medicine*. Oxford University Press: Clarendon Press.
- Hammacott, J. E., Williams, P. H., & Cashmore, A. M. (2000). *Candida albicans* CFL1 encodes a functional ferric reductase activity that can rescue a *Saccharomyces cerevisiae* fre1 mutant. *Microbiology*, 146 ( Pt 4), 869-876.
- Han, C. H., Freeman, J. L., Lee, T., Motalebi, S. A., & Lambeth, J. D. (1998). Regulation of the neutrophil respiratory burst oxidase. Identification of an activation domain in p67(phox). *J Biol Chem*, 273(27), 16663-16668.
- Hansberg, W. (2002). Biología de las especies de oxígeno reactivas. *Mensaje bioquímico*, XXVI, 19-54.
- Harper, A. M., Chaplin, M. F., & Segal, A. W. (1985). Cytochrome-B-245 from Human-Neutrophils Is a Glycoprotein. *Biochemical Journal*, 227(3), 783-788.
- Hassett, R., Dix, D. R., Eide, D. J., & Kosman, D. J. (2000). The Fe(II) permease Fet4p functions as a low affinity copper transporter and supports normal copper trafficking in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemical Journal*, 351, 477-484. doi: Doi 10.1042/0264-6021:3510477
- Hassett, R., & Kosman, D. J. (1995). Evidence for Cu(II) reduction as a component of copper uptake by *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, 270(1), 128-134.
- Hassett, R. F., Yuan, D. S., & Kosman, D. J. (1998). Spectral and kinetic properties of the Fet3 protein from *Saccharomyces cerevisiae*, a multinuclear copper ferroxidase enzyme. *J Biol Chem*, 273(36), 23274-23282.
- Hernandez-Rodriguez, Y., Hastings, S., & Momany, M. (2012). The septin AspB in *Aspergillus nidulans* forms bars and filaments and plays roles in growth emergence and conidiation. *Eukaryot Cell*, 11(3), 311-323. doi: 10.1128/EC.05164-11
- Hicks, J. K., Yu, J. H., Keller, N. P., & Adams, T. H. (1997). *Aspergillus* sporulation and mycotoxin production both require inactivation of the FadA G alpha protein-dependent signaling pathway. *EMBO J*, 16(16), 4916-4923. doi: 10.1093/emboj/16.16.4916
- Hill, T. W. K., E. (2001). Improved protocols for *Aspergillus* minimal medium: trace element and minimal medium stock solution. *Fungal Genet Newsl.*(48), 20-21.
- Ibrahim, A. S., Spellberg, B., Walsh, T. J., & Kontoyiannis, D. P. (2012). Pathogenesis of mucormycosis. *Clin Infect Dis*, 54 Suppl 1, S16-22. doi: 10.1093/cid/cir865
- Jones, S. A., O'Donnell, V. B., Wood, J. D., Broughton, J. P., Hughes, E. J., & Jones, O. T. (1996). Expression of phagocyte NADPH oxidase components in human endothelial cells. *Am J Physiol*, 271(4 Pt 2), H1626-1634.
- Kafer, E. (1958). An 8-chromosome map of *Aspergillus nidulans*. *Adv Genet*, 9, 105-145.
- Kafer, E. (1961). The processes of spontaneous recombination in vegetative nuclei of *Aspergillus nidulans*. *Genetics*, 46, 1581-1609.
- Kaim, W., & Rall, J. (1996). Copper - A "modern" bioelement. *Angewandte Chemie-International Edition in English*, 35(1), 43-60. doi: DOI 10.1002/anie.199600431

- Kamata, H., & Hirata, H. (1999). Redox regulation of cellular signalling. *Cellular Signalling*, 11(1), 1-14.
- Kami, K., Takeya, R., Sumimoto, H., & Kohda, D. (2002). Diverse recognition of non-PxxP peptide ligands by the SH3 domains from p67(phox), Grb2 and Pex13p. *EMBO J*, 21(16), 4268-4276.
- Kawahara, T., & Lambeth, J. D. (2007). Molecular evolution of Phox-related regulatory subunits for NADPH oxidase enzymes. *BMC Evol Biol*, 7, 178. doi: 10.1186/1471-2148-7-178
- Kawahara, T., Quinn, M. T., & Lambeth, J. D. (2007). Molecular evolution of the reactive oxygen-generating NADPH oxidase (Nox/Duox) family of enzymes. *BMC Evol Biol*, 7, 109. doi: 10.1186/1471-2148-7-109
- Kawasaki, L., Sanchez, O., Shiozaki, K., & Aguirre, J. (2002). SakA MAP kinase is involved in stress signal transduction, sexual development and spore viability in *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol*, 45(4), 1153-1163. doi: DOI 10.1046/j.1365-2958.2002.03087.x
- Keller, T., Damude, H. G., Werner, D., Doerner, P., Dixon, R. A., & Lamb, C. (1998). A plant homolog of the neutrophil NADPH oxidase gp91phox subunit gene encodes a plasma membrane protein with Ca<sup>2+</sup> binding motifs. *Plant Cell*, 10(2), 255-266.
- Kikuchi, H., Hikage, M., Miyashita, H., & Fukumoto, M. (2000). NADPH oxidase subunit, gp91(phox) homologue, preferentially expressed in human colon epithelial cells. *Gene*, 254(1-2), 237-243.
- Klebanoff, S. J. (2005). Myeloperoxidase: friend and foe. *J Leukoc Biol*, 77(5), 598-625. doi: 10.1189/jlb.1204697
- Knaus, U. G., Heyworth, P. G., Evans, T., Curnutte, J. T., & Bokoch, G. M. (1991). Regulation of phagocyte oxygen radical production by the GTP-binding protein Rac 2. *Science*, 254(5037), 1512-1515.
- Knight, S. A., Lesuisse, E., Stearman, R., Klausner, R. D., & Dancis, A. (2002). Reductive iron uptake by *Candida albicans*: role of copper, iron and the TUP1 regulator. *Microbiology*, 148(Pt 1), 29-40.
- Koga, H., Terasawa, H., Nunoi, H., Takeshige, K., Inagaki, F., & Sumimoto, H. (1999). Tetratricopeptide repeat (TPR) motifs of p67(phox) participate in interaction with the small GTPase Rac and activation of the phagocyte NADPH oxidase. *J Biol Chem*, 274(35), 25051-25060.
- Kosman, D. J. (2003). Molecular mechanisms of iron uptake in fungi. *Mol Microbiol*, 47(5), 1185-1197.
- Kozubowski, L., Larson, J. R., & Tatchell, K. (2005). Role of the septin ring in the asymmetric localization of proteins at the mother-bud neck in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell*, 16(8), 3455-3466. doi: 10.1091/mbc.E04-09-0764
- Kwak, J. M., Mori, I. C., Pei, Z. M., Leonhardt, N., Torres, M. A., Dangl, J. L., . . . Schroeder, J. I. (2003). NADPH oxidase AtrbohD and AtrbohF genes function in ROS-dependent ABA signaling in *Arabidopsis*. *EMBO J*, 22(11), 2623-2633. doi: 10.1093/emboj/cdg277
- Lalucque, H., & Silar, P. (2003). NADPH oxidase: an enzyme for multicellularity? *Trends Microbiol*, 11(1), 9-12.

- Lambeth, J. D. (2002). Nox/Duox family of nicotinamide adenine dinucleotide (phosphate) oxidases. *Curr Opin Hematol*, 9(1), 11-17.
- Lambeth, J. D. (2004). NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. *Nat Rev Immunol*, 4(3), 181-189. doi: 10.1038/nri1312
- Lambeth, J. D., Kawahara, T., & Diebold, B. (2007). Regulation of Nox and Duox enzymatic activity and expression. *Free Radic Biol Med*, 43(3), 319-331. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2007.03.028
- Lara-Ortiz, T., Riveros-Rosas, H., & Aguirre, J. (2003). Reactive oxygen species generated by microbial NADPH oxidase NoxA regulate sexual development in *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol*, 50(4), 1241-1255.
- Lardy, B., Bof, M., Aubry, L., Paclet, M. H., Morel, F., Satre, M., & Klein, G. (2005). NADPH oxidase homologs are required for normal cell differentiation and morphogenesis in *Dictyostelium discoideum*. *Biochim Biophys Acta*, 1744(2), 199-212. doi: 10.1016/j.bbamcr.2005.02.004
- Lee, B. N., & Adams, T. H. (1996). FluG and flbA function interdependently to initiate conidiophore development in *Aspergillus nidulans* through brlA beta activation. *EMBO J*, 15(2), 299-309.
- Lee, N. K., Choi, Y. G., Baik, J. Y., Han, S. Y., Jeong, D. W., Bae, Y. S., . . . Lee, S. Y. (2005). A crucial role for reactive oxygen species in RANKL-induced osteoclast differentiation. *Blood*, 106(3), 852-859. doi: 10.1182/blood-2004-09-3662
- Lesuisse, E., Casteras-Simon, M., & Labbe, P. (1996). Evidence for the *Saccharomyces cerevisiae* ferrireductase system being a multicomponent electron transport chain. *J Biol Chem*, 271(23), 13578-13583.
- MacManus-Spencer, L. A., & McNeill, K. (2005). Quantification of singlet oxygen production in the reaction of superoxide with hydrogen peroxide using a selective chemiluminescent probe. *J Am Chem Soc*, 127(25), 8954-8955. doi: 10.1021/ja052045b
- Malagnac, F., Lalucque, H., Lepere, G., & Silar, P. (2004). Two NADPH oxidase isoforms are required for sexual reproduction and ascospore germination in the filamentous fungus *Podospira anserina*. *Fungal Genet Biol*, 41(11), 982-997. doi: 10.1016/j.fgb.2004.07.008
- Marchler-Bauer, A., Zheng, C., Chitsaz, F., Derbyshire, M. K., Geer, L. Y., Geer, R. C., . . . Bryant, S. H. (2013). CDD: conserved domains and protein three-dimensional structure. *Nucleic Acids Res*, 41(Database issue), D348-352. doi: 10.1093/nar/gks1243
- Marquez-Fernandez, O., Trigos, A., Ramos-Balderas, J. L., Viniegra-Gonzalez, G., Deising, H. B., & Aguirre, J. (2007). Phosphopantetheinyl transferase CfwA/NpgA is required for *Aspergillus nidulans* secondary metabolism and asexual development. *Eukaryot Cell*, 6(4), 710-720. doi: 10.1128/EC.00362-06
- Marschner, H., & Römheld, V. (1995). Strategies of plants for acquisition of iron. In J. Abadía (Ed.), *Iron Nutrition in Soils and Plants* (Vol. 59, pp. 375-388): Springer Netherlands.
- Martins, L. J., Jensen, L. T., Simon, J. R., Keller, G. L., & Winge, D. R. (1998). Metalloregulation of FRE1 and FRE2 homologs in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, 273(37), 23716-23721.

- Martyn, K. D., Frederick, L. M., von Loehneysen, K., Dinauer, M. C., & Knaus, U. G. (2006). Functional analysis of Nox4 reveals unique characteristics compared to other NADPH oxidases. *Cellular Signalling*, *18*(1), 69-82. doi: 10.1016/j.cellsig.2005.03.023
- Maruo, Y., Takahashi, H., Soeda, I., Nishikura, N., Matsui, K., Ota, Y., . . . Takeuchi, Y. (2008). Transient congenital hypothyroidism caused by biallelic mutations of the dual oxidase 2 gene in Japanese patients detected by a neonatal screening program. *J Clin Endocrinol Metab*, *93*(11), 4261-4267. doi: 10.1210/jc.2008-0856
- Mims, C. W., Richardson, E. A., & Timberlake, W. E. (1988). Ultrastructural Analysis of Conidiophore Development in the Fungus *Aspergillus-Nidulans* Using Freeze-Substitution. *Protoplasma*, *144*(2-3), 132-141. doi: Doi 10.1007/Bf01637246
- Mirabito, P. M., Adams, T. H., & Timberlake, W. E. (1989). Interactions of three sequentially expressed genes control temporal and spatial specificity in *Aspergillus* development. *Cell*, *57*(5), 859-868.
- Momany, M. (2002). Polarity in filamentous fungi: establishment, maintenance and new axes. *Curr Opin Microbiol*, *5*(6), 580-585.
- Momany, M., & Hamer, J. E. (1997). The *Aspergillus nidulans* septin encoding gene, *aspB*, is essential for growth. *Fungal Genet Biol*, *21*(1), 92-100.
- Montero-Barrientos, M., Hermosa, R., Cardoza, R. E., Gutierrez, S., & Monte, E. (2011). Functional analysis of the *Trichoderma harzianum* *nox1* gene, encoding an NADPH oxidase, relates production of reactive oxygen species to specific biocontrol activity against *Pythium ultimum*. *Appl Environ Microbiol*, *77*(9), 3009-3016. doi: 10.1128/AEM.02486-10
- Morita, Y., Hyon, G. S., Hosogi, N., Miyata, N., Nakayashiki, H., Muranaka, Y., . . . Ikeda, K. (2013). Appressorium-localized NADPH oxidase B is essential for aggressiveness and pathogenicity in the host-specific, toxin-producing fungus *Alternaria alternata* Japanese pear pathotype. *Mol Plant Pathol*, *14*(4), 365-378. doi: 10.1111/mpp.12013
- Nakamura, Y., Ohtaki, S., Makino, R., Tanaka, T., & Ishimura, Y. (1989). Superoxide Anion Is the Initial Product in the Hydrogen-Peroxide Formation Catalyzed by Nadph Oxidase in Porcine Thyroid Plasma-Membrane. *Journal of Biological Chemistry*, *264*(9), 4759-4761.
- Nayak, T., Szewczyk, E., Oakley, C. E., Osmani, A., Ukil, L., Murray, S. L., . . . Oakley, B. R. (2006). A versatile and efficient gene-targeting system for *Aspergillus nidulans*. *Genetics*, *172*(3), 1557-1566. doi: 10.1534/genetics.105.052563
- Neilands, J. B. (1981). Microbial Iron Compounds. *Annual Review of Biochemistry*, *50*, 715-731. doi: DOI 10.1146/annurev.bi.50.070181.003435
- Neilands, J. B. (1983). Siderophores. *Advances in Inorganic Biochemistry*, *5*, 137-166.
- Neilands, J. B. (1984). Methodology of Siderophores. *Structure and Bonding*, *58*, 1-24. doi: Doi 10.1007/Bfb0111309
- Nisimoto, Y., Motalebi, S., Han, C. H., & Lambeth, J. D. (1999). The p67(phox) activation domain regulates electron flow from NADPH to flavin in flavocytochrome b(558). *J Biol Chem*, *274*(33), 22999-23005.

- Nyhus, K. J., & Jacobson, E. S. (1999). Genetic and physiologic characterization of ferric/cupric reductase constitutive mutants of *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun*, *67*(5), 2357-2365.
- Oakley, B. R., & Morris, N. R. (1981). A beta-tubulin mutation in *Aspergillus nidulans* that blocks microtubule function without blocking assembly. *Cell*, *24*(3), 837-845.
- Oakley, C. E., Weil, C. F., Kretz, P. L., & Oakley, B. R. (1987). Cloning of the Ribob Locus of *Aspergillus-Nidulans*. *Gene*, *53*(2-3), 293-298. doi: Doi 10.1016/0378-1119(87)90019-9
- Oberegger, H., Schoeser, M., Zadra, I., Schrettl, M., Parson, W., & Haas, H. (2002). Regulation of *freA*, *acoA*, *lysF*, and *cycA* expression by iron availability in *Aspergillus nidulans*. *Appl Environ Microbiol*, *68*(11), 5769-5772.
- Ogasawara, Y., Kaya, H., Hiraoka, G., Yumoto, F., Kimura, S., Kadota, Y., . . . Kuchitsu, K. (2008). Synergistic activation of the Arabidopsis NADPH oxidase *AtrbohD* by Ca<sup>2+</sup> and phosphorylation. *J Biol Chem*, *283*(14), 8885-8892. doi: 10.1074/jbc.M708106200
- Oliver, P. T. (1972). Conidiophore and spore development in *Aspergillus nidulans*. *J Gen Microbiol*, *73*(1), 45-54.
- Olson, J. S., Mathews, A. J., Rohlf, R. J., Springer, B. A., Egeberg, K. D., Sligar, S. G., . . . Nagai, K. (1988). The role of the distal histidine in myoglobin and haemoglobin. *Nature*, *336*(6196), 265-266. doi: 10.1038/336265a0
- Ono, E., Wong, H. L., Kawasaki, T., Hasegawa, M., Kodama, O., & Shimamoto, K. (2001). Essential role of the small GTPase Rac in disease resistance of rice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *98*(2), 759-764. doi: 10.1073/pnas.021273498
- Osmani, S. A., Engle, D. B., Doonan, J. H., & Morris, N. R. (1988). Spindle formation and chromatin condensation in cells blocked at interphase by mutation of a negative cell cycle control gene. *Cell*, *52*(2), 241-251.
- Osmani, S. A., & Mirabito, P. M. (2004). The early impact of genetics on our understanding of cell cycle regulation in *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genet Biol*, *41*(4), 401-410. doi: 10.1016/j.fgb.2003.11.009
- Osmani, S. A., Pu, R. T., & Morris, N. R. (1988). Mitotic induction and maintenance by overexpression of a G2-specific gene that encodes a potential protein kinase. *Cell*, *53*(2), 237-244.
- Overmyer, K., Brosche, M., & Kangasjarvi, J. (2003). Reactive oxygen species and hormonal control of cell death. *Trends Plant Sci*, *8*(7), 335-342. doi: 10.1016/S1360-1385(03)00135-3
- Paffenholz, R., Bergstrom, R. A., Pasutto, F., Wabnitz, P., Munroe, R. J., Jagla, W., . . . Bergstrom, D. E. (2004). Vestibular defects in head-tilt mice result from mutations in *Nox3*, encoding an NADPH oxidase. *Genes Dev*, *18*(5), 486-491. doi: 10.1101/gad.1172504
- Paravicini, T. M., & Touyz, R. M. (2006). Redox signaling in hypertension. *Cardiovascular Research*, *71*(2), 247-258. doi: 10.1016/j.cardiores.2006.05.001
- Penalva, M. A., & Arst, H. N., Jr. (2004). Recent advances in the characterization of ambient pH regulation of gene expression in filamentous fungi and yeasts. *Annu Rev Microbiol*, *58*, 425-451. doi: 10.1146/annurev.micro.58.030603.123715

- Piccoli, C., Ria, R., Scrima, R., Cela, O., D'Aprile, A., Boffoli, D., . . . Capitanio, N. (2005). Characterization of mitochondrial and extra-mitochondrial oxygen consuming reactions in human hematopoietic stem cells. Novel evidence of the occurrence of NAD(P)H oxidase activity. *J Biol Chem*, *280*(28), 26467-26476. doi: 10.1074/jbc.M500047200
- Pöggelker, S. N., M.; Kück, U. (2006). Fruiting-body development in Ascomycetes. In Kües/Fischer (Ed.), *The mycota I Growth, Differentiation and Sexuality*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Pontecorvo, G., Roper, J. A., Hemmons, L. M., Macdonald, K. D., & Bufton, A. W. (1953). The genetics of *Aspergillus nidulans*. *Adv Genet*, *5*, 141-238.
- Read, N. D., Goryachev, A. B., & Lichius, A. (2012). The mechanistic basis of self-fusion between conidial anastomosis tubes during fungal colony initiation. *Fungal Biology Reviews*, *26*(1), 1-11. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fbr.2012.02.003>
- Rinnerthaler, M., Buttner, S., Laun, P., Heeren, G., Felder, T. K., Klinger, H., . . . Breitenbach, M. (2012). Yno1p/Aim14p, a NADPH-oxidase ortholog, controls extramitochondrial reactive oxygen species generation, apoptosis, and actin cable formation in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *109*(22), 8658-8663. doi: 10.1073/pnas.1201629109
- Rittenour, W. R., Si, H., & Harris, S. D. (2009). Hyphal morphogenesis in *Aspergillus nidulans*. *Fungal Biology Reviews*, *23*(1-2), 20-29. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fbr.2009.08.001>
- Roca, M. G., Weichert, M., Siegmund, U., Tudzynski, P., & Fleissner, A. (2012). Germling fusion via conidial anastomosis tubes in the grey mould *Botrytis cinerea* requires NADPH oxidase activity. *Fungal Biol*, *116*(3), 379-387. doi: 10.1016/j.funbio.2011.12.007
- Roman, D. G., Dancis, A., Anderson, G. J., & Klausner, R. D. (1993). The fission yeast ferric reductase gene *frp1+* is required for ferric iron uptake and encodes a protein that is homologous to the gp91-phox subunit of the human NADPH phagocyte oxidoreductase. *Mol Cell Biol*, *13*(7), 4342-4350.
- Roper, J. A. (1952). Production of heterozygous diploids in filamentous fungi. *Experientia*(8), 14-15.
- Rossi, F., & Zatti, M. (1964). Biochemical aspects of phagocytosis in polymorphonuclear leucocytes. NADH and NADPH oxidation by the granules of resting and phagocytizing cells. *Experientia*, *20*(1), 21-23.
- Rotrosen, D., & Leto, T. L. (1990). Phosphorylation of neutrophil 47-kDa cytosolic oxidase factor. Translocation to membrane is associated with distinct phosphorylation events. *J Biol Chem*, *265*(32), 19910-19915.
- Rowlands, R. T., & Turner, G. (1973). Nuclear and Extranuclear Inheritance of Oligomycin-Resistance in *Aspergillus-Nidulans*. *J Gen Microbiol*, *75*(Apr), R19-R19.
- Royer-Pokora, B., Kunkel, L. M., Monaco, A. P., Goff, S. C., Newburger, P. E., Baehner, R. L., . . . Orkin, S. H. (1986). Cloning the gene for an inherited human disorder--chronic granulomatous disease--on the basis of its chromosomal location. *Nature*, *322*(6074), 32-38. doi: 10.1038/322032a0
- Ryder, L. S., Dagdas, Y. F., Mentlak, T. A., Kershaw, M. J., Thornton, C. R., Schuster, M., . . . Talbot, N. J. (2013). NADPH oxidases regulate septin-mediated cytoskeletal

- remodeling during plant infection by the rice blast fungus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110(8), 3179-3184. doi: 10.1073/pnas.1217470110
- Sagi, M., Davydov, O., Orazova, S., Yesbergenova, Z., Ophir, R., Stratmann, J. W., & Fluhr, R. (2004). Plant respiratory burst oxidase homologs impinge on wound responsiveness and development in *Lycopersicon esculentum*. *Plant Cell*, 16(3), 616-628. doi: 10.1105/tpc.019398
- Salles, N., Szanto, I., Herrmann, F., Armenian, B., Stumm, M., Stauffer, E., . . . Krause, K. H. (2005). Expression of mRNA for ROS-generating NADPH oxidases in the aging stomach. *Exp Gerontol*, 40(4), 353-357. doi: 10.1016/j.exger.2005.01.007
- Sambrook, J. R., D. W. (2001). *Molecular cloning: a laboratory manual*. N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sanchez, O., Navarro, R. E., & Aguirre, J. (1998). Increased transformation frequency and tagging of developmental genes in *Aspergillus nidulans* by restriction enzyme-mediated integration (REMI). *Molecular and General Genetics*, 258(1-2), 89-94.
- Sánchez, O. A., J. (1996). Efficient transformation of *Aspergillus nidulans* by electroporation of germinated conidia. *Fungal Genet Newsl.*, 43, 48-51.
- Santos, R., Buisson, N., Knight, S., Dancis, A., Camadro, J. M., & Lesuisse, E. (2003). Haemin uptake and use as an iron source by *Candida albicans*: role of CaHMX1-encoded haem oxygenase. *Microbiology-Sgm*, 149, 579-588. doi: DOI 10.1099/mic.0.26108-0
- Sarfstein, R., Gorzalczany, Y., Mizrahi, A., Berdichevsky, Y., Molshanski-Mor, S., Weinbaum, C., . . . Pick, E. (2004). Dual role of Rac in the assembly of NADPH oxidase, tethering to the membrane and activation of p67phox: a study based on mutagenesis of p67phox-Rac1 chimeras. *J Biol Chem*, 279(16), 16007-16016. doi: 10.1074/jbc.M312394200
- Schalk, I., Zeng, K., Wu, S. K., Stura, E. A., Matteson, J., Huang, M., . . . Balch, W. E. (1996). Structure and mutational analysis of Rab GDP-dissociation inhibitor. *Nature*, 381(6577), 42-48. doi: 10.1038/381042a0
- Schulz, E., & Munzel, T. (2008). NOX5, a new "radical" player in human atherosclerosis? *J Am Coll Cardiol*, 52(22), 1810-1812. doi: 10.1016/j.jacc.2008.08.040
- Segal, A. W., Garcia, R., Goldstone, A. H., Cross, A. R., & Jones, O. T. G. (1981). Cytochrome-B(-245) of Neutrophils Is Also Present in Human-Monocytes, Macrophages and Eosinophils. *Biochemical Journal*, 196(1), 363-367.
- Segal, A. W., West, I., Wientjes, F., Nugent, J. H., Chavan, A. J., Haley, B., . . . Scrace, G. (1992). Cytochrome b-245 is a flavocytochrome containing FAD and the NADPH-binding site of the microbicidal oxidase of phagocytes. *Biochem J*, 284 (Pt 3), 781-788.
- Seo, J. A., Guan, Y., & Yu, J. H. (2003). Suppressor mutations bypass the requirement of fluG for asexual sporulation and sterigmatocystin production in *Aspergillus nidulans*. *Genetics*, 165(3), 1083-1093.
- Shatwell, K. P., Dancis, A., Cross, A. R., Klausner, R. D., & Segal, A. W. (1996). The FRE1 ferric reductase of *Saccharomyces cerevisiae* is a cytochrome b similar to that of NADPH oxidase. *J Biol Chem*, 271(24), 14240-14244.

- Shatwell, K. P., & Segal, A. W. (1996). NADPH oxidase. *Int J Biochem Cell Biol*, 28(11), 1191-1195.
- Si, J., Fu, X., Behar, J., Wands, J., Beer, D. G., Souza, R. F., . . . Cao, W. (2007). NADPH oxidase NOX5-S mediates acid-induced cyclooxygenase-2 expression via activation of NF-kappaB in Barrett's esophageal adenocarcinoma cells. *J Biol Chem*, 282(22), 16244-16255. doi: 10.1074/jbc.M700297200
- Siegmund, U., Heller, J., van Kann, J. A., & Tudzynski, P. (2013). The NADPH oxidase complexes in *Botrytis cinerea*: evidence for a close association with the ER and the tetraspanin Pls1. *PLoS One*, 8(2), e55879. doi: 10.1371/journal.pone.0055879
- Sies, H. (1985). Oxidative stress: introductory remarks *Oxidative Stress* (pp. 1-8). Academic Press, London.
- Sies, H. (1986). Biochemistry of oxidative stress. *Angewandte Chemie*(25), 1058-1071.
- Sies, H. (1991). Oxidative stress: introduction. In H. Sies (Ed.), *Oxidative Stress: Oxidants and antioxidants* (pp. xv-xxii). Academic Press, London.
- Sies, H. (1997). Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Exp Physiol*, 82(2), 291-295.
- Sigel, A., & Sigel, H. (1998). Metal ions in biological systems, volume 35: iron transport and storage microorganisms, plants, and animals. *Met Based Drugs*, 5(5), 262. doi: 10.1155/MBD.1998.262a
- Singh, A., Kaur, N., & Kosman, D. J. (2007). The metalloredutase Fre6p in Fe-efflux from the yeast vacuole. *J Biol Chem*, 282(39), 28619-28626. doi: 10.1074/jbc.M703398200
- Skromne, I., Sanchez, O., & Aguirre, J. (1995). Starvation stress modulates the expression of the *Aspergillus nidulans* brlA regulatory gene. *Microbiology*, 141 (Pt 1), 21-28.
- Soid-Raggi, G., Sanchez, O., & Aguirre, J. (2006). TmpA, a member of a novel family of putative membrane flavoproteins, regulates asexual development in *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol*, 59(3), 854-869. doi: 10.1111/j.1365-2958.2005.04996.x
- Suh, Y. A., Arnold, R. S., Lassegue, B., Shi, J., Xu, X., Sorescu, D., . . . Lambeth, J. D. (1999). Cell transformation by the superoxide-generating oxidase Mox1. *Nature*, 401(6748), 79-82. doi: 10.1038/43459
- Sumimoto, H. (2008). Structure, regulation and evolution of Nox-family NADPH oxidases that produce reactive oxygen species. *FEBS J*, 275(13), 3249-3277. doi: 10.1111/j.1742-4658.2008.06488.x
- Takeya, R., Ueno, N., Kami, K., Taura, M., Kohjima, M., Izaki, T., . . . Sumimoto, H. (2003). Novel human homologues of p47phox and p67phox participate in activation of superoxide-producing NADPH oxidases. *J Biol Chem*, 278(27), 25234-25246. doi: 10.1074/jbc.M212856200
- Tanaka, A., Christensen, M. J., Takemoto, D., Park, P., & Scott, B. (2006). Reactive oxygen species play a role in regulating a fungus-perennial ryegrass mutualistic interaction. *Plant Cell*, 18(4), 1052-1066. doi: 10.1105/tpc.105.039263

- Timberlake, W. E. (1990). Molecular genetics of *Aspergillus* development. *Annu Rev Genet*, 24, 5-36. doi: 10.1146/annurev.ge.24.120190.000253
- Timberlake, W. E., & Clutterbuck, A. J. (1994). Genetic regulation of conidiation. *Prog Ind Microbiol*, 29, 383-427.
- Timberlake, W. E., & Marshall, M. A. (1989). Genetic engineering of filamentous fungi. *Science*, 244(4910), 1313-1317.
- Todd, R. B., Davis, M. A., & Hynes, M. J. (2007). Genetic manipulation of *Aspergillus nidulans*: meiotic progeny for genetic analysis and strain construction. *Nat Protoc*, 2(4), 811-821. doi: 10.1038/nprot.2007.112
- Torres, M. A., Dangl, J. L., & Jones, J. D. (2002). Arabidopsis gp91phox homologues AtrbohD and AtrbohF are required for accumulation of reactive oxygen intermediates in the plant defense response. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(1), 517-522. doi: 10.1073/pnas.012452499
- Trachootham, D., Alexandre, J., & Huang, P. (2009). Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: a radical therapeutic approach? *Nat Rev Drug Discov*, 8(7), 579-591. doi: 10.1038/nrd2803
- Tsitsigiannis, D. I., & Keller, N. P. (2007). Oxylipins as developmental and host-fungal communication signals. *Trends Microbiol*, 15(3), 109-118. doi: DOI 10.1016/j.tim.2007.01.005
- Tudzynski, P., Heller, J., & Siegmund, U. (2012). Reactive oxygen species generation in fungal development and pathogenesis. *Curr Opin Microbiol*, 15(6), 653-659. doi: 10.1016/j.mib.2012.10.002
- Ueyama, T., Geiszt, M., & Leto, T. L. (2006). Involvement of Rac1 in activation of multicomponent Nox1- and Nox3-based NADPH oxidases. *Mol Cell Biol*, 26(6), 2160-2174. doi: 10.1128/MCB.26.6.2160-2174.2006
- Vallet, P., Charnay, Y., Steger, K., Ogier-Denis, E., Kovari, E., Herrmann, F., . . . Szanto, I. (2005). Neuronal expression of the NADPH oxidase NOX4, and its regulation in mouse experimental brain ischemia. *Neuroscience*, 132(2), 233-238. doi: 10.1016/j.neuroscience.2004.12.038
- Vignais, P. V. (2002). The superoxide-generating NADPH oxidase: structural aspects and activation mechanism. *Cell Mol Life Sci*, 59(9), 1428-1459.
- Wallach, T. M., & Segal, A. W. (1996). Stoichiometry of the subunits of flavocytochrome b(558) of the NADPH oxidase of phagocytes. *Biochemical Journal*, 320, 33-38.
- Wallach, T. M., & Segal, A. W. (1997). Analysis of glycosylation sites on gp91phox, the flavocytochrome of the NADPH oxidase, by site-directed mutagenesis and translation in vitro. *Biochem J*, 321 ( Pt 3), 583-585.
- Wang, D. T., De Deken, X., Milenkovic, M., Song, Y., Pirson, I., Dumont, J. E., & Miot, F. (2005). Identification of a novel partner of Duox - EFP1, a thioredoxin-related protein. *Journal of Biological Chemistry*, 280(4), 3096-3103. doi: DOI 10.1074/jbc.M407709200
- Wang, M., Roberts, D. L., Paschke, R., Shea, T. M., Masters, B. S., & Kim, J. J. (1997). Three-dimensional structure of NADPH-cytochrome P450 reductase: prototype for FMN- and FAD-containing enzymes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94(16), 8411-8416.

- Westfall, P. J., & Momany, M. (2002). *Aspergillus nidulans* septin AspB plays pre- and postmitotic roles in septum, branch, and conidiophore development. *Mol Biol Cell*, *13*(1), 110-118. doi: 10.1091/mbc.01-06-0312
- Whelan, S., & Goldman, N. (2001). A general empirical model of protein evolution derived from multiple protein families using a maximum-likelihood approach. *Mol Biol Evol*, *18*(5), 691-699.
- Wilson, M. I., Gill, D. J., Perisic, O., Quinn, M. T., & Williams, R. L. (2003). PB1 domain-mediated heterodimerization in NADPH oxidase and signaling complexes of atypical protein kinase C with Par6 and p62. *Molecular Cell*, *12*(1), 39-50. doi: Doi 10.1016/S1097-2765(03)00246-6
- Xiang, X., Zuo, W., Efimov, V. P., & Morris, N. R. (1999). Isolation of a new set of *Aspergillus nidulans* mutants defective in nuclear migration. *Curr Genet*, *35*(6), 626-630.
- Yamamoto, A., Kami, K., Takeya, R., & Sumimoto, H. (2007). Interaction between the SH3 domains and C-terminal proline-rich region in NADPH oxidase organizer 1 (Nox1). *Biochem Biophys Res Commun*, *352*(2), 560-565. doi: DOI 10.1016/j.bbrc.2006.11.060
- Yang, S., Zhang, Y., Ries, W., & Key, L. (2004). Expression of Nox4 in osteoclasts. *Journal of Cellular Biochemistry*, *92*(2), 238-248. doi: 10.1002/jcb.20048
- Yang, S. L., & Chung, K. R. (2013). Similar and distinct roles of NADPH oxidase components in the tangerine pathotype of *Alternaria alternata*. *Mol Plant Pathol*, *14*(6), 543-556. doi: 10.1111/mpp.12026
- Yang, Z. (1994). Maximum likelihood phylogenetic estimation from DNA sequences with variable rates over sites: approximate methods. *J Mol Evol*, *39*(3), 306-314.
- Yoshioka, H., Numata, N., Nakajima, K., Katou, S., Kawakita, K., Rowland, O., . . . Doke, N. (2003). *Nicotiana benthamiana* gp91phox homologs NbrbohA and NbrbohB participate in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> accumulation and resistance to *Phytophthora infestans*. *Plant Cell*, *15*(3), 706-718.
- Yoshioka, H., Sugie, K., Park, H. J., Maeda, H., Tsuda, N., Kawakita, K., & Doke, N. (2001). Induction of plant gp91 phox homolog by fungal cell wall, arachidonic acid, and salicylic acid in potato. *Mol Plant Microbe Interact*, *14*(6), 725-736. doi: 10.1094/MPMI.2001.14.6.725
- Yu, J. H., Hamari, Z., Han, K. H., Seo, J. A., Reyes-Dominguez, Y., & Scazzocchio, C. (2004). Double-joint PCR: a PCR-based molecular tool for gene manipulations in filamentous fungi. *Fungal Genet Biol*, *41*(11), 973-981. doi: 10.1016/j.fgb.2004.08.001
- Yu, J. H., & Keller, N. (2005). Regulation of secondary metabolism in filamentous fungi. *Annu Rev Phytopathol*, *43*, 437-458. doi: 10.1146/annurev.phyto.43.040204.140214
- Yun, C. W., Bauler, M., Moore, R. E., Klebba, P. E., & Philpott, C. C. (2001). The role of the FRE family of plasma membrane reductases in the uptake of siderophore-iron in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, *276*(13), 10218-10223. doi: 10.1074/jbc.M010065200
- Zhang, X., Krause, K. H., Xenarios, I., Soldati, T., & Boeckmann, B. (2013). Evolution of the Ferric Reductase Domain (FRD) Superfamily: Modularity, Functional

- Diversification, and Signature Motifs. *PLoS One*, 8(3), e58126. doi: 10.1371/journal.pone.0058126
- Zhu, Y., Marchal, C. C., Casbon, A. J., Stull, N., von Lohneysen, K., Knaus, U. G., . . . Dinauer, M. C. (2006). Deletion mutagenesis of p22phox subunit of flavocytochrome b558: identification of regions critical for gp91phox maturation and NADPH oxidase activity. *J Biol Chem*, 281(41), 30336-30346. doi: 10.1074/jbc.M607191200
- Zonneveld, B. J. M. (1975). Sexual Differentiation in *Aspergillus-Nidulans* - Requirement for Manganese and Its Effect on Alpha-1,3 Glucan Synthesis and Degradation. *Arch Microbiol*, 105(2), 101-104. doi: Doi 10.1007/Bf00447121