



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

## Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

“LAS REDUCTASAS FÉRRICAS ATÍPICAS EN EL HONGO *Aspergillus nidulans* Y SU  
POSIBLE FUNCIÓN COMO NADPH OXIDASAS”

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
Maestro en Ciencias

PRESENTA:

Tadeo de Jesús Pérez Covarrubias

TUTOR PRINCIPAL

Dr. Jesús Aguirre Linares  
Instituto de Fisiología Celular, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dr. Carlos Leonardo Peraza Reyes  
Instituto de Fisiología Celular, UNAM

Dr. Luis Cárdenas Torres  
Instituto de Biotecnología, UNAM

Ciudad Universitaria, Cd. Mx., diciembre 2017



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.

## Agradecimientos

Este trabajo se realizó en el laboratorio 107 oriente bajo la dirección del Dr. Jesús Aguirre Linares, en el Departamento de Biología Celular y Desarrollo del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México.

La elaboración de este trabajo fue posible gracias al apoyo financiero de los proyectos CB-2014-01-238492 (CONACYT México) e IN208916 (PAPIIT-UNAM).

El alumno Tadeo de Jesús Pérez Covarrubias recibió una beca durante la realización de sus estudios de Maestría por parte del CONACYT, con número de registro CVU: 620389.

Se agradece a los miembros del comité tutor quienes asesoraron el desarrollo de este trabajo, el cual estuvo conformado por:

Dr. Jesús Aguirre Linares (IFC, UNAM)

Dr. Carlos Leonardo Peraza Reyes (IFC, UNAM)

Dr. Luis Cárdenas Torres (IBT, UNAM)

Se agradece al jurado que fue conformado por:

Presidenta Dra. Alejandra Alicia Covarrubias Robles

Vocal Dr. Julio Eduardo Roque Morán Andrade

Vocal Dr. Juan Pablo Pardo Vázquez

Vocal Dr. Héctor Riveros Rosas

Secretario Dr. Diego González Halphen

Agradezco ampliamente al Dr. Rafael Jaimes Arroyo por su apoyo técnico y su asesoría durante la realización de este trabajo.

Agradezco a la Dra. Verónica Garrido Bazán por su invaluable ayuda en los experimentos de qPCR.

Agradezco al Biol. José Antonio Contreras Chijate por el apoyo en los análisis estadísticos.

Agradezco al Psic. José Fabián Márquez Escalona por su asistencia en el laboratorio.

Agradezco al M. en C. Enrique Olgún Martínez y al Biol. Eugenio Contreras Castillo por sus consejos respecto al qPCR.

Agradezco a la M. en C. Vanessa Vega García por su ayuda en los ensayos bioquímicos de este trabajo.

Agradezco a las biólogas Ana Karen Gómez Angoa y Minerva Igrein González López por su apoyo en la obtención de las mutantes dobles y triples.

Agradezco a la diseñadora gráfica Carmen Pérez Covarrubias por su ayuda con las ilustraciones de la tesis.

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.

Se reconoce el apoyo técnico de la Biol. Alma Olivia Sánchez González.

## Dedicatoria

A mi madre María Esther Covarrubias y a mi padre Cándido Pérez, porque siempre me han apoyado en todas mis decisiones, también agradezco sus consejos, regaños, enseñanzas, opiniones y por supuesto todo el cariño que me han brindado.

A mi hermana Carmen Pérez, por ser mi compañera de juegos, peleas, regaños y aventuras en la isla.

A mi tío José Luis Covarrubias, por sus sabios consejos, sus grandes enseñanzas, sus pláticas críticas y su interés y empatía por la gente, siempre lo he considerado un gran ejemplo a seguir.

A mi Anilú, mi hermosa Anilú, mi pequeña, por todo el cariño, amor y confianza que me ha compartido, por iluminar mi ánimo en los momentos más oscuros y por acompañarme en este viaje en la nave conocida como Tierra.

A la hermandad gatuna, conformada por: Raymundo Sandoval Avilés, Héctor Márquez Pérez y Diego Rosas Hernández, gracias por su amistad y por los retiros organizados de manera aleatoria así como las numerosas experiencias acontecidas en diversos escenarios, tanto del tipo académico como del tipo recreativo, por cierto, éstos últimos sobrepasan a los primeros.

A mis amigos biólogos Juan Carlos, Alan, Sergio, Fernanda Ayhllon, Mayra Itzel, Giovanni Hazel, Giovanni Montiel, Brenda Pérez y Mariana Pineda, gracias por todos los momentos buenos que vivimos y seguiremos compartiendo.

A mis amigos que comparten el sendero de la investigación: Rafael Jaimes, Fabián Márquez, Verónica Garrido, José Antonio, Sol Hernández, Karen Angoa, Isareli Cruz, Paola Moreno, Cynthia Garnie, Anaíd Cándido, Alissa López, Antonio de Jesús, Paco Potter, María José, Jorge, José Luis, Eugenio, Arely Vega, Tere Nava, Abigail Guzmán, Miguel Ramírez y Osman Franco quienes con sus buenas pláticas, consejos basados en la experiencia, discusiones acerca de diversos temas, regaños y sobre todo esos buenos momentos que compartimos en las alitas, las pizzas, las hamburguesas de papá Pitufó, en la terraza junto a Ciencias del Mar donde compartimos palomitas, cacahuates, pepinos, naranjas, y demás alimentos ricos en carbs  $\alpha$ , así como junto a la tarja carcinogénica del lab con un “expresso-Rafa”, ustedes han hecho que mi camino en el posgrado sea más agradable.

Al Dr. Jesús Aguirre, pro brindarme la oportunidad de formar parte de su laboratorio.

Finalmente agradezco a todos aquellos con quienes compartí momentos breves pero importantes, como escribiría el maestro Doctor profesor Rafa “ya el tiempo me dará la oportunidad de agradecer”.

# Índice

<b>ABREVIATURAS</b> .....	1
<b>RESUMEN</b> .....	2
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	4
1.-Aspectos generales.....	4
1.1- Mecanismos antioxidantes.....	5
1.2-Mecanismos pro-oxidantes .....	5
1.3-El papel de las ERO en la diferenciación celular.....	6
2.-Las NADPH oxidasas (NOX).....	7
2.1- NOX en células no fagocíticas.....	14
2.2- Las NOX en los hongos.....	18
3.-La importancia del hierro y el cobre en los sistemas biológicos .....	21
3.1-Mecanismos de captura de hierro .....	22
3.2- Las reductasas de hierro (FRE) en los hongos .....	23
3.3-La proteína Yno1 y su papel como NOX .....	26
3.4.- Existen posibles homólogos de Yno1 en <i>Aspergillus nidulans</i> .....	27
4.- <i>Aspergillus nidulans</i> como modelo de estudio.....	32
<b>Hipótesis</b> .....	37
<b>Objetivo General</b> .....	37
<b>Objetivos particulares</b> .....	37
<b>Materiales y Métodos</b> .....	38
<b>Resultados</b> .....	50
1.- Eliminación del gen <i>AN_10893</i> mediante la técnica de PCRs sobrelapadas (Double Joint PCR). 50	
2.- Las proteínas <i>AN_8683</i> , <i>AN10893</i> y <i>NoxA</i> regulan la conidiación.....	57
3.- Las cepas carentes de los genes <i>AN_8683</i> y <i>AN_10893</i> producen estructuras sexuales maduras. .....	60
4.- Los genes <i>AN_8683</i> y <i>AN_10893</i> reprimen la diferenciación sexual de manera independiente	61
5.-Los primordios de cleistotecios de las cepas $\Delta noxA$ , $\Delta noxA/\Delta AN_10893$ y $\Delta noxA/\Delta AN_8683/\Delta AN_10893$ podrían producir menos ERO que los de la cepa silvestre. ....	63
6.- La expresión de los genes <i>noxA</i> , <i>freA</i> , <i>AN_8683</i> y <i>AN_10893</i> se induce por limitación de hierro .....	65

7.- El micelio de las cepas <i>ΔnoxA</i> , <i>ΔAN_8683</i> y <i>ΔAN_10893</i> reduce menos hierro que una cepa silvestre cuando se inoculan en medio con bajo hierro.....	68
8.- Los genes <i>AN_8683</i> y <i>AN_10893</i> son dispensables para la resistencia al estrés de la pared celular y la resistencia al estrés oxidativo.....	69
<b>Discusión</b> .....	72
<b>Conclusiones</b> .....	78
<b>Perspectivas</b> .....	79
<b>Referencias</b> .....	80

## ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
Bphen/BPDS	Batofenantrolina
C-	Extremo carboxilo terminal
CAT	Catalasa
CTCF	Fluorescencia Total Corregida de la Célula
DHE	Dihidroetidio
Et	Etidio
$\varepsilon$	Coefficiente de extinción molar
ERO	Especies Reactivas del Oxígeno
FAD	Flavín adenín dinucleótido
Fe <sup>3+</sup> -HEDTA	Ácido etilendiaminotetraacético férrico de sodio
FRE	Reductasa férrica
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrógeno
HO <sup>·</sup>	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

El hierro juega un papel esencial en múltiples reacciones redox que ocurren en todos los seres vivos. La adquisición de hierro en *Saccharomyces cerevisiae* está mediada por el mecanismo de asimilación de hierro por reducción (RIA), el cual consiste en la reducción de  $\text{Fe}^{3+}$  a  $\text{Fe}^{2+}$  mediante reductasas férricas (FRE), enzimas localizadas en la membrana. Las NADPH oxidasas (NOX) comparten características importantes con las FRE, ya que ambos tipos de enzimas poseen tres dominios canónicos: un dominio de reductasa férrica (FRD) que contienen 6 dominios transmembranales, un par de grupos hemo y dominios de unión al FAD y al NADPH en el extremo carboxilo terminal. Sin embargo, las FRE reducen metales como el  $\text{Fe}^{3+}$  o el  $\text{Cu}^{2+}$ , mientras que las NOX, que juegan papeles muy importantes en el desarrollo en los hongos filamentosos, catalizan la reducción del oxígeno para formar superóxido. En *Aspergillus nidulans*, las mutantes carentes de *noxA* no generan estructuras sexuales (cleistotecios) y producen aproximadamente 50% menos esporas asexuales (conidias) que la cepa silvestre. Recientemente se reportó que la proteína YNO1 de *Saccharomyces cerevisiae*, considerada antes como una FRE, posee actividad de NOX. Previamente realizamos un análisis filogenético que muestra que dos de las nueve FRE predichas en el genoma de *A. nidulans* (AN\_8683 y AN\_10893) se agrupan en un clado distinto al de las NOX y FRE canónicas. La eliminación de los genes AN\_8683 y AN\_10893 resulta en una producción exacerbada de cleistotecios y en una disminución en la producción de conidias. La caracterización fenotípica de mutantes dobles y triples afectadas en los genes AN\_8683, AN\_10893 y *noxA* y el análisis de la expresión de estos

genes, en relación con la disponibilidad de hierro, sugieren que las enzimas AN\_8683 y AN\_10893 participan en la asimilación del hierro y que este proceso es importante durante el desarrollo de *A. nidulans*.

# 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, deben al mismo tiempo 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 que produce el radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y el radical hidroxilo ( $HO\cdot$ ) (Fig. 1) (Halliwell and 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 mediada por catalasas, superóxido dismutasa, tioredoxinas, entre otros, como no enzimáticas mediada por ascorbato, tocoferoles y carotenoides (Sies 1985, Sies 1986, Sies 1991).

Cuando las ERO sobrepasan la capacidad del sistema celular de defensa antioxidante, debido a un alto nivel de ERO o a una baja capacidad del mecanismo antioxidante se produce el estrés oxidante (Sies 1985). El estrés oxidante produce daños directos o indirectos mediados por las ERO en ácidos nucleicos, proteínas y lípidos (Halliwell 1999) y ha sido implicado en carcinogénesis (Trachootham, Alexandre et al. 2009), neurodegeneración (Kozubowski, Larson et al. 2005, Read, Goryachev et al. 2012),

aterosclerosis, diabetes (Paravicini and Touyz 2006) y envejecimiento (Haigis and 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, es capaz de inhibir o retardar significativamente 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 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), así 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 and 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).

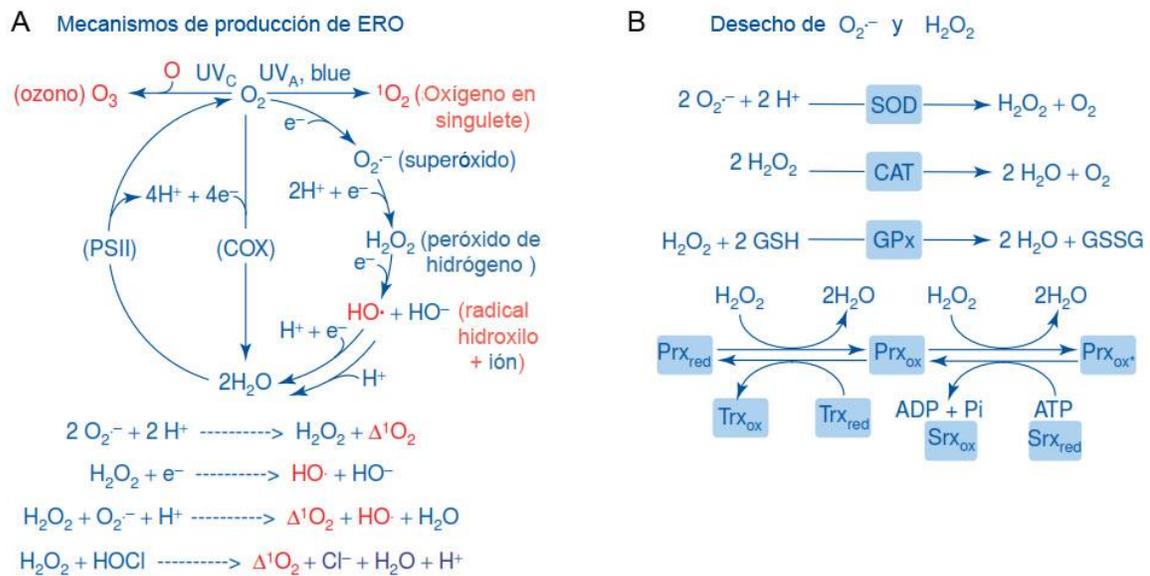
Dentro de los procesos metabólicos que producen ERO, la principal fuente de éstas es la respiración. En la mitocondria se produce  $O_2^-$  en los complejos I (NADH deshidrogenasa) y III (ubiquinona-citocromo *c* reductasa) de la cadena respiratoria, cuando hay fugas de electrones que no reducen el  $O_2$  hasta  $H_2O$  (Halliwell and 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 los citocromos  $P_{450}$  (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 oxidante se ha asociado con la detención del crecimiento y a la 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 que altera transitoriamente el balance entre oxidantes/antioxidantes dentro de la célula, lo que genera temporalmente 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 (Finkel 2003, Lara-Ortiz, Riveros-Rosas et al. 2003, Cano-Dominguez, Alvarez-Delfin et al. 2008).

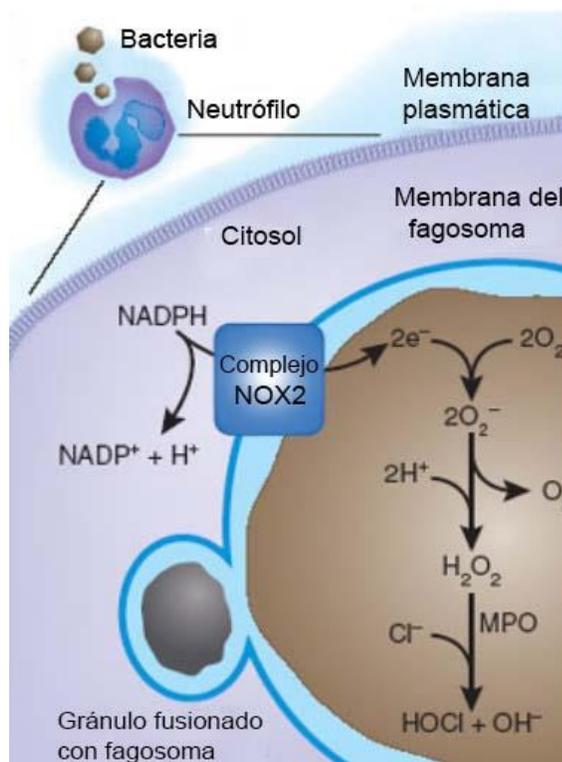


**Figura 1. Mecanismos de producción de ERO y de eliminación del superóxido y peróxido de hidrógeno. A)** Las ERO se pueden producir por excitación ( $O$ ,  $^1O_3$ ,  $^1O_2$ ) o por reducción ( $O_2^{\cdot-}$ ,  $H_2O_2$ ,  $HO \cdot$ ) del  $O_2$ . Las especies en rojo son más reactivas. El  $O_2$  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 sulfinico; el cual es reducido nuevamente a Cys-ácido sulfenico por la sulfirredoxina reducida ( $SrX_{red}$ ) y ATP (Coates, Jahn et al. 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, Nuno et al. 1999). La NOX más estudiada es la Nox2, presente en las células fagocíticas del sistema inmune. Las células fagocíticas están compuestas por

neutrófilos, eosinófilos, monocitos y macrófagos (Segal, Garcia et al. 1981, Batot, Martel et al. 1995) 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 and Zatti 1964). La fagocitosis, así como una gran variedad de estímulos artificiales, inducen la “explosión respiratoria” (Baldrige and Gerard 1933). Este proceso está mediado por la Nox2 que mediante su actividad produce superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) y eleva el pH interno de la vacuola mediante la absorción de “protones”. El superóxido es una de las armas del sistema fagocítico ya que actúa como precursor de la síntesis de muchos compuestos bactericidas. 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) (Halliwell and Gutteridge 1984).



**Figura 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 transfieren del NADPH a través de la membrana hacia el  $O_2$ , para generar  $O_2^{\cdot-}$ , 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).

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 and Segal 1996).

La síntesis de  $O_2^-$  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 and Segal 1996). Este sistema de transporte de electrones que genera superóxido ( $O_2^-$ ) está conformado por el flavocitocromo *b* membranal, tres elementos citoplasmáticos (p67<sup>phox</sup>, p47<sup>phox</sup> y p40<sup>phox</sup>), y una proteína G de bajo peso molecular (rac1 ó rac2) (Vignais 2002).

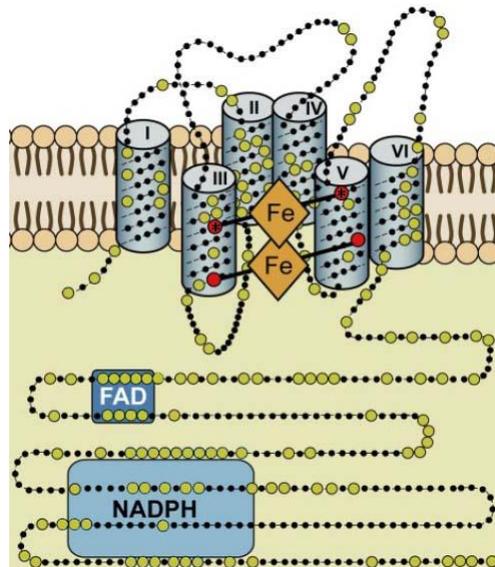
El elemento estructural principal es el flavocitocromo conocido como *b*<sub>558</sub> ó *b*<sub>-245</sub>, el cual está incorporado en la membrana de la vacuola fagocítica. El flavocitocromo es un heterodímero  $\alpha_1\beta_1$  (Wallach and Segal 1996). La subunidad  $\beta$  es la más grande y es conocida como gp91<sup>phox</sup>, (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 and Segal 1997).

Nox2 es una proteína altamente glicosilada (Harper, Chaplin et al. 1985), conformada por 570 aminoácidos con una masa molecular de 65 kDa (Royer-Pokora, Kunkel et al. 1986). Se han realizado análisis de hidropatía que indican que los extremos amino (N-) y carboxilo (C-) terminales son 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 and Segal 1997). Esta cadena de carbohidratos está conformada de *N*-acetilglucosamina y galactosa principalmente, aunque también contiene fructosa, manosa y glucosa (Harper, Chaplin et al. 1985). En el extremo C- hay dominios de unión a NADPH y FAD (Segal, West

et al. 1992). En las hélices transmembranales también existen cuatro residuos de histidina que están absolutamente conservados en todas las NOX conocidas (Kawahara and Lambeth 2007), ubicados en las hélices  $\alpha$  III y V y que proveen los ligandos citosólico ( $H^{101}$  y  $H^{209}$ ) y no citosólico ( $H^{115}$  y  $H^{222}$ ) para dos grupos hemo no idénticos del tipo *b* (Cross, Rae et al. 1995, Finegold, Shatwell et al. 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, West 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, Marchal et al. 2006) y posee una región rica en prolina (PRR), involucrada en la unión con p47<sup>phox</sup> (DeLeo, Nauseef 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 del complejo citosólico

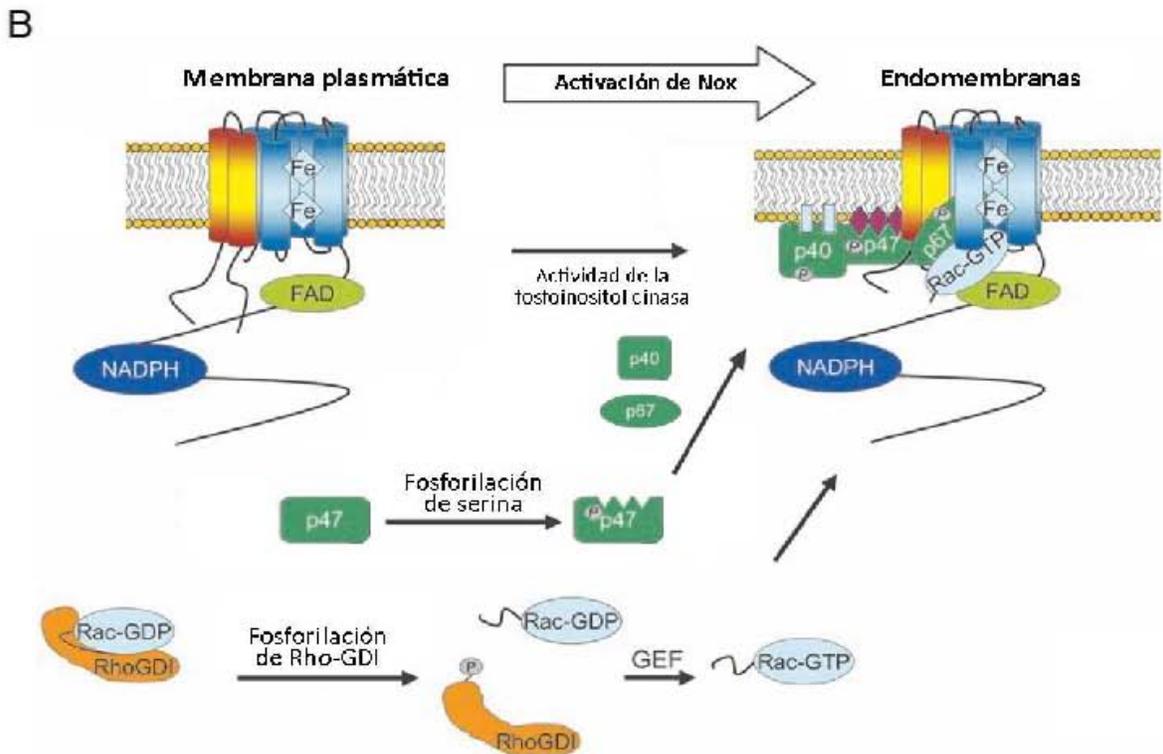
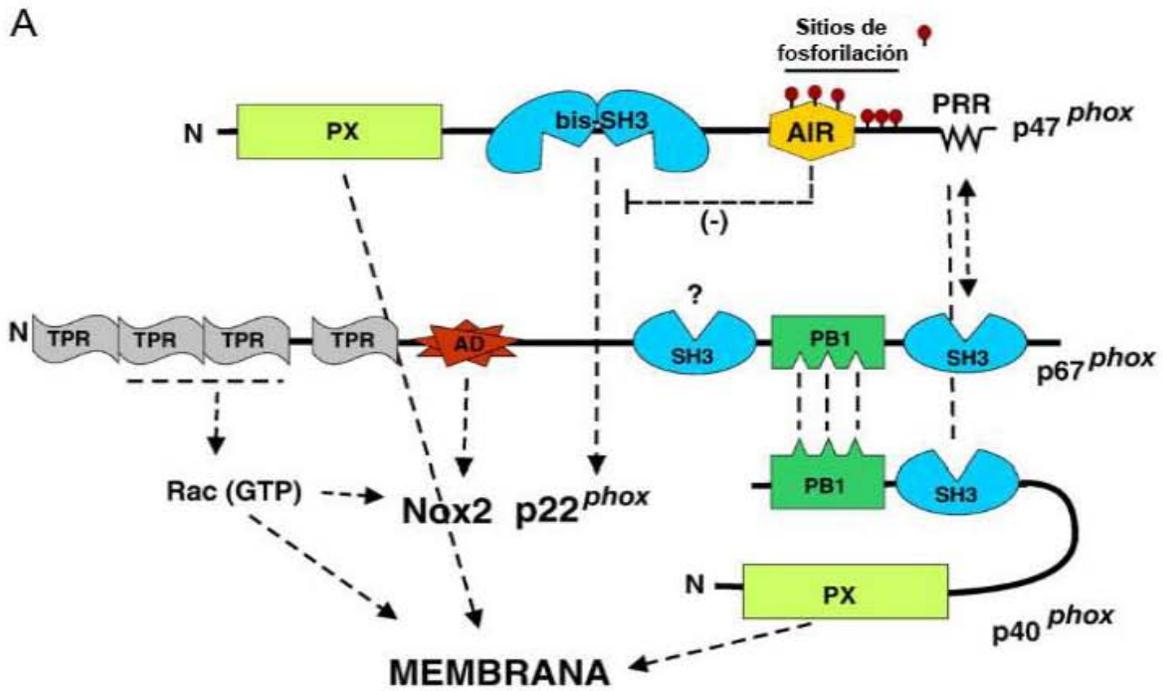


**Figura 3. Estructura de gp91<sup>phox</sup>/Nox2.** En el extremo amino-terminal la subunidad gp91<sup>phox</sup> tiene seis dominios transmembranales (representados por cilindros). Los dominios transmembranales III y V contienen un par de histidinas cada uno, que coordinan a dos grupos hemo del tipo *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 amarillos representan los aminoácidos conservados entre las Nox1, Nox2, Nox3 y Nox4 de humano, los círculos rojos indican las histidinas que unen el hemo citosólico y el no citosólico (\*). (Figura modificada de Bedard & Krause, 2007).

Formado por 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 et al. 1990). Cuando las células se activan, la proteína citosólica 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 auto inhibitoria (AIR), previniendo que el dominio *bis*-SH3 se una a la región PRR de p22<sup>phox</sup> (Rotrosen and Leto 1990, Ago, Nunoi et al. 1999). 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 permite la unión de p47<sup>phox</sup> a p22<sup>phox</sup> (Groemping, Lapouge et al. 2003). p47<sup>phox</sup> también posee un dominio PX, que le permite unirse a las cabezas de fosfatidinositol presentes en la membrana (Ago, Takeya 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 et al. 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 et al. 2002). Una vez en la membrana, p67<sup>phox</sup> (la “subunidad activadora”) y Nox2 interactúan (Han, Freeman et al. 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, Zeng 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



**Figura 4. Modelo de la activación de NOX en células fagocíticas. A)** Subunidades reguladoras de Nox2. Se muestran los dominios que se requieren 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, se reclutan 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).

nucleótidos de guanina (GEFs), que catalizan la formación de Rac-GTP (Knaus, Heyworth et al. 1991). Rac-GTP interactúa con Nox2 mediante un mecanismo de dos pasos que involucra una interacción directa con Nox2 (Diebold and 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, Terasawa et al. 1999). p67<sup>phox</sup> posee un dominio de activación (AD), que se regula conformacionalmente por la unión de Rac (Sarfstein, Gorzalczany 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 et al. 1999).

En el primer paso, los electrones se transfieren del NADPH al FAD, proceso regulado por la activación de p67<sup>phox</sup>. En el segundo paso, un electrón se transfiere del flavín reducido FADH<sub>2</sub> al hierro del hemo citosólico. El hierro del hemo sólo 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 et al. 1996).

Una vez que se genera el  $O_2^{\cdot -}$ , la enzima SOD lo convierte en  $H_2O_2$ . Se ha sugerido que el  $H_2O_2$  proveniente de  $O_2^{\cdot -}$  es un producto de la actividad de NOX (Geiszt and Leto 2004). El  $H_2O_2$  también puede ser empleado por la mieloperoxidasa (MPO), que produce potentes bactericidas, con la consiguiente inactivación de diversos patógenos (Klebanoff 2005). El  $O_2^{\cdot -}$  y el  $H_2O_2$  también se pueden transformar mediante vías no enzimáticas, produciendo radicales libres altamente reactivos. El hierro puede interactuar con el  $H_2O_2$  y producir radical hidroxilo mediante la reacción de Fenton (Halliwell and Gutteridge 1986). El  $H_2O_2$  puede reaccionar con el  $O_2^{\cdot -}$  produciendo radical hidroxilo y oxígeno en singulete (MacManus-Spencer and McNeill 2005), o con ácido hipocloroso produciendo oxígeno en singulete y cloraminas (El-Benna, Dang et al. 2005).

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

## 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 (Cross and Jones 1991). Inicialmente se suponía que estas ERO provenían de la respiración. Sin embargo, al agregar inhibidores de la explosión respiratoria desaparecía esta producción de ERO (Jones, O'Donnell et al. 1996), por lo que se inició la búsqueda de homólogos de Nox2 en células no fagocíticas (Emmendorffer, Roesler 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, Arnold et al. 1999), placenta (Cui, Brockman et al. 2006),

osteoclasto (Lee, Choi et al. 2005) y en las de la médula espinal (Fischer, Sharma et al. 2012). Nox1 genera bajas cantidades de  $O_2^-$  (Suh, Arnold et al. 1999) y  $H_2O_2$  (Emmendorffer, Roesler 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, Ueno et al. 2003) y la GTPasa Rac1 (Fig. 5) (Ueyama, Geiszt et al. 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 and Lambeth 2004). Noxo1 posee los dominios *bis*-SH3 y PRR. El dominio *bis*-SH3 de Noxo1 se une al extremo PRR (Yamamoto, Kami et al. 2007). Cuando esta interacción se interrumpe, el dominio PRR de Noxo1 se une al de p22<sup>phox</sup>. Noxa1 no posee los aminoácidos necesarios en su dominio PB1 para 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, Ueno et al. 2003).

Nox3 es una proteína conformada por una secuencia de 568 aminoácidos y muestra una identidad del 58% con Nox2 (Kikuchi, Hikage et al. 2000). Nox3 se encuentra en varios tejidos fetales, como el riñón, hígado, pulmón y el bazo (Banfi, Malgrange et al. 2004). La actividad de Nox3 también está regulada por p22<sup>phox</sup>, Noxo1 y Rac1 (Ueyama, Geiszt et al. 2006) y en animales no se requiere de Noxa1 (Fig. 5) (Cheng, Ritsick et al. 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, Bergstrom et al. 2004)

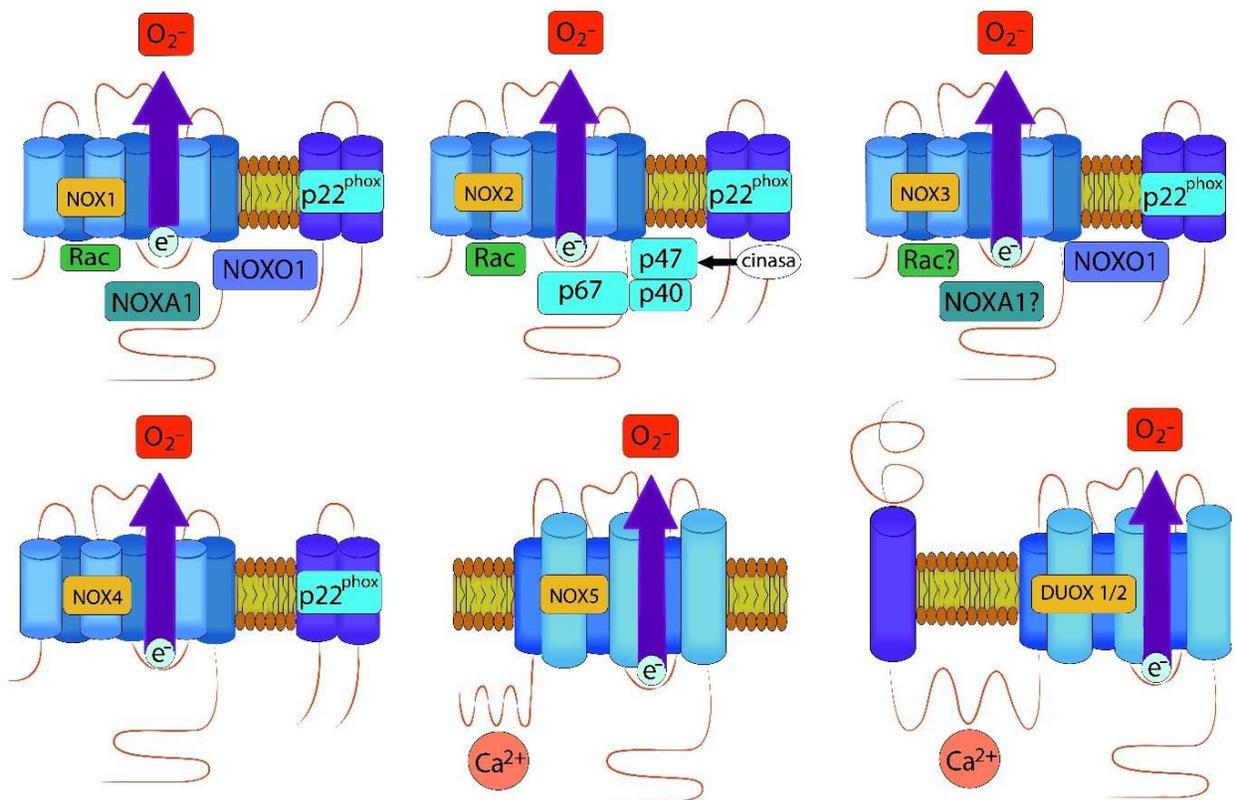
Nox4 tiene 578 aminoácidos y comparte un 39% de identidad con Nox2. Nox4 fue identificada inicialmente en riñón, tanto en el adulto como en el feto, por lo que recibió el nombre de “renox” (Geiszt, Kopp et al. 2000). Sin embargo, también se ha detectado en células endoteliales vasculares (Ago, Kitazono et al. 2004), células de músculo liso (Ellmark, Dusting et al. 2005), osteoclastos (Yang, Zhang et al. 2004), células troncales

hematopoyéticas (Piccoli, Ria et al. 2005), fibroblastos (Dhaunsi, Paintlia et al. 2004), queratinocitos (Chamulitrat, Stremmel et al. 2004), melanocitos (Brar, Kennedy et al. 2002), neuronas (Vallet, Charnay et al. 2005), placenta, ovario, corazón y páncreas (Kawahara, Quinn et al. 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, Sorescu et al. 2007). Además Nox4 podría producir H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en lugar de O<sub>2</sub><sup>-</sup>, (Martyn, Frederick et al. 2006, Chen, Kirber et al. 2008) debido a un residuo de histidina que posee en el giro-E, que promueve la dismutación rápida de O<sub>2</sub><sup>-</sup> en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Takac, Schroder et al. 2011).

Nox5 fue detectada en 2001 por dos grupos distintos a partir de cDNA (DNAcomplementario) (Banfi, Molnar et al. 2001, Cheng, Cao 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, Szanto et al. 2005), tejidos linfoides humanos, testículos, bazo (Banfi, Molnar et al. 2001), músculo liso, médula ósea, placenta, ovario, útero y varios tejidos fetales (Cheng, Cao 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 la aterosclerosis (Schulz and Munzel 2008). A diferencia de las demás NOX, la actividad de Nox5 está regulada por el calcio (Ca<sup>2+</sup>) 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 4 motivos EF-hand que se unen a Ca<sup>2+</sup> (Fig. 5) (Banfi, Molnar et al. 2001). Altos niveles de Ca<sup>2+</sup> pueden producir un exceso de ERO (BelAiba, Djordjevic et al. 2007). A diferencia de *nox1-4* y *duox1/2*, el gen de *nox5* no se encuentra en roedores (Si, Fu et al. 2007).

Las DUOX se llamaron inicialmente “oxidases tiroideas” debido a que se identificaron en la tiroides (Dupuy, Ohayon et al. 1999, De Deken, Wang et al. 2000). Duox1 y -2, también conocidos como Nox6 y Nox7, están relacionados con la producción de la hormona tiroidea, que requiere H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para su síntesis. Las mutaciones en DUOX están relacionadas

con el hipotiroidismo congénito (Maruo, Takahashi et al. 2008). Sin embargo, Duox1 también se ha detectado en pulmón (Forteza, Salathe et al. 2005) y en próstata (Wang, De Deken et al. 2005) mientras que Duox2 se ha encontrado en glándulas salivales (Geiszt, Witta et al. 2003), el tracto gastrointestinal, incluyendo duodeno, colon y ciego (El Hassani, Benfares et al. 2005) y en pulmón (Forteza, Salathe et al. 2005). Al igual que la Nox5, las DUOX están reguladas directamente por  $Ca^{2+}$ . 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



**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 y DUOX 1/2. Aun cuando su estructura y función enzimática es similar, las enzimas de la familia NOX difieren 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 y DUOX 1/2 son activadas por  $Ca^{2+}$  y al parecer no requieren subunidades para su actividad (Figura modificada de Bedard & Krause, 2007)

peroxidasa por lo que su función como peroxidasa se ha cuestionado (Daiyasu and Toh 2000). Al igual que las demás NOX, las DUOX producen  $O_2^{\cdot-}$ . Sin embargo, éste rápidamente es dismutado en  $H_2O_2$  (Nakamura, Ohtaki et al. 1989, Ameziane-El-Hassani, Morand et al. 2005).

Actualmente la familia NOX/DUOX consiste de siete miembros: Nox1-Nox5 y Duox1 y Duox2 (Suh, Arnold 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  $p22^{phox}$  para su actividad y Nox1-3 requieren además, de las subunidades *Phox* adicionales (Fig.5) (Kawahara, Quinn et al. 2007).

Evolutivamente las NOX de animales 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 (180 kDa) y tienen dos dominios extras, un dominio con homología a 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 la Nox2 (Lambeth 2002).

## 2.2- Las NOX en los hongos

En los hongos existen tres subfamilias de NOX,: NoxA (Nox1), NoxB (Nox2), que son homólogas a Nox2 de humanos y NoxC, la cual contiene dominios de unión a calcio (EF-hands) y es más parecida a la Nox5 de mamíferos (Fig. 6). (Aguirre, Rios-Momberg et al. 2005). Inicialmente se propuso que las NOX estaban relacionadas con la multicelularidad (Lalucque and Silar 2003); sin embargo recientemente se identificó la primera enzima con

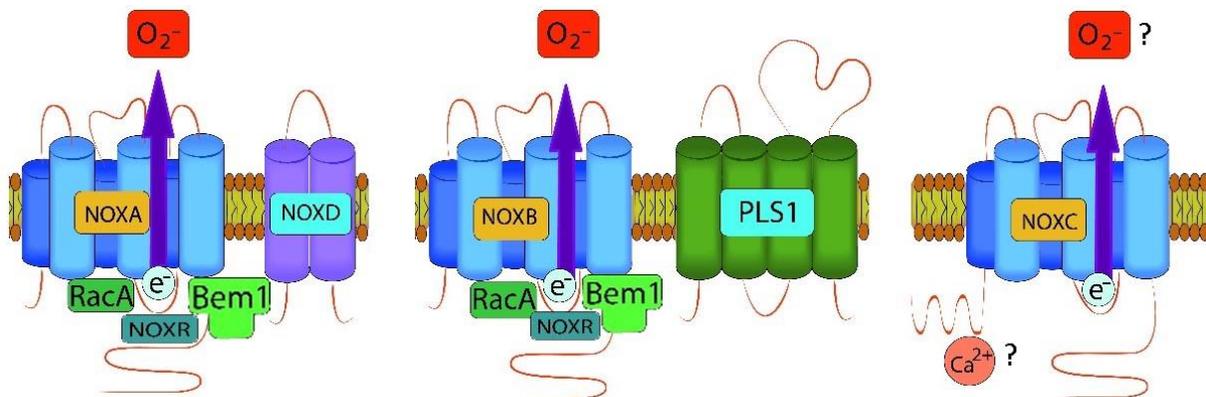
actividad de Nox en *Saccharomyces cerevisiae*, llamada Yno1, lo cual pone en duda este concepto (Rinnerthaler, Buttner et al. 2012).

Así como en mamíferos cada isoforma de la familia NOX se localiza en tejidos específicos en los cuales realizan diversas funciones, en los hongos las tres subfamilias de NOX regulan diferentes procesos del desarrollo (Aguirre, Rios-Momberg et al. 2005). Las enzimas de la subfamilia de NoxA controlan la formación de las estructuras sexuales (Lara-Ortiz, Riveros-Rosas et al. 2003, Malagnac, Lalucque et al. 2004, Cano-Dominguez, Alvarez-Delfin et al. 2008), la formación de los esclerocios (Giesbert, Schurg et al. 2008, Segmuller, Kokkelink et al. 2008, Schurmann, Buttermann et al. 2013), la formación de los tubos de anastomosis (CATs) (Roca, Weichert et al. 2012, Kayano, Tanaka et al. 2013), la virulencia (Segmuller, Kokkelink et al. 2008, Kim, Chen et al. 2011, Yang and Chung 2013) y la degradación de celulosa (Brun, Malagnac et al. 2009). Las proteínas que conforman el grupo de NoxB son responsables de la penetración del tejido del hospedero (Egan, Wang et al. 2007, Segmuller, Kokkelink et al. 2008) y la germinación de las ascosporas (Malagnac, Lalucque et al. 2004, Cano-Dominguez, Alvarez-Delfin et al. 2008). Finalmente, las proteínas del grupo de NoxC están presentes en pocas especies de hongos a diferencia de las proteínas pertenecientes a NoxA o NoxB (Takemoto, Tanaka et al. 2007), y no se les ha encontrado una función clara (Brun, Malagnac et al. 2009).

A pesar de la distancia evolutiva entre los hongos y los mamíferos, la mayor parte de las proteínas reguladoras del complejo NOX están conservados en ambos grupos. Recientemente se ha descrito a la proteína NoxD como el homólogo de p22<sup>phox</sup> en *P. anserina*, *B. cinerea* (Lacaze, Lalucque et al. 2015, Siegmund, Marschall et al. 2015) y *A. nidulans* (González-López 2017). NoxD interactúa directamente con la subunidad catalítica NoxA. En el caso de NoxB, la tetraspanina Pls1 podría ser la proteína que cumple la función de p22<sup>phox</sup> (Lambou, Malagnac et al. 2008, Siegmund, Heller et al. 2013) (Fig. 6). Con respecto a los componentes citosólicos del complejo NOX, el ortólogo de p67<sup>phox</sup>, llamado NoxR, se descubrió inicialmente en *Epichloe festucae*, y se demostró que activa a

Nox1 junto con las proteínas BemA, el factor intercambiador de nucleótidos Cdc24 y la Rho-GTPasa RacA (Tanaka, Christensen et al. 2006, Takemoto, Tanaka et al. 2007, Kayano, Tanaka et al. 2013). Posteriormente, se describió que NoxR regula la actividad tanto de NoxA como NoxB en *N. crassa* y *B. cinerea* (Cano-Dominguez, Alvarez-Delfin et al. 2008, Segmuller, Kokkelink et al. 2008). Se ha sugerido que la proteína de andamiaje BemA/1 podría realizar la función de las proteínas p47<sup>phox</sup> y p40<sup>phox</sup> debido a que presenta los dominios PX, PB1 y SH3 (Takemoto, Kamakura et al. 2011), los cuales podrían permitir la interacción con RacA y/o Cdc24 (Takemoto, Tanaka et al. 2006, Giesbert, Siegmund et al. 2014). RacA se ha mostrado que es importante en la activación de NoxA y en la producción de ERO (Takemoto, Tanaka et al. 2006, Takemoto, Tanaka et al. 2007)

La composición exacta de los complejos NOX, sus sitios de acción así como la comunicación con las principales vías de señalización descritas (señalización por MAPK y calcio) aún se entienden poco en los hongos filamentosos, por lo que siguen siendo importantes temas de estudio (Marschall, Siegmund et al. 2016).



**Fig 6. Isoformas y modelos de las NOX presentes en los hongos.** La presencia de homólogos de Nox2 en los hongos definió 3 nuevas subfamilias de este tipo de enzimas, NOXA, NOXB y NOXC. Los cilindros representan las seis hélices  $\alpha$  transmembranales que comparten todas las NOX. A diferencia de NOXA y NOXB, las proteínas tipo NOXC poseen dominios EF-hand que podrían unirse a Calcio (círculo rosa). Aun cuando su estructura y función enzimática es similar, las enzimas de la subfamilia de NOX en los hongos difieren en sus mecanismos de activación. La actividad de NOXA requiere a NOXD, NOXR, BEM1 y RacA, mientras que NOXB podría requerir a PLS1 en lugar de NOXD. La actividad de NOXC aún no ha sido comprobada y podría requerir calcio. (Figura modificada y adaptada de Bedard & Krause, 2007; Kim, H.J., 2014; Marschall, R. & Tudzynski, P. 2016; Takemoto, D., Tanaka, A. & Scott, B. 2007))

### 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 manganeso (Mn), hierro (Fe), cobre (Cu) y zinc (Zn), tienen una relevancia biológica especial porque participan en las reacciones redox en todos los biosistemas (Fraga 2005).

El hierro es un elemento traza indispensable para todos los seres vivos. Es el segundo metal más abundante, después del aluminio, y el cuarto más abundante en la corteza terrestre (Crichton and 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,  $\text{Fe}^{3+}$ ) (Sigel and Sigel 1998, Crichton and Pierre 2001). Los organismos sólo pueden aprovechar el  $\text{Fe}^{2+}$  y la baja biodisponibilidad de hierro se debe a que se oxida rápidamente en el ambiente aerobio a su forma férrica, que es poco soluble en agua y forma precipitados (oxihidróxidos) (Sigel and 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 o grupos hemo, el hierro se requiere para procesos celulares fundamentales, como la cadena respiratoria, el ciclo de los ácidos tricarbóxicos, la desintoxicación de las ERO, la biosíntesis de aminoácidos, desoxirribonucleótidos y esteroides (Blatzer, Binder et al. 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 and Pierre 2001), siendo el estado oxidado muy insoluble y por lo tanto no biodisponible (Lesuisse, Casteras-Simon et al. 1996). El cobre sirve como cofactor para muchas enzimas debido a su adecuado potencial redox (óxido-reducción). Las proteínas que contienen cobre están ampliamente distribuidas en los organismos vivos, con dos funciones principales, la transferencia de electrones y la activación y transporte de dioxígeno (Kaim and Rall 1996).

Aunque el hierro y el cobre son nutrientes esenciales para casi todos los organismos, estos nutrientes son tóxicos en altas cantidades, debido a la reacción de Fenton, que se produce cuando el  $\text{H}_2\text{O}_2$  acepta un electrón desapareado, por ejemplo, de un metal de transición como el  $\text{Fe}^{2+}$  o el  $\text{Cu}^+$ , entonces se fragmenta y forma el radical hidroxilo ( $\text{HO}^\cdot$ ) y el ión hidroxilo ( $\text{HO}^-$ ) (Halliwell and Gutteridge 1984, Crichton and Pierre 2001).

### 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, Neilands 1983), la asimilación de hierro por reducción (RIA) (Marschner and Römheld 1995), la captura de grupos hemo (Foster 2002, Santos, Buisson et al. 2003) y la captura directa de  $\text{Fe}^{2+}$  (Hassett, Dix et al. 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  $\text{Fe}^{3+}$  (Neilands 1981, Neilands 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 et al. 1992).

Otro mecanismo que emplean los hongos para capturar hierro es la RIA (Marschner and 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 se ha reducido, es importado y reoxidado intracelularmente por permeasas con alta afinidad por el hierro, como el sistema Fet3/Ftr1, o bien, es transportado directamente por el transportador de baja afinidad Fet4 (Hassett and Kosman 1995, Hassett, Yuan et al. 1998).

La captura de grupos hemo se da en organismos patógenos, como *Candida albicans* (Foster 2002) e *Histoplasma capsulatum* (Santos, Buisson 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 et al. 2008). La captura directa de  $Fe^{2+}$  únicamente ha sido estudiada en *S. cerevisiae*, este sistema tiene una afinidad baja y no es específico para  $Fe^{2+}$  ya que internaliza otros metales, como cobre y zinc (Hassett, Dix 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 et al. 1990).

Las FRE son homólogas a las NADPH oxidasas de hongos, lo que indica un origen común (Dancis, Roman et al. 1992). *S. cerevisiae* posee ocho posibles FRE llamadas Fre1-8 (Georgatsou, Mavrogiannis et al. 1997, Martins, Jensen et al. 1998, De Freitas, Kim et al. 2004). 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 al NADPH (Shatwell, Dancis et al. 1996), así como los cuatro residuos de histidina que coordinan dos grupos hemos del tipo *b*, de manera similar a las NOX (Dancis, Roman et al. 1992). Sin embargo, mientras que el transporte de electrones de las NOX reduce al  $O_2$  (Shatwell and Segal 1996), las FREs reducen  $Fe^{3+}$  o  $Cu^{2+}$  (Dancis, Roman et al. 1992, Martins, Jensen 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, Klausner et al. 1990, Dancis, Roman 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, Jensen et al. 1998).

Las Fre1-4 están involucradas en la asimilación del hierro por reducción (RIA). Fre1 y Fre2 son responsables de 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  $Fe^{3+}$ . También pueden catalizar la liberación de hierro de una gran cantidad de sideróforos además son reductasas de cobre, convirtiendo al  $Cu^{2+}$  en  $Cu^{1+}$ . Fre3 y Fre4 pueden catalizar la asimilación de hierro a partir de sideróforos de hidroxamato y del ácido rodotorúlico, respectivamente (Georgatsou, Mavrogiannis et al. 1997). Fre6 se localiza en la membrana vacuolar, donde actúa transportando hierro y cobre reducidos de la vacuola al citosol (Singh, Kaur et al. 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, Kim et al. 2004). Las funciones de Fre5 y Fre7 se desconocen (Blatzer, Binder et al. 2011). La expresión de los genes que codifican las proteínas Fre1-6 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 et al. 2001).

En el comensal humano *Candida albicans*, patógeno oportunista causante de la candidiasis, se han detectado por lo menos 17 secuencias con similitud a las FRE de *S. cerevisiae*, de las cuales sólo 5 se han estudiado: Cfl1, Cfl2, Fre5, Fre7 y Fre10 (Xu, Qian et al. 2014). *Cfl1* se regula negativamente por hierro y cobre, y la proteína que codifica puede reducir ambos metales (Hammacott, Williams et al. 2000). *Cfl2* se regula por hierro y podría codificar para una reductasa específica de este metal (Chen, Pande et al. 2011).

Con respecto a *fre5*, únicamente se sabe que es regulado por quelantes de hierro y pH alcalino (Baek, Li et al. 2008). *fre7* se induce en medios carentes de cobre y podría codificar una reductasa específica de este metal (Woodacre, Mason et al. 2008). *Fre10* es la responsable de la principal actividad de reductasa férrica a nivel celular y es específica para hierro (Jeeves, Mason et al. 2011). En *Cryptococcus neoformans*, otro patógeno oportunista, causante de meningitis, se han detectado 8 secuencias similares a reductasas férricas (Hu, Chen et al. 2014). Sin embargo, sólo se han caracterizado dos: FRE1 y FRE3. FRE1 puede reducir hierro y cobre (Nyhus and Jacobson 1999), mientras que FRE3 es una reductasa específica de hierro (Hu, Chen et al. 2014). En la levadura *Schizosaccharomyces pombe* existen dos FRE (Grissa, Bidard et al. 2010), pero sólo ha sido caracterizada Frp1, que está implicada en el transporte y reducción del hierro, y en la asimilación de cobre (Roman, Dancis et al. 1993).

A diferencia de las NOX, las FRE han sido poco estudiadas en los hongos filamentosos. Por ejemplo, en el hongo filamentoso *Fusarium verticillioides* se han detectado 19 genes que codifican para FRE, sin embargo, ninguno se ha caracterizado (Grissa, Bidard et al. 2010). En *Aspergillus fumigatus* existen 15 FRE y sólo una ha sido caracterizada; la denominada FreB, al igual que las FRE de *S. cerevisiae*, está involucrada en el mecanismo de la RIA. *freB* se expresa en bajas concentraciones de hierro y está relacionada con la homeostasis de este elemento (Blatzer, Binder et al. 2011).

El genoma del hongo causante del “carbón del maíz”, *Ustilago maydis*, comúnmente conocido como huitlacoche, contiene seis posibles FRE (Blatzer, Binder et al. 2011), aunque sólo se sabe que una de éstas, Fer9, se regula por hierro (Eichhorn, Lessing 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 et al. 2012).

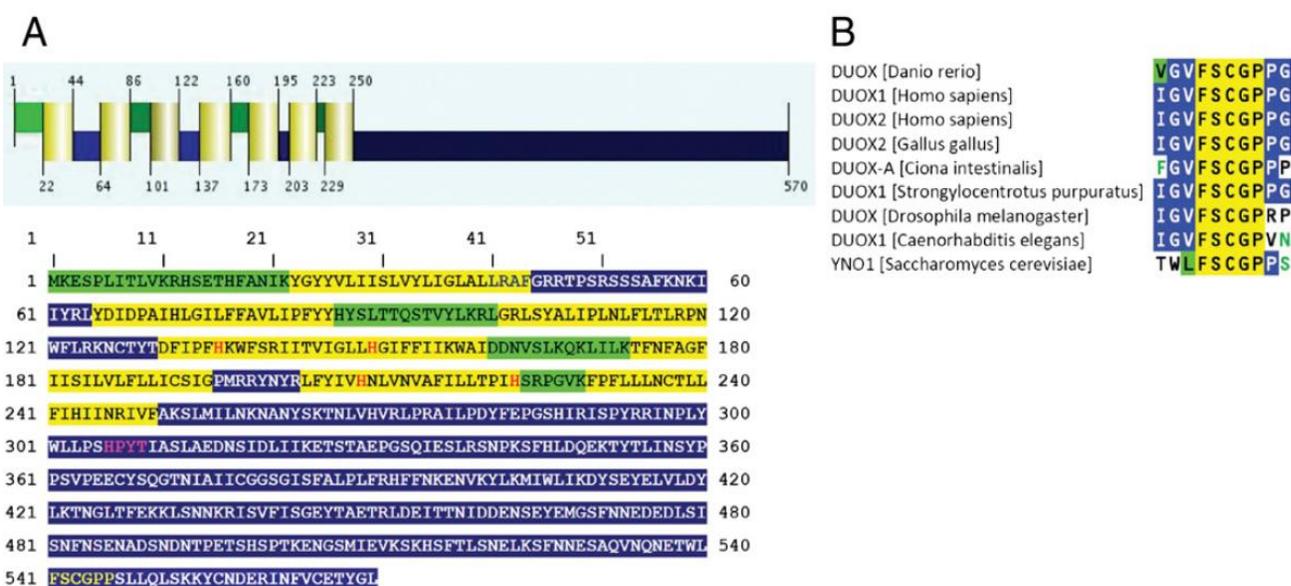
En el genoma de *Aspergillus nidulans* existen 9 secuencias que podrían codificar proteínas con función de FRE (Blatzer, Binder et al. 2011). Sin embargo, sólo se ha reportado que el

gen *freA* se induce en un medio con niveles bajos de hierro (Oberegger, Schoeser et al. 2002).

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

Inicialmente, YGL160w (Yno1) se identificó como el parólogo más distante de Fre1 y Fre2, con menos de 20% de identidad y posteriormente fue ubicada en la familia de FRE8 (Martins, Jensen et al. 1998, Yun, Bauler et al. 2001), debido a que parecía ser una FRE, aunque su expresión no estaba regulada por la limitación de hierro o de cobre en el medio (Martins, Jensen et al. 1998, Georgatsou and Alexandraki 1999). 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 carece de las EF-hands (manos de calcio) características de la Nox5 de humano (Fig. 7A). No obstante, posee los sitios de unión al FAD y al NADPH así como las cuatro histidinas que coordinan al grupo hemo. Además, el sitio de unión al NADPH del dominio FNR tiene una gran identidad con las proteínas DUOX de diversos organismos (Fig. 7B). Mediante el uso de una fusión de GFP en el extremo carboxilo de Yno1 se detectó una señal perinuclear y ésta colocalizó con la señal del marcador de retículo endoplásmico (RFP-HDEL), Yno1 se localiza en la membrana del retículo endoplásmico. Al sobreexpresar Yno1 no hay una acumulación significativa de hierro en las células, por lo que Yno1 carece de actividad de FRE; además al clonar los ocho genes FRE de levadura y el de YNO1 bajo un promotor inducible y medir los niveles de  $O_2^{\cdot-}$  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, lo que sugirió que Yno1 tiene actividad de NOX, es decir, produce  $O_2^{\cdot-}$ . Para corroborar esto, se utilizó resonancia paramagnética del electrón (EPR) usando como trampa de spin 5-dietoxifosforil-5-metil-1-pirrolina-N-óxido (DEPMPO), que es específico para detectar  $O_2^{\cdot-}$ .

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  $\mu$ M) que previene la nucleación de los cables de actina, y a la latrunculina B (20  $\mu$ M) que inhibe la elongación de los cables de actina, lo que es reversible al agregar  $H_2O_2$ , que en la célula podría provenir de la dismutación del  $O_2^-$  generado por Yno1 (Rinnerthaler, Buttner et al. 2012).

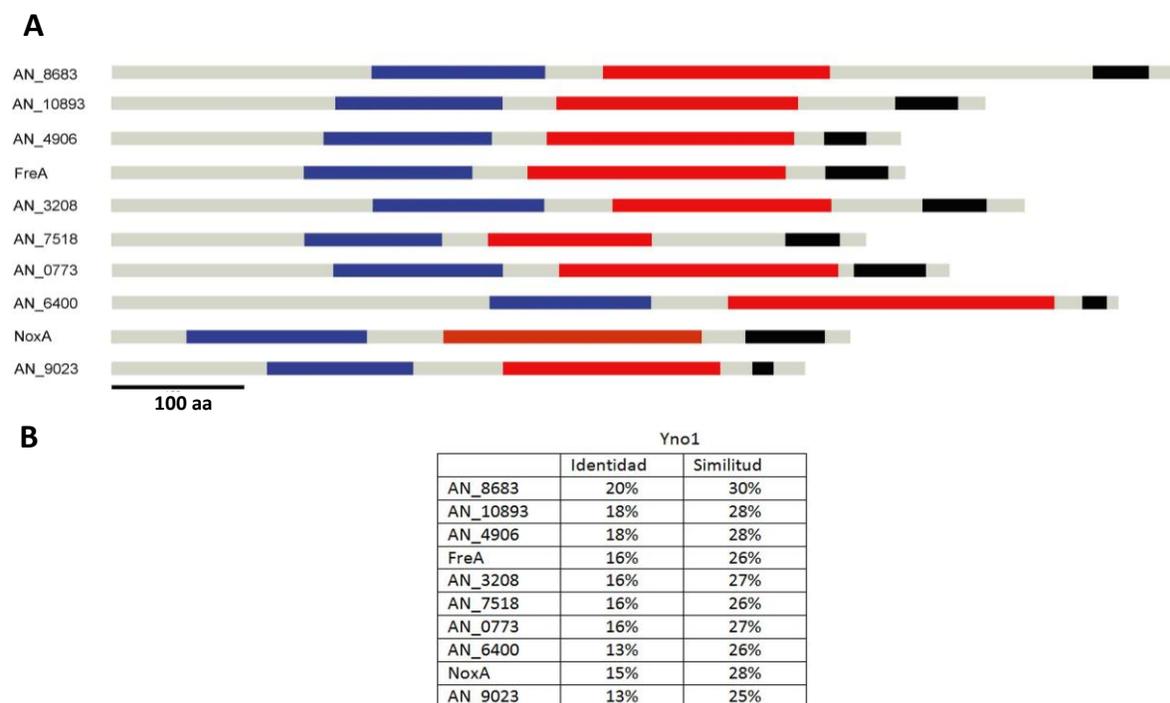


**Fig 7. Análisis bioinformático de la proteína YNO1 (YGL160W) como una posible NOX. A)** Predicción de la estructura secundaria de Yno1 obtenida con el algoritmo de predicción transmembranal de Phillius (Reynolds et al., 2008). Las hélices transmembranales están marcadas en amarillo, las regiones luminales, 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).

### 3.4.- Existen posibles homólogos de Yno1 en *Aspergillus nidulans*.

Debido al descubrimiento de que la proteína Yno1 tiene actividad de NOX y a que esto sugiere que algunas oxidorreductasas que han sido clasificadas como FRE podrían tener

actividad de NOX, realizamos un BLAST con el objeto de saber si existían secuencias homólogas a Yno1 en el genoma de *A. nidulans*. Este análisis arrojó 10 secuencias homólogas, dentro de las cuales se encontraban NoxA, la única NOX reportada en este hongo y FreA, la única reductasa férrica caracterizada. Como se observa en la figura 8A todas las secuencias identificadas presentan los dominios característicos de las proteínas NOX y FRE, el dominio FRD en el que se encuentran cuatro histidinas conservadas que participarían en la unión de dos grupos hemo no idénticos del tipo *b* (Cross, Rae et al. 1995, Finegold, Shatwell et al. 1996, Lambeth, Kawahara et al. 2007), y los Dominios NOX-DUOX y FNR en los que se encuentran los residuos de aminoácidos involucrados en la unión al FAD y NADPH (Segal, West et al. 1992). Sin embargo, las secuencias con mayor identidad a Yno1 están anotadas como “proteínas hipotéticas” en la base de datos de *A. nidulans* (<http://www.aspgd.org>) y ordenados de menor a mayor *e-value* (probabilidad de que la similitud se deba al azar) corresponden a: AN\_8683, AN\_10893 y AN\_4906 con valores de identidad respecto a Yno1 de 20%, 18% y 18%, respectivamente (Fig. 8B).



**Fig 8. *A. nidulans* tiene 10 oxidorreductasas con homología a Yno1.** A) Representación esquemática de la estructura primaria de las proteínas identificadas mediante BLAST contra Yno1. Los colores indican los dominios comunes entre las FRE y las NOX. En azul se representa el dominio FRD (Pfam: PF01794), en rojo se

representa el dominio NOX\_DUOX (Cdd: CD06186) (Marchler-Bauer, Zheng et al. 2013) y el dominio FNR está marcado en negro (Pfam: PF08030) (Finn, Mistry et al. 2010). **B)** La tabla muestra los valores de identidad y similitud de las oxidorreductasas de *A. nidulans* con respecto a Yno1 de *S. cerevisiae*.

A pesar de que las proteínas identificadas tienen tanto los dominios de FRE y NOX en un análisis reciente sobre la relación filogenética entre esta familia de proteínas se ha propuesto 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). Como se observa en la figura 9A, Yno1, AN\_8683 y AN\_10893 poseen una F en lugar de H, mientras que AN\_4906 posee un W y solamente AN8683 y AN\_10893 muestran los aminoácidos TG, mientras que estos corresponden a VG en Yno1 y a SG en AN\_4906. De acuerdo con estos resultados las proteínas AN\_8683, AN\_10893, AN\_4906 así como Yno1 sólo cumplen parcialmente con la presencia de los aminoácidos H\_TG, a pesar de que existe buena evidencia experimental de que Yno1 posee actividad de NOX (Rinnerthaler, Buttner et al. 2012).

Con el objeto de conocer cómo se agrupa esta familia de oxidorreductasas y su conservación en los hongos filamentosos, se realizó un análisis filogenético incluyendo secuencias homólogas a Yno1 de algunos hongos filamentosos representativos (Pérez 2014). Los resultados mostraron cuatro grupos principales de proteínas: el grupo de las NOX, en el que se agrupan las tres subfamilias de Nox presentes en los hongos (NoxA, NoxB y NoxC); el grupo de las FRE, donde se agrupa FreA y las siete FRE de *S. cerevisiae*; el grupo de Yno1/Fre8, en el que se agrupan proteínas no caracterizadas, y un grupo al que nombramos Fre/Nox, donde se agrupan AN\_8683 y AN\_10893, así como proteínas de otros hongos no estudiadas aún (Fig. 9B).

La eliminación del gen AN\_8683 y la caracterización de la mutante mostró que la cepa  $\Delta$ AN\_8683 está afectada tanto en el desarrollo sexual (produce más cleistotecios), como en el asexual (produce menos conidias). Aunque no de la misma manera, ambos procesos

A

```

Yno1      LT----TQSTVYLKRLGRIS-YALIPLNIFITLRFNWFL-RKNCTYTDPIPEHKWFSRIITVIGLIH 150
AN_8683   IR----VGSPPAIARAGMLA-VAMIPWIVAMSTRANETSMTGIGHERLNVLRHWAGYICLFLSLVH 244
AN_10893  TDTVNFGGSPPIATRIGWMA-VALLPFVLVLGTRKANI VSALTGVPPERLQIBEHWTSYAMFVLALVH 218
AN_4906   DS----V-AGVILSRIGVMATVNLIPLVLLAG-RNNEITILQVPYDTYNI IHRWLARIVVCEALAH 209
  
```

Dominio FRD

```

Yno1      GIFEIKWAIDDNVSL-KQKLI--LKTENEVGGIISILVLELLICSIGEMRRYNYRIFYIVHNLVNV 214
AN_8683   TVEFYITPIWEHGMLEIYQLNITPHIYVYGTGAALVPLVFLCIHSLPILRNCMYEYLFKHLHPVSM 311
AN_10893  TFEFVYVYNISKGQMVSE--E-NK--GSVVYWTGVVALVAQAYLTFMSIPTIRNRYEYEFKATHFLIAL 280
AN_4906   TFAWYIPKAQSMGWEAISCSEA--HSTFIQSGLIIGTCAFVALLVHSPSAVRHAEYETELHLHIAFAV 274
  
```

```

Yno1      AFILLTPHRSRPG-VKEFFLLNCTILFIHIINRIVEAK-----SIMILN-KNE--NYSKTNIIVH 270
AN_8683   IFVAMLEWHHTKNYLSSWAYLWSTVAILVLSYVVRIGYLNWNTNPLRLSFMIG--EDSATTVLEPQNAVK 376
AN_10893  LFI LFFEFHCFDRLTSWLYEIAAGSLYIFSLITSLNRTH-----LINCR-HDATTLSVLPCCGILQ 338
AN_4906   LAFAYLWVHLDGR-NAQNEFLAAIILWALERFARLNIIIVYR-----NVGCRATTAVVEALEGDAMR 334
  
```

Dominio NOX-DUOX

```

Yno1      VRLERAILPDYFEPGSHIRISPYRRINPL----YWLLPKHPYTIAS-LA-EDNSIDL-IIKETSTAE 330
AN_8683   VIVETQ---MRWKPGQYVYLR---MPGV----AFFQHHPFTIAS-LCSNIFPSE-----419
AN_10893  LRIETI---LSWKPGQHVFIR---FTCIQSVGLHSLT HPFTICS-TA-HDIQSL-----385
AN_4906   IITKLS-RPWAFEPGQHYIY---IPAI---GWWT HPFSIGWSDA-ELVMGDEKSLPVSSRDV 390
  
```

FAD

```

Yno1      PGSQIESLRSNKSFHID-----Q-EKTYTLINSYEPSVPE-ECYSQGTNIAIIC 378
AN_8683   YGE-----EYRIIALVFRPFRGFTRNVLKRSVEYGP-FKWTAFLEGPYGGR-RQAAFDVIFFA 479
AN_10893  --K-----RANRMVFYVKPKKGITGRIA-KLASRKE-GFTQTVLLEGPYGGIGMGALERSVLIIS 443
AN_4906   YGP-----QKTGISLLVRRRTGFTDKLIFQRAVSAVDCKVSLTAFAGPYGSIH--SMDSYGSVIIFA 450
  
```

FAD

```

Yno1      GGSGISFALPLFRHFFN-----RENVRYIKMIWLIK NYSEYELVLDYIKTNGLTFEK-KP 432
AN_8683   GGSGITAIASHLLDLIKMREG-----KAVTKSVRVIWALRDPESIDWKEELRI---CRDH-AP 535
AN_10893  GGSCGGFSIGILEAALKRIFTPSGCGCGAERGFERRIQVVFACQREDVAAWYRGEIEL---LLDL-YG 506
AN_4906   GCVGITHLVVPFCRHLVKGYAEG-----TVARRVTLVWIIQSEHLEWIRPWMTS---ILAMNRR 507
  
```

NADPH

NADPH

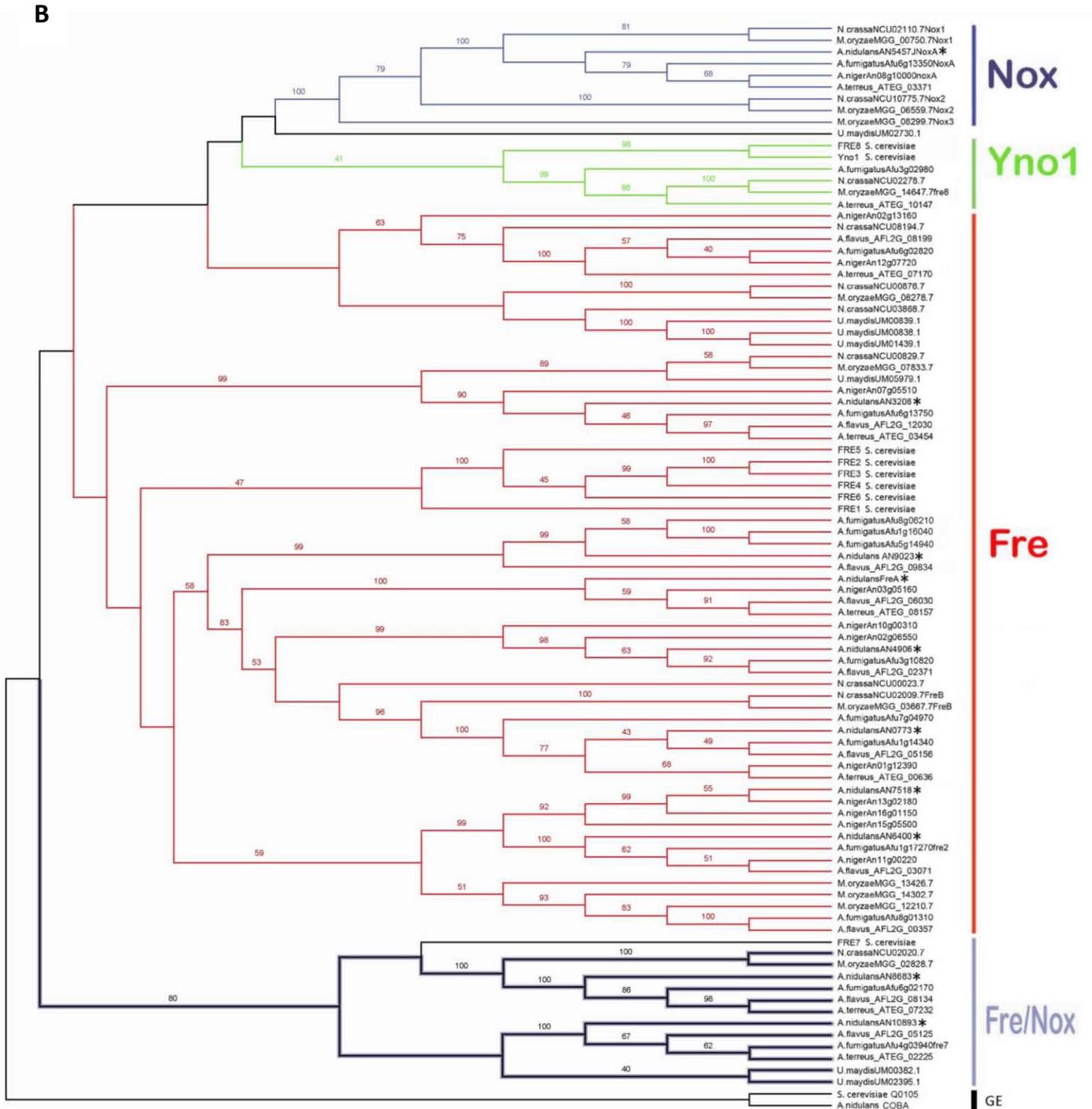
Dominio FNR

```

Yno1      SLIEVKS KHSFTLSNEIKSFNIESAQVNQNETWIFSCGPPSLIQLSKKVCN-----DERIN 562
AN_8683   WKIDY-----CRPVSQMLNDFSKTFGRRTCVYVCGPPSLRMEVSDAVARLQSLVLTDSKDEIF 793
AN_10893  ---SQ-----GRPKLPSIVAST-TDTGKHVAIYVCGEASMLHDVRNAAAAACEGILTGKAGGOVY 646
AN_4906  ---FP-----CRPNIDTLISMEVENQVGAMGLVCGNGSLSDVRRACRTRQD-----RTCID 585
  
```

NADPH

NADPH



**Fig. 9. Existen homólogos de Yno1 en *A. nidulans* y se agrupan en el clado FRE/NOX. A)** Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de la NOX atípica de levadura Yno1 (Rinnerthaler, Buttner et al. 2012) y las proteínas hipotéticas de *A. nidulans* AN\_8683, AN\_10893 y AN\_4906. Los aminoácidos conservados en las secuencias están sombreados. Los dominios FRD, NOX-DUOX y FNR están indicados por líneas. Las histidinas candidatas para la ligación de los grupos hemo están señaladas mediante cabezas de flecha. Se muestran encerrados en cajas los sitios de unión al FAD y NADPH. Los 27 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>). **B)** Para realizar el análisis filogenético las proteínas más parecidas a Yno1 y AN8683 se alinearon con el programa SeaView (Gouy, Guindon et al. 2010) usando MUSCLE (Edgar 2004). El árbol se construyó usando el método de máxima verosimilitud con el algoritmo PhyML (Guindon, Dufayard 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 1997). 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. El análisis filogenético muestra los clados canónicos de NOX y FRE así como dos nuevos grupos, el de YNO1 y el de FRE/NOX. Los asteriscos indican las proteínas de *A. nidulans* (Figura modificada de Pérez, T., & Aguirre, J., 2014).

están afectados en una cepa  $\Delta noxA$  (Lara-Ortiz, Riveros-Rosas et al. 2003, Hernández Becerril 2010), lo que sugirió cierta relación funcional entre ambas proteínas. Con base en estos resultados nos interesó conocer los efectos de la inactivación de la proteína AN\_10893, que también se encontró en el clado FRE/NOX.

#### 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 and 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, Calvo et al. 2005). *A. nidulans* (teleomorfo *Emericella nidulans*) es un hongo ascomiceto que pertenece a la clase *Eurotiomycetes* y al orden *Eurotiales* (Rittenour, Si et al. 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, Kafer 1961), el descubrimiento del ciclo parasexual (Pontecorvo, Roper et al. 1953), el desarrollo de las esporas (Clutterbuck 1969, Adams, Boylan et al. 1988, Mirabito, Adams et al. 1989, Timberlake 1990), el ciclo celular (Oakley and Morris 1981, Osmani, Engle et al. 1988, Osmani, Pu et al. 1988, Xiang, Zuo et al. 1999, Osmani and Mirabito 2004), la polaridad celular (Momany 2002), la reparación del ADN (Goldman and Kafer 2004), el metabolismo y su control (Brambl 2004), el metabolismo secundario (Yu and Keller 2005), la señalización (Hicks, Yu et al. 1997) y el control del pH (Arst and Penalva 2003, Penalva and 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 en diferentes bases de datos públicas como por ejemplo través del Aspergillus Genome Database (<http://www.aspgd.org>) (Cerqueira, Arnaud et al. 2014).

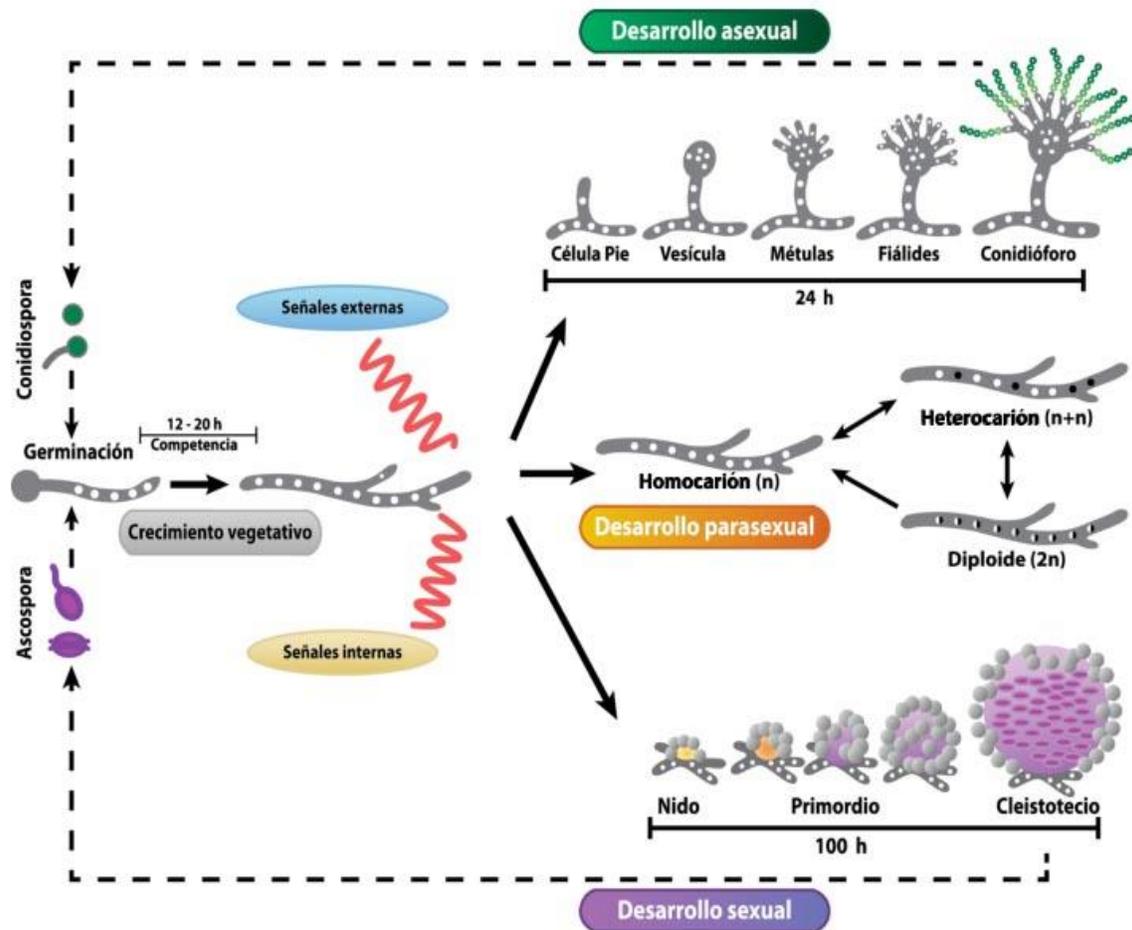
Como modelo de estudio, la levadura de la cerveza *S. cerevisiae* no es representativa de los hongos filamentosos, como los del género *Aspergillus*, ya que es un organismo unicelular que sufrió una duplicación genética ancestral. En cambio, *A. nidulans* es un organismo pluricelular con el doble de genes con respecto a dicha levadura, 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 et al. 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 (Clutterbuck 1969, Timberlake and Clutterbuck 1994, Adams, Wieser et al. 1998), la privación de nutrientes (Skromne, Sanchez et al. 1995), o la presencia de señales químicas propias (Lee and Adams 1996, Seo, Guan et al. 2003, Soid-Raggi, Sanchez et al. 2006, Marquez-Fernandez, Trigos et al. 2007, Tsitsigiannis and Keller 2007).

El desarrollo del conidióforo inicia con la diferenciación de una célula, denominada célula pie, de la que emerge el conidióforo (Fig. 10) (Pontecorvo, Roper et al. 1953). Al final del tallo se forma una vesícula, en donde se llevan a cabo múltiples divisiones nucleares (Adams and Yu 1998), en un proceso semejante al de la gemación, para formar las métulas (Clutterbuck 1969, Oliver 1972, Mims, Richardson et al. 1988). En cada métula se producen otras gemaciones que originan de dos a tres células uninucleadas llamadas fiálides (Pontecorvo, Roper et al. 1953, Fischer and Timberlake 1995). Las fiálides son las células productoras de esporas, éstas generan grandes cadenas de conidias, a través de gemaciones sucesivas (Clutterbuck 1969, Mims, Richardson 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 (Clutterbuck 1969, Axelrod, Gealt et al. 1973) y la abundancia de nutrientes en el medio (Zonneveld 1975). El proceso implica la producción de presuntas células nodrizas, llamadas células Hülle (Ellis, Don et al. 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. 10). Los cleistotecios pueden contener de 1000 (Pöggelker 2006) a más de 10000 ascosporas (Pontecorvo, Roper 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).



**Fig 10. 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).

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-oscuro 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. 10). Como consecuencia de la fusión de hifas genéticamente diferentes, se originan hifas que contienen núcleos de dos tipos diferentes (heterocarión)(Pontecorvo, Roper 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 (Roper 1952, Pontecorvo, Roper et al. 1953)

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, Davis et al. 2007), pueden usarse para análisis de complementación, dominancia (Pontecorvo, Roper et al. 1953), y de herencia citoplásmica (Rowlands and Turner 1973, Gunatilleke, Scazzocchio et al. 1975).

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).

## Hipótesis

Proponemos que las proteínas AN\_8683 y AN\_10893 funcionan como NADPH oxidasas y representan una nueva familia de NOX en los hongos.

## Objetivo General

Determinar si las proteínas AN\_8683 y AN\_10893 representan nuevas NOX en los hongos.

## Objetivos particulares

1. Determinar si la eliminación de los genes *AN\_8683*, *AN\_10893* y *noxA* afectan el crecimiento y/o el desarrollo en condiciones de suficiencia y limitación de hierro, en el hongo *Apergillus nidulans*.
2. Comprobar la actividad de reductasa férrica en mutantes sencillas dobles y triples afectadas en los genes *AN\_8683*, *AN\_10893* y *noxA*.
3. Determinar si las proteínas AN\_8683 o AN\_10893 son capaces de reemplazar la actividad de NoxA.
4. Medir los niveles de expresión de los genes que codifican las proteínas AN\_8683 y AN\_10893 durante el desarrollo sexual, asexual y el crecimiento vegetativo, en condiciones de suficiencia y limitación de hierro.

## Materiales y Métodos

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

Las cepas de *Aspergillus nidulans* se cultivaron 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>CLK43</b>	<i>pabaA1, yA2</i>	Kawasaki et al., 2002
<b>A1155</b>	<i>pyrG89; pyroA4, nkuA::bar; veA1</i>	Fungal Genetics Stock Center
<b>TTP1</b>	<i>pyrG89; pyroA4; ΔAN_8683::AfriboB; ΔnkuA::argB; veA1</i>	11035 transformada con el producto de PCR <i>AN_8683::riboB2::AN_8683</i> (Pérez, T., 2014)
<b>TTP6</b>	<i>pyrG89; pyroA4; riboB2; ΔAN_10893::AfpypG; ΔnkuA::argB; veA1</i>	Este trabajo, 11035 transformada con el producto de PCR <i>AN_10893::pyrG::AN_10893</i>
<b>TTP7</b>	<i>pyrG89; pyroA4; ΔAN_10893::AfpypG; nkuA::bar; veA1</i>	Este trabajo, A1155 transformada con el producto de PCR <i>AN_10893::AfpypG::AN_10893</i>
<b>TTP8</b>	<i>pyrG89; pyroA4; ΔAN_10893::AfpypG; nkuA::bar; veA1</i>	Este trabajo, A1155 transformada con el producto de PCR <i>AN_10893::AfpypG::AN_10893</i>
<b>TAH1</b>	<i>pyrG89; pyroA4; ΔnoxA::AfpypG; nkuA::bar; veA1</i>	A. Hernández., 2010

<b>TTP9</b>	<i>pyrG89; pyrA4; noxA::AN_8683::AfpyroA::noxA; nkuA::bar; veA1</i>	Este trabajo, A1155 transformada con el producto de PCR <i>noxA::AN_8683::AfpyroA::noxA</i>
<b>TTP10</b>	<i>pyrG89; pyrA4; noxA(p)::AN_8683::AfpyroA; ΔnkuA::bar; veA1</i>	Este trabajo, TAH1 transformada con el producto de PCR <i>noxA::AN_8683::AfpyroA::noxA</i>
<b>CAH4*</b>	<i>pabaA1, yA2; ΔnoxA::AfpyrG; nkuA+; veA1</i>	A. Hernández., 2010
<b>CTP1'</b>	<i>pabaA1, yA2; ΔAN_8683::AfriboB; nkuA+; veA1</i>	11035 transformada con el producto de PCR <i>AN_8683::riboB2::AN_8683</i> (Pérez, T., 2014)
<b>CTP2**</b>	<i>pabaA1, yA2; ΔnoxA::AfpyrG; ΔAN_8683::riboB; nkuA+; veA1</i>	Progenie de TTP1xCAH4 (Pérez, T., 2014)
<b>CTP3*</b>	<i>pabaA1, yA2; ΔAN_10893:: AfpyrG; nkuA+; veA1</i>	Este trabajo, progenie de CLK43 x TTP6
<b>CTP4*</b>	<i>pabaA1, yA2; ΔnoxA::AfpyrG; ΔAN_10893:: AfpyrG; nkuA+; veA1</i>	Este trabajo, progenie de CAH4 x TTP6
<b>CTP5**</b>	<i>pabaA1, yA2; ΔAN_8683::AfriboB; ΔAN_10893:: AfpyrG; nkuA+; veA1</i>	Este trabajo, progenie de CTP1 x TTP6
<b>CTP6**</b>	<i>pabaA1, yA2; ΔnoxA::AfpyrG; ΔAN_8683::AfriboB; ΔAN_10893:: AfpyrG; nkuA+; veA1</i>	Este trabajo, progenie de TTP1 x CTP4
<b>CTP7**</b>	<i>pabaA1, yA2; ΔnoxA::AfpyrG; ΔAN_8683::AfriboB; ΔAN_10893:: AfpyrG; ΔnkuA::argB; veA1</i>	Este trabajo, progenie de TTP1 x CTP4
<b>CTP8**</b>	<i>pabaA1, yA2; ΔnoxA::AfpyrG; ΔAN_8683::AfriboB; ΔAN_10893:: AfpyrG; nkuA+; veA1</i>	Este trabajo, progenie de TAH1 x CTP5
<b>CTP9°</b>	<i>pabaA1, yA2; noxA(p)::AN_8683::AfpyroA; nkuA+; veA1</i>	Este trabajo, progenie de TTP9 x CLK43
<b>CTP10°</b>	<i>pabaA1, yA2; noxA(p)::AN_8683::AfpyroA; veA1</i>	Este trabajo, progenie de TTP10 x CLK43

<b>CTP11</b> <sup>°</sup>	<i>pabaA1, yA2; noxA(p)::AN_8683::AfpYROA; veA1</i>	Este trabajo, progenie de TTP10 x CLK43
---------------------------	---	---

\*indica que puede contener la mutación *AfpYrG*

° indica que puede contener la mutación *AfpYROA*

´ indica que puede contener la mutación *AfriboB*

Para las pruebas de sensibilidad a los diferentes tipos de estrés, así como a diferentes fuentes de carbono y de nitrógeno, se inocularon  $1 \times 10^5$  esporas de la cepa silvestre o de las mutantes en el centro de cajas Petri. Para las pruebas de estrés osmótico, el NaCl, el KCl o el sorbitol se añadieron antes de esterilizar los medios. Para la prueba de estrés oxidativo y estrés a la pared celular, el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y el Rojo congo se añadieron al medio antes de que solidificara (~50°C). Las cajas con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y Rojo congo se prepararon y sembraron el mismo día o 24 h después como máximo.

### Eliminación del gen *AN\_10893*

Para eliminar el gen *AN\_10893* se utilizó la técnica de PCR sobrelapado (*Double Joint PCR*) descrita por Yu *et-al.*, 2004. Se amplificó 1 kb río arriba del ORF usando los primers 10893-5for y 10893-5tail (Tabla 2), así como 1 kb río abajo empleando los primers 10893-3tail y 10893-3rev. El gen *pyrG* de *A. fumigatus*, utilizado como marcador selectivo, se amplificó con los primers PyrGforward y PyrGreverse. Con una nueva PCR se generó el producto de fusión empleando las tres secuencias amplificadas anteriormente y los primers anidados 10893-Nestfor y 10893-Nestrev a 94°C por 3 min, seguido de 35 ciclos a 94°C (30s), 55°C (45s) y 72°C (4 min). Finalmente la reacción se mantuvo a 72°C por 7 min.

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

Se generaron células electrocompetentes de la siguiente manera. Se sembraron 10 placas con medio mínimo más suplementos (piridoxina, riboflavina, uridina y uracilo) de las cepas

11035, A1155 y *AnoxA* (TAH1) se incubaron a 37°C durante 7 días. Pasado este tiempo se rasparon las cajas con solución Tween 80 al 0.1 %. 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 a 6000 rpm 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 realizó 5 veces consecutivas. Finalmente se resuspendieron las esporas en 2 ml de agua y se cuantificaron 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 amortiguador de pretratamiento frío (100 ml YED, HEPES 20mM, pH ajustado a 8.0 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 1 ml de amortiguador de electroporación frío (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 270 mM sacarosa, 1 mM 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 -70°C.

Una vez obtenidas las células electrocompetentes se procedió a la electroporación, para lo cual se descongelaron en hielo y se hicieron alícuotas de 50  $\mu$ l de células 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. Ésta se mezcla lentamente pipeteando varias veces evitando hacer burbujas y después se incubó en hielo por 15 minutos. La solución se pasó a una celda de electroporación “0.2 cm cuvette” (Biorad, No. Cat. 1652086). Las condiciones de electroporación fueron 1.0 kV, 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 1.5 h a 100 rpm. Finalmente, cada tubo se plaqueó a confluencia en tres placas con medio mínimo sin el marcador selectivo (piridoxina, uridina y uracilo). Se dejó que secan y se incubaron a 37°C.

### **Extracción de ADN**

La extracción de ADN se realizó a partir de micelio crecido durante 12 horas a 37 °C en medio líquido sin agitación en cajas de Petri de la siguiente manera. Se inocularon esporas intactas en medio líquido, las cuales después de 12 horas de crecimiento forman una película de micelio, dicha película se colectó y se secó en papel absorbente, posteriormente se congeló en nitrógeno líquido en tubos de 1.5 ml. Las muestras de micelio congelado se secaron al vacío durante cuatro horas, para posteriormente pulverizarlas. A continuación se les adicionó 800  $\mu$ l de amortiguador 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 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 amortiguador 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, 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 colectó con una varilla triangular y una solución estéril de Tween al 0.1%. El total de las esporas colectadas de cada colonia se resuspendió en 10 ml de la solución de Tween en tubos Falcon de 50 ml. Se agitó vigorosamente cada tubo con el vórtex y las esporas se lavaron tres veces con agua bidestilada centrifugándolas por 5 minutos a 5000 rpm y decantando el sobrenadante. Las pastillas de esporas se resuspendieron en 2 ml de agua bidestilada 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, BD No. Cat. 214010) más los suplementos requeridos, pre-incubado a  $\approx 42^\circ\text{C}$ . Se agitaron inmediatamente con 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, Sanchez et al. 2002).

**Tabla 2.** Oligonucleótidos de DNA utilizados en este trabajo

Nombre	Secuencia (5' -> 3')	
10893-5for	GAGCTCGAGTCACTGTTGAA	
10893-5tail	TGAAGAGCATTGTTTGAGGCTTTGGCGGGCCTGGATCGGC	
10893-3rev	GTCGCAGTTGGATAGTCTGG	
10893-3tail	ATCAGTGCCTCCTCTCAGACCGACGGGAAGTGGTATAAAG	
10893-Nestfor	CATTTCTGTGTCTTTGCG	
10893-Nestrev	TATGCGCAACAGTAGAGC	
Pyrqforward	GGCTCAATGGTCAGTGTGAAA	
PyrGreverse	GTCTGAGAGGAGGCACTGATGC	
NoxA5 for	GCTGGGGTCGAGTGGAACG	
10893for	ATGAACCACATGAAGATAGCC	
8683for	CATGCTGCCTTGGGATTA	
PYRO-NOXtail	TTCATTATGTAGACACTCGCCTTACCAGTCTCATCTCGT T	
Nox-8683tail	AACATAATCCCAAGGCAGCATGGCGATAAGCCTACCGACC	
Nox10893tail	GCTATCTTCATGTGGTTCATGGCGATAAGCCTACCGACCC	
8683-PYROtail	TAATCCAGCATCTGATGTCCAATATTATAGTTCTCCGTAT	
10893-PYROtail	TAATCCAGCATCTGATGTCCCCACCTAAACAATCTATTAG	
NoxANestfor	GATAGAAGAACGACCACCGAAG	
NoxANestrev	CAGACTCAGGCCCCACGCACAC	
5Dig-nkuA	GATGCTGTCCTTTTTTGCC	
3Dig-nkuA	TACCCAGAGCGCGATAC	
NFWD	GTGCACTGAAAGAAATCG	
NREV	CGTACTGTTTCGCGTCTT	
Riboforward	CTGGCTCGTTTGATCACATGG	
Riboreverse	GCGCTGCAGAACCGTTACATG	
	Oligonucleótidos de RT-qPCR	Eficiencia de amplificación
8683_qFOR	CCCAGAACGCGGTTAAAGT	2.04
8683_qREV	CGTAAATCCACGGAATGGTC	
10893_qFOR	CCGGTTAACCTCTTG/GGACTA	2.17
10893_qREV	ATACCCGTGAAACGGATGAA	
FreA_qFOR	GCTAATTGCGGAGC/ATGG	1.81
FreA_qREV	CCAGAGTCCGACAAATGACAT	
noxA_qFOR	GCTGTTTTGTTCCGGATAGC	2.04
noxA_qREV	CATTGCGTCGTATGGATGAC	
Ubcl_qFOR	GCGTGTTACGCGAG/ACCT	2.02
Ubcl_qREV	GGCTCAATGGTCAGTGTGAAA	
tuba for	CAATTCCTGCTGGGAG/CTT	1.96
tuba rev	CATAGATGGTGCGTGGAAACA	

actA for	TATGTGCAAGGCCGTTT	2.13
actA rev	AGGATACCACGCTTGGACTG	
gpdA for	TTTTCCGTAACGC/CATCG	1.9
gpdA rev	AATGGTCCCTTGAAGTAC	

El "/" indica el solapamiento de exones en el RNAm maduro

## Extracción de ARN

Se inocularon  $1 \times 10^6$  esporas/ml de cada cepa (por duplicado) en 100 ml de MM con 1% de glucosa como fuente de carbono, más los suplementos requeridos y en presencia de hierro (10 mM de  $\text{FeSO}_4$ , pH 6.5). Se incubaron en agitación a 200 rpm a  $37^\circ\text{C}$  por 24 h. Al término de este tiempo, el micelio se filtró haciéndolo pasar por un embudo con miracloth estéril y prelavado y se enjuagó con 200 ml de agua miliQ preincubada a  $37^\circ\text{C}$ . Este micelio se transfirió a un matraz con 100 ml de MM con hierro (preincubado con agitación a  $37^\circ\text{C}$ ) o MM con bajo hierro preincubado con agitación a  $37^\circ\text{C}$ , (la solución de elementos traza de este medio no tiene  $\text{FeSO}_4$ ) y se incubaron en agitación a 200 rpm a  $37^\circ\text{C}$  por 20 h. Finalizado este tiempo, se filtró el micelio haciéndolo pasar por un embudo con miracloth, se lavó con 200 ml de agua miliQ preincubada a  $4^\circ\text{C}$ , se secó entre toallas de papel desechable y se pesaron 100 mg de micelio húmedo que se transfirieron a un tubo de 2 ml (preincubado en nitrógeno líquido por 30 minutos). Se procedió a congelar la muestra en  $\text{N}_2$  líquido. El micelio congelado se secó al vacío durante cuatro horas, para posteriormente pulverizarlo en el TissueLyser LT (Qiagen, No. Cat. ID: 69980) mediante dos ciclos de 1 minuto a 50 Hz, y 30 segundos en hielo. Terminado este tiempo, se procedió con la extracción de RNA, mediante el uso del RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, No. Cat. 74904). La concentración de los ácidos nucleicos se determinó con un Nanodrop<sup>TM</sup> 2000 (Thermo Scientific, Wilmington, DE). La pureza del RNA total se estimó mediante el cociente de absorbancia de los 260/280 nm. Las muestras se trataron con DNasa usando 1 U de la Dnasa RQ1 (Promega, Madison, WI, No. Cat. M6101) por  $\mu\text{g}$  de RNA. A partir de 1  $\mu\text{g}$  del RNA obtenido, se generó cDNA con la transcriptasa reversa VILO superscript III (Invitrogen, No. Cat. 11754-050) y como control negativo (no transcrito) se empleó 1  $\mu\text{g}$  de RNA al que se añadió agua en lugar de retrotranscriptasa en la reacción.

## Diseño de oligonucleótidos y condiciones de RT PCR

Se diseñó un set de oligonucleótidos específicos para amplificar los transcritos de los genes *ubcL*, *noxA*, *freA*, *AN\_8683* y *AN\_10893* (Tabla 1) en la base de datos Primer3Plus (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>).

Los experimentos de RT-qPCR se realizaron en el termociclador de tiempo real StepOnePlus™ Real-Time PCR System (ThermoFisher Scientific). Para detectar el producto de amplificación se empleó el fluoróforo SYBR Green. Cada reacción se llevó a cabo en un volumen final de 10 µL con 5 µL de Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix-UDG with ROX (Invitrogen, No. Cat. 11744-500), 1 µL de la mezcla de oligonucleótidos forward y reverse de cada gen a una concentración de 5 pmol/µL, 2 µL de cDNA a una concentración de 100 ng/µL y agua MiliQ. En las reacciones para detectar los transcritos del gen *noxA*, se añadieron 0.5 µL de la mezcla de oligonucleótidos (forward y reverse) a una concentración de 2.5 pmol/µL. En los controles negativos se usaron 2 µL de agua MiliQ o de muestra de no transcrito en lugar de cDNA. Para calcular la eficiencia de los oligonucleótidos de cada gen, se realizaron diluciones seriales de cDNA partiendo de una concentración de 500 ng (dilución 1:4). Los resultados obtenidos se analizaron en el software StepOne Software v2.3 mediante análisis de regresión lineal esperando una  $R^2$  de 0.99. Los valores de eficiencia de cada par de oligonucleótidos se muestran en la Tabla 2.

El programa de amplificación fue el siguiente: 10 minutos a 95°C, 40 ciclos de 15 segundos a 95°C y 40 segundos a 60°C (para amplificar el gen *noxA*, la temperatura fue de 64°C), seguida de 15 segundos a 95°C y finalmente una curva de desnaturalización con incrementos de 0.3°C cada 6 segundos en un gradiente lineal de 60-95°C. Las reacciones se realizaron por triplicado en tubos MicroAmp® Fast reaction (Applied biosystems, No. Cat. 4358293).

Los niveles de expresión se obtuvieron con la fórmula modificada por Pfaffl, 2001:

$$\text{Nivel de expresión} = \frac{(E_{\text{blanco}})^{\Delta CP_{\text{blanco}}(\text{control-tratamiento})}}{(E_{\text{ref}})^{\Delta CP_{\text{ref}}(\text{control-tratamiento})}}$$

En donde  $E$  indica la eficiencia de los oligonucleótidos para el gen del cual nos interesa conocer su expresión (blanco) y para el gen que usamos como referencia (ref). La  $\Delta CP$  indica la diferencia de los valores de Ct de la condición control y el tratamiento tanto para el gen blanco como para el gen de referencia. Como control se usó la condición con hierro (+Fe) y el tratamiento se refiere a la condición con bajo hierro (-Fe).

### **Ensayo cualitativo de actividad de reductasa férrica**

Se inocularon  $1 \times 10^8$  esporas/ml de cada una de las cepas mutantes y la WT (por triplicado) en 50 ml de MM con hierro (1% de glucosa como fuente de carbono, 20 mM de glutamina como fuente de nitrógeno, 0.1% de solución de elementos traza con 10 mM de  $\text{FeSO}_4$ , pH 6.5) o MM con limitación de hierro (la solución de elementos traza de este medio no tiene  $\text{FeSO}_4$ ) y se incubaron en agitación a 200 rpm a  $37^\circ\text{C}$  por 24 h. Al término de este tiempo se procedió con el ensayo de actividad de reductasa férrica que consiste en la cuantificación del  $\text{Fe}^{2+}$  en presencia del compuesto Batofenatrolina (Bphen, Sigma, No. Cat. 11880-1G-F) como describe Nyhus, Wilborn et al. (1997) con modificaciones. Se realizaron soluciones madre de Bphen 1.2 M en etanol absoluto y de  $\text{Fe}^{3+}$ -HEDTA 500 mM (Sigma, No. Cat. E6760-100G) en agua MiliQ; y para los experimentos se realizaron soluciones de trabajo 1 mM. La actividad de reducción de  $\text{Fe}^{3+}$  total se define como sigue: el  $\text{Fe}^{2+}$  total se midió mezclando 1 ml de cultivo (micelio más medio) con 1 ml de Bphen y  $\text{Fe}^{3+}$ -HEDTA a una concentración de 1 mM cada uno, dando un volumen total de 2 ml. El  $\text{Fe}^{2+}$  del medio se midió mezclando 1 ml de medio sin micelio (filtrado) con 1 ml de Bphen y  $\text{Fe}^{3+}$ -HEDTA, en un volumen final de 2 ml. Las muestras se incubaron por 1 h en la oscuridad a  $37^\circ\text{C}$  y 200 rpm. Al término de este tiempo, las muestras se centrifugaron y se pasaron a celdas de cuarzo en las que se midió la absorbancia a los 535 nm en un espectrofotómetro UV160U, Shimadzu. El ensayo consiste en la formación de un complejo Bphen- $\text{Fe}^{2+}$  rojo a partir de un EDTA- $\text{Fe}^{3+}$  incoloro. La actividad de reductasa férrica del

micelio se calculó como la diferencia entre el  $\text{Fe}^{2+}$  total del cultivo y el  $\text{Fe}^{2+}$  del medio. Los resultados fueron normalizados con base al peso seco del micelio producido en 50 ml de medio. El coeficiente de extinción milimolar del complejo Bphen- $\text{Fe}^{2+}$  a 535 nm usado para obtener los resultados fue  $\epsilon=22.14 \text{ cm}^{-1}\text{mM}^{-1}$ .

### **Técnicas de Microscopía**

Se inocularon  $1 \times 10^5$  esporas de cada una de las cepas mutantes y la WT (por triplicado) en el centro de cajas Petri con medio sólido con agar al 3% (sin sales, sin glucosa, sin elementos traza, más suplementos a pH 6.5) y se incubaron a  $37^\circ\text{C}$  por 3 días. Finalizado este tiempo, en la periferia de la colonia se colocaron 4 cilindros (0.5 cm de diámetro) de medio sintético de cruza (SC) (Davis and de Serres 1970) y se sellaron las cajas y se incubaron a  $37^\circ\text{C}$  por 96 h. Posteriormente se aislaron los primordios de cleistotecios de 96 h y se limpiaron en medio sólido con agar al 3% , finalmente se cortaron cuadros de agar para su observación. La tinción con Dihidroetidio (DHE) consiste en cubrir la superficie de los cuadros de agar que contienen los primordios con aproximadamente 100  $\mu\text{l}$  de una solución de DHE (Invitrogen, No. Cat. D1168) 31.7  $\mu\text{M}/\text{mL}$  durante 30 minutos, en la oscuridad y a temperatura ambiente. El DHE es un colorante permeable a la membrana que cuando se oxida se convierte en Etidio (Et) y se une al DNA, emitiendo fluorescencia en la longitud de onda roja en los núcleos (Robinson, Janes et al. 2006), además ha sido usado como detector del anión superóxido ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) debido a su relativa especificidad por esta ERO. Sin embargo, también puede oxidarse por otras ERO como el  $\text{H}_2\text{O}_2$ , el  $\text{ONOO}^-$  y el radical hidroxilo y por especies reactivas de nitrógeno (ERN) (Bindokas, Jordan et al. 1996, Zhao, Kalivendi et al. 2003). Finalmente se realizaron observaciones en el microscopio de epifluorescencia NIKON Eclipse E600 conectado a una cámara refrigerada Neo Andor sCMOS.

### **Cuantificación de la fluorescencia mediante el software ImageJ**

La cuantificación de la fluorescencia del etidio se realizó utilizando el software ImageJ como reporta McCloy et al., 2014. Se seleccionó el primordio con la herramienta de dibujo

“Free hand selections”; en el menú de analizar se eligió en menú “set measurements” y se seleccionaron las opciones “Area”, “Integrated Density” y “Mean gray value”; después se eligió la opción “Measure” que se encuentra dentro del menú “Analyze”. Posteriormente se realizó el mismo procedimiento seleccionando un área dentro de la foto que no fluoresce (esto es el ruido de fondo). Estas mediciones se realizaron tres veces en cada primordio y para reportar los datos se analizaron tres primordios independientes. Con los valores obtenidos se calculó la Fluorescencia Total Corregida de la Célula (CTCF) mediante la siguiente fórmula:

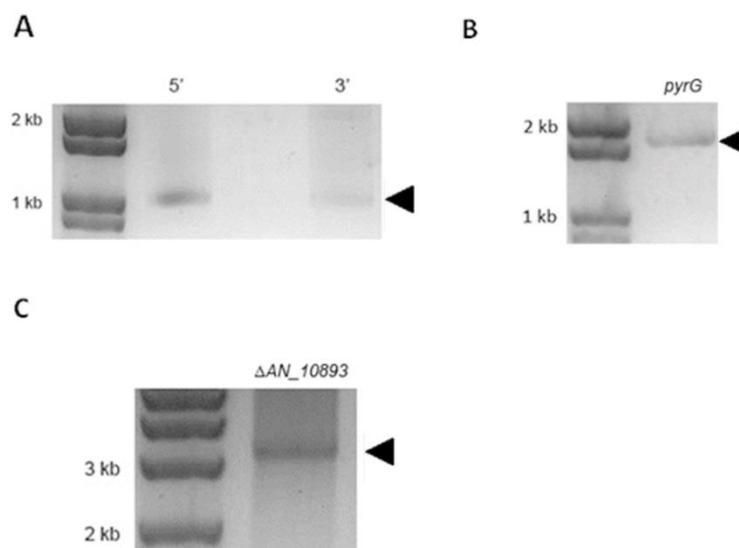
$$\text{CTCF} = \text{IntDen} - [(\text{Área de la célula})(\text{Promedio del ruido de fondo})]$$

Donde IntDen es el valor del promedio obtenido por “Integrated Density”, el Área de la célula es el promedio del valor obtenido en el menú “Area” y el Promedio del ruido de fondo es el valor del promedio obtenido en el menú “Mean gray value”. Los datos son expresados como Unidades arbitrarias de fluorescencia (UAF).

## Resultados

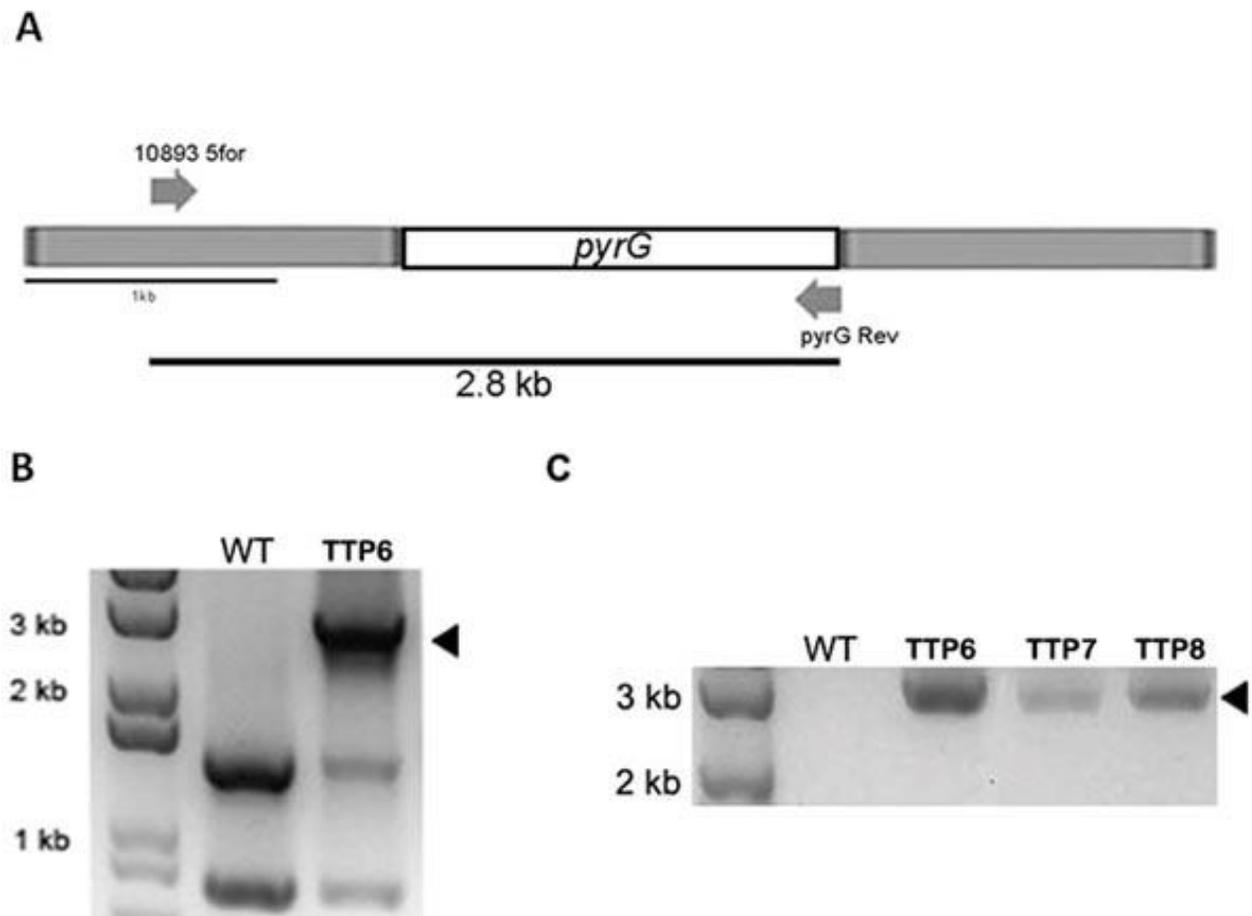
### 1.- Eliminación del gen *AN\_10893* mediante la técnica de PCRs sobrelapadas (Double Joint PCR)

Para eliminar el gen *AN\_10893*, se generó una construcción empleando la técnica de PCRs sobrelapadas (DJ PCR) (Yu, Hamari 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 *pyrG* de *A. fumigatus* (Oakley, Weil et al. 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. El producto final (Fig. 11C) se utilizó para transformar la cepa 11035 (Tabla 1) por electroporación (Sánchez 1996, Sanchez, Navarro et al. 1998).



**Figura 11. Eliminación del gen *AN\_10893*.** A) Fragmentos parciales de las regiones 5' y 3' río arriba del ORF de *AN\_10893* B) Amplificación del cassette *pyrG* de *A. fumigatus* C) La construcción generada mediante PCR para eliminar el gen *AN\_10893*, que contiene el gen *pyrG* como marcador selectivo, se usó para transformar la cepa 11035 de *A. nidulans*.

Se obtuvo una sola transformante que se confirmó mediante PCR diagnóstica usando los oligos 10893-5for y PyrG REVERSE (Tabla 2, Fig. 12A), que amplifican una banda de 2.8 kb. Como se observa en la figura 11B, tanto la cepa transformante como la WT presentan 2 bandas de PCR inespecíficas y sólo la cepa  $\Delta AN_{10893}$  mostró el fragmento de 2.8 kb esperado, confirmando que en la cepa mutante el marcador *pyrG* reemplazó al gen *AN\_{10893}*. Esta cepa se nombró TTP6 (Tabla 1).



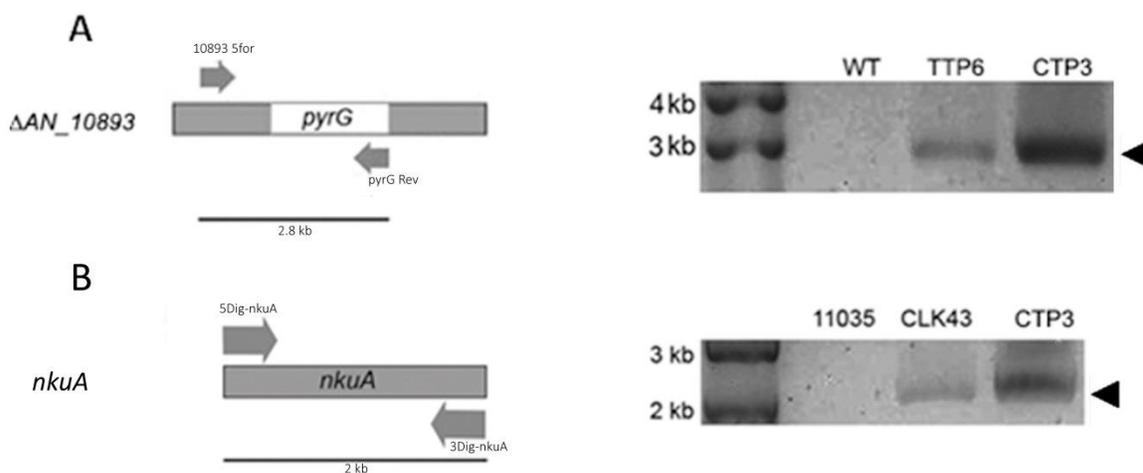
**Figura 12. Eliminación del gen *AN\_{10893}*.** **A)** La construcción generada mediante PCR para eliminar el gen *AN\_{10893}*, que contiene el gen *pyrG* como marcador selectivo, se usó para transformar las cepas 11035 y A1155 de *A. nidulans*. **B)** La remoción del gen *AN\_{10893}* en un fondo 11035 se comprobó mediante PCR diagnóstica empleando los oligos 10893-5for y *pyrG* reverse (Tabla 2) que en la transformante TTP6 amplifican una banda de 2.8 kb. **C)** Para comprobar la ausencia del gen *AN\_{10893}* en un fondo A1155 se realizó la misma estrategia de PCR diagnóstica con los oligos 10893-5for y *pyrG* reverse. Esta PCR diagnóstica produce un amplicón de 2.8 kb en las cepas mutantes. Se empleó ADN de una cepa silvestre 11035 (WT) como control negativo y ADN de la cepa TTP6 como control positivo.

Dado que sólo se obtuvo una mutante  $\Delta AN_{10893}$  en un fondo WT 11035, también se transformó la cepa A1155 (Tabla 1) mediante electroporación (Sánchez 1996, Sanchez, Navarro et al. 1998) con el producto final que se muestra en la figura 11C. Se obtuvieron dos mutantes que fueron confirmadas mediante PCR diagnóstica (Fig. 12C) usando los oligos 10893-5for y PyrG reverse (Tabla 2), que amplifican una banda de 2.8 kb. Estas cepas fueron nombradas TTP7 y TTP8 (Tabla 1).

### **Generación de cepas isogénicas**

Con el propósito de obtener las cepas  $\Delta AN_{10893}$  con el mismo fondo genético que la cepa CLK43 que empleamos en el laboratorio como cepa silvestre, se realizaron cruces sexuales de la mutante TTP6 con la cepa CLK43 (Kawasaki et al., 2002). De esta progenie se obtuvo una posible candidata  $\Delta AN_{10893}$ , llamada CTP3. Con el fin de comprobar que la cepa fuera mutante en el gen  $AN_{10893}$  se realizaron reacciones de PCR diagnósticas usando los oligos 10893-5for y PyrG reverse (Tabla 2), que amplifican una banda de 2.8 kb (Fig. 13A).

La cepa 11035 tiene reemplazado el gen  $nkuA$  ( $nkuA^-$ ) por el gen  $argB$ . NkuA es una proteína implicada en la unión de extremos no homólogos, por lo que su ausencia favorece la recombinación homóloga en esta cepa. Sin embargo, esta proteína también está involucrada en la reparación del daño al DNA, por lo que carecer de ella no es conveniente a largo plazo, debido a que podrían fijarse mutaciones no deseadas (Nayak, Szewczyk et al. 2006). Por lo anterior, se comprobó que la cepa CTP3 (progenie de TTP6 X CLK433) tuviera el gen silvestre  $nkuA$  ( $nkuA^+$ ) mediante una PCR diagnóstica con los oligos 5Dig-nkuA y 3Dig-nkuA (Tabla 2) que amplifican una banda de 2.1 kb (Fig. 12B).



**Figura 13. Obtención de cepas isogénicas auxótrofas a PABA y con el gen silvestre *nkuA*.** **A)** Comprobación de la cepa CTP3 ( $\Delta AN_{10893}$ ). PCR diagnósticas empleando los oligos 10893-5for y pyrG reverse, para confirmar la mutación  $\Delta AN_{10893}$ . **B)** Los oligos 5Dig-nkuA y 3Dig-nkuA se usaron para comprobar la presencia del gen silvestre *nkuA* en las cepas obtenidas de la cruce CLK43 X CTP3. Se utilizó ADN de las cepas silvestres CLK43 y 11035 (WT), como control negativo y ADN de la cepa TTP6 como control positivo.

### Generación de mutantes dobles y triples

La NOX reportada en *A. nidulans* (NoxA) es esencial para el desarrollo sexual (Lara-Ortiz, Riveros-Rosas et al. 2003) y las proteínas codificadas por los genes *AN\_10893* y *AN\_8683* podrían codificar proteínas NOX de una nueva familia (Pérez y Aguirre, datos no publicados), por lo que se realizaron cruces sexuales de la mutante TTP6 ( $\Delta AN_{10893}$ ) con las cepas CAH4 ( $\Delta noxA$ ) y TTP1 ( $\Delta AN_{8683}$ ) para obtener mutantes dobles  $\Delta noxA/\Delta AN_{10893}$  y  $\Delta AN_{10893}/\Delta AN_{8683}$ .

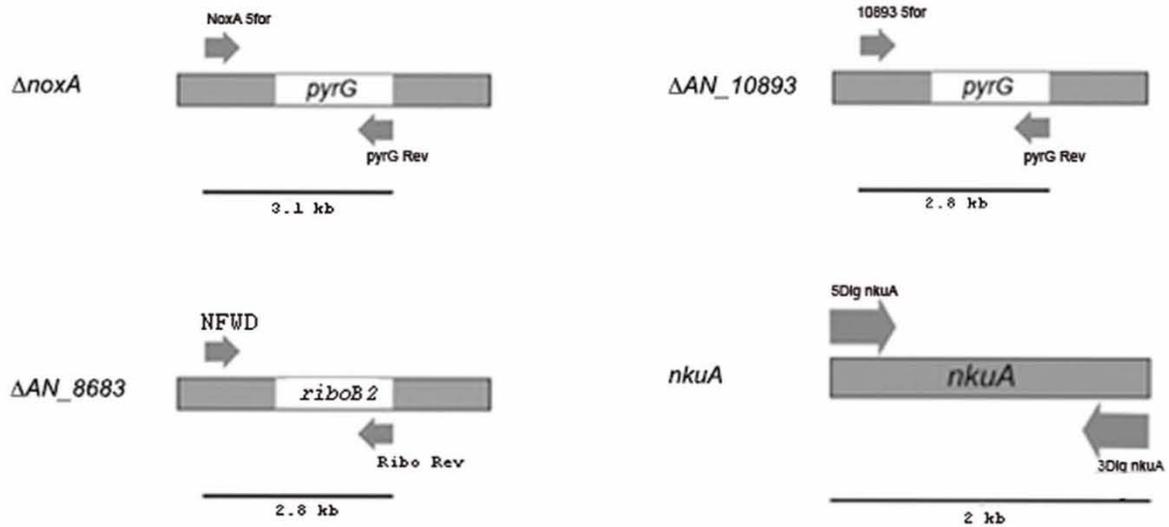
De la progenie de la cruce TTP6 X CAH4 se analizaron 10 cepas mediante PCR diagnóstica para corroborar la eliminación de los genes *AN\_10893* y *noxA*. Para comprobar que las cepas carecieran del gen *AN\_10893* se emplearon los oligos 10893 5for y pyrGrev (Tabla 2) que amplifican una banda de 2.8 kb (Fig. 13A, derecha). Como se ve en la figura 14B (panel central), sólo 3 cepas poseen la supresión  $\Delta AN_{10893}$ . Por otro lado, para corroborar la eliminación del gen *noxA* se emplearon los oligos NoxA5for y pyrGreverse (Tabla 2), que amplifican una banda de 3.1 kb en las cepas  $\Delta noxA$  (Fig. 14A, izquierda). Sólo la cepa 7

mostró las bandas deseadas (Fig. 14B panel izquierdo), la cual posteriormente se nombró CTP4 (Tabla 1). Para corroborar la presencia del gen silvestre *nkuA* se emplearon los oligos 5Dig-*nkuA* y 3Dig-*nkuA* (Tabla 2) que amplifican un producto de 2.1 kb en las cepas que poseen este gen. La cepa CTP4 posee el gen silvestre *nkuA* (Fig. 14B extremo derecho).

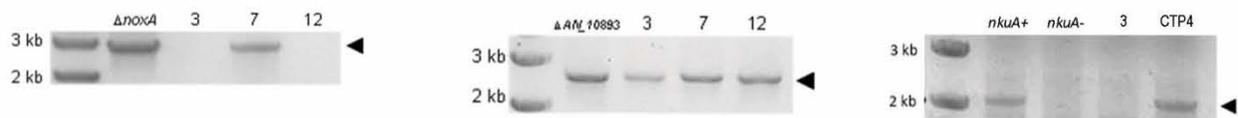
Con el fin de obtener mutantes dobles en los genes *AN\_10893* y *AN\_8683* se realizaron cruza sexuales entre las cepas TTP6 y CTP1, y de la progenie obtenida se analizaron 20 cepas mediante PCR diagnóstica. Para comprobar que las cepas carecieran del gen *AN\_10893* se empleó el par de oligonucleótidos 10893 5for y pyrGrev (Tabla 2) que amplifican una banda de 2.8 kb (Fig. 14A sección superior derecha); únicamente dos cepas son  $\Delta AN_10893$  (Fig. 14C centro). Por otro lado, para corroborar la eliminación del gen *AN\_8683* se emplearon los oligos NFWD y Ribo Rev (Tabla 2), que amplifican una banda de 2.8 kb en las cepas  $\Delta AN_8683$  (Fig. 14A extremo inferior izquierdo). La cepa 5 mostró la eliminación del gen *AN\_8683* (Fig. 14C extremo izquierdo) y se nombró CTP5 (Tabla 1). Para corroborar la presencia del gen silvestre *nkuA* se emplearon los oligos 5Dig-*nkuA* y 3Dig-*nkuA* (Tabla 2) que amplifican un producto de 2.1 kb en las cepas que poseen este gen. La cepa CTP5 es *nkuA*<sup>+</sup> (Fig. 14C sección derecha).

Con el objeto de saber cómo se comportaría una cepa carente de los genes *noxA*, *AN\_8683* y *AN\_10893*, se realizaron cruza sexuales de las cepas TTP1 ( $\Delta AN_8683$ ) X CTP2 ( $\Delta noxA/\Delta AN_8683$ ) y TAH1 ( $\Delta noxA$ ) X CTP5 ( $\Delta AN_10893/\Delta AN_8683$ ); las estrategias para comprobar la remoción de estos genes se muestran en la figura 14A. De ambas cruza se analizaron 10 cepas de la progenie obtenida. Sólo las cepas 1 y 5 provenientes de la cruza TTP1 con CTP2 presentaron la eliminación del gen *noxA* (Fig. 14D extremo superior izquierdo), mientras que de la cruza TAH4 X CTP5 únicamente la cepa 19 presentó este evento (Fig. 14D extremo inferior izquierdo).

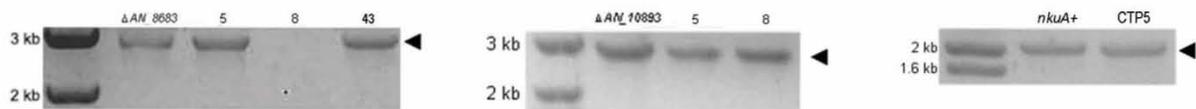
A



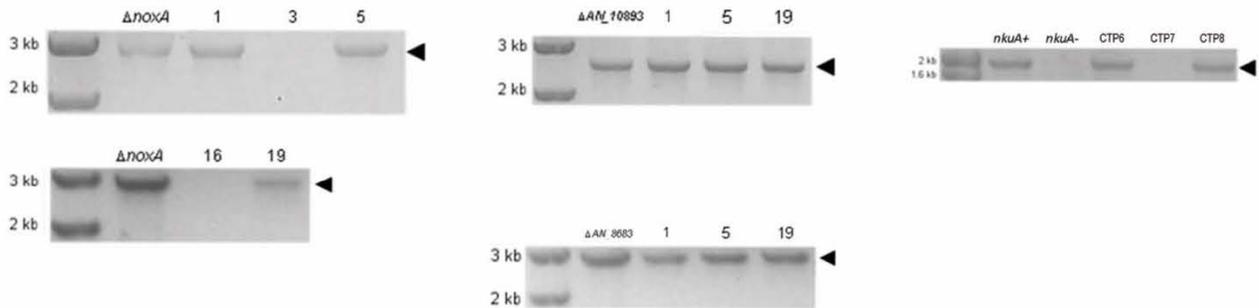
B



C



D



**Figura 14. Obtención de mutantes dobles y triples en los genes *noxA*, *AN\_8683* y *AN\_10893*. A)** Estrategias experimentales para la comprobación de la delección de los genes *noxA*, *AN\_10893* y *AN\_8683*, así como la presencia del gen silvestre *nkuA*. **B)** De la cruce TTP6 X CAH4 sólo la cepa 7 mostró la delección de los genes *noxA* y *AN\_10893* y la

*nkuA* y se denominó CTP4. **C)** De la cruce TTP6 X CTP1 únicamente la cepa 5 mostró la delección de los genes *AN\_8683* y *AN\_10893*, así como la presencia del gen *nkuA*. Esta cepa se nombró CTP5. **D)** De las cruces TTP1 X CTP4 y TAH1 X CTP5 sólo 3 cepas mostraron la eliminación de los genes *noxA*, *AN\_8683* y *AN\_10893*. Estas cepas se nombraron CTP6, CTP7 y CTP8, de las cuales sólo CTP6 y CTP8 poseen el gen silvestre *nkuA*. En las PCRs diagnósticas para corroborar la presencia del gen *nkuA*, se usó DNA de una cepa silvestre CLK43 (*nkuA+*) como control positivo y DNA de la cepa silvestre A1155 (*nkuA-*) como control negativo.

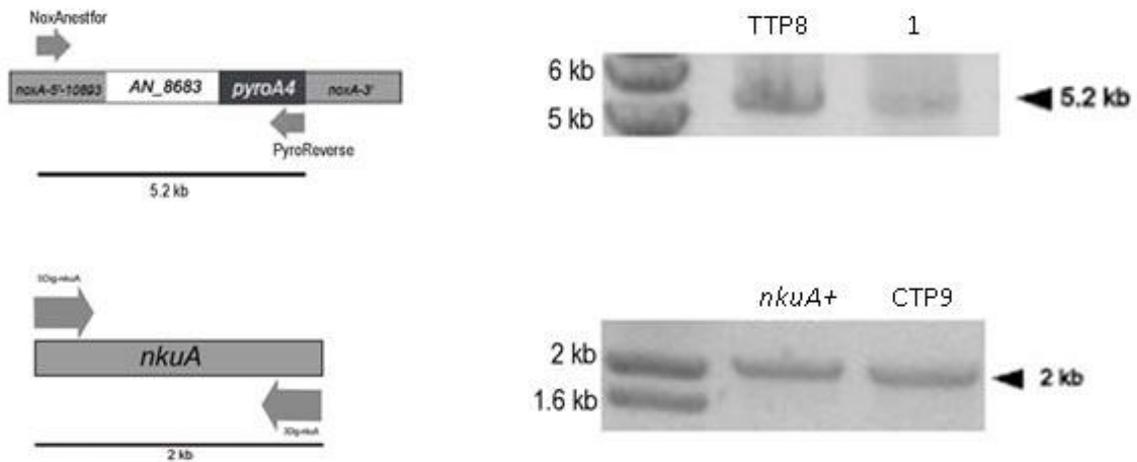
Estas tres cepas resultaron positivas para la eliminación de los genes *AN\_10893* (Fig. 14D panel central superior) y *AN\_8683* (Fig. 14D panel central inferior) y se nombraron CTP6, CTP7 y CTP8 respectivamente (Tabla 1). Posteriormente se analizó la presencia del gen *nkuA*, el cual se detectó en las cepas CTP6 y CTP8 (Fig. 14D extremo derecho).

### **Sustitución del ORF de *noxA* por el ORF de *AN\_8683***

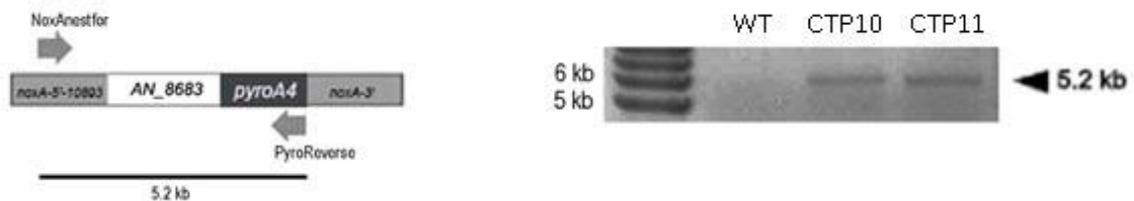
Con el objetivo de saber si la proteína codificada por el gen *AN\_8683* tenía actividad de NOX, se reemplazó el ORF de *noxA* con el ORF de *AN\_8683*. Para ello, se diseñaron oligonucleótidos para generar la construcción *noxA(P)::AN8683* que permita la integración del ORF del gen *AN\_8683* bajo el promotor del gen *noxA* en el locus *noxA*. Como marcador selectivo se empleó el gen de *pyroA4* de *A. fumigatus* (Fig. 15A extremo superior izquierdo). La construcción obtenida se utilizó para transformar las cepas A1155 y TAH1 (Tabla 1) por electroporación (Sánchez 1996, Sanchez, Navarro et al. 1998). Se obtuvieron dos cepas con la construcción *noxA(P)::AN8683*, una en un fondo genético silvestre A1155 que se nombró TTP9 y otra en un fondo mutante  $\Delta$ *noxA* que se nombró TTP10 (Tabla 1), las cuales fueron confirmadas mediante PCR diagnóstica (datos no mostrados). Con el propósito de obtener las cepas TTP9 y TTP10 en un fondo isogénico se realizaron cruces sexuales de las transformantes obtenidas con cepas silvestres CLK43. De la progenie de la cruce TTP9 X CLK43 se analizaron 5 cepas mediante PCR diagnóstica empleando los oligos NoxAneStfor y PyroReverse (Tabla 2), que amplifican una banda de 5.2 kb (Fig. 15A extremo superior izquierdo) en las cepas con el evento de recombinación deseado. Como se observa en la figura 15A (extremo superior derecho), la cepa 1 muestra el fragmento esperado de 5.2 kb y se nombró CTP9. Posteriormente se verificó la presencia del gen *nkuA* (Fig. 15A extremo inferior izquierdo) en esta cepa.

De la progenie de la cruce de TTP9 X CLK43 se analizaron 10 cepas mediante PCR diagnóstica empleando la estrategia previamente descrita (Fig. 15B extremo izquierdo). De éstas, dos presentaron la banda de 5.2 kb que indica la presencia de la construcción *noxA(P)::AN8683* (Fig. 15B extremo derecho); dichas cepas se nombraron CTP10 y CTP11.

A



B



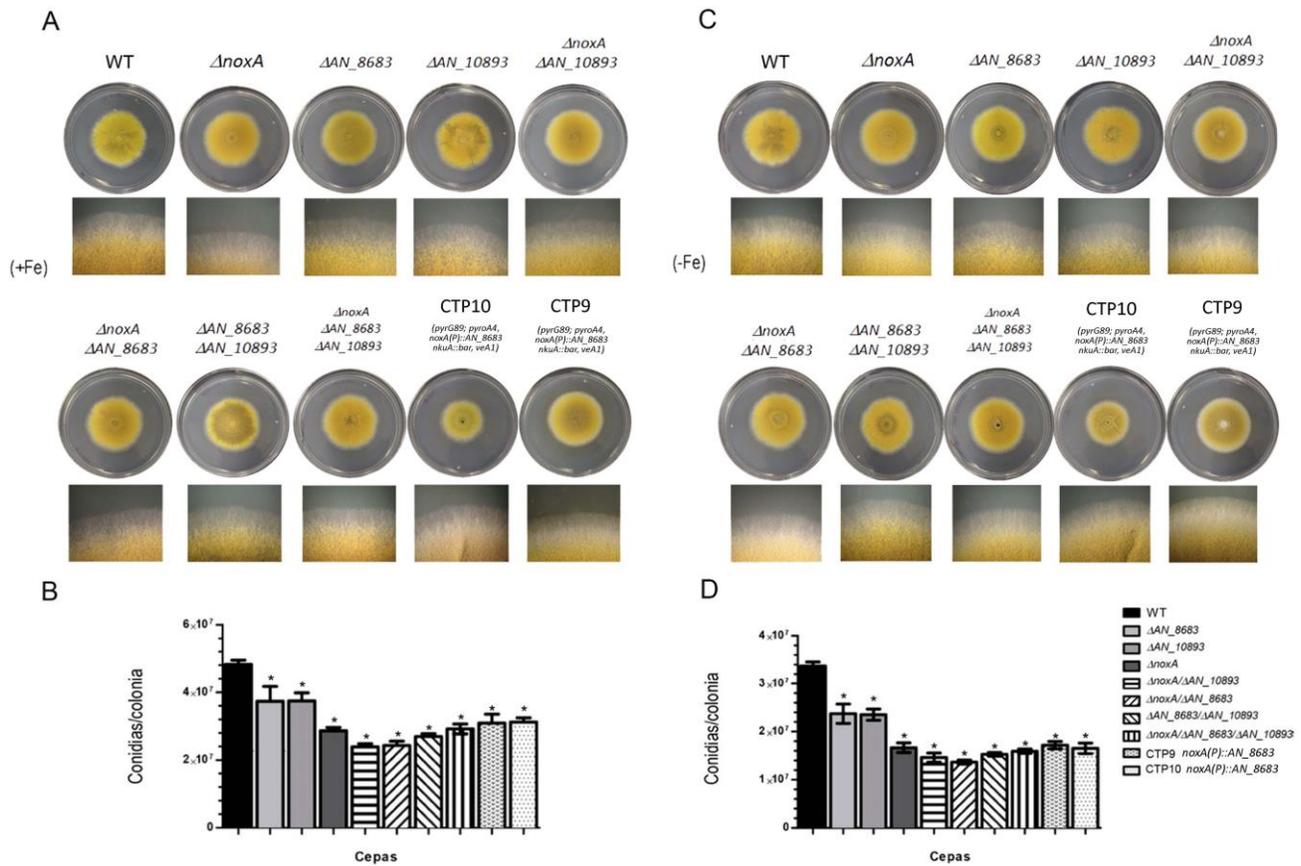
**Figura 15. Sustitución del ORF de *noxA* por el ORF de *AN\_8683*** A) Comprobación de la integración de la construcción *noxA(P)::AN\_8683* y la presencia del gen *nkuA* en la cepa proveniente de la cruce TTP9 X CLK43. Sólo la cepa 1 presentó el patrón de bandas deseado y fue llamada CTP9. B) Comprobación de la integración de la construcción *noxA(P)::AN\_8683* en las cepas provenientes de la cruce TTP10 X CLK43. Dos cepas presentaron el evento deseado y se denominaron CTP10 y CTP11.

## 2.- Las proteínas AN\_8683, AN10893 y NoxA regulan la conidiación

Se ha descrito que la supresión del gen *noxA* afecta la esporulación asexual o conidiación. Las cepas  $\Delta noxA$  generan aproximadamente la mitad del número de esporas asexuales

formadas por una cepa silvestre (Becerril y Aguirre, datos no publicados). Debido a que los genes *AN\_8683* y *AN\_10893* podrían codificar proteínas con actividad de NOX decidimos determinar si su ausencia afecta la producción de esporas con respecto a la cepa  $\Delta noxA$ . Para resolver esta cuestión, se generaron cepas sencillas, dobles y triples en los genes *AN\_8683*, *AN\_10893* y *noxA*, así como cepas en las que el ORF de *noxA* se sustituyó por el ORF *AN\_8683*. En la figura 16A se aprecia que a simple vista las colonias muestran pequeñas diferencias en su coloración, esta coloración está dada por el color de las esporas, lo cual sugirió que la carencia de estas proteínas afectaba la conidiación. Para corroborar esto, se realizó la cuantificación total de conidios en todas las cepas (Fig. 16B). Debido a que no podemos descartar que los genes *AN\_8683* y *AN\_10893* codifiquen para proteínas con actividad de FRE, se realizó la cuantificación de crecimiento y esporulación asexual en presencia (+Fe) y en limitación (-Fe) de hierro. Las mutantes  $\Delta AN_8683$  y  $\Delta AN_10893$  mostraron una conidiación menor que la de la cepa silvestre, aunque no tan reducida como la de la mutante  $\Delta noxA$ , tanto en presencia como en limitación de hierro. En las mutantes dobles  $\Delta noxA/\Delta AN_8683$  y  $\Delta noxA/\Delta AN_10893$  el defecto en la conidiación se incrementó, mientras que la mutante carente de las dos probables reductasas férricas  $\Delta AN_8683/\Delta AN10893$  así como la mutante triple  $\Delta noxA/\Delta AN_8683/\Delta AN_10893$  y las cepas CTP9 y CTP10 que poseen la construcción genética *noxA(P)::AN\_8683* produjeron una cantidad de conidias similar a la de una mutante sencilla  $\Delta noxA$ .

Por otro lado, como se puede apreciar en las figuras 16C y 16D, la carencia de hierro no afecta el crecimiento radial de ninguna de las cepas, pero sí tiene un efecto negativo en la esporulación tanto en la cepa silvestre como en las mutantes. Cabe señalar que en limitación de hierro (Fig. 16C) la mutante  $\Delta noxA$  produce un punto blanco en el centro de la colonia que podría indicar un área de conidióforos inmaduros. Este fenotipo se conserva en las mutantes dobles en un fondo genético  $\Delta noxA$ , así como en la triple (Datos no mostrados).



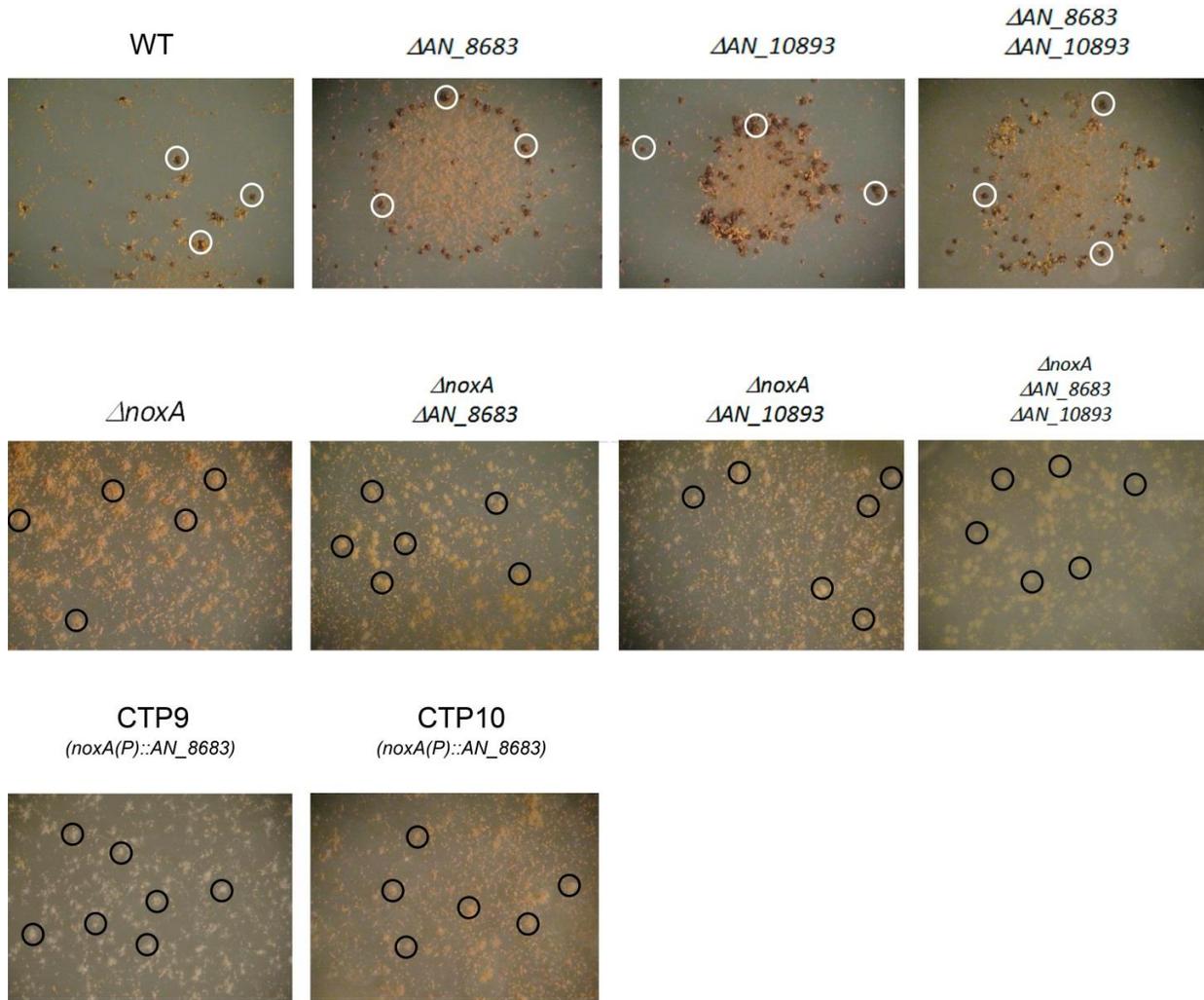
**Fig. 16. Las proteínas AN\_8683, AN\_10893 y NoxA regulan la conidiación.** **A y B** Se inocularon esporas ( $1 \times 10^5$ ) de las cepas CLK43 (WT), CTP1 ( $\Delta AN_{8683}$ ) CTP3 ( $\Delta AN_{10893}$ ), CAH4 ( $\Delta noxA$ ), CTP4 ( $\Delta noxA/\Delta AN_{10893}$ ), CTP2 ( $\Delta noxA/\Delta AN_{8683}$ ), CTP5 ( $\Delta AN_{8683}/\Delta AN_{10893}$ ), CTP8 ( $\Delta noxA/\Delta AN_{8683}/\Delta AN_{10893}$ ), CTP9 (*noxA(p)::AN8683*) y CTP10 (*noxA(p)::AN8683*) en el centro de cajas Petri con medio mínimo (con hierro) y en medio Pontecorvo (limitación de hierro), y se incubaron a 37°C por 5 días. **B y D**, se muestra la 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 por área. Se muestra la media de tres experimentos independientes, las barras indican la desviación estándar. La ANOVA de una vía con la prueba de comparaciones múltiples de Tukey muestra que hay diferencias significativas (\* $P < 0.05$ ) entre las cepas mutantes con respecto a la cepa silvestre.

Finalmente, a simple vista se observa que las cepas carentes del gen *AN\_8683* o *AN\_10893* producen una pigmentación oscura en el medio de cultivo a diferencia de la cepa silvestre o la cepa  $\Delta noxA$ , lo que es aún más evidente en la mutante doble  $\Delta AN_{8683}/\Delta AN_{10893}$ . Por otro lado, las cepas con un fondo genético  $\Delta noxA$ , producen una pigmentación en el medio similar al de la cepa sencilla  $\Delta noxA$ . Este fenotipo se conserva en la mutante triple  $\Delta noxA/\Delta AN_{8683}/\Delta AN_{10893}$  (Datos no mostrados). De manera inesperada, las dos cepas con la construcción *noxA(P)::AN\_8683* muestran ciertas diferencias en su fenotipo. La cepa CTP10 presenta un menor crecimiento radial, mientras que la cepa CTP9 crece de manera similar a las demás y produce una pigmentación del

medio parecida a la de la mutante  $\Delta AN_{8683}$ . Sin embargo, la conidiación de estas cepas es semejante a la de la mutante  $\Delta noxA$ , lo cual sugiere que ninguna de estas proteínas es capaz de substituir la función de NoxA.

### **3.- Las cepas carentes de los genes $AN_{8683}$ y $AN_{10893}$ producen estructuras sexuales maduras.**

Dado que las cepas  $\Delta noxA$  no generan estructuras sexuales o cleistotecios (Lara-Ortiz, Riveros-Rosas et al. 2003), decidimos seguir el desarrollo sexual en las cepas carentes de los genes  $AN_{8683}$  y  $AN_{10893}$ , en comparación de una cepa  $\Delta noxA$ , así como en las mutantes dobles y triples. Como se observa en la figura 17, al igual que la cepa silvestre, las cepas carentes de las proteínas  $AN_{8683}$  y  $AN_{10893}$ , así como la cepa doble mutante en estos genes, son capaces de formar cleistotecios maduros. Por otro lado, todas las cepas en un fondo genético  $\Delta noxA$ , ( $\Delta noxA/\Delta AN_{8683}$ ,  $\Delta noxA/\Delta AN_{10893}$  y  $\Delta noxA/\Delta AN_{8683}/AN_{10893}$ ) son incapaces de formar estructuras sexuales maduras. Sin embargo, son capaces de formar primordios de cleistotecios que poseen células Hülle, las cuales recubren a las estructuras sexuales. Las cepas CTP9 y CTP10 que poseen la construcción  $noxA(P)::AN_{8683}$  tampoco forman estructuras sexuales maduras y solo forman primordios de cleistotecios similares a los de la cepa  $\Delta noxA$ , nuevamente indicando que ninguna de estas proteínas es capaz de reemplazar la función de NoxA.

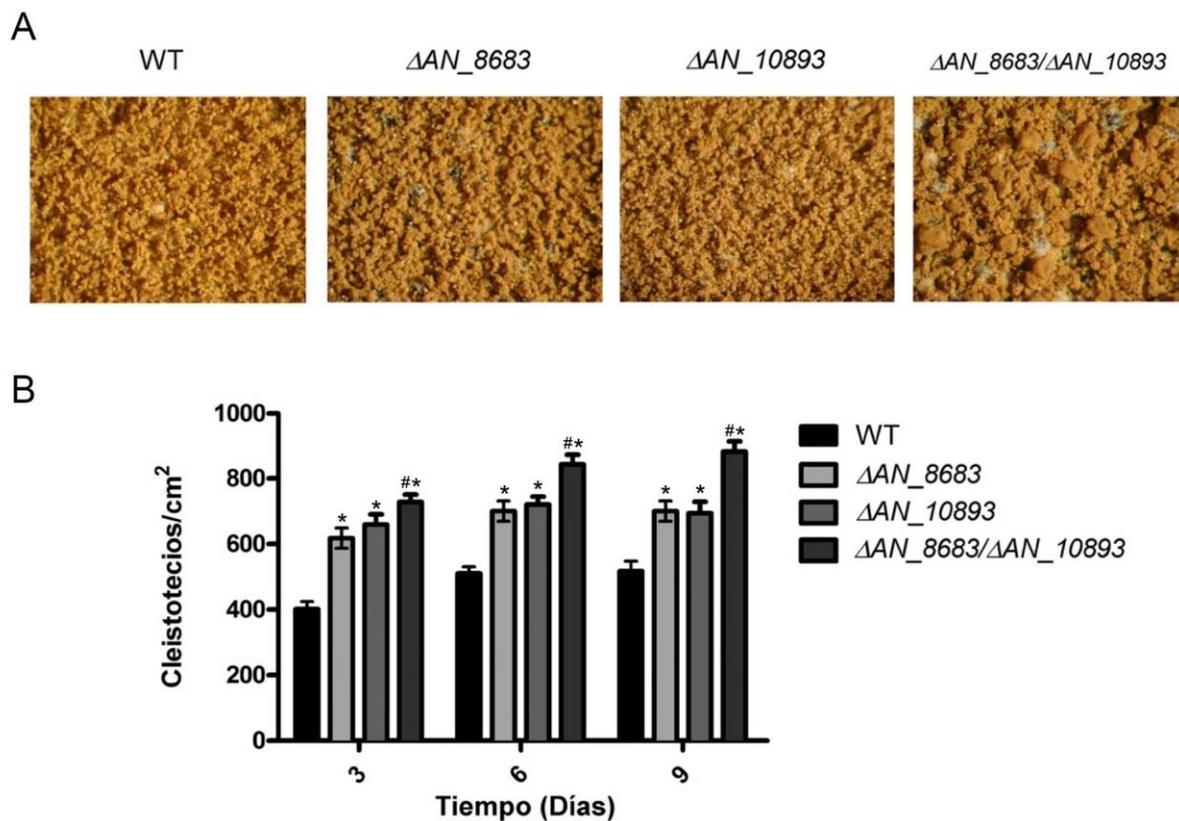


**Fig. 17. Las proteínas AN\_8683 y AN\_10893 no son esenciales para el desarrollo sexual.** Se inocularon  $1 \times 10^5$  esporas de las cepas CLK43 (WT), CTP1 ( $\Delta AN_8683$ ) CTP3 ( $\Delta AN_10893$ ), CAH4 ( $\Delta noxA$ ), CTP4 ( $\Delta noxA/\Delta AN_10893$ ), CTP2 ( $\Delta noxA/\Delta AN_8683$ ), CTP5 ( $\Delta AN_8683/\Delta AN_10893$ ), CTP8 ( $\Delta noxA/\Delta AN_8683/\Delta AN_10893$ ), CTP9 ( $noxA(p)::AN8683$ ) y CTP10( $noxA(p)::AN8683$ ) en el centro de cajas Petri con Agar al 3% más suplementos requeridos pero sin glucosa y se incubaron a 37 °C por cinco días. Pasado este tiempo se transfirieron cilindros de 0.7 cm de diámetro de medio sintético de cruza (SC) para *Neurospora crassa* al borde de las colonias, se sellaron las cajas con masking tape y finalmente se dejaron incubando a 37 °C por cinco días más. Las imágenes se tomaron en el microscopio estereoscópico por el frente de las cajas. Los círculos blancos indican cleistotecios, los círculos negros indican primordios de cleistotecios.

#### **4.- Los genes AN\_8683 y AN\_10893 reprimen la diferenciación sexual de manera independiente**

Se sabe que las cepas  $\Delta AN_8683$  presentan un desarrollo sexual acelerado (Pérez y Aguirre, datos no publicados), por lo cual decidimos cuantificar la producción de estructuras sexuales en las mutantes dobles  $\Delta AN_10893$  y  $\Delta AN_8683/\Delta AN_10893$ . Como se observa en la figura 18A, las cepas  $\Delta AN_8683$  y  $\Delta AN_10893$  parecen generar más

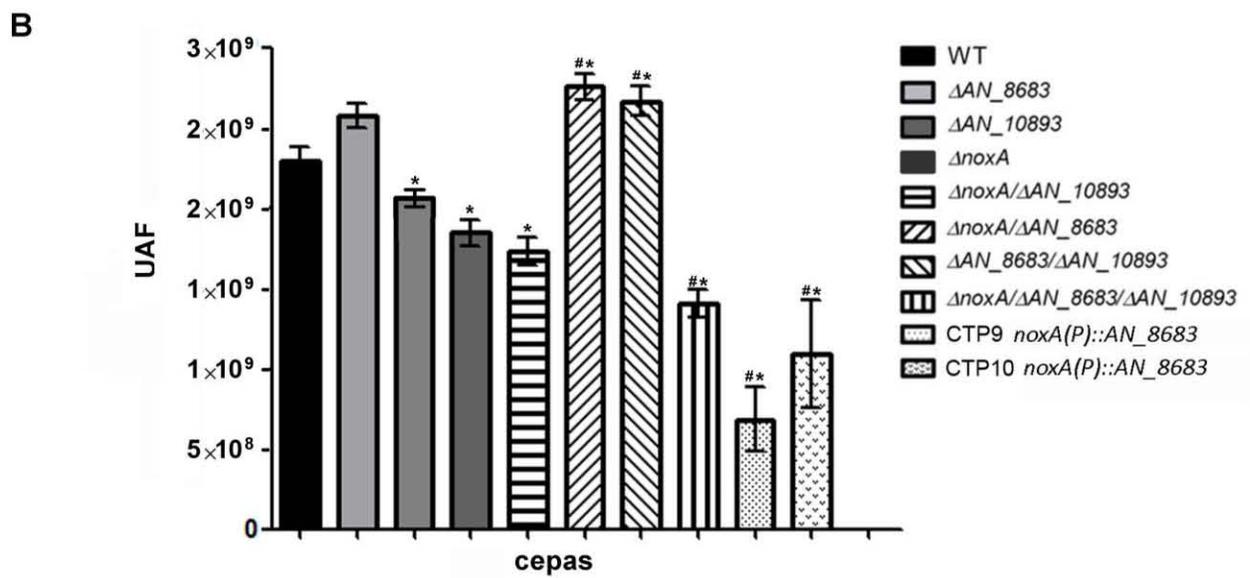
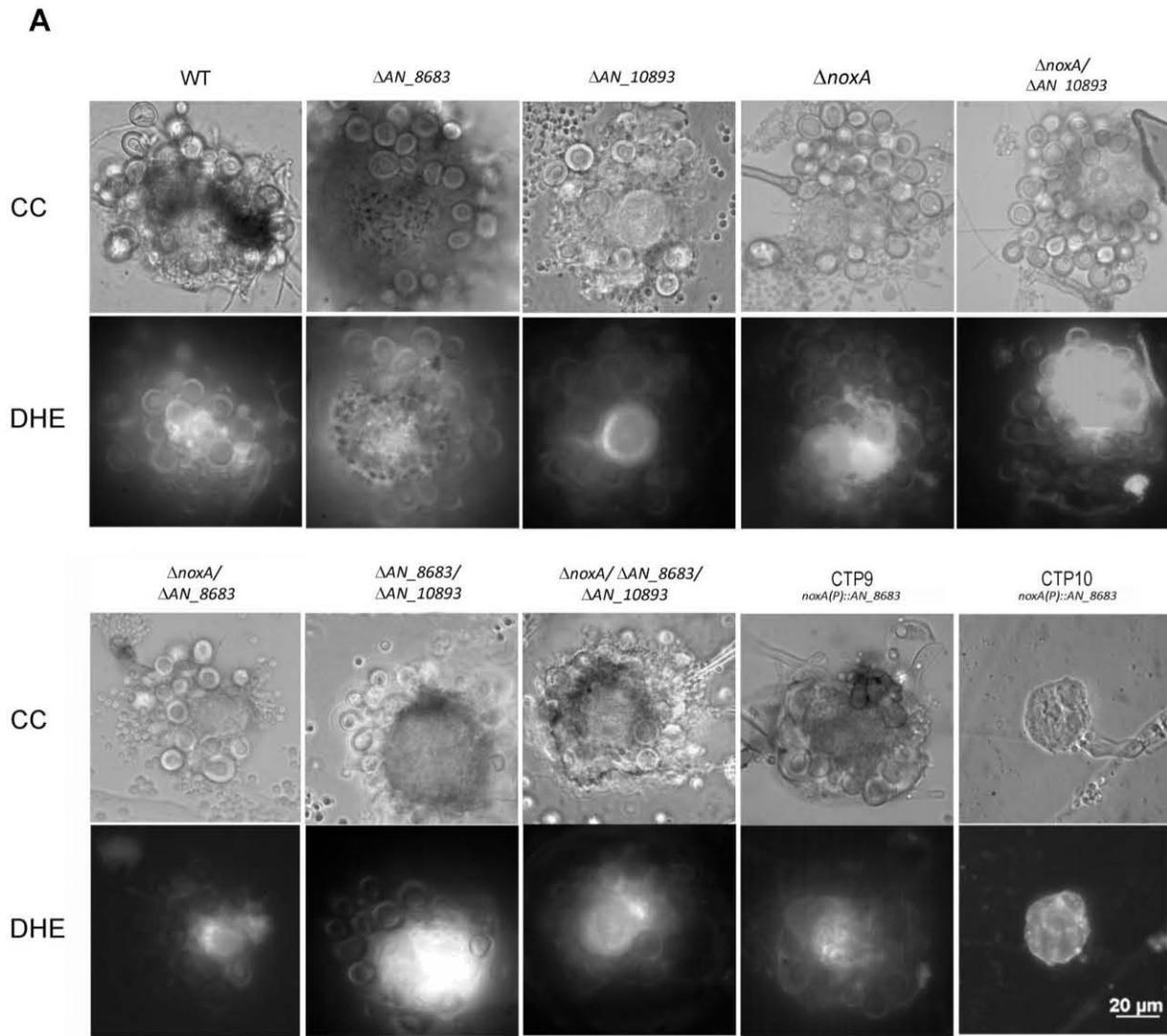
cleistotecios que una cepa silvestre, mientras que la cepa carente de ambos genes parece generar aún más cleistotecios que las mutantes sencillas. En efecto, la eliminación de los genes *AN\_8683* y *AN\_10893* produce 1.5 veces más cuerpos fructíferos, en comparación con una cepa silvestre (Fig. 18B), mientras que la doble mutante  $\Delta AN_8683/\Delta AN_10893$  produce todavía más cleistotecios que las mutantes sencillas y casi el doble que la cepa silvestre. Este resultado muestra que la supresión de ambos genes resulta en un fenotipo aditivo durante el desarrollo sexual e implica que ambos genes reprimen la diferenciación sexual de manera independiente. Esto también significa que los genes  $\Delta AN_8683$  y  $\Delta AN_10893$  juegan un papel opuesto al de *noxA* durante el desarrollo sexual.



**Fig. 18. Las cepas  $\Delta AN_8683$  y  $\Delta AN_10893$  generan más cleistotecios que una cepa WT. (A)** Se indujo el ciclo sexual de las cepas CLK43 (WT), CTP1 ( $\Delta AN_8683$ ) CTP3 ( $\Delta AN_10893$ ) y CTP5 ( $\Delta AN_8683/\Delta AN_10893$ ) como se reportó previamente (Kawasaki et. al., 2002). Las fotografías se tomaron después de nueve días de inducción. **(B)** Cuantificación de cleistotecios de las cepas mostradas en A, a los tiempos indicados. El número total de cleistotecios por área se contó en un microscopio estereoscópico y se calculó el número de cleistotecios por  $cm^2$  según lo reportado por Kawasaki et al., 2002. Los datos muestran el promedio de tres experimentos independientes; las barras indican la desviación estándar. La ANOVA de dos vías con la prueba de comparaciones múltiples de Tukey muestra que hay diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre las cepas mutantes con respecto a la cepa silvestre (\*) y entre la mutante doble con respecto a las mutantes sencillas (#).

**5.-Los primordios de cleistotecios de las cepas  $\Delta noxA$ ,  $\Delta noxA/\Delta AN_{10893}$  y  $\Delta noxA/\Delta AN_{8683}/\Delta AN_{10893}$  podrían producir menos ERO que los de la cepa silvestre.**

Durante momentos específicos del desarrollo hay picos de producción de ERO (Hansberg and Aguirre 1990). Tomando en cuenta que  $AN_{8683}$  y  $AN_{10893}$  pueden ser fuentes de ERO y debido a que la supresión de estos genes produce una desrepresión del ciclo sexual (Fig. 18B), contemplamos la posibilidad de que NoxA esté sobre compensando la carencia de estos genes produciendo más ERO, inclusive más que una cepa silvestre, lo que provocaría la producción de más cleistotecios. Para abordar esta idea decidimos comparar la formación de ERO en estructuras sexuales de las distintas cepas, empleando el indicador de superóxido dihidroetidio (DHE), el cual al oxidarse a etidio (Et) emite una fluorescencia a 605 nm. Tomando en cuenta que la cepa  $\Delta noxA$  no genera cleistotecios maduros, el experimento se realizó en un estadio más temprano, comparando la fluorescencia del DHE en los primordios de cleistotecios de las cepas carentes de los genes  $AN_{8683}$ ,  $AN_{10893}$  y  $noxA$  así como en las mutantes dobles y triples en estos genes. En la figura 19A se muestran imágenes representativas de los primordios de todas las cepas en campo claro (CC) y en fluorescencia en rojo (DHE). A simple vista parece haber diferencias entre la fluorescencia del etidio de los primordios de las distintas cepas. Sin embargo, al realizar la cuantificación de la fluorescencia mediante el software ImageJ (figura 19B) se observó que la mutante sencilla  $\Delta AN_{8683}$  muestra una oxidación del DHE similar al de la cepa silvestre (no hay diferencias significativas). Por otro lado, en las mutantes  $\Delta noxA$  y  $\Delta AN_{10893}$ , la oxidación del DHE es menor con respecto a la cepa silvestre. En las mutantes dobles  $\Delta noxA/\Delta AN_{8683}$  y  $\Delta AN_{8683}/\Delta AN_{10893}$  los niveles de fluorescencia del etidio son mayores con respecto a los de la cepa silvestre así como al de las mutantes sencillas en esos genes. Cabe resaltar que la fluorescencia del etidio en la doble mutante  $\Delta noxA/\Delta AN_{10893}$  es similar al de las mutantes sencillas en esos genes, por lo que no existe un efecto aditivo en la producción de ERO. La cepa triple mutante en estos genes tiene los niveles más bajos de fluorescencia de etidio en comparación con las mutantes sencillas y dobles durante este estadio de desarrollo, lo que indica un efecto



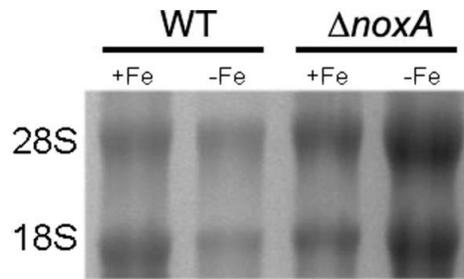
**Figura 19. Las proteínas NoxA y AN\_10893 contribuyen a la producción de ERO durante el desarrollo de los cleistotecios.** A) Se inocularon  $1 \times 10^5$  conidios en el centro de cajas Petri con agar al 3% más suplementos de las cepas CLK43 (WT), CTP1 ( $\Delta AN\_8683$ ) CTP3 ( $\Delta AN\_10893$ ), CAH4 ( $\Delta noxA$ ), CTP4 ( $\Delta noxA/\Delta AN\_10893$ ), CTP2 ( $\Delta noxA/\Delta AN\_8683$ ), CTP5 ( $\Delta AN\_8683/\Delta AN\_10893$ ), CTP8 ( $\Delta noxA/\Delta AN\_8683/\Delta AN\_10893$ ), CTP9 ( $noxA(P)::AN8683$ ) y CTP10 ( $noxA(P)::AN8683$ ) por triplicado y se incubaron a 37°C por tres días. Al término de este tiempo se indujo el ciclo sexual agregando cilindros de medio SC y posteriormente se aislaron primordios de cleistotecios de 96 h a los que se les agregó 100  $\mu$ L de DHE (31.15  $\mu$ M) y se incubaron 30 minutos en la oscuridad. Al término de este tiempo se realizaron observaciones en Campo claro (CC) y en fluorescencia (DHE). La barra de escala indica 20  $\mu$ m. B) La intensidad de la fluorescencia del etidio se cuantificó utilizando el software ImageJ, mediante la fórmula de la fluorescencia total corregida de la célula (McCloy, Rogers et al. 2014). Estos experimentos se realizaron por triplicado; las barras indican la desviación estándar. La ANOVA de una vía con la prueba de comparaciones múltiples de Tukey muestra que hay diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre las cepas mutantes con respecto a la cepa silvestre (\*) y de las mutantes dobles y triples con respecto a las mutantes sencillas (#).

aditivo. El comportamiento de las cepas con la construcción genética *noxA(P)::AN\_8683* es diferente al de las demás cepas, siendo la fluorescencia en estas cepas menor a la del resto de las mutantes.

Estos datos sugieren que las proteínas NoxA y AN\_10893 contribuyen a la producción de ERO durante el desarrollo de los cleistotecios.

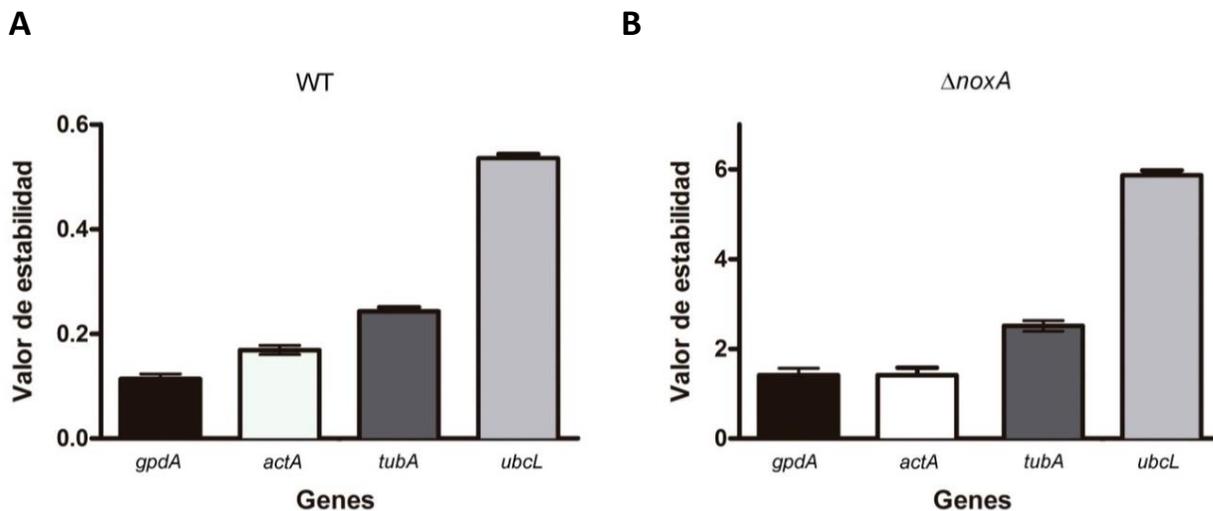
## **6.- La expresión de los genes *noxA*, *freA*, *AN\_8683* y *AN\_10893* se induce por limitación de hierro**

Se sabe que el gen *freA* que codifica para la reductasa férrica (FreA) se expresa en condiciones de bajo hierro (-Fe) (Oberegger, Schoeser et al. 2002). Debido a que las proteínas codificadas por los genes *AN\_8683* y *AN\_10893* podrían requerirse para la reducción de hierro, i.e., podrían ser reductasas férricas (FRE), decidimos analizar su expresión mediante PCR cuantitativa de tiempo real (RT-qPCR). También analizamos la inducción del gen *noxA*, que codifica para la única NOX reportada en *A. nidulans* (Lara-Ortiz et al., 2003). Se inocularon esporas de la cepa silvestre (CLK43) y la cepa mutante  $\Delta noxA$  en medio mínimo con hierro (+Fe) o con bajo hierro (-Fe) y posteriormente se realizó la extracción de RNA del micelio obtenido. La integridad del RNA se estimó mediante electroforesis en geles desnaturizantes al 1% de agarosa (w/v) (Fig. 20).



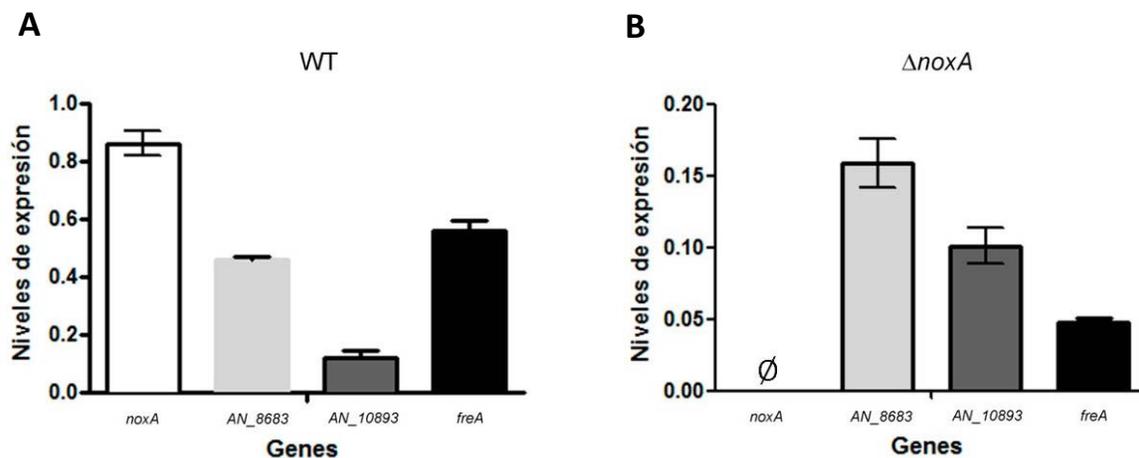
**Figura 20. Evaluación del RNA obtenido en condiciones de alto y bajo Fe.** Se cargaron 500 ng/ $\mu$ l del RNA obtenido del micelio de las cepas WT (CLK43) y  $\Delta$ *noxA* (CAH4) en las condiciones de alto hierro (+Fe) o bajo hierro (-Fe) en un gel desnaturizante al 1% de agarosa y se realizó una electroforesis a 65v por 3h. El gel se tiñó con bromuro de etidio y se observó en un transiluminador de luz UV. Se observan las bandas que corresponden a la subunidad 28S y 18S que indican RNA íntegro.

Para seleccionar el gen de referencia se evaluaron los genes *actA* (AN\_6542), *tubA* (AN\_00316), *gpdA* (AN\_8041) y *ubcL* (AN\_10324), los cuales codifican para la única isoforma de actina presente en *A. nidulans*, la tubulina A, la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa y la enzima parecida al conjugador de ubiquitina. Esto tanto en la cepa silvestre (CLK43) como en la cepa  $\Delta$ *noxA* (CAH4) bajo las condiciones experimentales. Como se puede observar en la Figura 21, de acuerdo al algoritmo GeNorm (Vandesompele, De Preter et al. 2002), el mejor gen de referencia para la cepa silvestre fue *gpdA*. Por otro lado en la cepa  $\Delta$ *noxA* la estabilidad de estos genes varió más que en la cepa silvestre, y finalmente se seleccionó el gen *actA* como gen de referencia en esta cepa porque mostró la menor variación (Fig. 21).



**Figura 21. Evaluación de la estabilidad en RT-PCR de cuatro genes mediante el algoritmo GeNorm.** Se evaluaron los genes *gpdA*, *actA*, *tubA*, *ubcL* con respecto a las condiciones con hierro (+Fe) y bajo hierro (-Fe) en la cepa silvestre (CLK43) **A**) y en la cepa  $\Delta noxA$  (CAH4) **B**). Las barras de error representan las desviaciones estándar de las medias de tres amplificaciones independientes.

Como se observa en la figura 22A, todos los genes analizados se inducen en la cepa silvestre cuando hay bajos niveles de hierro en el medio. De manera inesperada, el gen *noxA* es el que más se expresa, con un valor de 0.862. El segundo gen más expresado en bajo hierro es *freA* y finalmente los genes *AN\_8683* y *AN\_10893*. Por otro lado, en la cepa mutante  $\Delta noxA$ , los niveles de expresión de todos estos genes disminuye drásticamente (Fig. 22B) de manera que *AN\_8683* es el gen que más se expresa (muestra un nivel de expresión de 0.15), seguido de *AN\_10893* y finalmente *freA*. Estos resultados indican que el criterio de inducción por limitación de hierro no es suficiente para diferenciar a las NOX de las FRE. Cabe resaltar que la ausencia de NoxA tiene efectos en la regulación por hierro de los genes *AN\_8683*, *AN\_10893* y *freA*, sugiriendo una conexión fisiológica entre las NOX y las FRE.



**Fig. 22. La disminución de hierro (-Fe) induce la expresión de los genes *noxA*, *AN\_8683*, *AN\_10893* y *freA*.** Se inocularon  $1 \times 10^6$  esporas/ml de las cepas WT (CLK43) y  $\Delta noxA$  (CAH4) en 100 ml de MM más los suplementos requeridos en presencia de hierro, a 200 rpm y 37°C, durante 24 h. A continuación, el micelio se transfirió a 100mL de MM con hierro (+Fe) o sin hierro (-Fe) y se continuó la incubación durante 20 h. Finalizado este tiempo, las muestras de micelio se procesaron para la extracción de RNA y su análisis posterior por RT-qPCR. **A**) Expresión de los genes *noxA*, *AN\_8683*, *AN\_10893* y *freA* en una cepa WT (CLK43). **B**) Expresión de los genes *noxA*, *AN\_8683*, *AN\_10893* y *freA* en una cepa  $\Delta noxA$ . En **A**) y **B**) se muestran los niveles de expresión en bajo hierro (-Fe), normalizados con respecto a la condición control (en presencia de hierro, +Fe). Las barras de error representan las desviaciones estándar de las medias de tres amplificaciones independientes. ∅ = señal no detectada

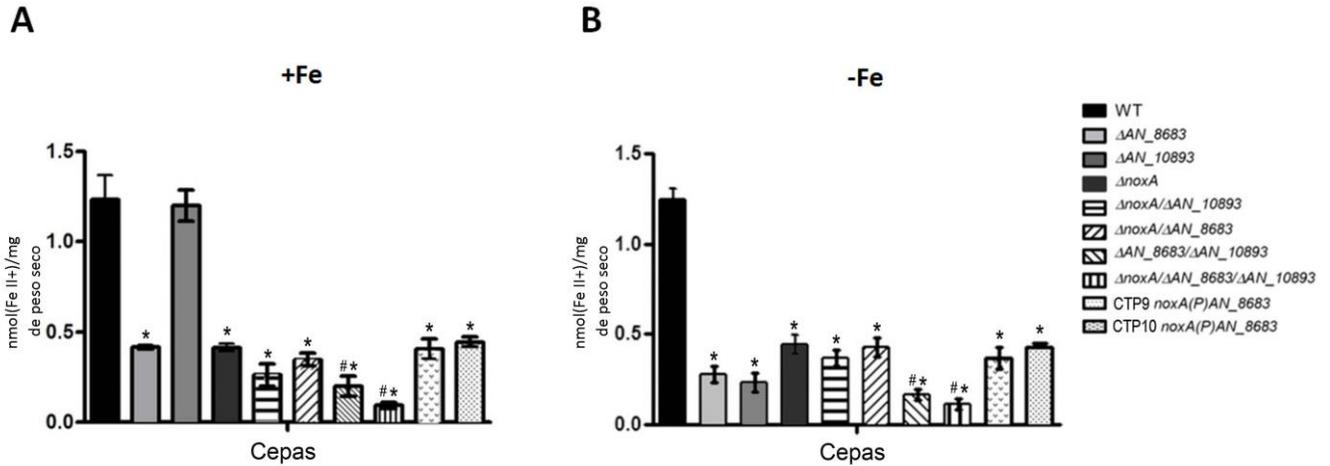
**7.- El micelio de las cepas  $\Delta noxA$ ,  $\Delta AN\_8683$  y  $\Delta AN\_10893$  reduce menos hierro que una cepa silvestre cuando se inoculan en medio con bajo hierro.**

Para comprobar si las proteínas AN\_8683 y AN\_10893 son proteínas involucradas en la reducción de hierro, decidimos analizar la actividad total de FRE en todas las cepas en limitación (-Fe) y presencia de hierro (+Fe), mediante la detección de  $Fe^{2+}$  en micelio, utilizando la batofenantrolina, que es un agente quelante específico de  $Fe^{3+}$  (Nyhus, Wilborn et al. 1997). En la figura 23A se observa que la cepa silvestre y la cepa carente del gen AN\_10893 tienen una cantidad semejante de hierro en el micelio, mientras que las mutantes sencillas en el gen AN\_8683 o en el gen *noxA* acumulan aproximadamente la mitad de hierro que una cepa silvestre. Las cepas dobles mutantes  $\Delta noxA/\Delta AN\_10893$  y  $\Delta AN\_8683/\Delta AN\_10893$  muestran un efecto aditivo en la cantidad de hierro en el micelio, es decir, tienen menos hierro que las mutantes sencillas en esos genes. Por otro lado, la cepa mutante doble  $\Delta noxA/\Delta AN\_8683$  se comporta como una mutante sencilla  $\Delta noxA$ . La mutante triple  $\Delta noxA/\Delta AN\_8683/\Delta AN\_10893$  es la cepa que menos hierro tiene en el micelio. Las cepas CTP9 y CTP10, que tienen la construcción genética (*noxA(P)::AN\_8683*), se comportan como las mutantes sencillas  $\Delta noxA$ .

En la figura 23B se muestran los resultados del mismo tipo de experimento realizado en limitación de hierro (-Fe). Como se puede observar en esta condición los niveles de hierro en la cepa silvestre son semejantes a los que presenta en la condición con hierro (+Fe). En cambio, la cepa carente del gen AN\_10893 disminuye su actividad de FRE casi cuatro veces y la cepa  $\Delta AN\_8683$  presenta una actividad de FRE mucho menor que en presencia de hierro. La mutante  $\Delta noxA$  tiene el mismo comportamiento que en presencia de hierro. En limitación de hierro las cepas mutantes dobles  $\Delta noxA/AN\_10893$  y  $\Delta noxA/\Delta AN\_8683$  se comportan como la cepa carente del gen *noxA*, mientras que la cepa  $\Delta AN\_8683/\Delta AN\_10893$  y la triple mutante  $\Delta noxA/\Delta AN\_8683/\Delta AN\_10893$  tienen un efecto aditivo en la reducción de la actividad de FRE, acumulando menos hierro que las mutantes sencillas en esos genes. Las cepas CTP9 y CTP10, que tienen la construcción

genética *noxA(P)::AN\_8683*, presentan un comportamiento similar al de la cepa  $\Delta noxA$ , es decir, su actividad de FRE es igual que en presencia de hierro.

Estos datos indican que las proteínas AN\_8683, AN\_10893 y NoxA tienen un papel importante en la reducción de hierro.



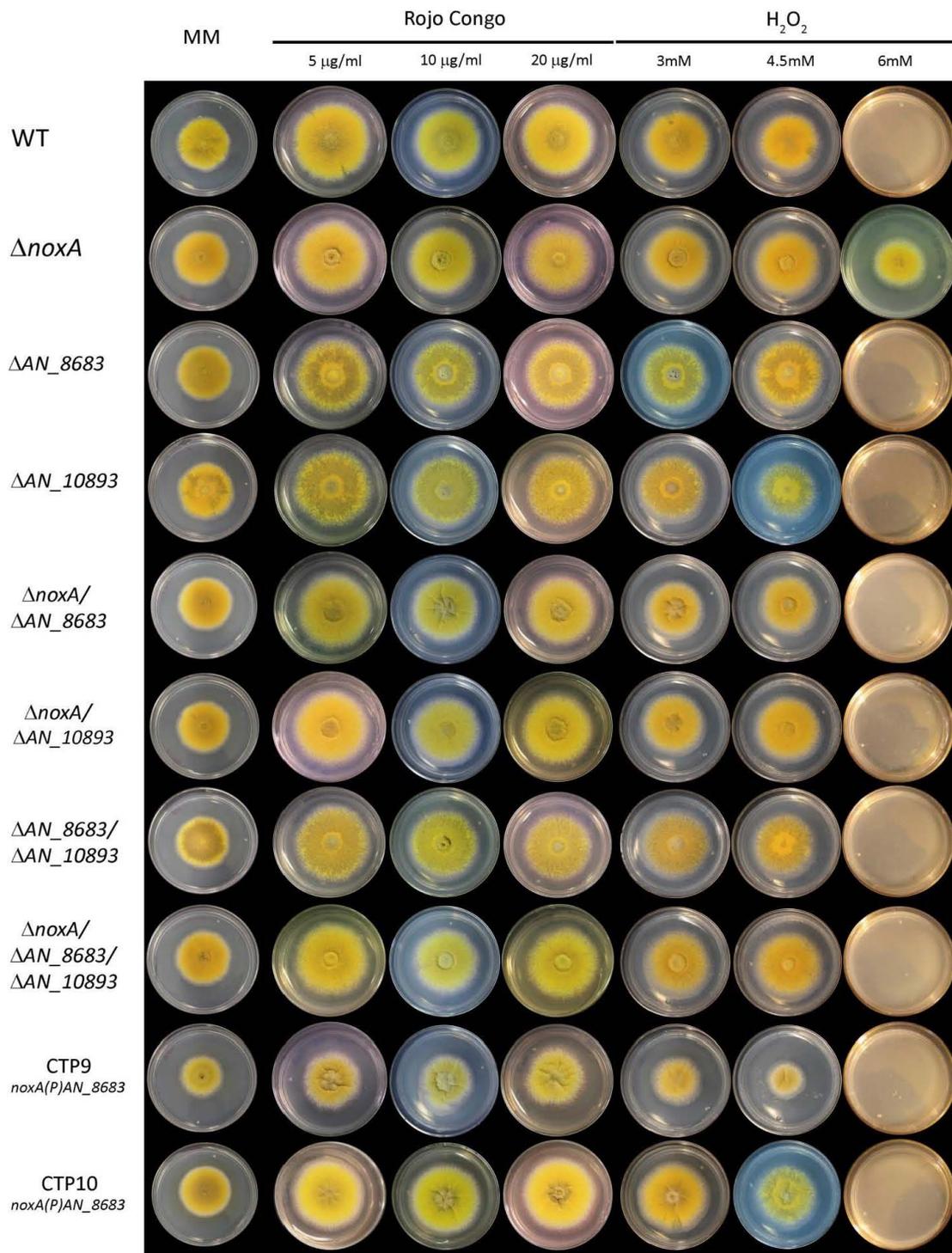
**Figura 23. Las cepas carentes de los genes *noxA*, *AN\_8683* y *AN\_10893* están afectadas en la actividad total de FRE.** Cuantificación de la actividad total de reductasa férrica (FRE) en medio con hierro **A)** o medio con limitación de hierro **B)**. Se inocularon  $1 \times 10^8$  conidios/mL de las cepas CLK43 (WT), CTP1 ( $\Delta AN_8683$ ), CTP3 ( $\Delta AN_10893$ ), CAH4 ( $\Delta noxA$ ), CTP4 ( $\Delta noxA/\Delta AN_10893$ ), CTP2 ( $\Delta noxA/\Delta AN_8683$ ), CTP5 ( $\Delta AN_8683/\Delta AN_10893$ ), CTP8 ( $\Delta noxA/\Delta AN_8683/\Delta AN_10893$ ), CTP9 (*noxA(P)::AN\_8683*) y CTP10 (*noxA(P)::AN\_8683*) en matraces con 50 mL de medio mínimo con hierro (+Fe) o en limitación de hierro (-Fe) y se incubaron a 37°C a 200 rpm por 24 h. Al término de este tiempo se realizó el ensayo cualitativo de actividad de reductasa férrica (Nyhus et al., 1997). Los datos muestran el promedio de tres experimentos independientes; las barras indican la desviación estándar. La ANOVA de una vía con la prueba de comparaciones múltiples de Tukey muestra que hay diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre las cepas mutantes con respecto a la cepa silvestre (\*) y de las mutantes dobles y triples con respecto a las mutantes sencillas (#).

## 8.- Los genes *AN\_8683* y *AN\_10893* son dispensables para la resistencia al estrés de la pared celular y la resistencia al estrés oxidativo.

Debido a que hemos visto que los genes *noxA*, *AN\_8683* y *AN\_10893* están implicados en el desarrollo sexual y asexual de *A. nidulans*, y que podrían estar implicados en la generación de ERO, nos preguntamos si las cepas carentes de estos genes podrían ser sensibles a ciertos tipos de estrés como el estrés de pared celular o el estrés oxidativo. Para explorar esta idea se inocularon esporas de las cepas mutantes sencillas, dobles, triples, así como las cepas CTP9 y CTP10 que tienen el ORF de *AN\_8683* en el locus de

*noxA* en presencia del colorante rojo congo, que afecta la pared celular, y del agente oxidante peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Como se observa en la figura 24, todas las cepas son resistentes al estrés de pared causado por el rojo congo. Por otro lado, ante la presencia del estrés oxidativo causado por el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, a bajas concentraciones (3 y 4.5 mM) todas las cepas se comportan de manera similar a la cepa silvestre. Notablemente, las esporas de la mutante  $\Delta noxA$  mostraron una mayor resistencia al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> que las de una cepa silvestre (Fig. 24). Sin embargo, esta resistencia se perdió en las mutantes dobles  $\Delta noxA/\Delta AN\_8683$ ,  $\Delta noxA/\Delta AN\_8683$  y  $\Delta AN\_8683/\Delta AN\_10893$ , así como en la mutante triple  $\Delta noxA/\Delta AN\_8683/\Delta AN\_10893$ , indicando que la actividad de estas enzimas es necesaria para la mayor resistencia al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> observada en cepas  $\Delta noxA$ .

Al igual que durante la diferenciación sexual, en este caso también se observa una relación opuesta entre NoxA y las proteínas AN\_8683 y AN\_10893.



**Fig. 24.** Las esporas de la cepa  $\Delta noxA$  son resistentes al estrés oxidativo causado por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y no muestran sensibilidad al rojo Congo. Se inocularon  $1 \times 10^4$  esporas de las cepas CLK43 (WT), CTP1 ( $\Delta AN_{8683}$ ) CTP3 ( $\Delta AN_{10893}$ ), CAH4 ( $\Delta noxA$ ), CTP4 ( $\Delta noxA/\Delta AN_{10893}$ ), CTP2 ( $\Delta noxA/\Delta AN_{8683}$ ), CTP5 ( $\Delta AN_{8683}/\Delta AN_{10893}$ ), CTP8 ( $\Delta noxA/\Delta AN_{8683}/\Delta AN_{10893}$ ), CTP9 (*noxA(P)::AN8683*) y CTP10(*noxA(P)::AN8683*) en el centro de cajas Petri conteniendo medio mínimo más los suplementos requeridos, y medio mínimo con rojo congo y peróxido de hidrógeno inorgánico (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) a las concentraciones indicadas y se incubaron a 37°C por 4 días. Se muestra un solo experimento representativo, el cual se repitió 3 veces.

## Discusión

En los hongos las NADPH oxidasas (NOX) son esenciales para el desarrollo sexual (Lara-Ortiz, Riveros-Rosas et al. 2003, Malagnac, Lalucque et al. 2004, Aguirre, Rios-Momberg et al. 2005, Cano-Dominguez, Alvarez-Delfin et al. 2008, Tudzynski, Heller et al. 2012). Las NOX y las FRE son proteínas homólogas que comparten dominios (Wang, Roberts et al. 1997), por lo que es difícil diferenciarlas estructuralmente. Sin embargo, diversos análisis filogenéticos (Aguirre, Rios-Momberg et al. 2005, Kawahara, Quinn et al. 2007) han indicado que los hongos poseen tres subfamilias de NOX (NOXA-C). Esta visión se modificó recientemente cuando se reportó que la proteína Yno1 de *S. cerevisiae* tiene actividad de NOX (Rinnerthaler, Buttner et al. 2012). Anteriormente, Yno1 se consideró una FRE y se colocó en la familia de FRE8 (Grissa, Bidard et al. 2010, Blatzer, Binder et al. 2011). Sin embargo, YNO1 parecía no tener actividad de FRE, debido a que no se expresa en condiciones de bajo hierro o cobre (Martins, Jensen et al. 1998, Yun, Bauler 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, Riveros-Rosas et al. 2003). Previamente realizamos un análisis filogenético para saber qué tan conservadas están estas proteínas en otros hongos e identificamos cuatro clados principales, el clado de las NOX, el clado de las FRE, el clado YNO1/FRE8 y un clado al que nombramos Fre/Nox, donde se agrupan dos proteínas homólogas de Yno1 en *A. nidulans* que son las proteínas AN\_8683 y AN\_10893 (Pérez 2014). El clado Fre/Nox agrupa proteínas que han sido tratadas como proteínas FRE no caracterizadas en *Neurospora crassa*; sin embargo, estas proteínas podrían estar involucradas con el desarrollo, ya que durante el crecimiento de la colonia cinco genes que codifican posibles proteínas FRE se sobre expresan durante las primeras tres horas de crecimiento, y uno de los genes disminuye su expresión durante la conidiación (Kasuga and Glass 2008, Tian, Beeson et al. 2009).

Para determinar si AN\_8683 tenía función de NOX obtuvimos cepas con el ORF de AN\_8683 en el locus de *noxA* (*noxA(p)::AN\_8683*) para saber si AN\_8683 podría

complementar el fenotipo de una mutante  $\Delta noxA$ . El hecho de que las cepas con esta construcción se comporten como cepas carentes del gen *noxA*; es decir, que producen menos esporas asexuales (Fig. 16) que la cepa silvestre y no producen estructuras sexuales o cleistotecios (Fig. 17), sugiere que AN\_8683 no es una proteína del tipo Nox. Sin embargo, aún sería posible que AN\_8683 codificara para una proteína NOX, pero que tanto su actividad en el desarrollo como en su regulación fuesen diferentes a NoxA. Es interesante que en el hongo fitopatógeno *Botrytis cinerea* se han generado cepas reemplazando el ORF de BcNoxA por el de BcNoxB y viceversa, y en ningún caso se observó complementación, lo que sugiere que aunque ambas proteínas tuvieran actividad de NOX, no son redundantes, y cada una se requiere en momentos específicos del desarrollo (Marschall, Siegmund et al. 2016).

Con respecto al desarrollo asexual de *A. nidulans*, nuestros resultados muestran que la eliminación de los genes AN\_8683 y AN\_10893 afectan la conidiación (Fig. 16) y este fenotipo es similar al provocado por la eliminación del gen *noxA* (Hernández Becerril 2010). Además, en las mutantes dobles y triples este efecto es aditivo, lo que sugiere que estas tres proteínas podrían estar regulando este proceso de manera independiente. En el hongo fitopatógeno *M. oryzae*, las cepas mutantes  $\Delta nox1$  son incapaces de organizar los filamentos de actina y las cepas  $\Delta nox2$  no pueden formar los anillos de septinas que son necesarios para la formación del apresorio (Ryder, Dagdas et al. 2013). En *A. nidulans* se han reportado cinco proteínas de la familia de las septinas y, dentro de éstas, AspB es esencial para la conidiogénesis (Hernandez-Rodriguez, Hastings et al. 2012). Es posible que NoxA, AN\_8683 y AN\_10893 contribuyan a la conidiación mediante la regulación de los anillos de septina. Para abordar esta hipótesis es necesario realizar otros estudios.

A diferencia de lo observado en el desarrollo asexual, la eliminación de los genes AN\_8683 y AN\_10893 tuvo efectos opuestos en el desarrollo sexual al compararlos con la eliminación del gen *noxA*. Es decir, mientras que la eliminación del gen *noxA* bloquea el desarrollo sexual (Lara-Ortiz, Riveros-Rosas et al. 2003), la supresión de los genes AN\_8683 o AN\_10893 produce una mayor cantidad de cleistotecios en comparación con

una cepa silvestre (Fig. 18A). Este fenómeno es sinérgico puesto que la mutante doble en estos genes produjo más cleistotecios que las mutantes sencillas o que la cepa silvestre (Fig. 18B), indicando que ambas proteínas reprimen el ciclo sexual de manera dependiente. Se sabe que la sobre expresión del gen *noxA* (Lara-Ortiz, Riveros-Rosas et al. 2003) resulta en la generación exacerbada de estructuras sexuales (cleistotecios). Independientemente de que AN\_8683 y AN\_10893 tengan actividad de NOX o de FRE, es claro que la actividad de NoxA es un factor limitante del ciclo sexual, ya que las mutantes en un fondo  $\Delta noxA$  ( $\Delta noxA/\Delta AN_8683$ ,  $\Delta noxA/\Delta AN_10893$  y  $\Delta noxA/\Delta AN_8683/\Delta AN_10893$ ) tampoco producen cleistotecios, sino primordios que parecen estacionados en el mismo estadio de desarrollo que los producidos por la mutante  $\Delta noxA$ . En conjunto, nuestros datos apoyan la idea que las proteínas AN\_8683 y AN\_10893 poseen actividad de FRE y están involucradas en la reducción de hierro. Dado que el gen *noxA* se induce en condiciones de limitación de hierro (Fig. 22), es posible que la eliminación de los genes AN\_8683 y/o AN\_10893 resulte en una condición de limitación de hierro, la sobre expresión de *noxA* y un consecuente aumento en el número de cleistotecios.

Sin embargo, al cuantificar la fluorescencia del dihidroetidio en los primordios de cleistotecios, la mutante sencilla  $\Delta AN_8683$  muestra una fluorescencia similar a la cepa silvestre, mientras que las mutantes sencillas  $\Delta noxA$  y  $\Delta AN_10893$  presentan una fluorescencia disminuida, lo que sugiere que NoxA es la principal productora de ERO en estas estructuras. De manera contraria, las cepas  $\Delta noxA/\Delta AN_8683$  y  $\Delta AN_8683/\Delta AN_10893$  tienen una mayor fluorescencia que la cepa silvestre, lo que refuerza la idea de un mecanismo de compensación por parte de AN\_10893 y de NoxA respectivamente. Esta idea es apoyada por el comportamiento de la mutante triple, en la que la fluorescencia del dihidroetidio es menor. Se ha reportado que AN\_10893 es un gen específico del desarrollo ya que se expresa tanto en el estadio asexual y sexual de *A. nidulans* (Bayram, Feussner et al. 2016), y es posible que éste último proceso actúe produciendo ERO mediado por NoxA, puesto que en una mutante  $\Delta noxA$ , la fluorescencia del dihidroetidio es menor que en una cepa silvestre y que en las mutantes sencillas.

Al evaluar la expresión de los genes *noxA*, *AN\_8683*, *AN\_10893* y *freA* en ausencia de hierro y tanto en una cepa silvestre como en una cepa  $\Delta noxA$ , observamos que la limitación de hierro induce los genes *noxA*, *AN\_8683*, *AN\_10893* y *freA* (Fig. 22). Inesperadamente, esta respuesta depende en parte de *noxA*, puesto que la expresión de los genes *AN\_8683* y *freA* disminuye en una mutante  $\Delta noxA$  y, únicamente, la expresión de *AN\_10893* es independiente de *noxA*, y está mediada por la carencia de hierro.

La inducción de genes que codifican oxidorreductasas del tipo FRE/NOX en condiciones de limitación de hierro considera como una característica para clasificar a estas oxidorreductasas como proteínas FRE en *S. cerevisiae* (Dancis, Klausner et al. 1990, Dancis, Roman et al. 1992, Dancis, Haile et al. 1994, Martins, Jensen et al. 1998, Georgatsou and Alexandraki 1999). En *A. nidulans* el gen *freA* se induce en medio con bajo hierro por lo que se clasificó como una proteína FRE (Oberegger, Schoeser et al. 2002). De acuerdo con esto, podríamos proponer que los cuatro genes evaluados corresponden a la familia de las FRE. Sin embargo, es claro que NoxA corresponde a una NOX, y puesto que posee dos grupos hemo, no es del todo sorprendente que se regule por la disponibilidad de hierro. Tal vez un poco más inesperado es que la actividad de NoxA regule la expresión de las FRE, posiblemente a través de un papel indirecto en la reducción de hierro. En *S. cerevisiae* se ha reportado que la proteína Fre1, además de reducir hierro, puede reducir compuestos orgánicos como el paraquat (Hassett and Kosman 1995), por lo que la idea de que NoxA pueda reducir metales además del oxígeno no es improbable; sin embargo, se necesita abordar bioquímicamente esta idea para poder probarla o descartarla. En todo caso, es claro que los niveles de expresión como criterio único para clasificar oxidorreductasas no caracterizadas no es adecuado para diferenciar una FRE de una NOX.

La hipótesis de que NoxA podría estar interactuando o regulando oxidorreductasas del tipo Fre/Nox, como *AN\_8683* y *FreA*, es consistente con los resultados de la actividad de FRE, puesto que tanto una cepa  $\Delta noxA$  como una  $\Delta AN_8683$ , reducen su actividad de FRE en medio con hierro y sin hierro (Fig. 23). Por otro lado, la mutante sencilla  $\Delta AN_10893$  presenta el comportamiento consistente con la afectación de una FRE, ya que en medio

con hierro su comportamiento es similar al de una cepa silvestre mientras que en medio con bajo hierro la actividad de FRE de esta cepa disminuye aproximadamente al 50%. Sin embargo, en la mutante doble  $\Delta noxA/\Delta AN_{10893}$ , la actividad de reductasa férrica es similar al de una cepa  $\Delta noxA$ , apoyando el resultado de qPCR de que NoxA podría regular la expresión o actividad de AN\_8683. Otra posibilidad es que AN\_8683 y NoxA, de alguna manera, estén regulando la producción de sideróforos, lo cual se ha reportado en el hongo fitopatógeno *Alternaria alternata*, en donde se sabe que una cepa  $\Delta noxA$  produce menos sideróforos que una cepa silvestre (Chen, Yang et al. 2014), argumentando que esta regulación puede deberse a la comunicación cruzada entre las ERO producidas por NoxA y la vía de la MAPK SakA. Estos datos se fundamentan en la idea de que las NOX pueden regular distintas vías de señalización de manera indirecta. Una tercera hipótesis implicaría cambios en la solubilidad del hierro, la cual aumenta en ambientes ácidos (Crichton and Pierre 2001). Cambios en el pH del medio externo e intracelular debidos a la actividad de proteínas como NoxA o AN\_8683 podrían relacionarse con el hecho de que el transporte de electrones a través una membrana esta acoplado con el transporte de protones (Segal 2016). La propuesta de que la actividad de NoxA o AN\_8683 podría regular el pH con el fin de facilitar la adquisición de hierro, favorece la idea de un vínculo con la síntesis de los sideróforos, puesto que la biosíntesis y el consumo de sideróforos se regula por el pH mediante el factor transcripcional PacC (Eisendle, Oberegger et al. 2004). Sin embargo, se necesitan realizar más experimentos para abordar estas ideas.

En este trabajo encontramos que la mutante  $\Delta noxA$  es resistente a 6 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Fig. 24), mientras que las demás mutantes se comportan como la cepa silvestre, lo cual difiere de lo reportado en otros hongos. En *A. alternata* y *Botrytis cinerea* se ha observado que las cepas mutantes en los genes *AanoxA/bcnoxA* o *AanoxB/bcnoxB* son más sensibles al estrés oxidante causado por el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Segmueller, Kokkelink et al. 2008, Yang and Chung 2012) y en *A. fumigatus* y *C. albicans* las cepas carentes de genes que codifican para reductasas férricas son más sensibles que una cepa silvestre al mismo tratamiento (Blatzer, Binder et al. 2011, Xu, Qian et al. 2014). Es importante recalcar que las cepas con la construcción *noxA(P)::AN\_8683*, que en el desarrollo sexual, asexual y en la actividad de

FRE se comportan como una cepa nula en el gen *noxA*, pierden la resistencia al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, sugiriendo que la expresión de *AN\_8683* anula dicha resistencia.

Una explicación a la mayor resistencia que muestra la mutante  $\Delta noxA$  ante el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> podría deberse a una actividad antioxidante exacerbada en esta cepa producida principalmente por las catalasas A y B (CatA y CatB), que son las principales enzimas degradadoras de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en conidias y en micelio, respectivamente (Navarro, Stringer et al. 1996, Kawasaki, Wysong et al. 1997). Debido a que las cepas  $\Delta AN_8683$  y  $\Delta AN_10893$ , así como las mutantes dobles con un fondo genético  $\Delta noxA$ , se comportan como una cepa silvestre, es posible que la activación de este sistema antioxidante se regule directa o indirectamente por *AN\_8683* y *AN\_10893*. Se ha reportado que en *A. alternata* *AaNoxA* regula la expresión de la MAPK *AaHOG1* (*SakA* en *A. nidulans*) y de *AaAP1* (*NapA* en *A. nidulans*) (Yang and Chung 2012) y que en el basidiomiceto *Ganoderma lucidum* la mutante doble *NoxAB*, el gen homólogo de *NapA*, *AP1* se encuentra bajorregulado, lo que sugiere una conexión entre el sistema NOX-*NapA* (Mu, Li et al. 2014). En *A. nidulans*, *NapA* es un regulador maestro de la respuesta específica ante el estrés por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Mendoza-Martínez et al., 2017). Para determinar si hay una comunicación indirecta entre el sistema Nox-*Nap* se requiere un abordaje experimental directo.

Nuestros resultados apoyan la idea de que los genes *AN\_8683* y *AN\_10893* codifican para proteínas con actividad de FRE y muestran que estas proteínas cumplen funciones importantes en el desarrollo de *A. nidulans*.

## Conclusiones

- Las mutantes  $\Delta AN_{8683}$ ,  $\Delta AN_{10893}$  y  $\Delta noxA$  producen menos conidios y este efecto es aditivo, lo que indica que esas proteínas son requeridas independientemente para este proceso de diferenciación.
- En contraste con las mutantes  $\Delta noxA$ , las mutantes  $\Delta AN_{8683}$  y  $\Delta AN_{10893}$  producen más cleistotecios y este fenotipo es aditivo en las mutante doble  $\Delta AN_{8683}/\Delta AN_{10893}$ . Quizá la carencia de estos genes podría generar un efecto compensatorio en la expresión o actividad de NoxA.
- El criterio de inducción de genes por carencia de hierro no es un criterio útil para distinguir las enzimas NOX de las FRE. En ausencia de *noxA* hay una reducción en la expresión de los genes *AN\_{8683}*, *AN\_{10893}* y *freA*, lo que sugiere una conexión fisiológica entre las proteínas NOX y FRE.
- El micelio de las mutantes  $\Delta AN_{8683}$  y  $\Delta noxA$  tiene menos actividad de FRE cuando crece en una concentración regular de hierro, mientras las mutantes  $\Delta AN_{10893}$  tienen una actividad reducida de FRE sólo bajo restricción de hierro.
- Los primordios de cleistotecios de las cepas  $\Delta noxA$  y  $\Delta AN_{10893}$  parecen producir menores niveles de ERO que la cepa silvestre y la cepa  $\Delta AN_{8683}$ , lo que indica que esas proteínas son importantes para la producción de ERO durante el desarrollo de los cleistotecios.
- Nuestros resultados sugieren que las proteínas *AN\_{8683}* y *AN\_{10893}* corresponden a reductasas férricas y que NoxA está conectada a la expresión y actividad de estas FRE. La posibilidad de que NoxA tenga actividad de FRE parece poco probable, pero no puede ser descartada a priori.

## Perspectivas

- Determinar la actividad de reductasa férrica mediante BPS y la actividad de NOX mediante DHE en extractos celulares, así como en colonias y micelio crecido en líquido, en las mutantes sencillas, dobles y triples en los genes *noxA*, *AN\_8683* y *AN\_10893*, así como en las cepas con el ORF de *AN\_8683* en el locus de *noxA*.
- Determinar el crecimiento en las mutantes sencillas, dobles y triples triples en los genes *noxA*, *AN\_8683* y *AN\_10893*, así como en las cepas con el ORF de *AN\_8683* en el locus de *noxA* en condiciones más severas de bajo hierro (en presencia de quelantes de Fe) y en baja síntesis de sideróforos (mutantes *cfwA2*).
- Realizar mutantes de las oxidorreductasas *AN\_4906*, *AN\_0773* y *FreA* y caracterizarlas en cuanto al desarrollo sexual y asexual, así como a la reducción de hierro.

## Referencias

- Adams, T. H., M. T. Boylan and W. E. Timberlake (1988). "BrlA Is Necessary and Sufficient to Direct Conidiophore Development in *Aspergillus-Nidulans*." Cell **54**(3): 353-362.
- Adams, T. H., J. K. Wieser and J. H. Yu (1998). "Asexual sporulation in *Aspergillus nidulans*." Microbiol Mol Biol Rev **62**(1): 35-54.
- Adams, T. H. and J. H. Yu (1998). "Coordinate control of secondary metabolite production and asexual sporulation in *Aspergillus nidulans*." Curr Opin Microbiol **1**(6): 674-677.
- Ago, T., T. Kitazono, H. Ooboshi, T. Iyama, Y. H. Han, J. Takada, M. Wakisaka, S. Ibayashi, H. Utsumi and M. Iida (2004). "Nox4 as the major catalytic component of an endothelial NAD(P)H oxidase." Circulation **109**(2): 227-233.
- Ago, T., H. Nunoi, T. Ito and H. Sumimoto (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., R. Takeya, H. Hiroaki, F. Kuribayashi, T. Ito, D. Kohda and H. Sumimoto (2001). "The PX domain as a novel phosphoinositide-binding module." Biochemical and Biophysical Research Communications **287**(3): 733-738.
- Aguirre, J. and J. D. Lambeth (2010). "Nox enzymes from fungus to fly to fish and what they tell us about Nox function in mammals." Free Radic Biol Med **49**(9): 1342-1353.
- Aguirre, J., M. Rios-Momberg, D. Hewitt and W. Hansberg (2005). "Reactive oxygen species and development in microbial eukaryotes." Trends Microbiol **13**(3): 111-118.
- Ameziane-El-Hassani, R., S. Morand, J. L. Boucher, Y. M. Frapart, D. Apostolou, D. Agnandji, S. Gnidehou, R. Ohayon, M. S. Noel-Hudson, J. Francon, K. Lalaoui, A. Virion and C. Dupuy (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.
- Arst, H. N. and M. A. Penalva (2003). "pH regulation in *Aspergillus* and parallels with higher eukaryotic regulatory systems." Trends Genet **19**(4): 224-231.
- Axelrod, D. E., M. Gealt and Pastusho, M (1973). "Gene Control of Developmental Competence in *Aspergillus-Nidulans*." Developmental Biology **34**(1): 9-15.
- Baek, Y. U., M. Li and D. A. Davis (2008). "Candida albicans ferric reductases are differentially regulated in response to distinct forms of iron limitation by the Rim101 and CBF transcription factors." Eukaryot Cell **7**(7): 1168-1179.
- Baldrige, C. W. and R. W. Gerard (1933). "The extra respiration of phagocytosis." American Journal of Physiology **103**(1): 235-236.
- Banfi, B., B. Malgrange, J. Knisz, K. Steger, M. Dubois-Dauphin and K. H. Krause (2004). "NOX3, a superoxide-generating NADPH oxidase of the inner ear." J Biol Chem **279**(44): 46065-46072.

- Banfi, B., G. Molnar, A. Maturana, K. Steger, B. Hegedus, N. Demaurex and K. H. Krause (2001). "A Ca(2+)-activated NADPH oxidase in testis, spleen, and lymph nodes." J Biol Chem **276**(40): 37594-37601.
- Batot, G., C. Martel, N. Capdeville, F. Wientjes and F. Morel (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. and G. H. Braus (2012). "Coordination of secondary metabolism and development in fungi: the velvet family of regulatory proteins." FEMS Microbiol Rev **36**(1): 1-24.
- Bayram, O., K. Feussner, M. Dumkow, C. Herrfurth, I. Feussner and G. H. Braus (2016). "Changes of global gene expression and secondary metabolite accumulation during light-dependent *Aspergillus nidulans* development." Fungal Genet Biol **87**: 30-53.
- BelAiba, R. S., T. Djordjevic, A. Petry, K. Diemer, S. Bonello, B. Banfi, J. Hess, A. Pogrebniak, C. Bickel and A. Grolach (2007). "NOX5 variants are functionally active in endothelial cells." Free Radic Biol Med **42**(4): 446-459.
- Bindokas, V. P., J. Jordan, C. C. Lee and R. J. Miller (1996). "Superoxide production in rat hippocampal neurons: selective imaging with hydroethidine." J Neurosci **16**(4): 1324-1336.
- Blatzer, M., U. Binder and H. Haas (2011). "The metalloredutase FreB is involved in adaptation of *Aspergillus fumigatus* to iron starvation." Fungal Genet Biol **48**(11): 1027-1033.
- Brambl, R. M., G. A. (2004). A comprehensive treatise on Fungi as experimental systems for basic and applied research. The mycota. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg. II.
- Brar, S. S., T. P. Kennedy, A. B. Sturrock, T. P. Huecksteadt, M. T. Quinn, A. R. Whorton and J. R. Hoidal (2002). "An NAD(P)H oxidase regulates growth and transcription in melanoma cells." Am J Physiol Cell Physiol **282**(6): C1212-1224.
- Braus, G. H. K., S.; Eckert, S. E. (2002). Sexual Development in Ascomycetes fruit body formation of *Aspergillus nidulans*. Molecular Biology of Fungal Development. H. D. Osiewacz. 270 Madison Avenue, New York, CRC Press: 223-252.
- Brun, S., F. Malagnac, F. Bidard, H. Lalucque and P. Silar (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.
- Cano-Dominguez, N., K. Alvarez-Delfin, W. Hansberg and J. Aguirre (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.
- Cerqueira, G. C., M. B. Arnaud, D. O. Inglis, M. S. Skrzypek, G. Binkley, M. Simison, S. R. Miyasato, J. Binkley, J. Orvis, P. Shah, F. Wymore, G. Sherlock and J. R. Wortman (2014). "The *Aspergillus* Genome Database: multispecies curation and incorporation of RNA-Seq data to improve structural gene annotations." Nucleic Acids Res **42**(Database issue): D705-710.
- Clempus, R. E., D. Sorescu, A. E. Dikalova, L. Pounkova, P. Jo, G. P. Sorescu, B. Lassegue and K. K. Griendling (2007). "Nox4 is required for maintenance of the

differentiated vascular smooth muscle cell phenotype." Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology **27**(1): 42-48.

- Clutterbuck, A. J. (1969). "A mutational analysis of conidial development in *Aspergillus nidulans*." Genetics **63**(2): 317-327.
- Coates, J., U. Jahn and D. F. Weetman (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. and J. L. Pierre (2001). "Old iron, young copper: from Mars to Venus." Biometals **14**(2): 99-112.
- Cross, A. R. and O. T. Jones (1991). "Enzymic mechanisms of superoxide production." Biochim Biophys Acta **1057**(3): 281-298.
- Cross, A. R., J. Rae and J. T. Curnutte (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.
- Cui, X. L., D. Brockman, B. Campos and L. Myatt (2006). "Expression of NADPH oxidase isoform 1 (Nox1) in human placenta: involvement in preeclampsia." Placenta **27**(4-5): 422-431.
- Chamulitrat, W., W. Stremmel, T. Kawahara, K. Rokutan, H. Fujii, K. Wingler, H. H. Schmidt and R. Schmidt (2004). "A constitutive NADPH oxidase-like system containing gp91phox homologs in human keratinocytes." J Invest Dermatol **122**(4): 1000-1009.
- Chen, C., K. Pande, S. D. French, B. B. Tuch and S. M. Noble (2011). "An iron homeostasis regulatory circuit with reciprocal roles in *Candida albicans* commensalism and pathogenesis." Cell Host Microbe **10**(2): 118-135.
- Chen, K., M. T. Kirber, H. Xiao, Y. Yang and J. F. Keaney, Jr. (2008). "Regulation of ROS signal transduction by NADPH oxidase 4 localization." J Cell Biol **181**(7): 1129-1139.
- Chen, L. H., S. L. Yang and K. R. Chung (2014). "Resistance to oxidative stress via regulating siderophore-mediated iron acquisition by the citrus fungal pathogen *Alternaria alternata*." Microbiology **160**(Pt 5): 970-979.
- Cheng, G., Z. Cao, X. Xu, E. G. van Meir and J. D. Lambeth (2001). "Homologs of gp91phox: cloning and tissue expression of Nox3, Nox4, and Nox5." Gene **269**(1-2): 131-140.
- Cheng, G. and J. D. Lambeth (2004). "NOXO1, regulation of lipid binding, localization, and activation of Nox1 by the Phox homology (PX) domain." J Biol Chem **279**(6): 4737-4742.
- Cheng, G., D. Ritsick and J. D. Lambeth (2004). "Nox3 regulation by NOXO1, p47phox, and p67phox." J Biol Chem **279**(33): 34250-34255.
- Daiyasu, H. and H. Toh (2000). "Molecular evolution of the myeloperoxidase family." J Mol Evol **51**(5): 433-445.
- Dancis, A., D. Haile, D. S. Yuan and R. D. Klausner (1994). "The *Saccharomyces cerevisiae* copper transport protein (Ctr1p). Biochemical characterization, regulation by copper, and physiologic role in copper uptake." J Biol Chem **269**(41): 25660-25667.

- Dancis, A., R. D. Klausner, A. G. Hinnebusch and J. G. Barriocanal (1990). "Genetic evidence that ferric reductase is required for iron uptake in *Saccharomyces cerevisiae*." Mol Cell Biol **10**(5): 2294-2301.
- Dancis, A., D. G. Roman, G. J. Anderson, A. G. Hinnebusch and R. D. Klausner (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.
- Davis, R. H. and F. J. de Serres (1970). "[4] Genetic and microbiological research techniques for *Neurospora crassa*." Methods in Enzymology **17**: 79-143.
- De Deken, X., D. Wang, M. C. Many, S. Costagliola, F. Libert, G. Vassart, J. E. Dumont and F. Miot (2000). "Cloning of two human thyroid cDNAs encoding new members of the NADPH oxidase family." J Biol Chem **275**(30): 23227-23233.
- De Freitas, J. M., J. H. Kim, H. Poynton, T. Su, H. Wintz, T. Fox, P. Holman, A. Loguinov, S. Keles, M. van der Laan and C. Vulpe (2004). "Exploratory and confirmatory gene expression profiling of *mac1Delta*." J Biol Chem **279**(6): 4450-4458.
- DeLeo, F. R., W. M. Nauseef, A. J. Jesaitis, J. B. Burritt, R. A. Clark and M. T. Quinn (1995). "A domain of p47phox that interacts with human neutrophil flavocytochrome b558." J Biol Chem **270**(44): 26246-26251.
- Dhaunsi, G. S., M. K. Paintlia, J. Kaur and R. B. Turner (2004). "NADPH oxidase in human lung fibroblasts." J Biomed Sci **11**(5): 617-622.
- Diebold, B. A. and G. M. Bokoch (2001). "Molecular basis for Rac2 regulation of phagocyte NADPH oxidase." Nat Immunol **2**(3): 211-215.
- Dinauer, M. C., E. A. Pierce, G. A. Bruns, J. T. Curnutte and S. H. Orkin (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.
- Doussiere, J., J. Gaillard and P. V. Vignais (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.
- Dupuy, C., R. Ohayon, A. Valent, M. S. Noel-Hudson, D. Deme and A. Virion (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.
- Egan, M. J., Z. Y. Wang, M. A. Jones, N. Smirnoff and N. J. Talbot (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.
- Eichhorn, H., F. Lessing, B. Winterberg, J. Schirawski, J. Kamper, P. Muller and R. Kahmann (2006). "A ferroxidation/permeation iron uptake system is required for virulence in *Ustilago maydis*." Plant Cell **18**(11): 3332-3345.
- Eisendle, M., H. Oberegger, R. Buttinger, P. Illmer and H. Haas (2004). "Biosynthesis and uptake of siderophores is controlled by the PacC-mediated ambient-pH Regulatory system in *Aspergillus nidulans*." Eukaryot Cell **3**(2): 561-563.

- El-Benna, J., P. M. Dang, M. A. Gougerot-Pocidallo and C. Elbim (2005). "Phagocyte NADPH oxidase: a multicomponent enzyme essential for host defenses." Arch Immunol Ther Exp (Warsz) **53**(3): 199-206.
- El Hassani, R. A., N. Benfares, B. Caillou, M. Talbot, J. C. Sabourin, V. Belotte, S. Morand, S. Gnidehou, D. Agnandji, R. Ohayon, J. Kaniewski, M. S. Noel-Hudson, J. M. Bidart, M. Schlumberger, A. Virion and C. Dupuy (2005). "Dual oxidase2 is expressed all along the digestive tract." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol **288**(5): G933-942.
- Elliott, C. G. (1960). "The Cytology of *Aspergillus-Nidulans*." Genetical Research **1**(3): 462-476.
- Ellis, T. T., R. R. Don and C. J. Alexopoulos (1973). "Hülle Cell Development in *Emericella nidulans*." Mycologia **65**(5): 1028-1035.
- Ellmark, S. H. M., G. J. Dusting, M. N. T. Fui, N. Guzzo-Pernell and G. R. Drummond (2005). "The contribution of Nox4 to NADPH oxidase activity in mouse vascular smooth muscle." Cardiovascular Research **65**(2): 495-504.
- Emmendorffer, A., J. Roesler, J. Elsner, E. Raeder, M. L. Lohmann-Matthes and B. Meier (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., K. P. Shatwell, A. W. Segal, R. D. Klausner and A. Dancis (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., J. Mistry, J. Tate, P. Coghill, A. Heger, J. E. Pollington, O. L. Gavin, P. Gunasekaran, G. Ceric, K. Forslund, L. Holm, E. L. Sonnhammer, S. R. Eddy and A. Bateman (2010). "The Pfam protein families database." Nucleic Acids Res **38**(Database issue): D211-222.
- Fischer, M. T., R. Sharma, J. L. Lim, L. Haider, J. M. Frischer, J. Drexhage, D. Mahad, M. Bradl, J. van Horssen and H. Lassmann (2012). "NADPH oxidase expression in active multiple sclerosis lesions in relation to oxidative tissue damage and mitochondrial injury." Brain **135**(Pt 3): 886-899.
- Fischer, R. and W. E. Timberlake (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., V. Demidchik, J. H. Bothwell, P. Mylona, H. Miedema, M. A. Torres, P. Linstead, S. Costa, C. Brownlee, J. D. Jones, J. M. Davies and L. Dolan (2003). "Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulate plant cell growth." Nature **422**(6930): 442-446.
- Forteza, R., M. Salathe, F. Miot, R. Forteza and G. E. Conner (2005). "Regulated hydrogen peroxide production by duox in human airway epithelial cells." American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology **32**(5): 462-469.
- Foster, L. A. A. (2002). "Utilization and cell-surface binding of hemin by *Histoplasma capsulatum*." Canadian Journal of Microbiology **48**(5): 437-442.

- Fraga, C. G. (2005). "Relevance, essentiality and toxicity of trace elements in human health." Mol Aspects Med **26**(4-5): 235-244.
- Galagan, J. E., S. E. Calvo, C. Cuomo, L. J. Ma, J. R. Wortman, S. Batzoglou, S. I. Lee, M. Basturkmen, C. C. Spevak, J. Clutterbuck, V. Kapitonov, J. Jurka, C. Scaccocchio, M. Farman, J. Butler, S. Purcell, S. Harris, G. H. Braus, O. Draht, S. Busch, C. D'Enfert, C. Bouchier, G. H. Goldman, D. Bell-Pedersen, S. Griffiths-Jones, J. H. Doonan, J. Yu, K. Vienken, A. Pain, M. Freitag, E. U. Selker, D. B. Archer, M. A. Penalva, B. R. Oakley, M. Momany, T. Tanaka, T. Kumagai, K. Asai, M. Machida, W. C. Nierman, D. W. Denning, M. Caddick, M. Hynes, M. Paoletti, R. Fischer, B. Miller, P. Dyer, M. S. Sachs, S. A. Osmani and B. W. Birren (2005). "Sequencing of *Aspergillus nidulans* and comparative analysis with *A. fumigatus* and *A. oryzae*." Nature **438**(7071): 1105-1115.
- Gascuel, O. (1997). "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., J. B. Kopp, P. Varnai and T. L. Leto (2000). "Identification of renox, an NAD(P)H oxidase in kidney." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(14): 8010-8014.
- Geiszt, M. and T. L. Leto (2004). "The Nox family of NAD(P)H oxidases: host defense and beyond." J Biol Chem **279**(50): 51715-51718.
- Geiszt, M., J. Witta, J. Baffi, K. Lekstrom and T. L. Leto (2003). "Dual oxidases represent novel hydrogen peroxide sources supporting mucosal surface host defense." FASEB J **17**(11): 1502-1504.
- Georgatsou, E. and D. Alexandraki (1999). "Regulated expression of the *Saccharomyces cerevisiae* Fre1p/Fre2p Fe/Cu reductase related genes." Yeast **15**(7): 573-584.
- Georgatsou, E., L. A. Mavrogiannis, G. S. Fragiadakis and D. Alexandraki (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.
- Giesbert, S., T. Schurg, S. Scheele and P. Tudzynski (2008). "The NADPH oxidase Cpnox1 is required for full pathogenicity of the ergot fungus *Claviceps purpurea*." Molecular Plant Pathology **9**(3): 317-327.
- Giesbert, S., U. Siegmund, J. Schumacher, L. Kokkelink and P. Tudzynski (2014). "Functional analysis of BcBem1 and its interaction partners in *Botrytis cinerea*: impact on differentiation and virulence." PLoS One **9** (5): e95172.
- Goldman, G. H. and E. Kafer (2004). "*Aspergillus nidulans* as a model system to characterize the DNA damage response in eukaryotes." Fungal Genetics and Biology **41**(4): 428-442.
- González-López, M. I. A. J. (2017). La proteína NoxD pero no la tetraspanina TplA son necesarias para las funciones de la NADPH oxidasa en *Aspergillus nidulans*. Licenciatura. Biología, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).
- Gouy, M., S. Guindon and O. Gascuel (2010). "SeaView version 4: A multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building." Mol Biol Evol **27**(2): 221-224.
- Grissa, I., F. Bidard, P. Grognet, S. Grossetete and P. Silar (2010). "The Nox/Ferric reductase/Ferric reductase-like families of Eumycetes." Fungal Biol **114**(9): 766-777.

- Groemping, Y., K. Lapouge, S. J. Smerdon and K. Rittinger (2003). "Molecular basis of phosphorylation-induced activation of the NADPH oxidase." Cell **113**(3): 343-355.
- Guindon, S., J. F. Dufayard, V. Lefort, M. Anisimova, W. Hordijk and O. Gascuel (2010). "New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0." Syst Biol **59**(3): 307-321.
- Gunatilleke, I. A. U. N., C. Scazzocchio and H. N. Arst (1975). "Cytoplasmic and Nuclear Mutations to Chloramphenicol Resistance in *Aspergillus-Nidulans*." Molecular & General Genetics **137**(3): 269-276.
- Haas, H., M. Eisendle and B. G. Turgeon (2008). "Siderophores in fungal physiology and virulence." Annu Rev Phytopathol **46**: 149-187.
- Haigis, M. C. and B. A. Yankner (2010). "The aging stress response." Mol Cell **40**(2): 333-344.
- Halliwell, B. (1989). "Superoxide, iron, vascular endothelium and reperfusion injury." Free Radic Res Commun **5**(6): 315-318.
- Halliwell, B. and J. M. Gutteridge (1984). "Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease." Biochem J **219**(1): 1-14.
- Halliwell, B. and J. M. Gutteridge (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. and J. M. C. Gutteridge (1986). "Oxygen Free-Radicals and Iron in Relation to Biology and Medicine - Some Problems and Concepts." Archives of Biochemistry and Biophysics **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., P. H. Williams and A. M. Cashmore (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., J. L. Freeman, T. Lee, S. A. Motalebi and J. D. Lambeth (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.
- Hansberg, W. and J. Aguirre (1990). "Hyperoxidant states cause microbial cell differentiation by cell isolation from dioxygen." J Theor Biol **142**(2): 201-221.
- Harper, A. M., M. F. Chaplin and A. W. Segal (1985). "Cytochrome-B-245 from Human-Neutrophils Is a Glycoprotein." Biochemical Journal **227**(3): 783-788.
- Hassett, R., D. R. Dix, D. J. Eide and D. J. Kosman (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.
- Hassett, R. and D. J. Kosman (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., D. S. Yuan and D. J. Kosman (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., S. Hastings and M. Momany (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.
- Hernández Becerril, A. A., J. (2010). Evaluación de NoxR y RacA como posibles reguladores de la actividad de la NADPH oxidasa NoxA de *Aspergillus nidulans*. Maestría Máster, Universidad Nacional Autónoma de México.
- Hicks, J. K., J. H. Yu, N. P. Keller and T. H. Adams (1997). "Aspergillus sporulation and mycotoxin production both require inactivation of the FadA G alpha protein-dependent signaling pathway." EMBO J **16**(16): 4916-4923.
- 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.
- Hu, G., S. H. Chen, J. Qiu, J. E. Bennett, T. G. Myers and P. R. Williamson (2014). "Microevolution during serial mouse passage demonstrates FRE3 as a virulence adaptation gene in *Cryptococcus neoformans*." MBio **5**(2): e00941-00914.
- Ibrahim, A. S., B. Spellberg, T. J. Walsh and D. P. Kontoyiannis (2012). "Pathogenesis of mucormycosis." Clin Infect Dis **54 Suppl 1**: S16-22.
- Jeeves, R. E., R. P. Mason, A. Woodacre and A. M. Cashmore (2011). "Ferric reductase genes involved in high-affinity iron uptake are differentially regulated in yeast and hyphae of *Candida albicans*." Yeast **28**(9): 629-644.
- Jones, S. A., V. B. O'Donnell, J. D. Wood, J. P. Broughton, E. J. Hughes and O. T. Jones (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. and J. Rall (1996). "Copper - A "modern" bioelement." Angewandte Chemie-International Edition in English **35**(1): 43-60.
- Kamata, H. and H. Hirata (1999). "Redox regulation of cellular signalling." Cell Signal **11**(1): 1-14.
- Kami, K., R. Takeya, H. Sumimoto and D. Kohda (2002). "Diverse recognition of non-PxxP peptide ligands by the SH3 domains from p67(phox), Grb2 and Pex13p." EMBO J **21**(16): 4268-4276.
- Kasuga, T. and N. L. Glass (2008). "Dissecting colony development of *Neurospora crassa* using mRNA profiling and comparative genomics approaches." Eukaryot Cell **7**(9): 1549-1564.
- Kawahara, T. and J. D. Lambeth (2007). "Molecular evolution of Phox-related regulatory subunits for NADPH oxidase enzymes." BMC Evol Biol **7**: 178.

- Kawahara, T., M. T. Quinn and J. D. Lambeth (2007). "Molecular evolution of the reactive oxygen-generating NADPH oxidase (Nox/Duox) family of enzymes." BMC Evol Biol **7**: 109.
- Kawasaki, L., O. Sanchez, K. Shiozaki and J. Aguirre (2002). "SakA MAP kinase is involved in stress signal transduction, sexual development and spore viability in *Aspergillus nidulans*." Molecular Microbiology **45**(4): 1153-1163.
- Kawasaki, L., D. Wysong, R. Diamond and J. Aguirre (1997). "Two divergent catalase genes are differentially regulated during *Aspergillus nidulans* development and oxidative stress." J Bacteriol **179**(10): 3284-3292.
- Kayano, Y., A. Tanaka, F. Akano, B. Scott and D. Takemoto (2013). "Differential roles of NADPH oxidases and associated regulators in polarized growth, conidiation and hyphal fusion in the symbiotic fungus *Epichloe festucae*." Fungal Genet Biol **56**: 87-97.
- Kikuchi, H., M. Hikage, H. Miyashita and M. Fukumoto (2000). "NADPH oxidase subunit, gp91(phox) homologue, preferentially expressed in human colon epithelial cells." Gene **254**(1-2): 237-243.
- Kim, H. J., C. Chen, M. Kabbage and M. B. Dickman (2011). "Identification and characterization of *Sclerotinia sclerotiorum* NADPH oxidases." Appl Environ Microbiol **77**(21): 7721-7729.
- Klebanoff, S. J. (2005). "Myeloperoxidase: friend and foe." J Leukoc Biol **77**(5): 598-625.
- Knaus, U. G., P. G. Heyworth, T. Evans, J. T. Curnutte and G. M. Bokoch (1991). "Regulation of phagocyte oxygen radical production by the GTP-binding protein Rac 2." Science **254**(5037): 1512-1515.
- Koga, H., H. Terasawa, H. Nuno, K. Takeshige, F. Inagaki and H. Sumimoto (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., J. R. Larson and K. Tatchell (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.
- Kwak, J. M., I. C. Mori, Z. M. Pei, N. Leonhardt, M. A. Torres, J. L. Dangl, R. E. Bloom, S. Bodde, J. D. Jones and J. I. Schroeder (2003). "NADPH oxidase AtrbohD and AtrbohF genes function in ROS-dependent ABA signaling in *Arabidopsis*." EMBO J **22**(11): 2623-2633.
- Lacaze, I., H. Lalucque, U. Siegmund, P. Silar and S. Brun (2015). "Identification of NoxD/Pro41 as the homologue of the p22phox NADPH oxidase subunit in fungi." Mol Microbiol **95**.
- Lalucque, H. and P. Silar (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.
- Lambeth, J. D., T. Kawahara and B. Diebold (2007). "Regulation of Nox and Duox enzymatic activity and expression." Free Radic Biol Med **43**(3): 319-331.
- Lambou, K., F. Malagnac, C. Barbisan, D. Tharreau, M. H. Lebrun and P. Silar (2008). "The crucial role of the Pls1 tetraspanin during ascospore germination in *Podospora anserina* provides an example of the convergent evolution of morphogenetic processes in fungal plant pathogens and saprobes." Eukaryot Cell **7**(10): 1809-1818.
- Lara-Ortiz, T., H. Riveros-Rosas and J. Aguirre (2003). "Reactive oxygen species generated by microbial NADPH oxidase NoxA regulate sexual development in *Aspergillus nidulans*." Mol Microbiol **50**(4): 1241-1255.
- Lee, B. N. and T. H. Adams (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., Y. G. Choi, J. Y. Baik, S. Y. Han, D. W. Jeong, Y. S. Bae, N. Kim and S. Y. Lee (2005). "A crucial role for reactive oxygen species in RANKL-induced osteoclast differentiation." Blood **106**(3): 852-859.
- Lesuisse, E., M. Casteras-Simon and P. Labbe (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. and K. McNeill (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.
- Malagnac, F., H. Lalucque, G. Lepere and P. Silar (2004). "Two NADPH oxidase isoforms are required for sexual reproduction and ascospore germination in the filamentous fungus *Podospora anserina*." Fungal Genet Biol **41**(11): 982-997.
- Marchler-Bauer, A., C. Zheng, F. Chitsaz, M. K. Derbyshire, L. Y. Geer, R. C. Geer, N. R. Gonzales, M. Gwadz, D. I. Hurwitz, C. J. Lanczycki, F. Lu, S. Lu, G. H. Marchler, J. S. Song, N. Thanki, R. A. Yamashita, D. Zhang and S. H. Bryant (2013). "CDD: conserved domains and protein three-dimensional structure." Nucleic Acids Res **41**(Database issue): D348-352.
- Marquez-Fernandez, O., A. Trigos, J. L. Ramos-Balderas, G. Viniegra-Gonzalez, H. B. Deising and J. Aguirre (2007). "Phosphopantetheinyl transferase CfwA/NpgA is required for *Aspergillus nidulans* secondary metabolism and asexual development." Eukaryot Cell **6**(4): 710-720.
- Marschall, R., U. Siegmund, J. Burbank and P. Tudzynski (2016). "Update on Nox function, site of action and regulation in *Botrytis cinerea*." Fungal Biology and Biotechnology **3**(1): 8.
- Marschner, H. and V. Römheld (1995). Strategies of plants for acquisition of iron. Iron Nutrition in Soils and Plants. J. Abadía, Springer Netherlands. **59**: 375-388.
- Martins, L. J., L. T. Jensen, J. R. Simon, G. L. Keller and D. R. Winge (1998). "Metalloregulation of FRE1 and FRE2 homologs in *Saccharomyces cerevisiae*." J Biol Chem **273**(37): 23716-23721.

- Martyn, K. D., L. M. Frederick, K. von Loehneysen, M. C. Dinauer and U. G. Knaus (2006). "Functional analysis of Nox4 reveals unique characteristics compared to other NADPH oxidases." Cell Signal **18**(1): 69-82.
- Maruo, Y., H. Takahashi, I. Soeda, N. Nishikura, K. Matsui, Y. Ota, Y. Mimura, A. Mori, H. Sato and Y. Takeuchi (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.
- McCloy, R. A., S. Rogers, C. E. Caldon, T. Lorca, A. Castro and A. Burgess (2014). "Partial inhibition of Cdk1 in G(2) phase overrides the SAC and decouples mitotic events." Cell Cycle **13**(9): 1400-1412.
- Mims, C. W., E. A. Richardson and W. E. Timberlake (1988). "Ultrastructural Analysis of Conidiophore Development in the Fungus *Aspergillus-Nidulans* Using Freeze-Substitution." Protoplasma **144**(2-3): 132-141.
- Mirabito, P. M., T. H. Adams and W. E. Timberlake (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.
- Mu, D., C. Li, X. Zhang, X. Li, L. Shi, A. Ren and M. Zhao (2014). "Functions of the nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase family in *Ganoderma lucidum*: an essential role in ganoderic acid biosynthesis regulation, hyphal branching, fruiting body development, and oxidative-stress resistance." Environ Microbiol **16**(6): 1709-1728.
- Nakamura, Y., S. Ohtaki, R. Makino, T. Tanaka and Y. Ishimura (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.
- Navarro, R. E., M. A. Stringer, W. Hansberg, W. E. Timberlake and J. Aguirre (1996). "catA, a new *Aspergillus nidulans* gene encoding a developmentally regulated catalase." Curr Genet **29**(4): 352-359.
- Nayak, T., E. Szewczyk, C. E. Oakley, A. Osmani, L. Ukil, S. L. Murray, M. J. Hynes, S. A. Osmani and B. R. Oakley (2006). "A versatile and efficient gene-targeting system for *Aspergillus nidulans*." Genetics **172**(3): 1557-1566.
- Neilands, J. B. (1981). "Microbial Iron Compounds." Annual Review of Biochemistry **50**: 715-731.
- 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.
- Nisimoto, Y., S. Motalebi, C. H. Han and J. D. Lambeth (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. and E. S. Jacobson (1999). "Genetic and physiologic characterization of ferric/cupric reductase constitutive mutants of *Cryptococcus neoformans*." Infect Immun **67**(5): 2357-2365.
- Nyhus, K. J., A. T. Wilborn and E. S. Jacobson (1997). "Ferric iron reduction by *Cryptococcus neoformans*." Infect Immun **65**(2): 434-438.
- Oakley, B. R. and N. R. Morris (1981). "A beta-tubulin mutation in *Aspergillus nidulans* that blocks microtubule function without blocking assembly." Cell **24**(3): 837-845.
- Oakley, C. E., C. F. Weil, P. L. Kretz and B. R. Oakley (1987). "Cloning of the Ribob Locus of *Aspergillus-Nidulans*." Gene **53**(2-3): 293-298.
- Oberegger, H., M. Schoeser, I. Zadra, M. Schrettl, W. Parson and H. Haas (2002). "Regulation of *freA*, *acoA*, *lysF*, and *cycA* expression by iron availability in *Aspergillus nidulans*." Appl Environ Microbiol **68**(11): 5769-5772.
- Oliver, P. T. (1972). "Conidiophore and spore development in *Aspergillus nidulans*." J Gen Microbiol **73**(1): 45-54.
- Osmani, S. A., D. B. Engle, J. H. Doonan and N. R. Morris (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. and P. M. Mirabito (2004). "The early impact of genetics on our understanding of cell cycle regulation in *Aspergillus nidulans*." Fungal Genet Biol **41**(4): 401-410.
- Osmani, S. A., R. T. Pu and N. R. Morris (1988). "Mitotic induction and maintenance by overexpression of a G2-specific gene that encodes a potential protein kinase." Cell **53**(2): 237-244.
- Paffenholz, R., R. A. Bergstrom, F. Pasutto, P. Wabnitz, R. J. Munroe, W. Jagla, U. Heinzmann, A. Marquardt, A. Bareiss, J. Laufs, A. Russ, G. Stumm, J. C. Schimenti and D. E. Bergstrom (2004). "Vestibular defects in head-tilt mice result from mutations in *Nox3*, encoding an NADPH oxidase." Genes Dev **18**(5): 486-491.
- Paravicini, T. M. and R. M. Touyz (2006). "Redox signaling in hypertension." Cardiovasc Res **71**(2): 247-258.
- Penalva, M. A. and H. N. Arst, 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.
- Pérez, T., & Aguirre, J. (2014). El papel de la probable reductasa férrica AN 8683 en el crecimiento y la diferenciación celular en el hongo *Aspergillus nidulans*. Licenciatura. Biología, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).
- Piccoli, C., R. Ria, R. Scrima, O. Cela, A. D'Aprile, D. Boffoli, F. Falzetti, A. Tabilio and N. Capitanio (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.
- Pöggelker, S. N., M.; Kück, U. (2006). Fruiting-body development in Ascomycetes. The mycota I Growth, Differentiation and Sexuality. Kües/Fischer. Springer-Verlag Berlin Heidelberg: 325-355.

- Pontecorvo, G., J. A. Roper, L. M. Hemmons, K. D. Macdonald and A. W. Bufton (1953). "The genetics of *Aspergillus nidulans*." Adv Genet **5**: 141-238.
- Read, N. D., A. B. Goryachev and A. Lichius (2012). "The mechanistic basis of self-fusion between conidial anastomosis tubes during fungal colony initiation." Fungal Biology Reviews **26**(1): 1-11.
- Rinnerthaler, M., S. Buttner, P. Laun, G. Heeren, T. K. Felder, H. Klinger, M. Weinberger, K. Stolze, T. Grousl, J. Hasek, O. Benada, I. Frydlova, A. Klocker, B. Simon-Nobbe, B. Jansko, H. Breitenbach-Koller, T. Eisenberg, C. W. Gourlay, F. Madeo, W. C. Burhans and M. Breitenbach (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.
- Rittenour, W. R., H. Si and S. D. Harris (2009). "Hyphal morphogenesis in *Aspergillus nidulans*." Fungal Biology Reviews **23**(1-2): 20-29.
- Robinson, K. M., M. S. Janes, M. Pehar, J. S. Monette, M. F. Ross, T. M. Hagen, M. P. Murphy and J. S. Beckman (2006). "Selective fluorescent imaging of superoxide in vivo using ethidium-based probes." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(41): 15038-15043.
- Roca, M. G., M. Weichert, U. Siegmund, P. Tudzynski and A. Fleissner (2012). "Germling fusion via conidial anastomosis tubes in the grey mould *Botrytis cinerea* requires NADPH oxidase activity." Fungal Biol **116**(3): 379-387.
- Roman, D. G., A. Dancis, G. J. Anderson and R. D. Klausner (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. and M. Zatti (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. and T. L. Leto (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. and G. Turner (1973). "Nuclear and Extranuclear Inheritance of Oligomycin-Resistance in *Aspergillus-Nidulans*." Journal of General Microbiology **75**(Apr): R19-R19.
- Royer-Pokora, B., L. M. Kunkel, A. P. Monaco, S. C. Goff, P. E. Newburger, R. L. Baehner, F. S. Cole, J. T. Curnutte and S. H. Orkin (1986). "Cloning the gene for an inherited human disorder--chronic granulomatous disease--on the basis of its chromosomal location." Nature **322**(6074): 32-38.
- Ryder, L. S., Y. F. Dagdas, T. A. Mentlak, M. J. Kershaw, C. R. Thornton, M. Schuster, J. Chen, Z. Wang and N. J. Talbot (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.

- Salles, N., I. Szanto, F. Herrmann, B. Armenian, M. Stumm, E. Stauffer, J. P. Michel and K. H. Krause (2005). "Expression of mRNA for ROS-generating NADPH oxidases in the aging stomach." Exp Gerontol **40**(4): 353-357.
- Sanchez, O., R. E. Navarro and J. Aguirre (1998). "Increased transformation frequency and tagging of developmental genes in *Aspergillus nidulans* by restriction enzyme-mediated integration (REMI)." 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., N. Buisson, S. Knight, A. Dancis, J. M. Camadro and E. Lesuisse (2003). "Haemin uptake and use as an iron source by *Candida albicans*: role of CaHMX1-encoded haem oxygenase." Microbiology-Sgm **149**: 579-588.
- Sarfstein, R., Y. Gorzalczany, A. Mizrahi, Y. Berdichevsky, S. Molshanski-Mor, C. Weinbaum, M. Hirshberg, M. C. Dagher and E. Pick (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.
- Schalk, I., K. Zeng, S. K. Wu, E. A. Stura, J. Matteson, M. Huang, A. Tandon, I. A. Wilson and W. E. Balch (1996). "Structure and mutational analysis of Rab GDP-dissociation inhibitor." Nature **381**(6577): 42-48.
- Schulz, E. and T. Munzel (2008). "NOX5, a new "radical" player in human atherosclerosis?" J Am Coll Cardiol **52**(22): 1810-1812.
- Schurmann, J., D. Buttermann, A. Herrmann, S. Giesbert and P. Tudzynski (2013). "Molecular Characterization of the NADPH Oxidase Complex in the Ergot Fungus *Claviceps purpurea*: CpNox2 and CpPls1 Are Important for a Balanced Host-Pathogen Interaction." Molecular Plant-Microbe Interactions **26**(10): 1151-1164.
- Segal, A. W. (2016). "NADPH oxidases as electrochemical generators to produce ion fluxes and turgor in fungi, plants and humans." Open Biology **6**: 160028(5).
- Segal, A. W., R. Garcia, A. H. Goldstone, A. R. Cross and O. T. G. Jones (1981). "Cytochrome-B(-245) of Neutrophils Is Also Present in Human-Monocytes, Macrophages and Eosinophils." Biochemical Journal **196**(1): 363-367.
- Segal, A. W., I. West, F. Wientjes, J. H. Nugent, A. J. Chavan, B. Haley, R. C. Garcia, H. Rosen and G. Scrace (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.
- Segmuller, N., L. Kokkelink, S. Giesbert, D. Odinius, J. van Kan and P. Tudzynski (2008). "NADPH oxidases are involved in differentiation and pathogenicity in *Botrytis cinerea*." Mol Plant Microbe Interact **21**(6): 808-819.
- Seo, J. A., Y. Guan and J. H. Yu (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., A. Dancis, A. R. Cross, R. D. Klausner and A. W. Segal (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. and A. W. Segal (1996). "NADPH oxidase." Int J Biochem Cell Biol **28**(11): 1191-1195.
- Si, J., X. Fu, J. Behar, J. Wands, D. G. Beer, R. F. Souza, S. J. Spechler, D. Lambeth and W. Cao (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.
- Siegmund, U., J. Heller, J. A. Kan and P. Tudzynski (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.
- Siegmund, U., R. Marschall and P. Tudzynski (2015). "BcNoxD, a putative ER protein, is a new component of the NADPH oxidase complex in *Botrytis cinerea*." Mol Microbiol **95**.
- Sies, H. (1985). Oxidative stress: introductory remarks Oxidative Stress. Academic Press, London: 1-8.
- Sies, H. (1986). "Biochemistry of oxidative stress." Angewandte Chemie(25): 1058-1071.
- Sies, H. (1991). Oxidative stress: introduction. Oxidative Stress: Oxidants and antioxidants. H. Sies. Academic Press, London: xv-xxii.
- Sies, H. (1997). "Oxidative stress: oxidants and antioxidants." Exp Physiol **82**(2): 291-295.
- Sigel, A. and H. Sigel (1998). "Metal ions in biological systems, volume 35: iron transport and storage microorganisms, plants, and animals." Met Based Drugs **5**(5): 262.
- Singh, A., N. Kaur and D. J. Kosman (2007). "The metalloredutase Fre6p in Fe-efflux from the yeast vacuole." J Biol Chem **282**(39): 28619-28626.
- Skromne, I., O. Sanchez and J. Aguirre (1995). "Starvation stress modulates the expression of the *Aspergillus nidulans* brlA regulatory gene." Microbiology **141 ( Pt 1)**: 21-28.
- Soid-Raggi, G., O. Sanchez and J. Aguirre (2006). "TnpA, a member of a novel family of putative membrane flavoproteins, regulates asexual development in *Aspergillus nidulans*." Mol Microbiol **59**(3): 854-869.
- Suh, Y. A., R. S. Arnold, B. Lassegue, J. Shi, X. Xu, D. Sorescu, A. B. Chung, K. K. Griending and J. D. Lambeth (1999). "Cell transformation by the superoxide-generating oxidase Mox1." Nature **401**(6748): 79-82.
- Takac, I., K. Schroder, L. L. Zhang, B. Lardy, N. Anilkumar, J. D. Lambeth, A. M. Shah, F. Morel and R. P. Brandes (2011). "The E-loop Is Involved in Hydrogen Peroxide Formation by the NADPH Oxidase Nox4." Journal of Biological Chemistry **286**(15): 13304-13313.
- Takemoto, D., S. Kamakura, S. Saikia, Y. Becker, R. Wrenn, A. Tanaka, H. Sumimoto and B. Scott (2011). "Polarity proteins Bem1 and Cdc24 are components of the filamentous fungal NADPH oxidase complex." Proc Natl Acad Sci U S A **108**.
- Takemoto, D., A. Tanaka and B. Scott (2006). "A p67Phox-like regulator is recruited to control hyphal branching in a fungal-grass mutualistic symbiosis." Plant Cell **18**(10): 2807-2821.

- Takemoto, D., A. Tanaka and B. Scott (2006). "A p67Phox-Like Regulator Is Recruited to Control Hyphal Branching in a Fungal–Grass Mutualistic Symbiosis." The Plant Cell **18**(10): 2807-2821.
- Takemoto, D., A. Tanaka and B. Scott (2007). "NADPH oxidases in fungi: diverse roles of reactive oxygen species in fungal cellular differentiation." Fungal Genet Biol **44**(11): 1065-1076.
- Takemoto, D., A. Tanaka and B. Scott (2007). "NADPH oxidases in fungi: diverse roles of reactive oxygen species in fungal cellular differentiation." Fungal Genet Biol **44**.
- Takeya, R., N. Ueno, K. Kami, M. Taura, M. Kohjima, T. Izaki, H. Nunoi and H. Sumimoto (2003). "Novel human homologues of p47phox and p67phox participate in activation of superoxide-producing NADPH oxidases." J Biol Chem **278**(27): 25234-25246.
- Tanaka, A., M. J. Christensen, D. Takemoto, P. Park and B. Scott (2006). "Reactive oxygen species play a role in regulating a fungus-perennial ryegrass mutualistic interaction." Plant Cell **18**(4): 1052-1066.
- Tian, C., W. T. Beeson, A. T. Iavarone, J. Sun, M. A. Marletta, J. H. Cate and N. L. Glass (2009). "Systems analysis of plant cell wall degradation by the model filamentous fungus *Neurospora crassa*." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(52): 22157-22162.
- Timberlake, W. E. (1990). "Molecular genetics of *Aspergillus* development." Annu Rev Genet **24**: 5-36.
- Timberlake, W. E. and A. J. Clutterbuck (1994). "Genetic regulation of conidiation." Prog Ind Microbiol **29**: 383-427.
- Timberlake, W. E. and M. A. Marshall (1989). "Genetic engineering of filamentous fungi." Science **244**(4910): 1313-1317.
- Todd, R. B., M. A. Davis and M. J. Hynes (2007). "Genetic manipulation of *Aspergillus nidulans*: meiotic progeny for genetic analysis and strain construction." Nat Protoc **2**(4): 811-821.
- Trachootham, D., J. Alexandre and P. Huang (2009). "Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: a radical therapeutic approach?" Nat Rev Drug Discov **8**(7): 579-591.
- Tsitsigiannis, D. I. and N. P. Keller (2007). "Oxylipins as developmental and host-fungal communication signals." Trends in Microbiology **15**(3): 109-118.
- Tudzynski, P., J. Heller and U. Siegmund (2012). "Reactive oxygen species generation in fungal development and pathogenesis." Curr Opin Microbiol **15**(6): 653-659.
- Ueyama, T., M. Geiszt and T. L. Leto (2006). "Involvement of Rac1 in activation of multicomponent Nox1- and Nox3-based NADPH oxidases." Mol Cell Biol **26**(6): 2160-2174.
- Vallet, P., Y. Charnay, K. Steger, E. Ogier-Denis, E. Kovari, F. Herrmann, J. P. Michel and I. Szanto (2005). "Neuronal expression of the NADPH oxidase NOX4, and its regulation in mouse experimental brain ischemia." Neuroscience **132**(2): 233-238.
- Vandesompele, J., K. De Preter, F. Pattyn, B. Poppe, N. Van Roy, A. De Paepe and F. Speleman (2002). "Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes." Genome Biol **3**(7): RESEARCH0034.
- 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. and A. W. Segal (1996). "Stoichiometry of the subunits of flavocytochrome b(558) of the NADPH oxidase of phagocytes." Biochemical Journal **320**: 33-38.
- Wallach, T. M. and A. W. Segal (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., X. De Deken, M. Milenkovic, Y. Song, I. Pirson, J. E. Dumont and F. Miot (2005). "Identification of a novel partner of Duox - EFP1, a thioredoxin-related protein." Journal of Biological Chemistry **280(4)**: 3096-3103.
- Wang, M., D. L. Roberts, R. Paschke, T. M. Shea, B. S. Masters and J. J. Kim (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.
- Wilson, M. I., D. J. Gill, O. Perisic, M. T. Quinn and R. L. Williams (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.
- Woodacre, A., R. P. Mason, R. E. Jeeves and A. M. Cashmore (2008). "Copper-dependent transcriptional regulation by *Candida albicans* Mac1p." Microbiology **154(Pt 5)**: 1502-1512.
- Xiang, X., W. Zuo, V. P. Efimov and N. R. Morris (1999). "Isolation of a new set of *Aspergillus nidulans* mutants defective in nuclear migration." Curr Genet **35(6)**: 626-630.
- Xu, N., K. Qian, Y. Dong, Y. Chen, Q. Yu, B. Zhang, L. Xing and M. Li (2014). "Novel role of the *Candida albicans* ferric reductase gene CFL1 in iron acquisition, oxidative stress tolerance, morphogenesis and virulence." Res Microbiol **165(3)**: 252-261.
- Yamamoto, A., K. Kami, R. Takeya and H. Sumimoto (2007). "Interaction between the SH3 domains and C-terminal proline-rich region in NADPH oxidase organizer 1 (Noxo1)." Biochemical and Biophysical Research Communications **352(2)**: 560-565.
- Yang, S., Y. Zhang, W. Ries and L. Key (2004). "Expression of Nox4 in osteoclasts." J Cell Biochem **92(2)**: 238-248.
- Yang, S. L. and K. Chung (2012). "The NADPH oxidase-mediated production of hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) and resistance to oxidative stress in the necrotrophic pathogen *Alternaria alternata* of citrus." Mol Plant Pathol **13**: 900-914.
- Yang, S. L. and K. R. Chung (2013). "Similar and distinct roles of NADPH oxidase components in the tangerine pathotype of *Alternaria alternata*." Mol Plant Pathol **14(6)**: 543-556.
- Yu, J. H., Z. Hamari, K. H. Han, J. A. Seo, Y. Reyes-Dominguez and C. Scazzocchio (2004). "Double-joint PCR: a PCR-based molecular tool for gene manipulations in filamentous fungi." Fungal Genet Biol **41(11)**: 973-981.
- Yu, J. H. and N. Keller (2005). "Regulation of secondary metabolism in filamentous fungi." Annu Rev Phytopathol **43**: 437-458.
- Yun, C. W., M. Bauler, R. E. Moore, P. E. Klebba and C. C. Philpott (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.

- Zhang, X., K. H. Krause, I. Xenarios, T. Soldati and B. Boeckmann (2013). "Evolution of the Ferric Reductase Domain (FRD) Superfamily: Modularity, Functional Diversification, and Signature Motifs." PLoS One **8**(3): e58126.
- Zhao, H., S. Kalivendi, H. Zhang, J. Joseph, K. Nithipatikom, J. Vasquez-Vivar and B. Kalyanaraman (2003). "Superoxide reacts with hydroethidine but forms a fluorescent product that is distinctly different from ethidium: potential implications in intracellular fluorescence detection of superoxide." Free Radic Biol Med **34**(11): 1359-1368.
- Zhu, Y., C. C. Marchal, A. J. Casbon, N. Stull, K. von Lohneysen, U. G. Knaus, A. J. Jesaitis, S. McCormick, W. M. Nauseef and M. C. Dinauer (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.
- Zonneveld, B. J. M. (1975). "Sexual Differentiation in Aspergillus-Nidulans - Requirement for Manganese and Its Effect on Alpha-1,3 Glucan Synthesis and Degradation." Archives of Microbiology **105**(2): 101-104.