

00551



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE MÉXICO

UNAM  
POSGRADO



FACULTAD DE QUÍMICA

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO  
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

ANÁLISIS DE LA FUNCIÓN DE LA  
NADPH OXIDASA NOX-2 EN EL  
HONGO *Neurospora crassa*

T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRA EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS  
P R E S E N T A:  
KAREN ALVAREZ DELFÍN

ASESOR: DR. JESÚS AGUIRRE LINARES



MÉXICO, D. F.

JUNIO 2004



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA

Este trabajo se realizó bajo la dirección del Dr. Jesús Aguirre Linares en el laboratorio 107 oriente, en el departamento de Genética Molecular del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México y con la asesoría del Dr. Wilhelm Hansberg Torres del departamento de Bioquímica del mismo instituto. Karen Álvarez Delfín recibió una beca de DGEP, UNAM durante dos años. Este trabajo se financió con el apoyo del CONACyT (proyecto 2002-C01-40026).

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Karen ALVAREZ

Delfín

FECHA: 18 junio / 2004

FIRMA: 

## ÍNDICE

<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	1
I.1. Las especies reactivas del oxígeno.	1
I.1.1 Aspectos químicos.	1
I.1.2. Aspectos biológicos.	2
I.1.2.1 Daños celulares producidos por las ERO y algunos antioxidantes.	3
I.1.2.2. Las ERO como reguladores fisiológicos.	4
I.1.2.2.1 Las ERO en la transducción de señales.	5
I.1.2.3. Algunas enzimas que producen ERO.	7
I.2. La NADPH oxidasa de las células fagocíticas (NOX2).	8
I.3. Las NADPH oxidasas en las células no fagocíticas.	10
I.3.1. NOX1.	11
I.3.2. NOX3.	11
I.3.3. NOX4.	12
I.3.4. NOX5.	12
I.3.5. Las enzimas DUOX.	13
I.3.6. Las NADPH oxidasas en las plantas.	14
I.3.7. Las NADPH oxidasas en los microorganismos.	15
I.4. <i>N. crassa</i> como modelo de estudio.	16
I.5. Las ERO y la diferenciación celular en los microorganismos.	19
I.6. Hipótesis.	20
I.7. Objetivos generales.	21
I.8. Objetivos particulares.	21
<b>II. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	22
II.1. Cepas de <i>Neurospora crassa</i> empleadas en este trabajo.	22
II.2. Construcción de los plásmidos.	22
II.3. Medios de cultivo y condiciones de crecimiento.	24
II.4. Colección de conidios.	24
II.5. Germinación de conidios.	25
II.6. Cruzas sexuales y germinación de ascosporas.	25

II.7. Determinación del crecimiento radial.	25
II.8. Obtención de esferoplastos y transformación.	26
II.9. Extracción de DNA.	27
II.10. Extracción de RNA.	27
II.11. Hibridación tipo Southern blot.	27
II.12. Hibridación tipo Northern blot.	28
II.13. Obtención de extractos de proteínas de membrana.	28
II.14. Electroforesis de proteínas.	29
II.15. Inmunodetección de proteínas.	29
II.16. Ensayos de actividad por reducción de NBT.	29
II.16.1 Reducción de NBT en geles.	29
II.16.2 Reducción de NBT en solución.	29
<b>III. RESULTADOS</b>	32
III.1. <i>N. crassa</i> posee dos genes <i>nox</i> .	32
III. 2. La proteína NOX-2 esta anotada erróneamente en el genoma de <i>N. crassa</i> .	35
III.3. Expresión y regulación de los genes <i>nox-1</i> y <i>nox-2</i> .	37
III.4. Interrupción del gen <i>nox-2</i> .	39
III.5. La cepa mutante TKA1b no expresa el gen <i>nox-2</i> .	42
III.6. Ensayos de reducción de NBT en extractos de proteínas membranales.	43
III.7. Reconocimiento de NOX-2 por anticuerpos.	46
III.8. Caracterización fenotípica de la mutante $\Delta$ <i>nox-2</i> .	48
III.9. El gen <i>nox-2</i> es necesario para la germinación de las ascosporas.	53
<b>IV. DISCUSIÓN</b>	57
<b>V. CONCLUSIONES</b>	64
<b>VI. REFERENCIAS</b>	

## RESUMEN

Estamos interesados en estudiar el papel de las especies reactivas del oxígeno (ERO) en la diferenciación celular de los microorganismos. Las NADPH oxidasas (NOX) son enzimas membranales que producen superóxido por reducción del O<sub>2</sub>, con electrones donados por el NADPH. La enzima más estudiada de esta clase ha sido la NADPH oxidasa de las células fagocíticas que participa en la llamada “descarga oxidativa”, como parte de la respuesta inmune innata. Recientemente se han encontrado otras NOX en células no fagocíticas de los mamíferos, las plantas y algunos nemátodos. Estas NOX participan en diversas funciones, tales como la biosíntesis de hormonas, la señalización celular, el desarrollo, la estabilización de la matriz extracelular, la detección del nivel de oxígeno, etc. En el hongo filamentoso *A. nidulans* se describió por primera vez un homólogo de la subunidad catalítica de una NADPH oxidasa (NoxA) en microorganismos. La proteína NoxA es esencial para el desarrollo sexual del hongo, ya que una mutante  $\Delta noxA$  está bloqueada en una etapa muy temprana del desarrollo de los cleistotecios, los cuerpos fructíferos que contienen las esporas sexuales o ascosporas. El análisis de los genomas de otros hongos mostró que las NADPH oxidasas están ampliamente distribuidas entre los hongos filamentosos y se agrupan en las subfamilias NoxA y NoxB. A diferencia de *A. nidulans*, *N. crassa* posee dos genes que codifican para las NADPH oxidasas NOX-1 y NOX-2, las cuales son 70% y 40% idénticas a NoxA, respectivamente. Estas NOX tienen los aspectos distintivos de una NADPH oxidasa funcional: 5-6 segmentos transmembranales, 4 histidinas implicadas en la ligación de los grupos hemo y sitios de unión a FAD y NADPH. En este trabajo se ha abordado la caracterización del gen *nox-2* y su posible función en la diferenciación de *N. crassa*. A diferencia de *nox-1*, el gen *nox-2* se expresa en las esporas asexuales o conidios y se induce durante la fase estacionaria del crecimiento. El nivel de RNAm de *nox-2* se regula negativamente en condiciones de elevación de ERO y en fuentes pobres de carbono. Para conocer la función de *nox-2*, éste se interrumpió por recombinación homóloga, utilizando el gen de resistencia a higromicina como marcador de selección. Se obtuvo una cepa mutante  $\Delta nox-2$ , la cual carece de la mayor parte del ORF NOX-2. Con ayuda de esta mutante se determinó la actividad enzimática de NOX-2 en extractos de proteínas membranales, midiendo la reducción de azul de tetrazolio (NBT). Los resultados muestran que la actividad de NADPH oxidasa de NOX-2 contribuyó muy

poco a la actividad general de reducción de NBT en las condiciones ensayadas. Aunque no se observaron diferencias entre las cepas mutante y silvestre con respecto a la reducción del NBT, se detectaron otras actividades celulares capaces de reducir este compuesto. Para detectar a las proteínas NOX, se emplearon los anticuerpos anti-gp91 $phox$  y anti-MOX1, que reconocen a dos NADPH oxidasas diferentes de humanos. Estos anticuerpos no reconocieron a NOX-2 en las condiciones ensayadas, pero mostraron reacción con otras proteínas de *N. crassa*, posiblemente NOX-1. En comparación con una cepa silvestre, la transformante original  $\Delta nox-2$  no mostró diferencias evidentes con respecto al crecimiento vegetativo o la diferenciación asexual. Sin embargo, en condiciones de alta osmolaridad esta cepa mostró un crecimiento notablemente menor. Para determinar si este fenotipo estaba ligado a la mutación  $\Delta nox-2$ , se llevó a cabo una cruce sexual entre la mutante  $\Delta nox-2$  y una cepa silvestre del sexo opuesto. De manera notable, la mayor parte de la progenie de esta cruce resultó sensible a higromicina ( $hph^-$ ), pudiéndose recuperar solamente dos hijas resistentes a higromicina ( $hph^+$ ). El análisis molecular y fenotípico de esta progenie demostró que el fenotipo de crecimiento reducido en alta osmolaridad segrega mendelianamente, pero no se debe a la mutación  $\Delta nox-2$  y que las mutantes  $\Delta nox-2$  se recuperan con muy baja frecuencia después de una cruce sexual. Coincidiendo este resultado y el hecho de que la NADPH oxidasa NoxA es esencial para el desarrollo de los cuerpos fructíferos del hongo homotálico (sin sexos separados) *A. nidulans*, se analizó detalladamente el papel del gen *nox-2* en el desarrollo sexual de *N. crassa*. Para ello, se llevaron a cabo cruces en las que la mutante  $\Delta nox-2$  se utilizó como cepa receptora (hembra) y donadora (macho), así como una cruce entre dos cepas  $\Delta nox-2$  de sexo opuesto y con crecimiento normal en alta osmolaridad. Los resultados mostraron que las mutantes  $\Delta nox-2$  no son estériles ni como hembra ni como macho, pudiendo desarrollar cuerpos fructíferos (peritecios) capaces de producir ascosporas. Sin embargo, en este tipo de cruces prácticamente no se recuperó progenie  $\Delta nox-2$ . En una cruce  $\Delta nox-2$  X  $\Delta nox-2$  también se desarrollaron peritecios y ascosporas con apariencia normal, pero ninguna de las ascosporas obtenidas fue capaz de germinar. Estos resultados demuestran que la NADPH oxidasa NOX-2 de *N. crassa* es esencial para la viabilidad y/o la germinación de las ascosporas y sugiere que las especies reactivas generadas por NOX-2 juegan un papel fundamental en estos procesos.



## I. INTRODUCCION.

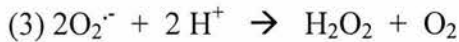
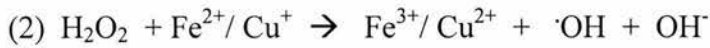
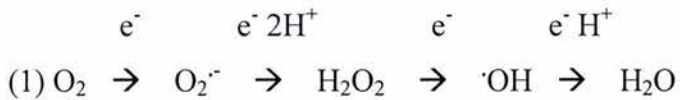
### I.1. Las especies reactivas del oxígeno.

#### I.1.1 Aspectos químicos.

El oxígeno molecular ( $O_2$ ) es indispensable para la vida y proviene mayoritariamente de la fotosíntesis biológica. La llamada “paradoja del oxígeno” consiste en que este gas es utilizado para respirar y obtener energía por la mayoría de los seres vivos, pero su uso resulta dañino en determinadas condiciones (Davies, 1995). Desde el punto de vista químico, el  $O_2$  es un dirradical, porque tiene dos electrones sin aparear. Estos electrones se encuentran en orbitales diferentes, lo que hace que el  $O_2$  sea poco reactivo (McCord, 2000). Las especies reactivas del oxígeno (ERO) son las causantes de la toxicidad del  $O_2$  y se pueden definir como moléculas que están en un estado más reactivo que éste (Droge, 2002). Algunas especies se producen por excitación del oxígeno, como es el caso del oxígeno en singulete. El superóxido, el peróxido de hidrógeno y el radical hidroxilo se forman por la reducción parcial del oxígeno al ganar electrones (reacción 1) (Tabla 1). El radical hidroxilo es muy reactivo y también se forma mediante la reacción de Fenton, en presencia de algunos metales de transición (reacción 2). De todos éstos, sólo el peróxido de hidrógeno no es un radical, porque no tiene electrones desapareados (Halliwell y Gutteridge, 1999). Todas estas moléculas son fácilmente interconvertidas y muchas pueden reaccionar con otros elementos: el superóxido puede dismutar a peróxido de manera espontánea, sobre todo a pH bajo (reacción 3) y puede formar derivados halogenados como el hipoclorito o hipobromito.

**Tabla 1. Algunas especies reactivas del oxígeno.**

Fórmula química	Nombre
$^1O_2$	Oxígeno en singulete
$O_2^{\cdot-}$	Anión superóxido
$H_2O_2$	Peróxido de hidrógeno
$\cdot OH$	Radical hidroxilo



### I.1.2. Aspectos biológicos.

Todos los organismos aeróbicos producen ERO como subproducto del metabolismo normal. La mitocondria se considera el lugar donde se genera la mayor cantidad de ERO en los organismos: a nivel del Complejo I y de la semiquinona de la cadena de transporte electrónica, se escapan del 1-2% de los electrones para reducir parcialmente al  $\text{O}_2$  y formar  $\text{O}_2^{\cdot-}$  (Cadenas y Davies, 2000). El  $\text{O}_2^{\cdot-}$  es poco reactivo, sólo reacciona con unas pocas moléculas como los centros de Fe-S de algunas proteínas, pero no con los aminoácidos, los lípidos o el DNA (Halliwell y Gutteridge, 1999).

El peróxido de hidrógeno es un oxidante débil y puede difundir a través de las membranas biológicas. Su presencia en las células proviene principalmente de la dismutación espontánea o enzimática del  $\text{O}_2^{\cdot-}$ .

El radical hidroxilo se genera principalmente por la reacción del  $\text{H}_2\text{O}_2$  con algunos metales de transición. Es un oxidante muy activo para los sistemas biológicos, ya que reacciona con casi todas las moléculas: puede reaccionar con las dobles ligaduras de los ácidos grasos insaturados membranales y genera lipoperóxidos, puede romper las cadenas de DNA, etc.

El oxígeno en singlete ( $^1\text{O}_2$ ) se genera en la célula fundamentalmente cuando un cromóforo absorbe la energía de un fotón y rápidamente la transfiere al  $\text{O}_2$ . En los organismos vivos existen varios compuestos fotoactivos capaces de producir  $^1\text{O}_2$  como las flavinas, las porfirinas, la bilirrubina, las quinonas, el retinal, el NAD(P)H y la clorofila en las plantas. Esta ERO también puede producirse por la dismutación espontánea del  $\text{O}_2^{\cdot-}$ , la reacción del  $\text{H}_2\text{O}_2$  con  $\text{O}_2^{\cdot-}$  en presencia de metales de transición y por la descomposición del  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Lledias y Hansberg, 2000). El  $^1\text{O}_2$  tiene vida media muy corta, ya que es capaz

de reaccionar rápidamente con los aminoácidos, los lípidos insaturados y otros componentes celulares que estén en la proximidad del lugar en que se produce (Kochevar, 2004).

En los últimos años se han identificado otras especies reactivas derivadas del nitrógeno, que se han llamado especies reactivas de nitrógeno, aunque frecuentemente se incluyen en las ERO. El representante de mayor interés biológico es el radical óxido nítrico (NO<sup>•</sup>) que se produce por la enzima NO<sup>•</sup> sintasa. El NO<sup>•</sup> es un gas moderadamente reactivo que puede difundir en las células y puede reaccionar con los residuos de cisteína (S-nitrosilación), de tirosina y con los centros Fe-S de las proteínas, para generar aductos nitrados. En grandes cantidades el NO<sup>•</sup> es tóxico porque puede inactivar proteínas vitales.

#### **1.1.2.1 Daños celulares producidos por las ERO y algunos antioxidantes.**

Las ERO pueden causar daños al DNA, las membranas biológicas y las proteínas. Las principales modificaciones que producen las ERO en el DNA son la oxidación de las bases púricas, el entrecruzamiento con proteínas y la fragmentación (Martinez *et al.*, 2003).

El radical hidroxilo es el principal causante de modificaciones oxidativas en las proteínas. Puede haber oxidaciones de las cadenas laterales de los aminoácidos o en la cadena polipeptídica principal, lo que conduce a su fragmentación, también producen entrecruzamientos proteína-proteína. Los aminoácidos más sensibles a la oxidación son la cisteína y la metionina, otros aminoácidos como el triptofano, la fenilalanina, la tirosina y la histidina también pueden oxidarse. La oxidación directa de algunos residuos produce derivados carbonilados. La presencia de grupos carbonilos en las proteínas se emplea como marcador de la oxidación de las proteínas celulares por las ERO y se puede detectar por diferentes metodologías (Berlett y Stadtman, 1997; Stadtman y Berlett, 1998).

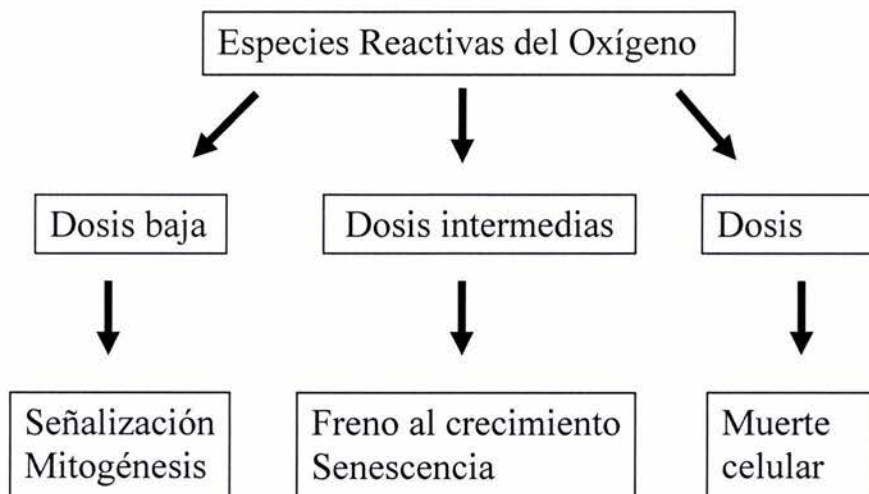
Entre los lípidos, los ácidos grasos insaturados son el principal blanco de oxidación por ERO. La oxidación de los lípidos membranales afecta las interacciones que estabilizan la integridad de la membrana, alterando su función.

La sobreproducción de ERO se ha vinculado a condiciones patológicas como: las enfermedades inflamatorias y neurodegenerativas, el rechazo a trasplantes de órganos, el envejecimiento, el cáncer y la diabetes, entre otras (Cai *et al.*, 2003; Halliwell y Gutteridge,

1999). Los sistemas biológicos han desarrollado mecanismos enzimáticos y no enzimáticos para la degradación de especies reactivas. Entre las enzimas antioxidantes más importantes están la superóxido dismutasa (SOD) que dismuta el superóxido a  $H_2O_2$ , las catalasas que convierten el  $H_2O_2$  en  $H_2O$  y  $O_2$  y las peroxidasas que catalizan la reducción del  $H_2O_2$  empleando una amplia gama de compuestos orgánicos e inorgánicos. El sistema de peroxidasas dependientes del glutatión y de la tiorredoxina contiene con el  $H_2O_2$ , los hidroperóxidos, los lipoperóxidos, etc. Entre los antioxidantes no enzimáticos más importantes se destacan el glutatión, los quelantes de metales de transición, el ácido lipoico, la melatonina, el ascorbato, los  $\beta$ -carotenos, el  $\alpha$ -tocoferol, el urato, etc. (Halliwell y Gutteridge, 1999).

### I.1.2.2. Las ERO como reguladores fisiológicos.

Por mucho tiempo las ERO sólo se habían considerado como agentes dañinos o como instrumento de defensa en las plantas y las células fagocíticas de los mamíferos. Ese paradigma se ha modificado ante un creciente número de evidencias a favor de funciones adicionales. Los sistemas biológicos han echado mano de las ERO y las han empleado para regular diversos aspectos de la fisiología normal de la célula. En este nuevo esquema la dosis de ERO parece modular distintos procesos: las dosis elevadas son citotóxicas y las más bajas promueven diferentes eventos como la proliferación y la señalización celular (Martindale y Holbrook, 2002).



**Figura 1. Las ERO promueven un amplio espectro de respuestas.** Generalmente bajas dosis de ERO participan en procesos de señalización celular que promueven la proliferación, entre otros efectos. En dosis intermedias provocan la detención temporal o permanente del crecimiento, como por ejemplo en la senescencia. Un estrés oxidativo muy severo puede causar la muerte celular por apoptosis o necrosis. Modificado de Martindale y Holbrook (2002).

#### **I.1.2.2.1 Las ERO en la transducción de señales.**

Las ERO califican como segundos mensajeros porque: (i) su producción puede ser regulada en respuesta a un agonista, (ii) existen mecanismos catabólicos de degradación para terminar la señal y (iii) pueden modificar reversiblemente a proteínas blanco, alterando su función (Cooper *et al.*, 2002). El término “señalización redox” se emplea para describir un proceso de transducción en el cual la señal se transmite empleando la química redox, o sea, el balance oxidación-reducción (Droge, 2002). Algunos ejemplos notables de la regulación redox a diferentes niveles son:

- a) Ciertas interacciones ligando-receptor producen ERO. Algunos ligandos como la insulina, la angiotensina II, el PDGF, el TGF- $\beta$ 1, la IL-1 $\beta$ , el TNF $\alpha$ , etc, provocan la formación de superóxido y peróxido de hidrógeno en el interior de la célula. En la mayoría de estos casos se presume que la fuente de ERO sea la activación de alguna NADPH oxidasa, pero no se descarta la participación de la mitocondria (Finkel, 2003). En algunos casos los oxidantes actúan como agonistas del receptor. Se cree que en estos casos hay dos mecanismos posibles: (i) los oxidantes pueden modificar alguna cisteína del receptor y semejar el efecto del ligando, (ii) los oxidantes pueden actuar inactivando alguna fosfatasa membranal necesaria para desfosforilar (y activar) al receptor (Martindale y Holbrook, 2002).
- b) Las cinasas MAP de serina/treonina regulan muchos procesos celulares como la proliferación, la adaptación al estrés y la diferenciación a través de cascadas de fosforilación (Torres y Forman, 2003). Bajo condiciones normales, la proteína reguladora del estado redox tioredoxina (Trx) se une y mantiene inactiva a la cinasa ASK1 (MAPKKK que se encuentra por encima en la vía de las cinasas MAP p38 y JNK1). La oxidación de Trx, probablemente por S-nitrosilación, disocia el complejo y

permite la apoptosis mediada por ASK1 (Saitoh *et al.*, 1998; Sumbayev, 2003; Ueda *et al.*, 2002).

- c) Las fosfatasas participan en la regulación negativa de las cascadas de fosforilación, eliminando los grupos fosfatos bajo determinadas condiciones. Entre los blancos de la regulación redox más frecuentes está la inhibición de las fosfatasas de tirosina a través de modificaciones oxidativas en la cisteína del sitio activo. Se ha visto este tipo de regulación en la fosfatasa de lípidos PTEN y la fosfatasa reguladora del ciclo celular Cdc25C. Una vez oxidadas, las fosfatasas podrían sufrir reducción espontánea o enzimática (Finkel, 2003; Mahadev *et al.*, 2004).
- d) Las ERO participan en la regulación de la transcripción del DNA, modulando la actividad de algunos factores de transcripción como OxyR y SoxRS en bacterias; AP-1, NF- $\kappa$ B, Yap-1, Pap-1 y HIF-1 $\alpha$  en eucariotes (Droge, 2002). En estos casos, la oxidación de algún residuo aminoacídico o de centros metálicos activa o inactiva al factor de transcripción, generalmente alterando la capacidad de unión de estas proteínas al DNA.
- e) El Ca<sup>++</sup> es un segundo mensajero importante en la transducción de señales que conducen a la contracción muscular, la neurotransmisión, la transcripción de genes y el crecimiento celular (Suzuki *et al.*, 1997). Después de un cierto estímulo, se produce una elevación del nivel de calcio, que puede provenir del espacio extracelular o de las reservas celulares del retículo endoplasmático. Posteriormente ocurre la activación de varias proteínas dependientes de calcio. Se ha demostrado que O<sub>2</sub><sup>-</sup> y el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> regulan algunos canales de calcio del retículo endoplasmático en diferentes tipos celulares (Boraso y Williams, 1994; Matalon *et al.*, 2003; Morad y Suzuki, 2000; Suzuki *et al.*, 1997; Suzuki *et al.*, 1998). Otros canales regulados por oxidación son el canal de potasio activado por calcio en el endotelio y el músculo liso vascular, donde el NO lo activa y el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> lo inhibe (Bolotina *et al.*, 1994; Brakemeier *et al.*, 2003). El canal olfatorio dependiente de nucleótidos cíclicos se activa por la nitrosilación de un residuo de cisteína. El canal de Cl<sup>-</sup> sensible a volumen, se activa en respuesta al incremento del volumen celular y recientemente se encontró que el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> derivado de una NADPH oxidasa es necesario para la actividad de este canal, probablemente mediante la inactivación oxidativa de una fosfatasa de tirosina (Varela *et al.* 2004).

f) El óxido nítrico (NO), el mediador de señalización redox mejor estudiado (Ignarro, 1990, 1991), modula el tono muscular (produce relajación del músculo liso), es un inmunoregulador y media la comunicación neuronal. El NO<sup>•</sup> reacciona con el Fe del grupo hemo de la enzima guanilato ciclasa, activándola para producir cGMP, el cual ejerce múltiples efectos en la célula. Por otro lado el NO<sup>•</sup> puede nitrosilar directamente diversas proteínas y así modular su actividad, algunos ejemplos son la tiorredoxina, la caspasa-3, algunos receptores, etc. (Foster *et al.*, 2003; Stamler *et al.*, 2001). Se ha propuesto que el O<sub>2</sub><sup>-•</sup> contribuye a la modulación del tono vascular, porque puede reaccionar con el NO<sup>•</sup> para producir peroxinitrito, apagando de esta manera la señal vasodilatadora del NO (Cai *et al.*, 2003).

### **I.1.2.3. Algunas enzimas que producen ERO.**

La mitocondria es la principal fuente de ERO en la célula, pero hay otras enzimas que pueden producirlas de manera directa o indirecta. La xantina deshidrogenasa es una flavoproteína citosólica con cuatro centros Fe-S y un átomo de Mb que cataboliza la xantina en hipoxantina y luego en ácido úrico, durante la degradación de las purinas (Lehninger *et al.*, 2000). En algunas ocasiones, se pueden producir modificaciones en la proteína que la convierten en una oxidasa que puede formar superóxido a partir del O<sub>2</sub> (Enroth *et al.*, 2000).

En la membrana del retículo endoplasmático, los electrones pueden escapar del citocromo P<sub>450</sub> dependiente de NADPH y reducir al oxígeno para producir ERO. El citocromo P<sub>450</sub> es una hemoproteína vinculada a la generación de ERO durante la oxidación de los ácidos grasos insaturados y la bioactivación de xenobióticos como la talidomida o la fenitoína (Sauer *et al.*, 2001).

La NO sintasa produce el radical NO<sup>•</sup> y citrulina a partir del grupo guanidinio de la arginina, en presencia de O<sub>2</sub> y de NADPH. Existen dos variantes constitutivas (neuronal y endotelial) y una inducible de esta enzima (Moncada y Higgs, 1995).

Posiblemente el complejo enzimático más importante en la generación de ERO sea la NADPH oxidasa (Sauer *et al.*, 2001), la cual ha sido muy estudiada en las células fagocíticas. En este tipo celular la enzima es capaz de producir grandes cantidades de

superóxido a partir del O<sub>2</sub> y es un claro ejemplo de que los organismos vivos han sacado ventaja de la toxicidad de las ERO.

## **I.2. La NADPH oxidasa de las células fagocíticas (NOX2).**

La NADPH oxidasa es una enzima membranal que cataliza la producción de grandes cantidades de superóxido a través de la reducción del oxígeno, durante la llamada “descarga oxidativa” en células fagocíticas como los macrófagos, los neutrófilos y los eosinófilos (Dinauer *et al.*, 1987). La reacción emplea los electrones del NADPH para reducir al O<sub>2</sub> (reacción 4).



La activación de las células fagocíticas se produce en respuesta a algunos mediadores inflamatorios o a la infección por microorganismos. Como resultado de estos eventos se fusionan gránulos intracelulares con la membrana plasmática o fagosomal del fagocito para producir una “descarga oxidativa” que consiste en la liberación de una amplia gama de moléculas activas como oxidantes, proteínas antimicrobianas, proteasas, peroxidasas, etc (Babior, 1999). El superóxido producido por la NADPH oxidasa sirve como material inicial para la producción de otras moléculas oxidantes como algunos halógenos oxidados, el oxígeno en singulete y otros radicales (Babior, 2002; Babior *et al.*, 2002). Otro posible efecto de la actividad de la NADPH oxidasa, es la despolarización de la membrana del fagolisosoma, provocando la entrada compensatoria de H<sup>+</sup> y K<sup>+</sup>. Esto conduce a la activación de proteasas que también participan en aniquilación de los patógenos (Reeves *et al.*, 2002).

La NADPH oxidasa es una enzima multimérica compuesta por las subunidades membranales gp91phox y p22phox, que juntos forman el citocromo b<sub>558</sub>, tres proteínas citosólicas: p67phox, p47phox, p40phox y la GTPasa Rac. La subunidad catalítica gp91phox es un flavocitocromo muy glicosilado de 570 aminoácidos, que contiene sitios de unión a FAD y NADPH y dos grupos hemos no idénticos, coordinados por dos pares de residuos de histidina (Babior, 2004; Biberstine-Kinkade *et al.*, 2001). Se ha propuesto que



el flujo de electrones se mueve desde el NADPH al FAD, luego pasa a los grupos hemos, hasta llegar al aceptor final que es el O<sub>2</sub>. Debido a que la NADPH es una flavoproteína, el DPI (difeniliodonio) se ha empleado frecuentemente como inhibidor no específico de estas enzimas. El DPI compite por el sitio de unión a FAD (O'Donnell *et al.*, 1993). La reacción química de la NADPH oxidasa es electrogénica y se ha visto que la misma enzima es capaz de funcionar como canal para permitir la salida de los protones (Vignais, 2002). En estado basal, las subunidades p67phox, p47phox y p40phox se encuentran como un complejo preensamblado en el citosol. Después de la activación del fagocito, estas subunidades se traslocan a la membrana, para lo cual la subunidad p47phox es fosforilada en múltiples serinas por la proteína cinasa C y Akt (Hoyal *et al.*, 2003). De esta manera se elimina la conformación autoinhibida de p47phox y se expone un dominio SH3 en el extremo amino terminal que puede interactuar con el dominio rico en prolinas de p22phox. La subunidad p47phox fosforilada puede unir fosfoinosítidos, lo que también contribuye a su estabilización en la membrana (Ago *et al.*, 2003). La GTPasa Rac se recluta a la membrana de manera independiente del resto de las subunidades. En estado basal Rac se encuentra en el citosol formando un complejo con Rho-GDI, un factor inhibitorio que la mantiene soluble en el citosol y unida a GDP. La activación del fagocito libera esta inhibición, Rac une ahora GTP y se transloca a la membrana. Rac-GTP es capaz de interactuar con p67phox y probablemente con gp91phox (Babior, 2002; Babior *et al.*, 2002; Babior, 2004) para activar la NADPH oxidasa.

La granulomatosis crónica es una enfermedad genética que se produce por mutaciones en los genes de gp91phox, p22phox, p47phox y p67phox, que no permiten el funcionamiento normal de la NADPH oxidasa de las células fagocíticas. Esta condición provoca una sensibilidad a las infecciones en quienes la padecen, porque el sistema inmune es incapaz de contender con las mismas (Dinauer *et al.*, 1987; Geiszt *et al.*, 2001). La investigación en los pacientes con granulomatosis crónica ha permitido avanzar en el conocimiento sobre la NADPH oxidasa de células fagocíticas y su regulación (Pallister y Hancock, 1995).

### I.3. Las NADPH oxidasas en las células no fagocíticas.

Mier y colaboradores (Meier *et al.*, 1993) observaron que los fibroblastos de los pacientes con granulomatosis crónica producían superóxido, lo que sugirió la existencia de otra NADPH oxidasa en este tipo celular, genéticamente diferente a la de los neutrófilos. En los últimos años se han identificado las siguientes enzimas homólogas a gp91*phox*: NOX1, NOX3, NOX4 y NOX5 (Cheng *et al.*, 2001; Lambeth *et al.*, 2000). Las ERO producidas por estas enzimas están vinculadas a diversos procesos fisiológicos, probablemente requiriendo que el  $O_2^-$  producido por ellas dismute a  $H_2O_2$ , que tiene mayor capacidad de difusión en los tejidos. Por otro lado, la producción desregulada de ERO por las NADPH oxidasas se ha propuesto que participa en procesos patológicos como la hipertensión, la aterosclerosis, la diabetes y algunas enfermedades neurodegenerativas (Cai *et al.*, 2003; Harrison *et al.*, 2003; Shimohama *et al.*, 2000; Zekry *et al.*, 2003). Se ha encontrado que NOX1, NOX3, NOX4 y NOX5 (Cheng *et al.*, 2001; Lambeth *et al.*, 2000) están estructuralmente muy relacionadas con gp91*phox* (NOX2), pero funcionalmente tienen algunas diferencias: (i) la NADPH de células no fagocíticas parece generar bajos niveles de superóxido, incluso en células no estimuladas, (ii) aunque su actividad puede estar desregulada en algunas condiciones patológicas, la producción de superóxido es mucho menor que en neutrófilos activados, (iii) una proporción importante del superóxido que se genera es intracelular, mientras que en los neutrófilos activados se considera que el  $O_2^-$  se genera en el compartimento extracelular o fagosoma (Li y Shah, 2003).

Con respecto a la regulación de estas nuevas isoformas de NOX; NOX5 se regula por la elevación del calcio intracelular; NOX1, NOX3 y NOX4 podrían estar reguladas por p67*phox* y p47*phox* u homólogos de los mismos. Recientemente se encontró que las proteínas p41 y p51 de células epiteliales de colon son homólogas a p47*phox* y p67*phox*, respectivamente (Geiszt *et al.*, 2003; Takeya *et al.*, 2003). Estas proteínas tienen una organización de dominios casi idéntica a las de sus homólogos de células fagocíticas, con algunas pequeñas diferencias. Por ejemplo, p41 carece del dominio autoinhibitorio de p47*phox*, lo que hablaría a favor de una actividad constitutiva de esta isoforma. p61 no

tiene el dominio de unión a p40*phox*, lo que sugiere que p40*phox* no participa en este sistema regulatorio. En el colon, p41 y p51 parecen estar regulando la actividad de NOX1.

### **I.3.1. NOX1.**

NOX1, también conocida como Mox1, fue el primer homólogo de gp91*phox* que se identificó. Es una proteína 56% idéntica a gp91*phox* (Suh *et al.*, 1999), se expresa fundamentalmente en el colon, aunque en menor grado en la próstata, el útero y el músculo liso vascular. Cuando se transfectaron fibroblastos con cDNA de Mox1, las células adquirieron el aspecto de células transformadas y se observó una actividad mitogénica aumentada. Las mismas células transfectadas provocaron tumores agresivos en ratones atímicos. La supresión de la expresión de Mox1 en las células del músculo liso vascular condujo a la inhibición del crecimiento, por lo que esta enzima podría tener un papel importante en el crecimiento normal en este tejido (Banfi *et al.*, 2003; Suh *et al.*, 1999).

Se ha encontrado una isoforma producida por empalme alternativo (splicing) de Mox1 que predice una proteína de 191 aminoácidos correspondiente al extremo amino terminal de Mox1. Esta forma codifica cuatro segmentos transmembranales, pero carece del dominio de flavoproteína y también de las histidinas esenciales para la unión del hemo. Se supone que esta versión corta de NOX1 tendría una función solamente como canal de protones (Banfi *et al.*, 2000).

### **I.3.2. NOX3.**

El cDNA de *NOX3* muestra que codifica una proteína 55% idéntica a gp91*phox* (Cheng *et al.*, 2001). La expresión del RNAm de *NOX3* es baja y se ha encontrado principalmente en la placenta y en el tejido fetal de riñón, hígado, pulmón y bazo, por lo que se supone que podría tener algún papel en el desarrollo.

Recientemente Paffenholz y colaboradores (2004) encontraron que diferentes mutaciones en *NOX3* eran responsables de los defectos en el sistema vestibular de un grupo de ratones. Este sistema se encuentra en el oído interno y es el responsable de la percepción de los movimientos y la gravedad. En estado embrionario temprano se detectó que los ratones carecían de las otoconias, unas estructuras cristalinas que forman parte del sistema

vestibular y que se encargan de transmitir los efectos de la gravedad y los cambios de aceleración lineal. Estos ratones mutantes presentaban diversos trastornos motores, de coordinación, orientación y comportamiento. Esto evidencia la importancia de las ERO en la morfogénesis de las otoconias, probablemente mediante la oxidación la otoconina 90, una de las proteínas que forma parte de esta estructura y que tiene más de 20 cisteínas. Este hallazgo evidencia el alto grado de especialización de esta NOX y de las ERO que ella produce.

### **I.3.3. NOX4.**

Dos grupos de investigación (Geiszt *et al.*, 2000; Shiose *et al.*, 2001) encontraron simultáneamente a NOX4 en la corteza renal de ratones y de humanos, respectivamente. Identificaron a una proteína de 758 aa que mostraba 39% de identidad con gp91*phox* y demostraron su actividad productora de superóxido en líneas celulares transfectadas. Ambos trabajos plantean la hipótesis de que NOX4 tenga la función de detectar los niveles de oxígeno en el riñón, debido a que se encuentra expresada muy cerca de las células que producen la hormona eritropoietina (EPO). Si el nivel de oxígeno es alto, NOX4 produce ERO que oxidan a HIF-1 $\alpha$ , el factor transcripcional para el gen de EPO, de manera que se “marca” para ser degradado por el sistema del proteosoma. Por el contrario, si hay baja tensión de oxígeno, se podrá transcribir el gen de EPO y cumplir su función que es mediar la respuesta a la hipoxia. También se ha demostrado que NOX4 es responsable de la producción de O<sub>2</sub><sup>-</sup> en osteoclastos, participando en el proceso de reabsorción ósea (Yang *et al.*, 2001).

Recientemente se encontró que la isoforma NOX4 se expresa abundantemente en adipocitos. En este tipo celular esta NADPH oxidasa participa en la vía de señalización mediada por la insulina, a través de la inhibición oxidativa de la fosfatasa de tirosina PTP1b que reprime la vía (Mahadev *et al.*, 2004).

### **I.3.4. NOX5.**

Es una isoforma distante de la familia NOX (Banfi *et al.*, 2001), presenta solamente un 27% de identidad con gp91*phox*. Está compuesta por 737 aminoácidos y contiene una

extensión en el amino terminal con cuatro sitios de unión a calcio: tres dominios EF y un cuarto sitio atípico (Banfi *et al.*, 2004). *NOX5* se expresa en órganos linfoides y testículos, pero con dos variantes diferentes producidas por empalme alternativo que dan lugar a las isoformas  $\alpha$  y  $\beta$ , respectivamente. En líneas celulares transfectadas con *NOX5* se encontró que la generación de superóxido es dependiente de calcio y que esta enzima también es capaz de actuar como canal de protones. El calcio produce un cambio conformacional en *NOX5* a través de una interacción intramolecular que activa a la proteína (Banfi *et al.*, 2004).

Brar y colaboradores (2003) encontraron la expresión de *NOX5* en líneas celulares de adenocarcinoma de próstata, así como en las muestras de pacientes que padecían la enfermedad. El RNA antisentido de *NOX5*, el DPI y algunos antioxidantes inhibieron la proliferación celular en la línea celular DU 145. Con el antecedente conocido de la importancia de las ERO en el inicio y el desarrollo del carcinoma de próstata, la enzima *NOX5* se muestra como una posible fuente de ERO involucrada en la patogenia de esta enfermedad, probablemente a través de la inhibición de la apoptosis.

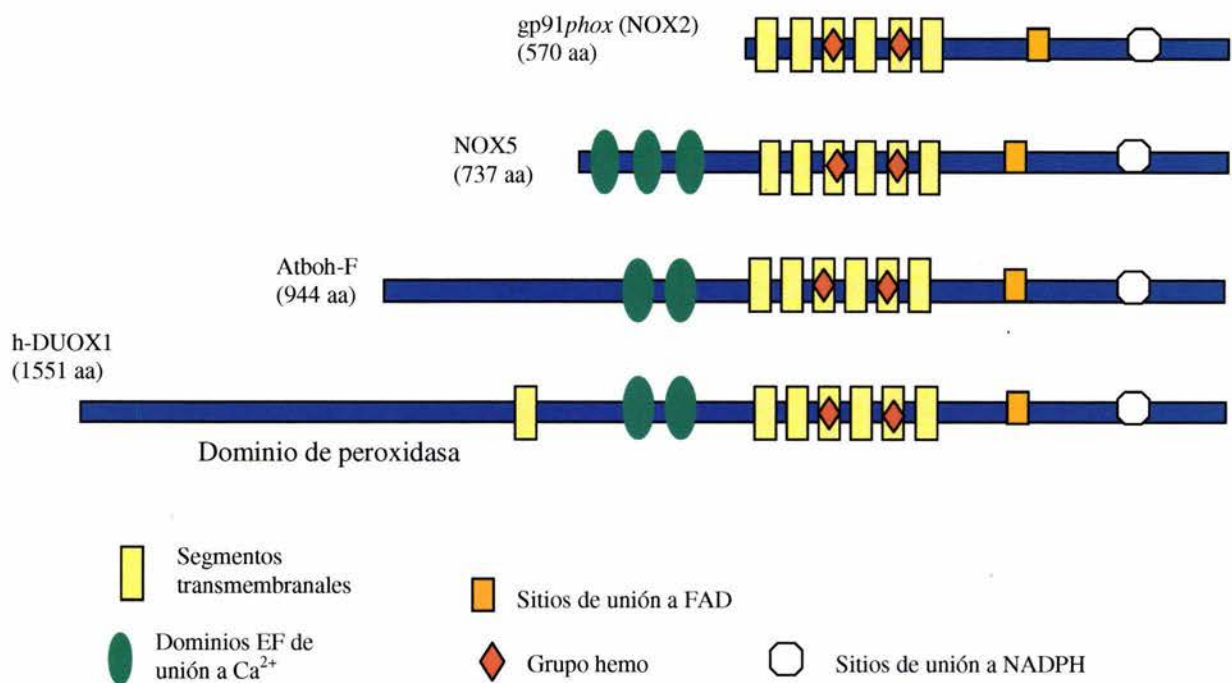
### **I.3.5. Las enzimas DUOX.**

Existen isoformas más grandes de las NADPH oxidasas que contienen un dominio adicional de peroxidasa en el extremo amino terminal y dos dominios EF de unión a calcio y se denominan DUOX, término que proviene de “oxidasa dual”. En la glándula tiroides el dominio peroxidasa de las enzimas DUOX participa en la yodación de la tiroglobulina, un precursor de la tiroxina. En efecto, mutaciones en *DUOX2* son causa de hipotiroidismo congénito (Moreno *et al.*, 2002). A través de RT-PCR se encontró una expresión abundante del RNAm de *DUOX1* y 2 en el tejido fetal humano y en el tejido adulto como el páncreas, el riñón y los testículos, aunque la función de estas proteínas en estos tejidos no se ha comprendido (Edens *et al.*, 2001). Geiszt y colaboradores (2003) detectaron por RT-PCR el RNAm de *DUOX1* y 2 de humanos en epitelios de mucosas y en glándulas secretoras, proponiendo que estas enzimas puedan ser la fuente de peróxido para que la lactoperoxidasa produzca compuestos microbicidas en estos tejidos. También se han identificado otros miembros de la subfamilia DUOX en eucariotes menos complejos tales como *Drosophila melanogaster*, *Anopheles gambiae*, *Ciona intestinalis* y *Caenorhabditis*

*elegans* (Lara-Ortiz *et al.*, 2003). En el nemátodo *C. elegans* se han descrito dos genes *DUOX*, uno de ellos se expresa en las células hipodérmicas de la cutícula larval y al obtener mutantes por RNA de interferencia se observaron defectos en la morfología de la cutícula. El mecanismo propuesto es que el superóxido producido por la *DUOX* se convierte en peróxido de hidrógeno y éste es sustrato para el dominio peroxidasa de la enzima, que forma enlaces di y tritirosina entre algunos residuos de este aminoácido en algunas proteínas estructurales como el colágeno, estabilizando así la matriz extracelular de la cutícula del gusano (Edens *et al.*, 2001).

### **I.3.6. Las NADPH oxidasas en las plantas.**

Las NADPH oxidasas de plantas se describieron por primera vez en arroz (Groom *et al.*, 1996) y luego en *Arabidopsis thaliana* (Keller *et al.*, 1998) como homólogas funcionales y estructurales de las enzimas de células fagocíticas animales, ya que participan en la descarga oxidativa inducida por la infección de patógenos, durante la respuesta hipersensible. Estos homólogos se denominaron *Rboh* (respiratory burst oxidase homologue) y tienen una extensión hidrofílica en el extremo amino que no se encuentra en *gp91phox* y que contiene dos motivos EF de unión a  $Ca^{2+}$ , por lo que pueden estar reguladas por este catión. *A. thaliana* posee diez genes *Rboh* (*Atrboh*): *Atrboh D* y *F* producen ERO en respuesta a la infección por patógenos (Torres *et al.*, 2002), pero también participan en la vía de señalización por el ácido abscísico en las células guardianas de los estomas, promoviendo el cierre de los mismos y la activación de algunos canales de calcio (Kwak *et al.*, 2003). *Atrboh C* produce ERO que activan a canales de calcio y promueve la diferenciación y el crecimiento de la raíz (Foreman *et al.*, 2003). Aunque los genomas de plantas presentan genes homólogos a la GTPasa Rac, no se han encontrado homólogos de *p47phox*, *p67phox* y *p40phox* en el genoma de *A. thaliana*, por lo que se piensa que las NADPH oxidasas de las plantas tienen una regulación diferente a las de mamíferos (Dangl y Jones, 2001).



**Figura 2. Modelo de la organización de dominios en las NADPH oxidasas.** La NADPH oxidasa de las células fagocíticas (NOX2) tiene un amino terminal con seis segmentos transmembranales y dos grupos hemos (Babior, 2002), el extremo carboxilo tiene sitios de unión a FAD y NADPH. El resto de las NADPH oxidasas de la familia Nox tiene características semejantes, con algunas diferencias. NOX5 tiene una extensión en el amino terminal con tres dominios EF de unión a Ca<sup>2+</sup> y uno atípico (Banfi *et al.*, 2004). Atboh-F es un ejemplo de NADPH oxidasa de *A. thaliana* que tiene la extensión en el amino terminal más grande y con sólo dos dominios EF de unión a Ca<sup>2+</sup> (Keller *et al.*, 1998). h-Duox1 es una oxidasa dual (duox) de humanos y tiene dos dominios de unión a Ca<sup>2+</sup>, un segmento transmembranal extra y un dominio de peroxidasa (Dupuy *et al.*, 1999).

### I.3.7. Las NADPH oxidasas en los microorganismos.

Hasta hace poco tiempo no se habían reportado la presencia de NADPH oxidasas en microorganismos. En nuestro laboratorio se ha caracterizado el gen *noxA* de *Aspergillus nidulans* que codifica para la subunidad catalítica (*gp91phox*) de una NADPH oxidasa (Lara-Ortiz *et al.*, 2003). El trabajo en *Aspergillus* es el primero en analizar una mutante de estas enzimas en microorganismos y demuestra que la proteína NoxA es esencial para el desarrollo sexual del hongo. En efecto, una mutante  $\Delta noxA$  no produce cleistotecios, los cuerpos fructíferos que contienen las ascosporas, producto de la meiosis. Al contrario de lo

que ocurre en una cepa silvestre, los primordios sexuales de la mutante  $\Delta noxA$  se tiñen poco con algunos colorantes que detectan ERO.



**Figura 3. Los hongos poseen NADPH oxidasas que definen dos nuevas subfamilias Nox.** Fragmento de un árbol filogenético donde aparecen las subfamilias NoxA y NoxB de algunos hongos. NEUCR (*Neurospora crassa*), MAGGR (*Magnaporthe grisea*), FUSGR (*Fusarium graminearum*), PHACR (*Phanerochaete chrysosporium*), ASPNI (*Aspergillus nidulans*), PODAN (*Podospora anserina*). Tomado y modificado de Lara-Ortiz et al. (2003).

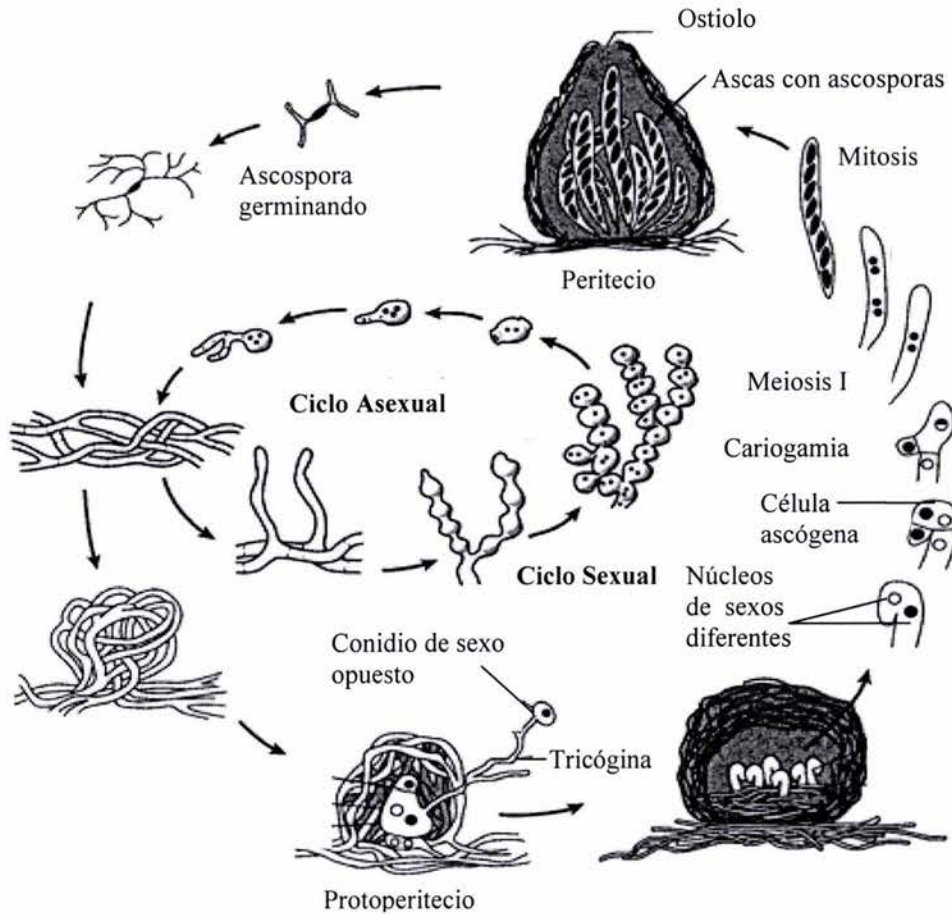
El análisis de los genomas de otros hongos (Lalucque y Silar, 2003; Lara-Ortiz et al., 2003) muestra que las NADPH oxidasas de los hongos constituyen dos nuevas subfamilias Nox. Hay hongos que tienen dos enzimas, mientras que otros tienen una sola. El genoma del hongo filamentoso *Neurospora crassa* reveló la existencia de dos genes que podrían codificar para NADPH oxidasas: *nox-1* y *2*. NOX-1 y NOX-2 mostraron identidades del 70% y 40%, respectivamente, con respecto a NoxA de *A. nidulans*.

#### **I.4. *Neurospora crassa* como modelo de estudio.**

*N. crassa* es un hongo filamentoso de la clase de los Ascomycetes. Este hongo se conoce como contaminante de panaderías desde el siglo XIX, y se ha empleado como modelo de estudio desde 1941, brindando numerosas contribuciones en áreas como la bioquímica, la biología celular, la genética, la fotobiología, estudios de ritmos circadianos, el desarrollo, el silenciamiento de genes, la evolución y la ecología (Borkovich et al., 2004). *N. crassa* es un modelo útil para los estudios de diferenciación celular, ya que presenta ventajas como: una fácil manipulación genética, un crecimiento rápido y masivo, la posibilidad de separar las estructuras asexuales para su estudio, etc. Por otro lado, el genoma de *N. crassa* está



secuenciado y disponible (<http://www.broad.mit.edu/annotation/fungi/neurospora/>) (Galagan, 2003).



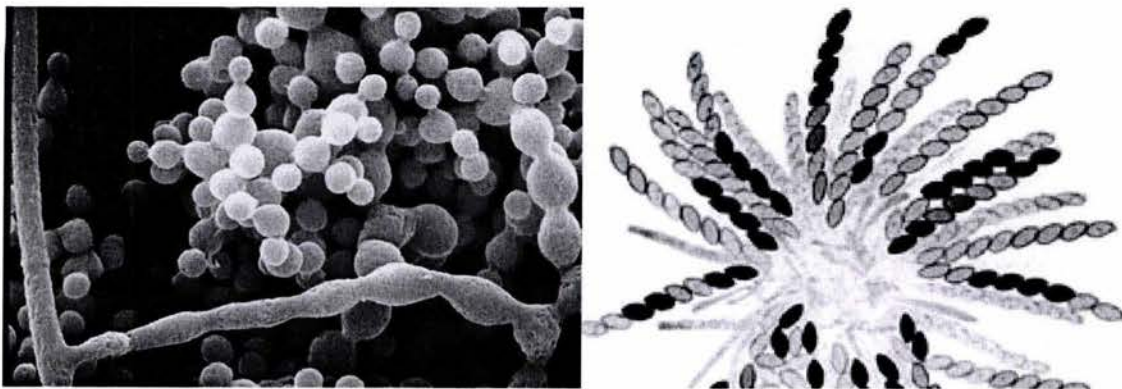
**Figura 4. Ciclo de vida de *N. crassa*.** En el centro se muestra el ciclo asexual de *N. crassa*. Este se produce cuando las hifas vegetativas se adhieren para luego formar el micelio aéreo, el cual posteriormente forma los conidios en los extremos de las hifas. Los conidios se liberan al medio ambiente y pueden germinar dando lugar a nuevas hifas. El ciclo sexual se encuentra ilustrado en la periferia de la figura. En determinadas condiciones las hifas se diferencian en un protoperitecio, a partir del cual emerge el tricógino. A través de esta estructura se reciben los gametos masculinos y ocurre la fecundación. Posteriormente se producen dos divisiones meióticas y una mitótica. De esta manera se forma el peritecio que porta las ascas. Dentro de las ascas se desarrollan ocho ascosporas que son disparadas al exterior a través del orificio apical del peritecio. A la derecha se indican los procesos que dan lugar a un ascas individual.

En la naturaleza, este hongo se encuentra colonizando tempranamente los bosques incendiados y los campos de caña de azúcar (Perkins y Davis, 2000). Tiene un color naranja característico, producto de su alto contenido en carotenos. Las hifas de *N. crassa* son multinucleadas y con septos incompletos que permiten el movimiento de los organelos

entre los compartimentos. El crecimiento es apical y por ramificación de las hifas. El micelio se produce por fusión de las hifas en una especie de red compleja (Perkins y Davis, 2000). *N. crassa* tiene dos ciclos reproductivos, uno asexual y otro sexual (Fig. 4).

No se conocen bien los agentes que inducen el ciclo asexual, pero algunos que se han descrito son la desecación, la luz y el aire. En estas condiciones, las hifas vegetativas se adhieren unas con otras y luego se diferencian en hifas aéreas y estas últimas forman cadenas de conidios asexuales (macroconidios) en sus extremos, por constricción y septación de los conidióforos (Fig. 5). Los conidios son multinucleados y se pueden conservar latentes por largos períodos en condiciones de desecación. También se pueden formar otros tipos de conidios como los microconidios, directamente de la hifa vegetativa o de microconidióforos (Davis y Perkins, 2002). Cuando encuentran las condiciones adecuadas, los conidios germinan y producen hifas nuevamente (Fig. 4).

*N. crassa* es un hongo heterotálico, es decir, posee dos sexos separados determinados genéticamente (*mat-A* y *mat-a*). Cualquiera de los dos sexos puede funcionar como femenino (receptor) o como masculino (donador). La limitación de nitrógeno y la temperatura baja inducen una agregación de hifas que genera la estructura multinucleada femenina llamada protoperitecio, que funcionará como órgano receptor del gameto masculino. Del protoperitecio emerge una hifa especializada llamada tricógina que con ayuda de algunas feromonas, localiza al conidio de sexo opuesto y ocurre la fertilización.



**Figura 5. Esporas asexuales y sexuales de *N. crassa*.** En el panel de la izquierda se muestran los conidios o esporas asexuales que se forman por constricción de las hifas aéreas. En el panel derecho se muestran un peritecio roto con las ascosporas de diferente grado de melanización (maduración), ordenadas dentro de las ascas. Tomado del Fungal Genetics Stock Center (<http://www.fgsc.net/>).

Luego de la fertilización se desarrolla el peritecio o cuerpo fructífero dentro del que se forman las ascas, una especie de vaina con ocho esporas sexuales o ascosporas, resultado de la meiosis. Un peritecio individual puede formar entre 200-400 ascas, que no se desarrollan simultáneamente. Inicialmente cada asca tiene cuatro núcleos provenientes de la meiosis, pero luego se dividen por mitosis para formar ocho ascosporas (Fig. 5). Estas células, después de crecer y acumular melanina en sus paredes, forman las ascosporas maduras que son disparadas del peritecio a través de un agujero apical llamado ostiolo (Davis y de Serres, 1970) (Fig. 4). Las ascosporas están completamente maduras a los dos o tres días de ser disparadas y requieren de una activación a 60°C para que puedan germinar y dar lugar a las nuevas hifas.

No todo es atracción entre sexos opuestos en *N. crassa*. En condiciones de crecimiento vegetativo los hongos filamentosos son capaces de llevar a cabo fusión entre sus hifas. Cuando esta fusión ocurre entre sexos diferentes, se produce una fuerte reacción de incompatibilidad acompañada de lisis que conduce a la muerte celular (Loubradou y Turcq, 2000).

### **I.5. Las ERO y la diferenciación celular en los microorganismos.**

Se ha propuesto que las ERO en microorganismos juegan un papel importante en el envejecimiento y la senescencia (Osiewacz, 2002), así como en la diferenciación celular. Hansberg y Aguirre (1990) propusieron que la diferenciación celular se produce en respuesta a un estado hiperoxidante inestable, el cual se define como un estado transitorio en el que las ERO sobrepasan la capacidad antioxidante de la célula. En *N. crassa* se evidencian cuatro etapas de diferenciación en el desarrollo asexual: la exposición de una masa de micelio al aire induce la adhesión de las hifas (1) y a partir de éstas crece el micelio aéreo (2), donde finalmente se forman los conidios (3) que posteriormente germinarán (4). Se ha visto que se producen ERO al inicio de cada uno de estos cuatro procesos morfogénicos (Hansberg y Aguirre, 1990; Hansberg *et al.*, 1993; Lledias *et al.*, 1999). En las transiciones se ha detectado la oxidación y degradación de algunas proteínas como NADP-glutamato deshidrogenasa, la glutamina sintetasa y la catalasa (Aguirre y Hansberg, 1986; Aguirre *et al.*, 1989; Lledias y Hansberg, 1999). Otra manifestación de la

generación de ERO durante la diferenciación es el incremento de la actividad de las catalasas que se detecta durante la conidiación de *N. crassa* (Hansberg, 1996) y el hecho de que en una mutante nula de catalasa-3 se produce una mayor y precoz diferenciación asexual (Michan *et al.*, 2003). Por otro lado, la concentración de carotenoides, que son moléculas antioxidantes, disminuye en cada paso de transición entre los estados estables, y luego se incrementa en cada estructura diferenciada (Hansberg *et al.*, datos no publicados). Al inicio de cada transición morfológica se ha detectado también quimioluminiscencia dependiente del oxígeno, la cual se inhibe por antioxidantes (Hansberg *et al.*, 1993), indicando la formación de ERO durante la diferenciación asexual de *N. crassa*.

*Dyctiostelium discoideum* es una ameba de gran interés para los estudios de diferenciación porque se encuentra en la frontera entre la vida unicelular y la multicelular. En condiciones de bajo nutrimento, las células libres se agregan para formar un organismo multicelular. Recientemente se ha encontrado que para que ocurra esta agregación se requiere la presencia de superóxido, así mismo, la reducción del mismo por medios farmacológicos o genéticos, inhibe la agregación. La fuente del superóxido es probablemente una NADPH oxidasa; el genoma de *Dyctiostelium discoideum* predice tres genes que codifican para estas enzimas (Bloomfield y Pears, 2003; Lara-Ortiz *et al.*, 2003). Por otro lado una mutante de la catalasa B tiene un desarrollo tardío y asincrónico del cuerpo fructífero que se forma luego de la agregación, además de alteraciones en el patrón de expresión de algunos genes, lo que presupone un papel regulatorio del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a este nivel (García *et al.*, 2003).

## **1.6. Hipótesis.**

Se ha observado que la diferenciación asexual de *N. crassa* se relaciona con condiciones de tensión oxidativa. En este contexto, resulta importante analizar la función de enzimas como la NADPH oxidasa, capaz de producir especies reactivas de oxígeno de manera regulada. En *A. nidulans* se ha encontrado que NoxA, la única NADPH oxidasa en este hongo, es imprescindible para la diferenciación sexual del mismo (Lara-Ortiz *et al.*, 2003).

*N. crassa* posee dos genes que codifican para enzimas NADPH oxidasas: *nox-1* y *nox-2*. Proponemos que las NADPH oxidasas NOX-1 y NOX-2 regulan distintos aspectos del desarrollo del hongo *N. crassa*, a través de la producción regulada de ERO.

### **I.7. Objetivos generales.**

Determinar el papel de la NADPH oxidasa NOX-2 en la diferenciación celular del hongo *N. crassa*.

### **I.8. Objetivos particulares.**

1. Estudiar la regulación de los genes *nox-1* y *nox-2*.
2. Interrumpir el gen *nox-2* de *N. crassa*.
3. Caracterizar la mutante  $\Delta nox-2$  en cuanto a su crecimiento y diferenciación.
4. Detectar y caracterizar la proteína y actividad de la NADPH oxidasa NOX-2 en extractos crudos.

## II. MATERIALES Y METODOS

### II.1. Cepas de *N. crassa* empleadas en este trabajo.

Cepa	Genotipo	Origen
74-OR23-1A	Sexo A	FGSC #987 (McCluskey, 2003)
74-OR8-1a	Sexo a	FGSC #988 (McCluskey, 2003)
RPNCR3A	$mep^R$ <i>his-3</i> ; $int^{\Delta(SacI-BglII)}::\lambda A$	(Pratt y Aramayo, 2002)
TKA1b	$mep^R$ <i>his-3</i> ; $int^{\Delta(SacI-BglII)}::\lambda A$	Este trabajo. Transformación de RPNCR3A con pKAD9.
CNCKA-28	$\Delta nox-2::hph$ $int^{\Delta(SacI-BglII)}$ $\Delta nox-2::hph$	Este trabajo. Progenie de TKA1b x 74-OR8-1a
CNCKA-Z	<i>his-3::\lambda A</i> $\Delta nox-2::hph$	Este trabajo. Progenie de TKA1b x 74-OR8-1a
CNCKA-KA1	$int^{\Delta(SacI-BglII)}::\lambda a$ $\Delta nox-2::hph$	Este trabajo. Progenie de TKA1b x 74-OR8-1a
CNCKA-AN1	$int^{\Delta(SacI-BglII)}::\lambda a$ $\Delta nox-2::hph$	Este trabajo. Progenie de TKA1b x 74-OR8-1a

### II.2. Construcción de los plásmidos.

- Para obtener el plásmido pTOKAD-1.5 se amplificó un fragmento de 1572 pb del ORF del gen *nox-2* con los oligos nox2-1 (ATGGCTTGTTGGGACGAG) y nox2-2 (TTACCCAGGCTCACTATAC). La reacción de PCR se realizó con *Taq* polimerasa y consistió en una desnaturalización inicial de 5 min. a 94°C y 35 ciclos de desnaturalización a 94°C (30 seg.), cebado a 52°C (1 min.) y extensión a 72°C (2.5 min.), en presencia de 1 mM de MgCl<sub>2</sub>. El producto de PCR se clonó en el vector TOPO 2.1 a través del estuche Topo TA Cloning (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), según las especificaciones del proveedor.
- El plásmido pTOKAD-3.5 se obtuvo al amplificarse un fragmento de PCR de 3.5 kb (incluye todo el ORF de *nox-2* y región 5' del gen) obtenido con los oligos KpNOX-2 (CGGGGTACCTGAACTGAGGCGATAACG) y nox2-2 (TTACCCAGGCTCACTATAC). La reacción de PCR se realizó con *Taq* polimerasa y consistió en una desnaturalización inicial de 4 min. a 94°C y 33 ciclos de desnaturalización a 94°C (1 min.), cebado a 53°C (1 min.) y extensión a 68°C (4.5 min.), en presencia de 1.5 mM de MgCl<sub>2</sub>. El producto de PCR se clonó en el vector TOPO 2.1 a través del estuche Topo TA Cloning (Invitrogen), según las especificaciones del proveedor.
- El plásmido pKAD9, utilizado para interrumpir el gen *nox-2*, se construyó en varias etapas:

- a) Los plásmidos pRATT25d y pDLAM89d fueron una donación gentil del Dr. Rodolfo Aramayo (Texas A& M University, Texas, EUA) (Pratt y Aramayo, 2002).
  - b) Para obtener el plásmido pKAD28 se amplificó por PCR un fragmento de 2075 pb de la región 3' del gen *nox-2* con los oligos NotP3394 (TTTAGCGGCCGCAACGCCGATAAGGATACC) y NOX-2Nt (TTTAGCGGCCGCTTCATCCATTCCACCACC). La reacción de PCR se realizó con *Taq* polimerasa y consistió en una desnaturalización inicial de 4 min. a 94°C y 35 ciclos de desnaturalización a 94°C (1 minuto), cebado a 52°C (1 min.) y extensión a 72°C (3 min.), en presencia de 1 mM de MgCl<sub>2</sub>. Se obtuvieron algunas bandas inespecíficas, por lo que el producto de 2075 pb se purificó de un gel de agarosa y se reamplificó con las mismas condiciones que el PCR inicial. El producto de PCR se digirió con *NotI* y se clonó en el sitio *NotI* del plásmido pDLAM89d.
  - c) El plásmido pKAD23 se obtuvo al clonar el gen *mat-a1*: fragmento *EcoRI-HindIII* de 1.5 Kb del vector pRATT25d, en el sitio *EcoRI-HindIII* de pKAD28.
  - d) El plásmido pKAD9 se obtuvo al clonar el fragmento *EcoRI* de 1572 pb del vector pTOKAD-3.5 en el sitio *EcoRI* del plásmido pKAD23.
- Para obtener el plásmido pKAD10-Nc se digirió el plásmido pKAD23 con la enzima *NotI*, se desechó el fragmento *NotI* que incluye la región 3' de *nox-2* de 2075 pb y se religó.
  - Para obtener el plásmido pTOKAD-2 se amplificó un fragmento de 2059 pb del ORF del gen *nox-1* con los oligos Nox1-1 (GACATTCATCAACTTCCG) y Nox1-2 (CAAAAGGGAAACTGTAGG). La reacción de PCR se realizó con *Taq* polimerasa y consistió en una desnaturalización inicial de 5 min. a 94°C y 35 ciclos de desnaturalización a 94°C (30 seg.), cebado a 52°C (1 minuto) y extensión a 72°C (3 min.), en presencia de 1.5 mM de MgCl<sub>2</sub>. El producto de PCR se clonó en el vector TOPO 2.1 a través del estuche Topo TA Cloning (Invitrogen), según las especificaciones del proveedor.

Para purificar fragmentos de DNA de geles de agarosa, se empleó el estuche QIAquick Gel Extraction (QIAGEN GmbH, Alemania). Los plásmidos se purificaron con el estuche Quantum Prep (Bio-Rad, CA, EUA) y con el estuche Plasmid Midi (QIAGEN).

### **II.3. Medios de cultivo y condiciones de crecimiento.**

*N. crassa*: El medio de cultivo empleado para crecer *N. crassa* fue el medio mínimo de Vogel (Davis y de Serres, 1970) con 1.5% de sacarosa. En el caso de las cepas RPNCR3A, TKA1b y sus derivados, el medio se suplementó con L-histidina (200 µg/ml) y/o inositol (50 µg/ml). Para preparar los medios sólidos se adicionó agar al 1.8%. La temperatura de incubación en todos los casos fue de 30°C. Todos los cultivos en medio líquido se realizaron con un inóculo de 10<sup>6</sup> conidios/ml, con agitación orbital de 200 rpm y una relación aire/líquido 3:2. Para obtener colonias aisladas se empleó medio con sorbosa (Davies y De Serres, 1970) que consistió en sales de Vogel 1x, fructosa 0.05%, glucosa 0.05%, sorbosa 2% y agar 1.8%, además de los suplementos requeridos por cada cepa.

Para las cruza sexuales se empleó el medio sintético de crusa (SC) (Davies y De Serres 1970) con los suplementos requeridos por cada cepa. Para la siembra de protoplastos los medios se adicionaron con sorbitol 1M.

*Escherichia coli*: Para propagar los plásmidos que confieren resistencia a ampicilina en *E. coli*, se empleó el medio Luria Bertani sólido (2% de agar) o líquido con 75 µg/ml de ampicilina (Sambrook y Russell, 2001). Las células competentes que se emplearon fueron de las cepas DH5α y TOP 10 (Invitrogen). Las cepas bacterianas que contienen los vectores construidos en este trabajo se almacenaron a -70°C con glicerol al 18.5%.

### **II.4. Colección de conidios.**

Se colectaron conidios a partir de cultivos sólidos (100 ml) en matraces de 500 ml, inoculados con una suspensión de conidios y crecidos por dos días en la oscuridad y cinco días en luz. La cosecha se realizó lavando los matraces con agua fría estéril para recuperar los conidios. La suspensión se filtró a través Miracloth y se recuperó en tubos Falcon de 50 ml. Los tubos se centrifugaron a 5000 rpm por 10 min. en una centrífuga refrigerada Universal 16R (Hettich, Alemania) con el rotor 1616. La pastilla que contenía los conidios se lavó dos veces con agua fría estéril. La suspensión de conidios se cuantificó en un hemocitómetro, se alicuotó en tubos *Eppendorf* y se almacenó a -70°C.



## **II.5. Germinación de conidios.**

Los ensayos de germinación de conidios en medio líquido se realizaron en matraces de 250 ml. Los mismos se inocularon con  $10^6$  conidios/ml en 50 ml de medio Vogel suplementado con sacarosa 1.5% y los requerimientos de cada cepa. Los matraces se incubaron a 30°C y se agitaron a 200 rpm por 6 horas y media. A ese tiempo se sacó una alícuota del cultivo y se contaron los conidios germinados y no germinados en un hemocitómetro. Se consideró como un conidio germinado cuando era visible el tubo germinal.

## **II.6. Cruzas sexuales y germinación de ascosporas.**

Una suspensión de conidios de la cepa receptora se plaqueó con una asa de triángulo en cajas de Petri con medio SC. Las cajas se sellaron con parafilm y se incubaron a temperatura ambiente por 6-8 días. A este tiempo se fertilizaron con unas gotas (1000-5000 conidios/gota) de una suspensión de conidios de la cepa donadora. Las cajas se mantuvieron selladas con parafilm a temperatura ambiente y en condiciones de iluminación. Las ascosporas disparadas desde los peritecios se colectaron con agua estéril de la tapa de la caja de Petri a los 12-14 días después de la fertilización. Después de ser hidratadas a temperatura ambiente toda la noche, las ascosporas se activaron a 60°C por 30 min. y se plaquearon de 200-300 ascosporas por caja de Petri en medio de cultivo con sorbosa. Después de 24 ó 48 horas de incubación a 30°C, las colonias provenientes de una ascospora (según la observación bajo el microscopio estereoscópico) se transfirieron a tubos de ensayo con medio de cultivo sólido. La germinación de las ascosporas se cuantificó bajo el microscopio estereoscópico a las 40 horas de germinación.

## **II.7. Determinación del crecimiento radial.**

Se inocularon aproximadamente 3000 conidios en el centro de una caja de Petri con medio Vogel, sacarosa 1.5% sólido. Se incubaron a 30°C y se midió el radio de la colonia a diferentes tiempos. Cada caja de Petri se dividió en cuatro cuadrantes y se tomó la medida del radio de una colonia en los cuatro puntos y se promediaron.

## II.8. Obtención de esferoplastos y transformación.

La obtención de esferoplastos se realizó según Pratt y Aramayo (2002), pero empleando Enzimas Líticas de *Trichoderma harzianum* (#L-1412, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). Se inocularon 80 ml de medio sólido en cuatro matraces de 500 ml con conidios de la cepa RPNCR3A (Pratt y Aramayo, 2002). Los cultivos se dejaron crecer por tres días a 30°C en la oscuridad y dos días a temperatura ambiente y luz. Los conidios se colectaron en agua estéril y se filtraron a través de Miracloth. La suspensión se centrifugó a 2000 x g por 15 min. y el pellet se resuspendió en 20 ml de sorbitol 1M. La preparación se dividió en dos partes iguales en tubos Falcon. A cada tubo se le añadieron 60 mg de albúmina de suero de bovino (#A-6003, Sigma-Aldrich) y 100 mg de Enzimas Líticas de *Trichoderma harzianum* disueltos en 4 ml de sorbitol 1M estéril. La digestión se realizó a 30°C, por 90 min. y con agitación de 80 rpm. Los esferoplastos se centrifugaron a 3500-4000 x g en una centrífuga Universal 16R con el rotor 1616 por diez minutos. El pellet se lavó tres veces con sorbitol 1M; dos veces con 20 ml de STC (sorbitol 1M, Tris-HCl 50 mM (pH 8), CaCl<sub>2</sub> 50 mM) y una vez con 10 ml de STC. La suspensión de esferoplastos se ajustó a 1 X 10<sup>8</sup>/ml con STC. Por cada ml de esferoplastos, se añadieron 12.5 µl de DMSO, 62.5 µl de heparina (5 mg/ml en STC) y 250 µl de PTC (polietilenglicol 3,350 40% (#P-3640, Sigma-Aldrich); Tris-HCl 50 mM (pH 8); CaCl<sub>2</sub> 50 mM). Se hicieron alícuotas de 1 ml y se guardaron a -70°C.

Para la transformación se emplearon 135-150 µl de protoplastos y 2-10 µg de DNA plasmídico linearizado. El plásmido pKAD9 se digirió con la enzima *ApaI*, se hizo una electroforesis en gel de agarosa y la banda del plásmido lineal se cortó y purificó. En la transformación se empleó un control negativo sin DNA. En frío, se mezcló el DNA y el STC en un tubo *Eppendorf* hasta un volumen final de 150 µl, se añadieron los esferoplastos y se incubaron en hielo por 30 min. Posteriormente se añadió 1 ml de PTC a la suspensión, se mezcló por inversión varias veces y se incubó a temperatura ambiente por 30 min. La mezcla de transformación se transfirió a un tubo Falcon de 15 ml con 10 ml de agar suave tibio que consistió en medio para colonia aislada, agar 1%, L-histidina 200 mg/ml e inositol 50 mg/ml. El contenido se sembró en cajas de Petri con medio de cultivo con sorbosa, sorbitol 1M, agar 1.8%, L-histidina 200 mg/ml, inositol 50 mg/ml e higromicina 250 µg/ml (#H-7772, Sigma-Aldrich) y se incubaron a 30°C hasta la aparición de colonias. Las transformantes se purificaron después de tres resiembras en medio selectivo con 150 µg/ml

de higromicina a partir de colonias aisladas. Las transformantes purificadas de esta forma se analizaron por hibridación tipo Southern.

### **II.9. Extracción de DNA.**

Para la extracción de DNA se utilizaron conidios para inocular 10 ml de medio líquido en matraces de 25 ml y se incubaron por 48 horas a 30°C sin agitación. La película de micelio se colectó con una espátula, se secó en papel absorbente y se congeló en N<sub>2</sub> líquido y posteriormente se almacenó a -70°C. El micelio congelado se secó al vacío por 4 horas (Savant, Farmingdale, NY, EUA) y se pulverizó con una espátula. El DNA se obtuvo de acuerdo al protocolo de Timberlake (1980) y se cuantificó por absorbencia a 260 nm en un espectrofotómetro.

### **II.10. Extracción de RNA.**

Se crecieron cultivos líquidos de *N. crassa* a diferentes tiempos, se filtraron al vacío y el micelio cosechado se congeló en N<sub>2</sub> líquido o se almacenó a -70°C hasta su uso. Las muestras se pulverizaron con un mortero y N<sub>2</sub> líquido. El RNA total se extrajo con TRIZOL (Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante y se cuantificó por absorbencia a 260 nm en un espectrofotómetro.

### **II.11. Hibridación tipo Southern blot.**

Se digirieron aproximadamente 10 µg de DNA con las enzimas de restricción requeridas y RNAasa A (10 µg/ml) durante toda la noche a temperatura ambiente y se separaron electroforéticamente en un gel de agarosa al 1%. El gel se incubó en una solución recién preparada de HCl 0.25 N a temperatura ambiente por 15 min. y con agitación. Después de tres lavados con agua, el gel se desnaturalizó en NaCl 1.5 M y NaOH 0.5 M por 30 min. a temperatura ambiente y con agitación. Se repitieron tres lavados con agua y el gel se neutralizó en Tris-HCl 0.5 M (pH 7.2) y NaCl 1.5 M por 30 min. a temperatura ambiente y con agitación. El gel se transfirió durante toda la noche a una membrana de nylon Hybond-N (Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, UK) siguiendo el protocolo de transferencia por capilaridad (Sambrook y Russell, 2001). El DNA se fijó a la membrana con luz ultravioleta (Stratalinker). La membrana se prehibridó en una botella de vidrio a

65°C por dos horas en solución de hibridación (Sambrook y Russell, 2001) con DNA de esperma de salmón 0.1 mg/ml (Promega Corporation) y se hibridó con la sonda marcada radiactivamente en solución de hibridación nueva. La sonda se marcó empleando el estuche “Random Primers DNA Labeling System” (Invitrogen), según las instrucciones del fabricante. La hibridación se realizó a 65°C durante toda la noche. Al día siguiente la membrana se sometió a dos lavados a 65°C por 45 minutos: el primero con una solución SSC 2X (SSC 20X: NaCl 3M, ácido cítrico 0.3 M pH 7) y SDS 0.1% y el segundo con SSC 0.1X y SDS 0.1%. La membrana se expuso a una película BioMat (Kodak) y se guardó a -70°C hasta ser revelada. La sonda *nox-2* consistió en el fragmento *HindIII-EcoRV* de 1.5 kb del vector pTOKAD-1.5 o de 3.5 kb del vector pTOKAD-3.5. La sonda del gen *hph* consistió en el fragmento *KpnI* de 1.5 Kb del plásmido pDLAM89d.

### **II.12. Hibridación tipo Northern blot.**

Se cargaron 10-12 µg de RNA total por carril en un gel de agarosa al 1% con formaldehído (Sambrook y Russell, 2001). La corrida se realizó a 80 V y el RNA se transfirió a una membrana de nylon (Hybond-N, Amersham Pharmacia Biotech) como se indicó antes. La membrana se hibridó con la sonda apropiada marcada radiactivamente, esencialmente como se describió para el Southern blot.

Se realizaron ensayos de hibridación tipo Northern reusando algunas membranas previamente obtenidas por la Dra. Shaday Michán en el laboratorio del Dr. Hansberg (IFC, UNAM). Los procedimientos para la obtención de estas membranas se describen en (Michan *et al.*, 2002).

### **II.13. Obtención de extractos de proteínas de membrana.**

Los extractos de proteínas membranales se obtuvieron basado en el trabajo de Sagi y colaboradores (Sagi y Fluhr, 2001a). Se inocularon 200 ml de medio líquido con 10<sup>6</sup> conidios/ml en dos matraces de 500 ml de capacidad y se crecieron a 30<sup>0</sup>C en agitación. Se colectó el micelio por filtración al vacío a las 16 y 24 horas, se congeló en N<sub>2</sub> líquido y se almacenó a -70°C. Las muestras se pulverizaron en morteros con N<sub>2</sub> líquido. Se mezcló polvo de micelio equivalente a un volumen de 3 ml con 3 ml de amortiguador de extracción (MgCl<sub>2</sub> 0.1 mM, EDTA 3 mM, HEPES 50 mM, DTT 1 mM, polivinil pirrolidona 0.6%,

mezcla de inhibidores de proteasas para hongos y levaduras (Sigma-Aldrich), PMSF 2 mM, pH 7.2 (se ajustó con KOH) y 1 ml de perlas de vidrio (#G-1152, Sigma-Aldrich) en tubos Falcon de 15 ml. Para romper el micelio, los tubos se agitaron por 30 seg. en vórtex y se mantuvieron en hielo por un minuto; esta operación se repitió cinco veces. La mezcla se transfirió a tubos Corex que se centrifugaron a 10 000 rpm por 20 min. en el rotor SS-34 de la centrífuga Sorvall. El sobrenadante se centrifugó en tubos de policarbonato por 40 min. (Beckman, EUA) a 40 000 rpm en la ultracentrífuga Ultra-Beckman 7-55 con rotor Ti50. La pastilla se resuspendió en 600 µl de amortiguador de fosfato de potasio 50 mM (pH 7.2) y PMSF 2 mM. Se hicieron alícuotas de 100 µl y se guardaron a  $-70^{\circ}\text{C}$ . Las proteínas de membrana se cuantificaron empleando el método de Bradford con el reactivo “Bio-Rad Protein Assay” (Bio-Rad). La curva patrón se obtuvo con albúmina de suero de bovino (Sigma-Aldrich).

#### **II.14. Electroforesis de proteínas.**

Los extractos de proteínas de membranales se descongelaron en hielo y 100-150 µg de proteína total se solubilizaron con CHAPS 0.5 % durante 45 min. a  $4^{\circ}\text{C}$ , con agitación lenta. Se añadió amortiguador de carga (1x: Tris-HCl 47 mM (pH 7.8), SDS 2%, glicerol 7.5%, DTT 40 mM y azul de bromofenol 0.002%) y se incubó por 30 min. a  $45^{\circ}\text{C}$ . Las muestras se corrieron en una cámara de electroforesis Bio-Rad con un sistema de amortiguador discontinuo (Tris-HCl 25 mM (pH 8.3), glicina 192 mM, SDS 0.1%) según el protocolo de Laemmli a 100 V en geles PAGE-SDS de 1.5 mm de grosor: gel separador al 8 % y gel concentrador al 4%. Se emplearon marcadores de peso molecular de proteína preteñidos (Bio-Rad).

#### **II.15. Inmunodetección de proteínas.**

Después de la electroforesis, las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Bio-Rad) por una hora a 100 V, empleando una cámara (Bio-Rad) y el amortiguador (Tris-HCl 25 mM (pH 8.3), glicina 192 mM, metanol 20%). Las membranas se bloquearon toda la noche a  $4^{\circ}\text{C}$  en agitación con TBS 1X (1L 10x: Tris base 24.2g NaCl 80g pH 7.6), Tween 20 0.1%, leche descremada 5% y después se lavaron tres veces con TBS 1X, Tween 20 0.1% por cinco minutos. El anticuerpo primario Anti-gp91*phox* o Anti-Mox1 (Santa

Cruz Biotechnology, Inc., EUA) se diluyó 1:800 en TBS 1X, Tween 20 0.1%, leche descremada 2% y se incubó con las membranas durante 5 horas. Posteriormente se realizaron tres lavados con TBS 1X, Tween 20 0.1% de cinco minutos cada uno. El anticuerpo secundario Rabbit Anti-Goat IgG (H+L), conjugado con *Horse Radish Peroxidase* (HRP) (#31402, Pierce Biotechnology Inc., Rockford IL, EUA) se diluyó 1:5000 en TBS 1X, Tween 20 0.1%, leche descremada 2% y se incubó con la membrana por una hora y luego se repitieron tres lavados con TBS 1X, Tween 20 0.1% de cinco minutos cada uno. Para la detección de la peroxidasa se empleó el sustrato quimioluminiscente SuperSignal West Pico (Pierce Biotechnology Inc., EUA) según las instrucciones del fabricante.

## **II.15. Ensayo de actividad por reducción de NBT (p-nitro azul de tetrazolio).**

### **II.15.1. En geles.**

Se realizó electroforesis PAGE-SDS con 150 µg de proteína de la preparación membranal solubilizada como se describió antes. El gel se lavó en 800 ml de amortiguador Tris-HCl 10 mM (pH 7.8), EDTA 2%, Triton X-100 1% por 75 min. a temperatura ambiente y después con 200 ml por 15 min. más. Luego el gel se incubó en 100 ml de amortiguador Tris-HCl 20 mM (pH 7.4), MgCl<sub>2</sub> 0.1 mM, FAD 25 µM, DTT 1 mM, CaCl<sub>2</sub> 1 mM por 45 min. a temperatura ambiente y después en Tris-HCl 50 mM (pH 7.4), MgCl<sub>2</sub> 0.1 mM, CaCl<sub>2</sub> 1.0 mM, NBT 0.2 mM, NADPH 0.2 mM durante dos horas (o por toda la noche) a temperatura ambiente, con agitación lenta y en la oscuridad hasta visualizar las bandas oscuras de formazán, que es producto de reducción del NBT por el superóxido. La reacción se detuvo al incubar el gel en agua (Sagi y Fluhr, 2001).

### **II.15.2. En solución.**

Se incubaron 40 µg de proteínas de membrana de una cepa silvestre de *N. crassa* con NBT y NADPH (ó NADH) para medir la producción de formazán. Los ensayos se realizaron a temperatura ambiente en Tris-HCl 50 mM (pH 7.4), CaCl<sub>2</sub> 1 mM con NBT 0.2 mM y NADPH o NADH 0.2 mM. Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen de 400 µl. Las muestras se leyeron a 510 nm en un espectrofotómetro a los 0, 10, 20 y 30 min. de haberse iniciado la reacción. Como el formazán es un precipitado, al momento de leer las muestras se añadieron 40 µl de DMSO para solubilizarlo. Se determinó la sensibilidad a algunos

inhibidores como la rotenona (0.5 mM), el DPI (50  $\mu$ M) y la SOD (7.5 U/ $\mu$ l). Estos se incubaron por 10 min. en presencia de los extractos, antes de añadir el NBT y el NADPH o el NADH. En todos los casos la reacción se inició con la adición del NADPH y el blanco consistió en la solución de Tris-HCl, CaCl<sub>2</sub> y NBT (Sagi y Fluhr, 2001).

### III. RESULTADOS

#### III.1. *N. crassa* posee dos genes *nox*.

Nuestro análisis de la secuencia genómica de *N. crassa* reveló la existencia de dos genes que predicen proteínas homólogas a *gp91phox*, la subunidad catalítica de la NADPH oxidasa de las células fagocíticas humanas. En el cromosoma I detectamos un marco de lectura abierto con tres intrones que predice a un polipéptido de 553 aa y 64 kDa, al que designamos NOX-1. En el cromosoma VII encontramos otro marco de lectura abierto interrumpido por dos intrones, el cual predice un polipéptido de 581 aa con una masa molecular de 67 kDa, al cual hemos denominado NOX-2. NOX-1 y NOX-2 tienen una identidad de 39% y 44% respectivamente, con respecto a la *gp91phox* de neutrófilos humanos. El alineamiento de las proteínas NOX de hongos y de neutrófilos (Fig. 6), muestra una clara agrupación entre las proteínas de los hongos, en las cuales hay pequeñas ablaciones e inserciones que las distinguen de la NOX de mamíferos. Es notable también que NOX-2 tenga una extensión en el amino terminal que está ausente en NOX-1 y en *gp91phox*. Sin embargo, las proteínas NOX-1 y NOX-2 poseen todos los aspectos distintivos de una NADPH oxidasa funcional: los seis dominios transmembranales en el amino terminal que contienen cuatro histidinas conservadas vinculadas a la ligación del grupo hemo (Biberstine-Kinkade *et al.*, 2001) y también los sitios de unión a FAD y NADPH en el extremo carboxilo (Vignais, 2002). Los residuos P415 y D500 son indispensables para la actividad catalítica de *gp91phox*, y su mutación provoca la enfermedad granulomatosis crónica en humanos (Dinauer *et al.*, 1987; Geiszt *et al.*, 2001). Como se aprecia en la figura 6, NOX-1 y NOX-2 también tienen conservados estos aminoácidos. Por el contrario, *gp91phox* muestra cinco secuencias consenso para la glicosilación tipo N (en las asparaginas), de las cuales se ha demostrado que solamente los residuos N132, N149 y N240 se encuentran glicosilados (Vignais, 2002). Ninguno de estos residuos se encuentra conservado en NOX-1 y ni en NOX-2 y además no está presente el motivo N-X-S/T para glicosilación tipo N.



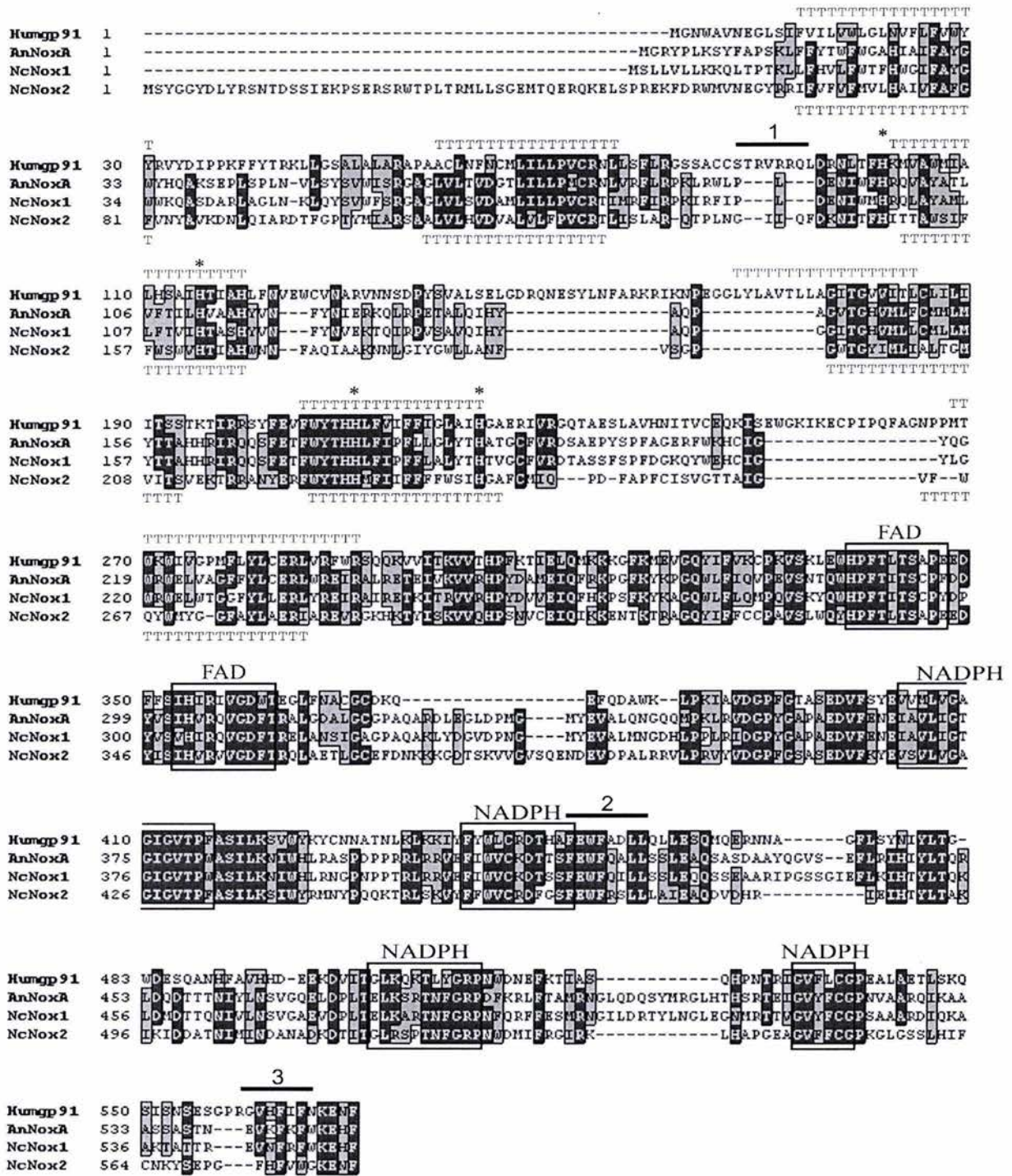


Figura 6. Los genes *nox-1* y *nox-2* de *N. crassa* codifican para una NADPH oxidasa homóloga a *gp91phox* de mamíferos. La secuencia de aminoácidos de la proteína *gp91phox* de neutrófilos humanos (Humgp91) se alineó con la proteína NoxA de *A. nidulans* (AnNoxA) y las proteínas NOX-1 y NOX-2 de *N. crassa* (NcNox1 y NcNox 2). Los aminoácidos idénticos están sombreados en negro y los aminoácidos similares en gris. Los residuos de histidina involucrados en la unión de hemos están indicados con asteriscos (Biberstine-Kinkade *et al.*, 2001). Los posibles sitios de unión a FAD y NADPH (Vignais,

2002) están encerrados en cajas. Las regiones de interacción entre gp91*phox* y p47*phox* están indicadas con líneas negras enumeradas (Vignais, 2002). Las regiones transmembranales predichas para gp91*phox* y NOX-2 están marcadas con TTT y se definieron según los algoritmos de <http://www.enzim.hu/hmmtop> y <http://www.embl-heidelberg.de/predictprotein/predictprotein.html>.

El sitio de unión a NADPH es muy parecido al que une NADH, pero contiene una F luego del sitio canónico GXGXXP (Babior *et al.*, 2002). NOX-2, al igual que gp91*phox* tienen una F, mientras que NoxA y NOX-1 tienen un W en la posición correspondiente (Fig. 6).

En los fagocitos la NADPH oxidasa es una enzima multimérica. Está formada por p22*phox*, que junto a gp91*phox*, forma el citocromo b<sub>558</sub>, llamado así por que en estado reducido absorbe a 558 nm. También forman parte otras subunidades reguladoras como p67*phox*, p47*phox*, p40*phox* y Rac (Babior *et al.*, 2002). En el genoma de *N. crassa* (<http://www.broad.mit.edu/annotation/fungi/neurospora/>) no encontramos ninguna proteína hipotética con similitud clara a las proteínas p67*phox*, p47*phox* y p40*phox* o sus homólogos p51 y p41 de epitelio de colon (Geiszt *et al.*, 2003). La proteína p22*phox*, de 190 aa, está muy conservada entre los mamíferos (Davis *et al.*, 1998). Al buscar un homólogo de esta proteína en el genoma de *N. crassa*, el programa no encontró ningún candidato. Creemos que estas proteínas reguladoras no existen en *N. crassa* y probablemente tampoco en otros hongos. La GTPasa Rac de 192 aminoácidos, sí tiene dos homólogos con alta identidad en el genoma de *N. crassa* y aunque este tipo de proteínas cumple funciones variadas en la célula, podría estar regulando a las NADPH oxidasas en este hongo. En la figura 6 también se muestran los posibles sitios de interacción entre gp91*phox* y la proteína reguladora p47*phox* determinados experimentalmente (Davis *et al.*, 1998; Vignais, 2002). Aunque en las NADPH oxidasas de hongos el sitio 2 está conservado, el sitio 3 muestra baja conservación y el sitio 1 no existe. Este hecho y el no haber encontrado homólogos de las proteínas reguladoras p67*phox*, p47*phox* y p40*phox*, sugiere que las NADPH oxidasas de *N. crassa* (y probablemente de otros hongos) se regulan de manera diferente que las de los mamíferos.

La figura 7 muestra el alineamiento de tres NADPH oxidasas de la subfamilia B, a la que pertenece NOX-2 (Lara-Ortiz *et al.*, 2003). Estas NOX guardan una identidad entre sí mayor al 90%. Gran parte de la extensión del extremo amino que distingue a NOX-2 de

NOX-1 en el alineamiento de la Fig. 6, aparece conservado en las Nox de esta subfamilia (Fig. 7).

<i>NcNox2</i>	1	MS---YGGYDLYRSNTDSSIEKFSERSRWTELPTRMLLSGEMTQERCKELSPREKFDWRMV
<i>MgNox2</i>	1	MSGYGYGGGGGFRDSYGSEKGCERSRSRWTELPTRMLLSGEMTQERCKELTEREKFDWRMV
<i>FusNox2</i>	1	MS-----YQMQDWSKEFSERSRWTELPTRMLLSGEMTQERCKELSSREKFDWRMVI
<i>NcNox2</i>	58	NEGYRRIFFVVFVFMVLHAIIVFAFGFVNYAVKDNLQIARDTFGGETYMIARSAAALVLHVDVAL
<i>MgNox2</i>	61	NEGYRREFFVVFVFMILHAMVFAFGFVNYAVKDNLQIARDTFGGETYMIARAAALVLHEDVAL
<i>FusNox2</i>	50	NEGYRREFFVVFVFMILHALIFSPACVHYACKESLETSRCTFGGETYMIARSAAALVLHVDVAI
<i>NcNox2</i>	118	VLFPVCRTEIISLARQTPLNGIIQFDKNITFHIITAWSTVEFSWVHTIAHWNNFACIAAKN
<i>MgNox2</i>	121	ILFPVCRTEIISLARQTPLNGIIQFDKNITFHIITAWSTVEFSWVHTIAHWNNFACIAAQQ
<i>FusNox2</i>	110	ILFPVCRTEIISLIRQTPLNGIIQFDKNITFHIITAWSTVEFSWVHTIAHWNNFACVAIKY
<i>NcNox2</i>	178	NLGIYGWLLANFVSGPGWGTGYVMLIALMGMVITTSVEKERRANMERFWYTHHVFIVFFFFW
<i>MgNox2</i>	181	RLGIYGWLLANFVSGPGWGTGYVMLIALMGMVITTSVEKERRANMERFWYTHHVFIVFFFFW
<i>FusNox2</i>	170	NLGIYGWLLANFVSGPGWGTGYVMLIALMGMVITTSVEKERRANMERFWYTHHVFIVFFFFW
<i>NcNox2</i>	238	SIHGAFCMIQPDFAPFCISVGTIAIGVFWCEWMYSGFYLAERIAREVRGRHKHTYISKVVI
<i>MgNox2</i>	241	SIHGAFCMIQPDFAPFCISVGTIAIGVFWCEWMYSGFYVAERIAREVRGRHKHTYISKVVI
<i>FusNox2</i>	230	SIHGAFCMIQPDVAPFCISIGSSAIGVFWCEWMYSGFYLAERIAREVRGRHRTYISKVVI
<i>NcNox2</i>	298	QHPSNVCEICIKKENTKTRAGQYIFLCCPAVSIWQYHFPTLTSAPEDDYISIHVRVVGDF
<i>MgNox2</i>	301	QHPSNVCEICIKKENTKTRAGQYIFLCCPEVSVWQYHFPTLTSAPEDDYISIHVRVVGDF
<i>FusNox2</i>	290	QHPSNVCEICIKKENTKTRAGQYIFLCCPAVSIWQYHFPTLTSAPEDDYISIHVRVVGDF
<i>NcNox2</i>	358	TRQLAETLGCEFDNK-KKGDISKVVGVVSGENDEVDPAALRVLPRVYVDGPFSGASEDVFK
<i>MgNox2</i>	361	TRGVSKALGCDWD---RKGDASKVVGVVNGENPDVDEALRVLPRVYVDGPFSGASEDVFK
<i>FusNox2</i>	350	TKELAKSLGCDWSKKKADGDAKVVVGLTGREAETDEALRVLPRVYVDGPFSGASEDVFK
<i>NcNox2</i>	417	YEVSVLVGAGIGVTPPFASILKSIWYRMNYPCKKTRLSKVYFFWICRDFGSFEWFRSLLLA
<i>MgNox2</i>	418	YEIAVLCGAGIGVTPPFASILKSIWYRMNYPCKKTRLSKVYFFWICRDFGSFEWFRSLLLA
<i>FusNox2</i>	410	YEVSVLVGAGIGVTPPFASILKSIWYRMNYPCKKTRLSKVYFFWICRDFGSFEWFRSLLLA
<i>NcNox2</i>	477	IEAQDQDNRRIEIHLYLTAKIKIADDATNIMINDANADKDAITGLRSEPTNFGRPNWDMIFRG
<i>MgNox2</i>	478	IEAQDQDNRRIEIHLYLTAKIKIADDATNIMINDANADKDAITGLRSEPTNFGRPNWDMIFRG
<i>FusNox2</i>	470	VEAQDQDNRRIEIHLYLTARIKADDATNIMINDANADKDAITGLRSEPTNFGRPNWDMIFRG
<i>NcNox2</i>	537	IRKIHSPAEAGVFFCGPKGLGSSLHIFCNKYSEPEFHFVWGKENS
<i>MgNox2</i>	538	IRKIHSPAEAGVFFCGPKGLGSSLHIFCNKYSEPEFAFVWGKENS
<i>FusNox2</i>	530	IRKIHSPAEAGVFFYGGPKGLGSSLHTYCNKYTEPEFHFVWGKENS

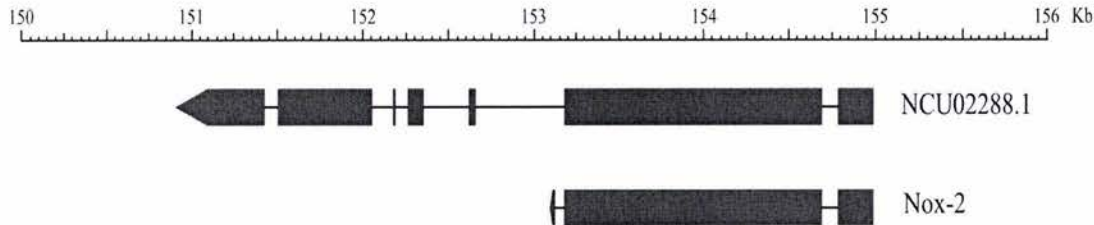
**Figura 7.** Las proteínas NOX de la subfamilia B de los hongos están muy conservadas. Se alinearon las secuencias de aminoácidos de las NOX de la subfamilia B presentes en los hongos *N. crassa* (*NcNox2*), *M. grisea* (*MgNox2*) y *F. graminearum* (*FusNox2*). Los aminoácidos idénticos aparecen sombreados en negro y los aminoácidos similares en gris. La identidad entre estas tres proteínas es superior al 90%. Las proteínas se dedujeron de las bases de datos genómicas de la “Fungal Genome Initiative” (<http://www.broad.mit.edu/annotation/fungi/fgi/>).

### III. 2. La proteína NOX-2 esta anotada erróneamente en el genoma de *N. crassa*.

Según la secuencia genómica de *N. crassa* publicada y anotada (<http://www.broad.mit.edu/annotation/fungi/neurospora/>) (Galagan, 2003), en el

cromosoma VII, contig 3.108, se definió una proteína hipotética de 782 aminoácidos (locus NCU02288.1) que muestra similitud con las NADPH oxidasas en el amino terminal y con endonucleasas relacionada con la reparación del DNA en el extremo carboxilo (Fig. 8).

A



B

(NCU02288.1) hypothetical protein (translated coding sequence)

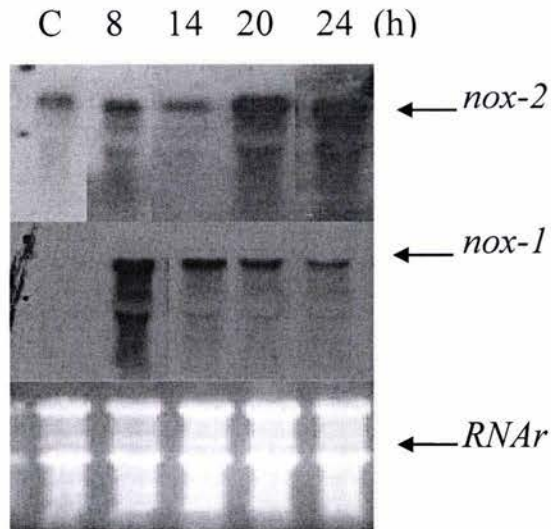
MSYGGYDLYRSNTDSSIEKPSERSRWTPLTRMLLSGEMTQERQKELSPRE  
KFDRWMVNEGYYRI FVFVFMVLHAI VFAFGFVNYAVKDNLQIARDTFGPT  
YMIARSAALVLHVDVALVLFVVCRTLISLARQTPLNGLIQFDKNITFHIT  
TAWSIFFWSVHTIAHWNNFAQIAAKNNLGIYGWLLANFVSGPGWTGYIM  
LIALTGMVITSVEKTRRANYERFWYTHMFIIFFFFWSIHGAFCEMIQPDF  
APFCISVGTTAIGVFWQYWMYGGFAYLAERIAREVRGKHKTYISKVVQHP  
SNVCEIQIKKENTKTRAGQYIFFCCPAVSLWQYHPFTLTSAPPEEDYISIH  
VRVVGDFTRQLAETLGCEFDNKKKGDTSKVVGVSQENDEVDPALRRVLPR  
VYVDGPFSGASEDVFKYEVSVLVAGIGVTPFASILKSIWYRMNYPQQKT  
RLSKVYFFWVCRDFGSFEWFRSLLLAIEAQDVDHRIEIH TYLTAKIKIDD  
ATNIMINDANADKDTITGLRSPTNFGRPNWDMIFRGIRKLHAPGEAGVFF  
CGPKGLGSSLHIFCNKYSEPGDSKCPTFTIAKELFSVIKDEAPDAIKEGE  
IKNQFGRKVAIDASMSIYSFLIAVRSDGQQLMNEAGETTSHLMGMFYRTL  
RMVDNGIKPLYVFDGAPPKLSGELAKRFQRKQEATEGLEEAKETGTAED  
VEKFSRRTVRVTREHNAECQKLLKLMGIPYIVAPTEAEAQCAVLARAGKV  
YAAASEDMDTLCFNAPILLRHLTFSEQRKEPIQEIHLKVLLEGLGMERKQ  
FIDLICILLGCDYLDPIPKVGPSTALKLIREHGTLEKVVEWMKADPKGRYQ  
IPEDWPFEDARTLFFEPDVRPADDPLCDFKWDKPDIEGLIQFLVHEKGFS  
EDRVRSAGTKLEKNMKT SQARIEGFFKILPKTEEEKKAHKRKL EEQAEQ  
KRKKVKEEKKEKAKLKAKPRGA\*

**Figura 8. NOX-2 está anotada erróneamente como una NOX-endonucleasa.** En el panel A se muestra un esquema de la disposición de las secuencias codificantes para la proteína hipotética definida por el locus NCU02288.1 del genoma de *N. crassa* y el de la proteína que en este trabajo se propone como NOX-2. En el panel B se muestra la secuencia de la proteína hipotética deducida del gen NCU02288.1. La secuencia subrayada corresponde a 570 aa de la NADPH oxidasa NOX-2 definida en este trabajo y el resto a una endonucleasa relacionada con la reparación del DNA y la remoción de los fragmentos de Okazaki durante la replicación del DNA (Borkovich *et al.*, 2004).

Nosotros definimos manualmente la proteína NOX-2, teniendo en cuenta la secuencia de aminoácidos de otros miembros de esta subfamilia B (Lara-Ortiz *et al.*, 2003) (Fig. 7) y la regla de sitios consenso para el “splicing” o el procesamiento de intrones. En el panel A de la figura 8 se muestra un esquema de la definición del locus NCU02288.1 en el genoma de *N. crassa*, la proteína híbrida NOX-endonucleasa correspondiente y la proteína NOX-2 definida por nosotros. Los exones se muestran en líneas gruesas y los intrones en líneas delgadas. En el panel B se muestra la secuencia de aminoácidos definida para la proteína híbrida, en la cual los primeros 570 aa. corresponden a NOX-2 y el resto corresponde a la endonucleasa. Nuestros resultados sugieren que la anotación actual del genoma está errada en esta zona. En experimentos tipo Northern hemos detectado un RNAm de aproximadamente 3 kb para *nox-2*, un tamaño semejante al del transcrito de *nox-1* (Fig. 9) y que difícilmente podría corresponder al transcrito para una proteína de 782 aa. Por otro lado, al revisar el genoma de otros hongos que poseen proteínas de la subfamilia NoxB (Lara-Ortiz *et al.*, 2003) como *M. grisea* (<http://www.broad.mit.edu/annotation/fungi/magnaporthe/>), no se observó el arreglo *nox-endonucleasa*, ni éste ha sido descrito previamente en ningún organismo. El tercer exón de NOX-2, que codifica aminoácidos muy conservados en las NoxB (ver Fig. 7), está ausente en la proteína híbrida (Fig. 8). Creemos que el error en la definición de la proteína NOX-2 se debe probablemente a la cercanía del gen de la NOX y de la endonucleasa, que se encuentran a poco menos de 1 Kb de distancia. Para confirmar estas evidencias será necesario secuenciar el cDNA correspondiente al gen *nox-2*.

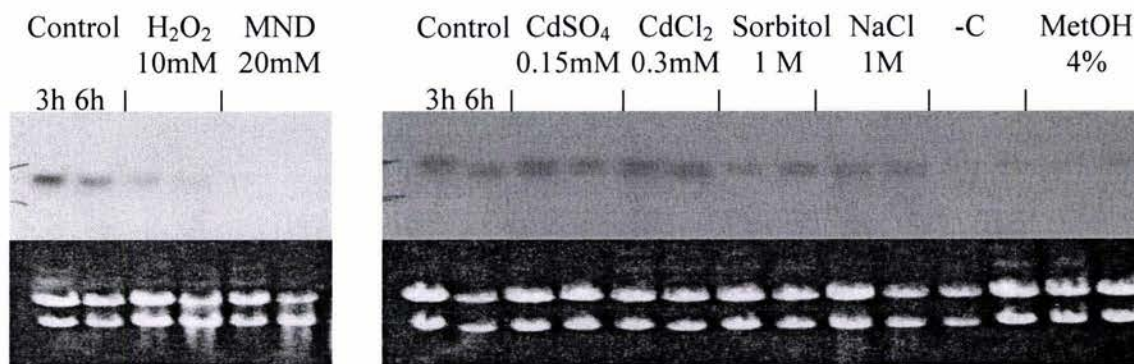
### III.3. Expresión y regulación de los genes *nox-1* y *nox-2*.

Antes de intentar definir la función de los genes *nox-1* y *nox-2*, decidimos confirmar su expresión y estudiar su regulación durante el crecimiento. Los resultados en la figura 9 muestran que el RNAm de *nox-2* está presente en las esporas asexuales intactas (conidios) y a las 8 y 14 horas de crecimiento en medio líquido, mientras que a las 20 y 24 horas los niveles de RNAm son mayores. El RNAm del gen *nox-1* no se detecta en los conidios, pero se acumula notablemente a las 8 horas y posteriormente mantiene niveles constantes.



**Figura 9. Expresión de los genes *nox-1* y *nox-2*.** Se obtuvo el RNA total a partir de conidios intactos (C) y de cultivos de la cepa silvestre RPNCR3A crecidos en medio líquido por los tiempos indicados. Las muestras de RNA se procesaron para Northern y la membrana se hibridó con la sonda específica para *nox-2* (fragmento *Hind*III-*Eco*RV de 1572 pb del plásmido pTOKAD-1.5) y posteriormente se rehibridó con la sonda *nox-1* (fragmento *Eco*RI de 2059 pb del plásmido pTOKAD-2). La sección inferior muestra los RNA ribosomales como control de cargado.

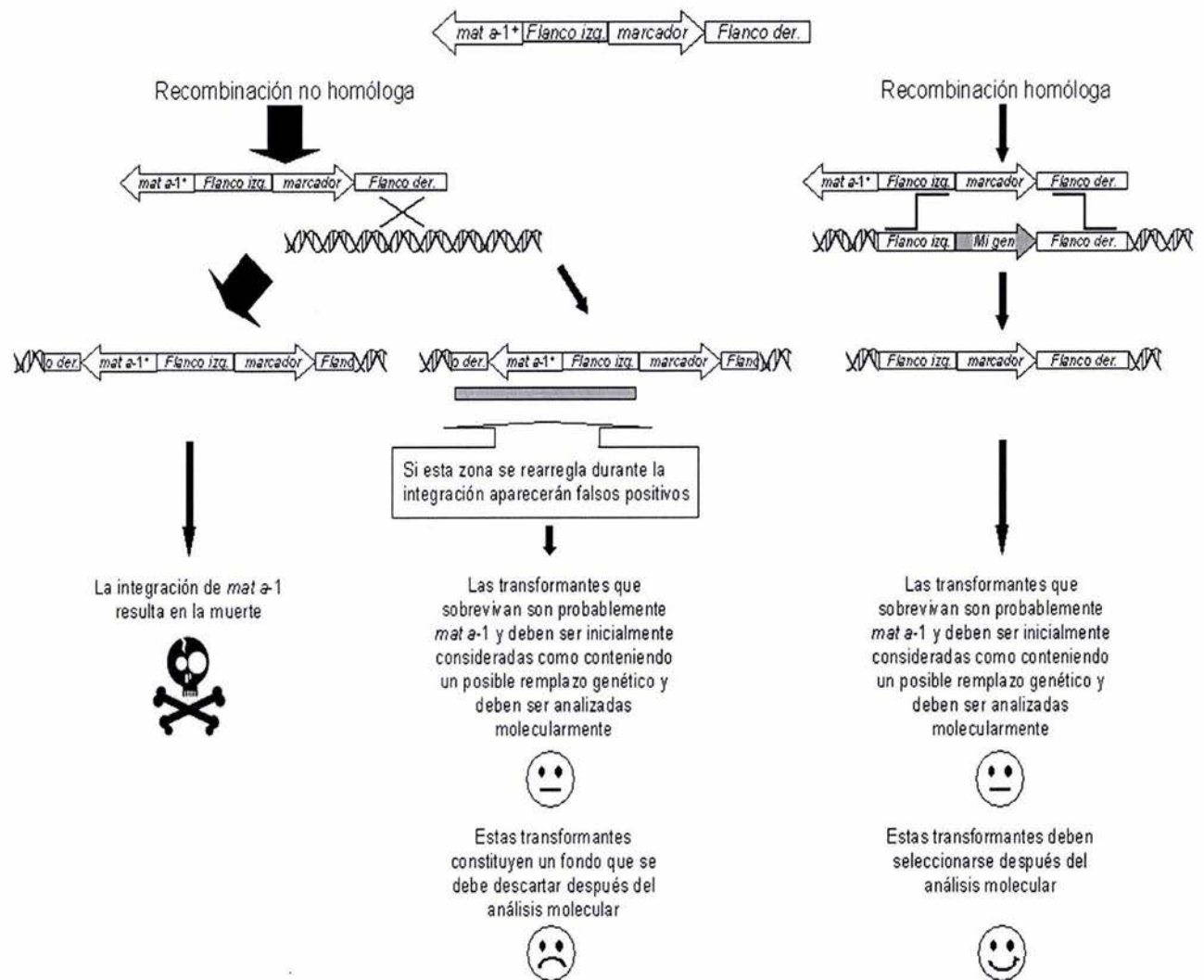
Una vez que detectamos los transcritos de los genes *nox-1* y *nox-2*, decidimos explorar el efecto de algunas condiciones de estrés sobre la expresión de *nox-2*. Se realizaron ensayos de hibridación tipo Northern reusando membranas obtenidas previamente por la Dra. Shaday Michán en el laboratorio del Dr. Hansberg (IFC, UNAM) y una sonda específica para el gen *nox-2*. Los resultados de la figura 10 muestran que los niveles del RNAm de *nox-2* no se vieron alterados en la mayoría de las condiciones probadas. Sin embargo, el nivel del mensajero se redujo notablemente en presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y de menadiona, que es un agente generador de superóxido (Fig. 10A). En condiciones de privación de carbono o con una fuente pobre de carbono como es el metanol, también se abate la expresión del gen *nox-2* (Fig. 10B). Estos resultados sugieren que la expresión de *nox-2* está regulada negativamente en condiciones de elevación de ERO y posiblemente en fuentes pobres de carbono.



**Figura 10. El gen *nox-2* se regula negativamente en condiciones de incremento de ERO y de limitación de carbono.** Se extrajo el RNA de cultivos líquidos de una cepa silvestre de *N. crassa*, crecidos por 16 horas y que se sometieron a diferentes condiciones de estrés por 3 y 6 horas (Michan *et al.*, 2002). Se realizó una hibridación tipo Northern con una sonda específica para el gen *nox-2* (fragmento *Hind*III-*Eco*RV de 1572 pb del plásmido pTOKAD-1.5). Control (sin tratamiento), MND (menadiona), MetOH (metanol), -C (sin carbono). La sección inferior muestra el RNA ribosomal como control de cargado.

#### III.4. Interrupción del gen *nox-2*.

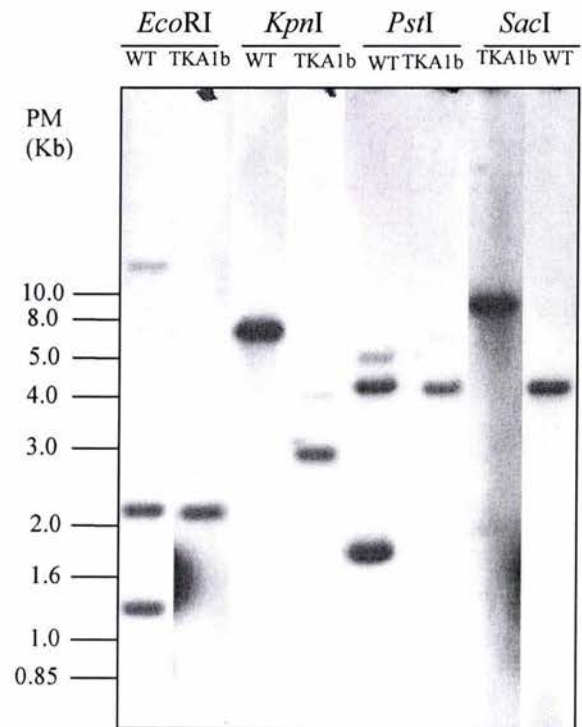
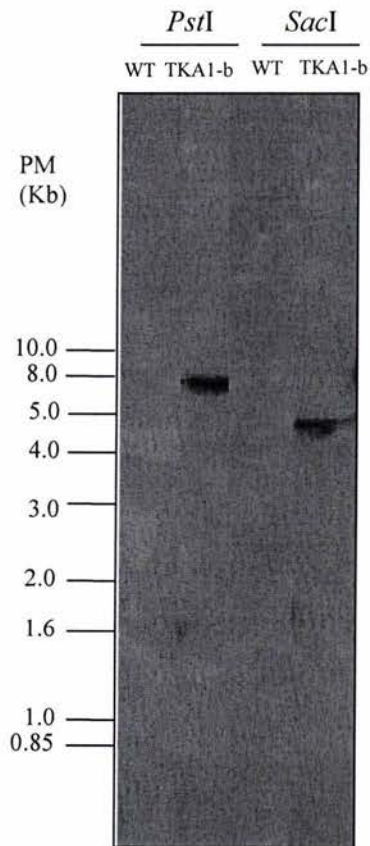
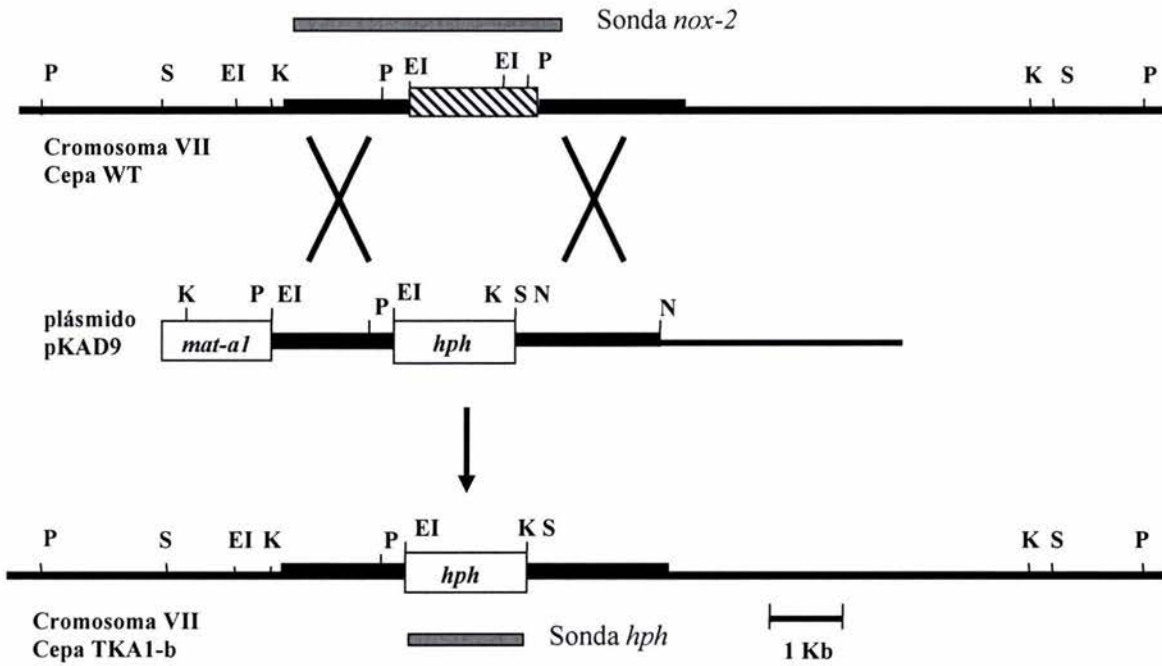
Decidimos evaluar primero la función del gen *nox-2*, debido a que la proteína NOX-2 muestra menos similitud con NoxA de *A. nidulans* y pensamos que a diferencia de NoxA, NOX-2 podría estar involucrada en aspectos no relacionados con el ciclo sexual de *N. crassa* (Lara-Ortiz *et al.*, 2003). Con este propósito, establecimos una estrategia para interrumpir el gen *nox-2* basada en el trabajo de Pratt y Aramayo (Pratt y Aramayo, 2002), que consiste en transformar una cepa de *N. crassa* con un plásmido lineal que contenga regiones 5' y 3' del gen *nox-2* flaqueando al gen de resistencia a higromicina *hph*. De esta manera, una doble recombinación homóloga resultaría en la sustitución del ~85 % del ORF NOX2 por el gen de resistencia a higromicina. *N. crassa* tiene una tasa muy alta de recombinación no homóloga, por lo que esta estrategia incluye el empleo del gen “tóxico” *mat-1* para seleccionar en contra de los eventos de recombinación no homóloga. *mat-1* funciona como gen tóxico cuando al transformar el sexo “A” de *N. crassa* este gen se integra en el genoma por recombinación no homóloga, estableciendo una reacción de incompatibilidad entre sexos o *mating types* opuestos y causando la muerte de la cepa receptora (Pratt y Aramayo, 2002). De esta manera se elimina una proporción importante de transformantes no deseados (Fig. 11).



**Figura 11. El gen *mat-a1* funciona como gen tóxico cuando se integra por recombinación no homóloga.** Se muestra la estrategia experimental para la interrupción de genes utilizando el gen *mat-a1* como un gen tóxico, al transformar una cepa del sexo A de *N. crassa*. Flanco derecho y flanco izquierdo se refiere a las secuencias de DNA 5' y 3' del gen que será interrumpido. "Mi gen" se refiere al fragmento del gen de interés que será sustituido por el marcador (resistencia a higromicina) (Pratt y Aramayo, 2002).

El plásmido pKAD9 lineal (ver Materiales y Métodos) se empleó para transformar la cepa RPNCR3A por fusión de esferoplastos y se obtuvieron 20 transformantes resistentes a higromicina que se analizaron por hibridación tipo Southern. Primeramente se hizo un análisis hibridando con la sonda del gen de resistencia a higromicina (*hph*) y se obtuvieron





### **Figura 12. Interrupción del gen *nox-2*.**

A) El plásmido pKAD9 se construyó reemplazando aproximadamente el 85% del ORF de *nox-2* por el gen *hph* de resistencia a higromicina. La caja rayada corresponde a la región del gen *nox-2* eliminada. Las barras negras gruesas en la secuencia de DNA representan la zona que se amplificó por PCR. Las barras grises indican las sondas empleadas. El plásmido pKAD9 lineal se utilizó para transformar la cepa RPNCR3A y se seleccionaron las transformantes resistentes a higromicina. Sitios de restricción: EI (*EcoRI*), K (*KpnI*), P (*PstI*), S (*SacI*), N (*NotI*).

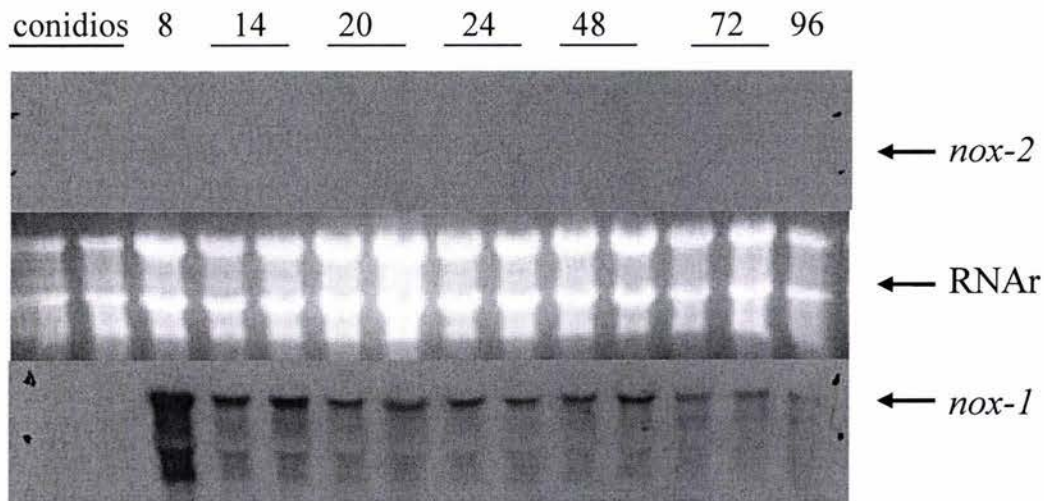
B y C) Se extrajo el DNA de las cepas RPNCR3A y TKA1b ( $\Delta nox-2$ ), se digirió con las enzimas de restricción indicadas y se realizó una hibridación tipo Southern. B) La sonda empleada fue el fragmento *KpnI* de 1.5 Kb del plásmido pDLAM89d que contiene el gen de resistencia a higromicina. En la cepa silvestre no se espera ninguna hibridación. En la cepa TKA1b ( $\Delta nox-2$ ) se esperan las bandas: *SacI*, 4799 pb y *PstI*, 8020 pb. C) La sonda empleada incluye todo el ORF y parte de la región 5' del gen *nox-2* y consistió en el fragmento de 3.5 Kb *HindIII-EcoRV* del plásmido pTOKAD-3.5. En la cepa silvestre se observan las bandas esperadas: *EcoRI*, 2341 pb, 1372 pb y 32000 pb (muy tenue); *KpnI*, 8073 pb; *PstI*, 1839 pb, 4813 pb y 6181 pb; *SacI*, 9944 pb. En la cepa TKA1b ( $\Delta nox-2$ ) se esperan las bandas: *EcoRI*, 2341 pb; *KpnI*, 3230 pb y 4600 pb (muy tenue); *PstI*, 4813 pb y 8020 pb (muy tenue); *SacI*, 4846 pb y 4799 pb.

6 cepas que mostraron un solo evento de integración del gen *hph*. Estas cepas se analizaron posteriormente hibridando con el fragmento de 3.5 Kb que incluye el ORF NOX-2 y la región 5' del gen y solamente obtuvimos una cepa que mostró el evento de interrupción esperado, que llamamos TKA1b. La figura 12A muestra el evento de integración del plásmido pKAD9 en el cromosoma VII de *N. crassa*. Las figuras 12B y 12C muestran los patrones de hibridación tipo Southern de la cepa TKA1b y de la cepa silvestre RPNCR3A al hibridar con las sondas *hph* y *nox-2*, respectivamente. El patrón de bandas es consistente con la integración de una copia del gen de resistencia a higromicina para interrumpir el gen *nox-2* (ver leyenda Fig.12).

### **III.5. La cepa mutante TKA1b no expresa el gen *nox-2*.**

Para iniciar la caracterización de la cepa mutante  $\Delta nox-2$  quisimos confirmar que se había eliminado la expresión del gen *nox-2* en la transformante TKA1b. Se extrajo el RNA a diferentes tiempos de crecimiento de cultivos líquidos de la cepa mutante TKA1b y de la cepa silvestre isogénica RPNCR3A y las muestras se analizaron mediante hibridación tipo Northern. En la figura 13 se puede apreciar que la cepa  $\Delta nox-2$  no muestra señal alguna de hibridación en condiciones en las que una cepa silvestre si expresa el gen (ver Fig. 9).

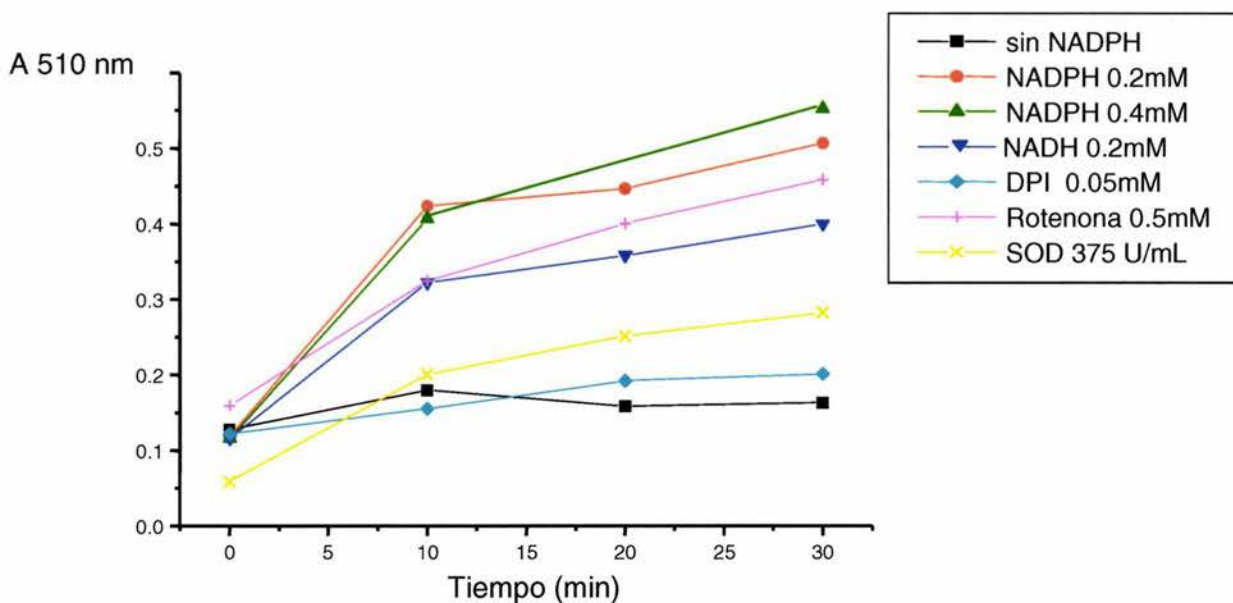
Cuando la misma membrana se hibridó con una sonda específica para *nox-1*, se observó que el patrón de expresión de *nox-1* no parece alterarse en un fondo genético  $\Delta nox-2$  (comparar con la Fig. 9).



**Figura 13. Expresión de los genes *nox-2* y *nox-1* en un fondo genético  $\Delta nox-2$ .** Se extrajo el RNA total de las cepas RPNCR3A y TKA1b de conidios intactos y a diferentes tiempos de crecimiento en medio líquido. Se realizó una hibridación tipo Northern empleando una sonda específica del gen *nox-2* (fragmento *Hind*III-*Eco*RV de 1572 pb del plásmido pTOKAD-1.5) y como control la sonda *nox-1* (fragmento *Eco*RI de 2059 pb del plásmido pTOKAD-2).

### III.6. Ensayos de reducción de NBT en extractos de proteínas membranales.

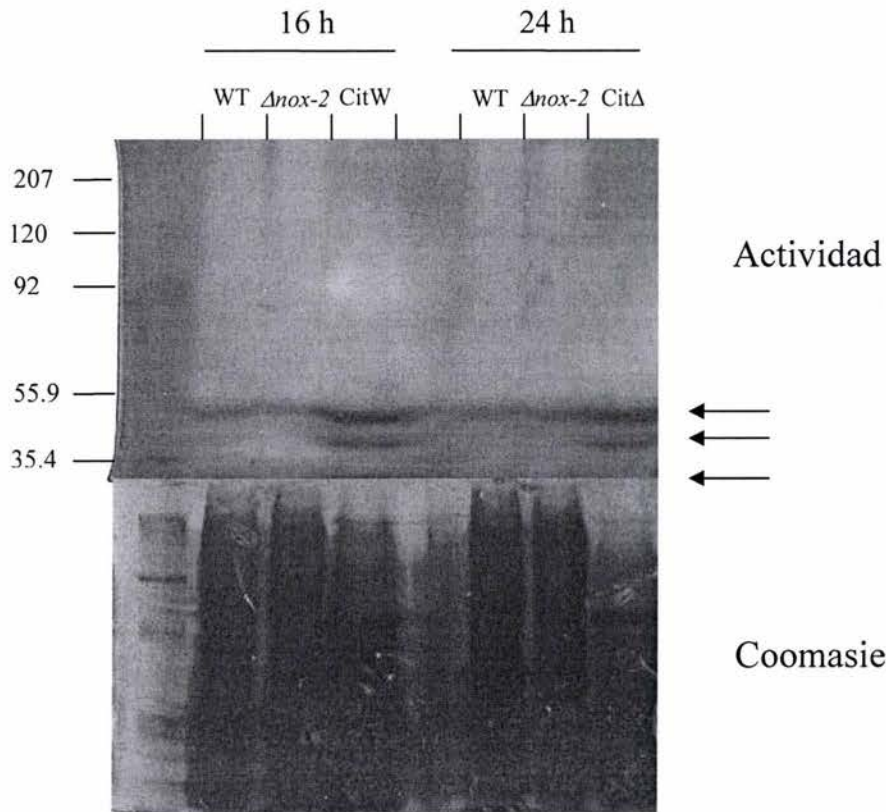
Para tratar de determinar la actividad enzimática de las NADPH oxidasas NOX-1 y NOX-2, adaptamos un ensayo de reducción de NBT utilizado para determinar la actividad de NADPH oxidasa en extractos de proteínas membranales de tabaco y tomate (Sagi y Fluhr, 2001). El principio de este ensayo está basado en que el superóxido producido por una NADPH oxidasa es capaz de reducir al NBT, que entonces se convierte en formazán, un precipitado azul que absorbe a 510 nm. En *N. crassa* hicimos dos determinaciones de reducción de NBT, una en solución y la otra en geles de acrilamida, ambas a partir de extractos de proteínas membranales.



**Figura 14. Los extractos de proteínas de membrana de *N. crassa* contienen una actividad de reducción de NBT que se inhibe por DPI y SOD y requiere NADPH (NADH).** Se obtuvieron extractos de proteínas de membrana de cultivos de 16 horas de crecimiento en medio líquido. Los extractos se incubaron con NBT, NADPH y los reactivos que se indican, para medir la aparición de formazán mediante absorbancia a 510 nm.

La figura 14 muestra un experimento representativo de reducción de NBT en solución. Se emplearon extractos proteicos de membranas de una cepa silvestre obtenidos a partir de cultivos de 16 horas, ya que en este tiempo habíamos encontrado la expresión de los genes *nox-1* y *nox-2* (Fig. 9). Los extractos se incubaron con NBT y NADPH para medir la aparición de formazán por absorbancia a 510 nm. Se emplearon algunos reactivos para indagar sobre las posibles fuente de las ERO detectadas: la rotenona inhibe el complejo I de la cadena de transporte de electrones mitocondrial; el DPI compite por el sitio de unión a FAD, por lo que es inhibidor de la NADPH oxidasa y de otras flavoproteínas y la superóxido dismutasa (SOD), la cual transforma al superóxido en peróxido de hidrógeno y agua. Se detectó una actividad enzimática en los extractos de membranas que se inhibe totalmente por DPI, parcialmente por rotenona y por SOD y que requiere NADPH ó NADH en menor grado, lo cual es consistente con lo esperado para una actividad de NADPH oxidasa. Al realizar esta determinación en extractos membranales de la cepa mutante  $\Delta nox-2$ , no se obtuvieron diferencias notables con la actividad medida en los extractos de la cepa silvestre (dato no mostrado). Por esta razón decidimos ensayar la reducción de NBT en geles de poliacrilamida para ver si de manera cualitativa podíamos detectar alguna

diferencia entre las bandas de formazán producidas en una cepa silvestre y en la mutante  $\Delta nox-2$  (Fig. 15).



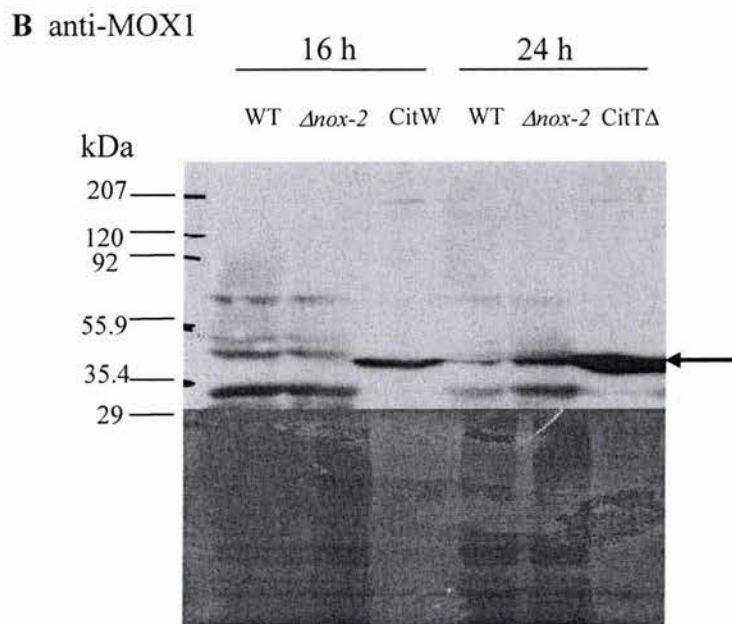
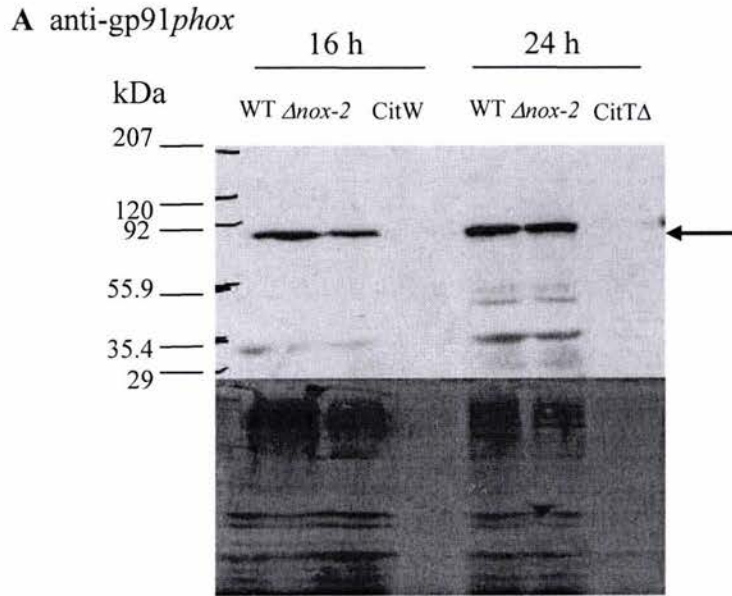
**Figura 15.** Los extractos membranales de las cepas silvestre y  $\Delta nox-2$  de *N. crassa* no muestran diferencia en la actividad de reducción de NBT en gels PAGE-SDS. Se corrieron gels PAGE-SDS con 150  $\mu$ g de extractos de proteínas de membrana de las cepas RPNCR3A y TKA1b obtenidos a las 16 y 24 horas de cultivo en medio líquido. El gel de actividad se trató posteriormente con FAD, NBT y NADPH hasta la aparición de las bandas de formazán indicadas. El gel inferior se tiñó con azul Coomasie. WT (cepa silvestre),  $\Delta nox-2$  (cepa TKA1b), Cit $\Delta$  (fracción citosólica de la cepa  $\Delta nox-2$ ), CitW (fracción citosólica de la cepa silvestre).

Esencialmente en este ensayo se separan las proteínas por PAGE-SDS, luego se regenera la NADPH oxidasa con FAD y se incuba con NBT y NADPH, sustratos de la enzima. La figura 15 muestra un gel de actividad y las bandas de formazán se encuentran señaladas. Por un lado, las bandas de formazán que se obtuvieron son de un peso molecular menor al esperado para la proteína NOX-2 o NOX-1. Por otro lado, no se observaron diferencias en el patrón de bandas en la cepa silvestre y la mutante  $\Delta nox-2$  TKA1b. En resumen, hemos

detectado una actividad reductora de NBT en extractos de *N. crassa* que se inhibe por DPI, parcialmente por rotenona y SOD y que requiere NADPH o NADH, pero que no está relacionada con NOX-2.

### III.7. Reconocimiento de NOX-2 por anticuerpos.

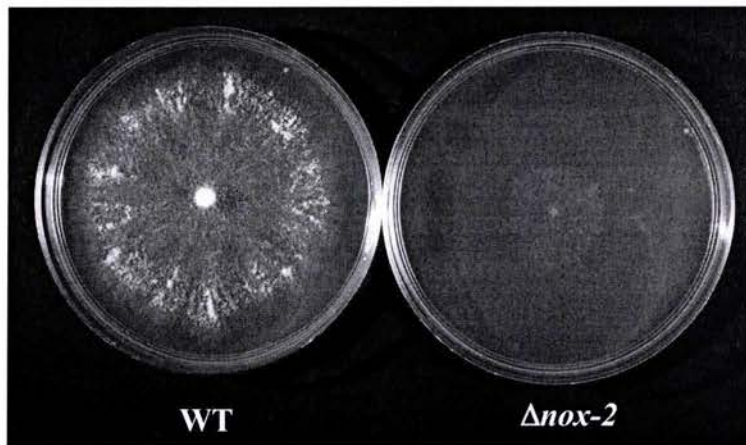
Quisimos determinar si la proteína NOX-2 sería reconocida por anticuerpos dirigidos contra otras NADPH oxidasas con la idea de poder ver posteriormente su localización celular a través de inmunohistoquímica, así como para explorar una posible falta de correlación entre la actividad y la presencia de la proteína. Empleamos anticuerpos policlonales contra gp91*phox* (Nox2) y contra MOX1 (Nox1) de humanos. El anticuerpo anti-gp91*phox* reconoce un péptido en el extremo carboxilo terminal de gp91*phox* humana y el anticuerpo contra MOX1 reconoce un péptido en una región interna de esta proteína. Se escogieron los tiempos de 16 y 24 horas de crecimiento para obtener los extractos de proteínas membranales, porque en esos tiempos habíamos visto previamente la expresión del RNAm de *nox-1* y *nox-2* (Fig. 9). En las inmunorréplicas tipo Western con los extractos membranales de una cepa silvestre de *N. crassa*, encontramos que estos anticuerpos reconocen proteínas de una manera diferencial. Como se muestra en la figura 16A, el anticuerpo anti-gp91*phox* reconoce principalmente a una proteína de alrededor de 80 kDa que se encuentra mayoritariamente en la fracción membranal. El anticuerpo anti-MOX1 reconoce principalmente a una proteína de 45 kDa, pero que en este caso se encuentra enriquecida en la fracción citosólica (Fig. 16B). Estos anticuerpos también reconocen otras proteínas, pero en menor grado. Cuando analizamos la cepa mutante  $\Delta$ *nox-2*, (Fig. 16) obtuvimos el mismo patrón de reconocimiento que en la cepa silvestre con ambos anticuerpos. Las fracciones citosólicas tampoco mostraron diferencias entre las dos cepas mutante y silvestre (Fig. 16). Estos resultados muestran que estos anticuerpos contra NADPH humanas no reconocen a NOX-2 de *N. crassa*, en estas condiciones, aunque alguno podría estar reconociendo a NOX-1.



**Figura 16. Los anticuerpos contra NADPH oxidasas humanas reconocen proteínas presentes tanto en una cepa silvestre como en una cepa  $\Delta nox-2$  de *N. crassa*.** Se obtuvieron extractos de membranas de las cepas RPNCR3A y TKA1b a las 16 y 24 horas de crecimiento en cultivos en medio líquido y se realizó un ensayo de inmunorréplica tipo Western revelado con los anticuerpos A) anti-gp91 $phox$  y B) anti-Mox1. En cada caso también se muestran los mismos geles teñidos con azul Coomasie, luego de realizarse la transferencia del gel. WT (cepa silvestre),  $\Delta nox-2$  (cepa TKA1b), Cit $\Delta$  (fracción citosólica de la cepa  $\Delta nox-2$ ), CitW (fracción citosólica de la cepa silvestre).

### III.8. Caracterización fenotípica de la mutante $\Delta nox-2$ .

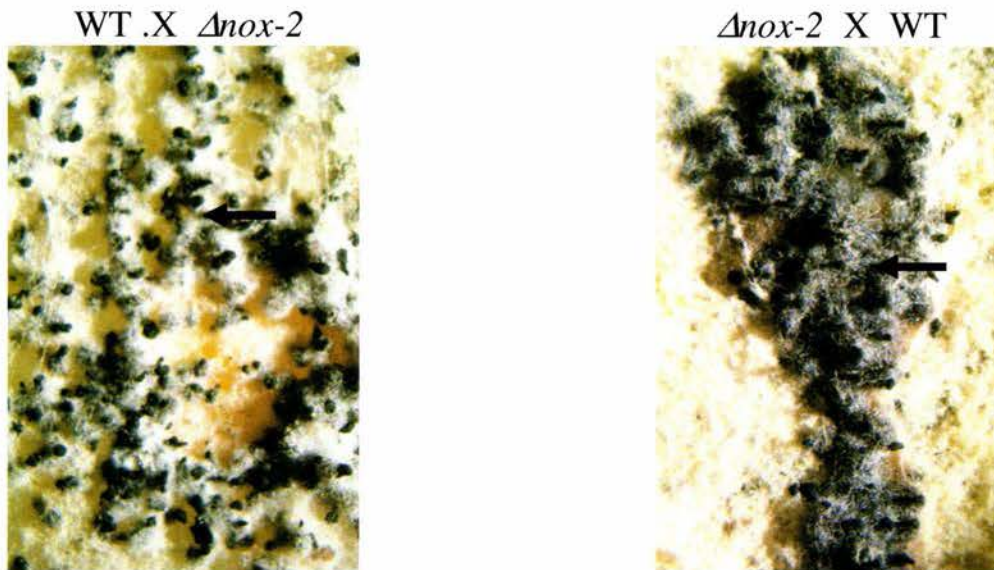
Como se ha indicado, no se detectaron diferencias bioquímicas entre las cepas silvestre y  $\Delta nox-2$ , ni tampoco diferencias fenotípicas evidentes. Por ello decidimos evaluar la posibilidad de que la carencia de *nox-2* causara defectos en el crecimiento bajo condiciones de estrés. En *C. elegans* las ERO producidas por la NADPH oxidasa DUOX están relacionadas con la estabilidad de la cutícula del gusano, ya que las mismas producen enlaces cruzados entre las tirosinas de algunas proteínas estructurales (Edens *et al.*, 2001). Cuando se sembraron conidios de la cepa mutante TKA1b y de una silvestre en el centro de una caja de Petri con medio Vogel y sorbitol 1.2 M, la mutante TKA1b mostró un crecimiento radial menor que el de una cepa silvestre, como se muestra en la figura 17.



**Figura 17. La cepa TKA1b crece con dificultad en un medio con alta osmolaridad.** Se inocularon aproximadamente 3000 conidios de las cepas RPNCR3A (WT) y TKA1b ( $\Delta nox-2$ ) en el centro de una caja de Petri con medio sólido que contenía sorbitol 1.2 M. Las cajas se dejaron crecer a 30°C. La fotografía se tomó a las 64 horas de la inoculación.

Al encontrar que la cepa  $\Delta nox-2$  tenía problemas en el crecimiento, analizamos si esto se debía a algún problema en la germinación. Encontramos que los conidios de la cepa TKA1b mostraban un retraso en la germinación, visible a tiempos cortos. Así por ejemplo, a las 6 horas y media de germinación en medio Vogel líquido, el 72% de los conidios de la cepa mutante TKA1b aún no había formado el tubo germinal en comparación con el 37% en la cepa silvestre (dato no mostrado).





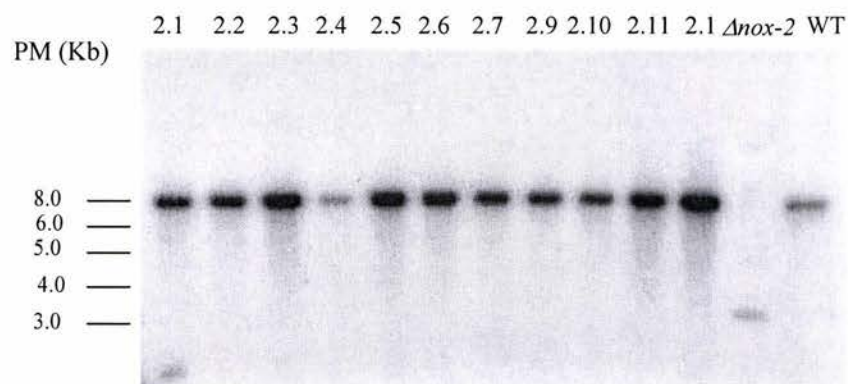
**Figura 18. La cepa  $\Delta nox-2$  produce peritecios normales si actúa como donadora o como receptora en una cruce sexual.** Se señalan con flechas unas estructuras negras llamadas peritecios que se forman después de una cruce sexual y que contienen las ascosporas o esporas sexuales. Se hicieron cruces de una cepa  $\Delta nox-2$  (TKA1b como donadora en la foto de la derecha o como receptora en la foto de la izquierda) con la cepa silvestre 74-OR8-1a (WT). La cepa que actuó como receptora se sembró en un medio SC y a los 8 días se fertilizó con una suspensión de conidios de la cepa donadora. Las fotografías se tomaron a los 10 días de la fertilización.

Para corroborar que estos fenotipos se encontraban ligados a la interrupción  $\Delta nox-2$  realizamos varias cruces sexuales entre la cepa TKA1b y una cepa silvestre. Dado el antecedente de que una cepa  $\Delta noxA$  en *A. nidulans* está bloqueada en una etapa temprana del desarrollo de los cuerpos fructíferos (cleistotecios) que contienen las esporas sexuales o ascosporas, decidimos también evaluar el papel de *nox-2* en el ciclo sexual de *N. crassa*. Por esta razón, la mutante TKA1b se cruzó con una cepa silvestre de sexo “a” en la que TKA1b (sexo “A”) actuaba tanto como receptora (femenina) o donadora (masculina). En ambos casos se produjeron peritecios que maduraron (Fig.18) y formaron ascosporas de morfología normal que se expulsaron al medio (dato no mostrado). Al probar si la progenie de estas cruces era resistente a higromicina, de manera inesperada observamos que se obtenía un número muy reducido de hijos  $hph^+$ : de 37 analizados, sólo 2 resultaron  $hph^+$  (Tabla 1).

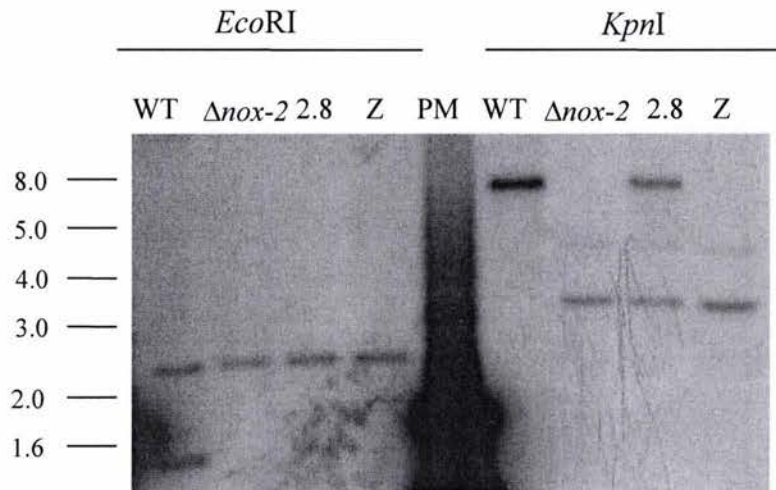
**Tabla 1. Análisis de la progenie de cruzas de la cepa TKA1b ( $\Delta nox-2$ ) con la cepa silvestre 74-OR8-1a.** El crecimiento en sorbitol 1.2 M se describe como bueno (B) o malo (M). El resultado de la hibridación tipo Southern se expresa como WT si la cepa resultó silvestre y  $\Delta nox-2$  si tenía la interrupción del gen  $nox-2$ . En la columna “Higromicina” se indica si las cepas resultaron resistentes (R) o sensibles (S) a higromicina. El sexo se expresa como “a” o “A”. n.d. no determinado.

Cepa	Higromicina	Sorbitol 1.2M	Genotipo	Southern
1.1	S	B	his <sup>-</sup>	WT
1.2	S	B	ino <sup>-</sup>	WT
1.3	S	B	ino <sup>-</sup>	WT
1.4	S	n.d.	ino <sup>-</sup>	WT
1.5	S	B		WT
1.6	S	n.d.	his <sup>-</sup> ino <sup>-</sup>	WT
1.7	S	B		WT
1.8	S	n.d.	his <sup>-</sup> ino <sup>-</sup>	N.d.
1.9	S	B		WT
2.1	S	M	ino <sup>-</sup>	WT
2.2	S	M	ino <sup>-</sup>	WT
2.3	S	M	his <sup>-</sup> ino <sup>-</sup>	WT
2.4	S	M	his <sup>-</sup> ino <sup>-</sup>	WT
2.5	S	M	ino <sup>-</sup>	WT
2.6	S	M	ino <sup>-</sup>	WT
2.7	S	M	ino <sup>-</sup>	WT
CNCKA-2.8	R	n.d.	ino <sup>-</sup>	$\Delta nox-2$
2.9	S	M	his <sup>-</sup> ino <sup>-</sup>	WT
2.10	S	M	his <sup>-</sup> ino <sup>-</sup>	WT
2.11	S	M	ino <sup>-</sup>	WT
2.12	S	B	ino <sup>-</sup>	n.d.
2.13	S	B	his <sup>-</sup>	n.d.
2.14	S	M	his <sup>-</sup> ino <sup>-</sup>	WT
2.15	S	B	ino <sup>-</sup>	n.d.
B1	S	M		WT
B2	S	M	ino <sup>-</sup>	WT
B3	S	M		WT
B4	S	M		WT
B5	S	M	ino <sup>-</sup>	WT
A1	S	B	ino <sup>-</sup>	WT
A3	S	B	ino <sup>-</sup>	WT
A4	S	B		WT
A5	S	B		WT
W	S	M	his <sup>-</sup> ino <sup>-</sup>	WT
X	S	M	his <sup>-</sup> ino <sup>-</sup>	WT
Y	S	M		WT
CNCKA-Z	R	B	his <sup>-</sup> sexo A	$\Delta nox-2$

Buscando una explicación a este fenómeno, encontramos un reporte en la literatura sobre la inactivación del gen de resistencia a higromicina después de realizarse una cruce sexual en *N. crassa* (Dev y Maheshwari, 2003). Entonces pensamos que podía haberse inactivado el gen de resistencia a higromicina en la progenie de estas cruces. Debido a esto, decidimos analizar por hibridación tipo Southern parte de esta progenie, para determinar la presencia de la interrupción  $\Delta nox-2$ . Se analizaron 29 hijos sensibles a higromicina por hibridación tipo Southern. En la Fig. 19 se muestra el análisis de 11 cepas sensibles a higromicina, en donde se observa que todas resultaron silvestres para el gen *nox-2* (carecen del evento de interrupción  $\Delta nox-2$ ). También se analizaron las dos cepas *hph*<sup>+</sup>. Uno de los dos hijos resistentes a higromicina analizados muestra el patrón de la interrupción  $\Delta nox-2$  (Fig. 20), mientras que el segundo hijo (cepa CNCKA-2.8) muestra tanto el patrón de hibridación silvestre como el mutante  $\Delta nox-2$ , lo cual sugiere que se trata de un heterocarión. Al encontrar que las cepas resistentes a higromicina tenían la interrupción  $\Delta nox-2$  y las sensibles no, descartamos la interpretación de la inactivación del gen de resistencia a higromicina como explicación a la reducida representación de la mutación  $\Delta nox-2$  entre la progenie de nuestras cruces.



**Figura 19. La progenie sensible a higromicina entre una cepa  $\Delta nox-2$  y una cepa silvestre carece de la interrupción  $\Delta nox-2$ .** Se extrajo el DNA de algunos hijos sensibles a higromicina (Tabla 1) producto de una cruce entre las cepas TKA1b y 74-OR8-1a. Se analizaron también las cepas RPNCR3A (WT) y TKA1b ( $\Delta nox-2$ ) como controles. El DNA se digirió con la enzima de restricción *KpnI* y se realizó una hibridación tipo Southern. La sonda *nox-2* consistió en el fragmento de 3.5 Kb *HindIII-EcoRV* del plásmido pTOKAD-3.5. En la cepa silvestre se espera una banda de 8073 pb y en la mutante dos bandas de 3230 pb y de 4600 pb (muy tenue).



**Figura 20. La resistencia a higromicina corresponde con la interrupción  $\Delta nox-2$ .** Se extrajo el DNA de dos hijos resistentes a higromicina CNCKA-2.8 y CNCKA-Z, productos de una cruce entre TKA1b y 74-OR8-1a. También se analizaron las cepas RPNCR3A (WT) y TKA1b ( $\Delta nox-2$ ) como controles. El DNA se digirió con las enzimas de restricción indicadas y se realizó una hibridación tipo Southern. La sonda *nox-2* consistió en el fragmento de 3.5 Kb *HindIII-EcoRV* del plásmido pTOKAD-3.5. Con *EcoRI* en la cepa silvestre se esperan las bandas de 2341 pb, 1372 pb y 32000 pb (muy tenue); en una cepa  $\Delta nox-2$  solamente se observa una banda de 2341 pb. Con *KpnI* en la cepa silvestre se espera una banda de 8073 pb y en la mutante de 3230 pb y de 4600 pb (muy tenue).

Al analizar el fenotipo del crecimiento en sorbitol en la progenie de una cruce de la cepa mutante  $\Delta nox-2$  con una cepa silvestre, encontramos que de 33 hijos sensibles a higromicina, el 57.5% crece mal en presencia de sorbitol y el 42.5% lo hace bien (Tabla 1), con lo cual se demostró que el mal crecimiento en sorbitol segregaba mendelianamente y de manera independiente a la interrupción  $\Delta nox-2$ . Al repetir los experimentos de germinación de conidios con las cepas hijas vimos que el defecto en la germinación estaba ligado con la incapacidad de crecer bien en sorbitol (datos no mostrados). Estos resultados indican que la transformante inicial  $\Delta nox-2$  (TKA1b) contiene otra mutación, independiente de  $\Delta nox-2$ , responsable de los fenotipos de crecimiento deficiente en sorbitol y retraso en la germinación de los conidios. Para continuar caracterizando los efectos de la mutación  $\Delta nox-2$ , era necesario obtener una cepa  $\Delta nox-2$  libre de problemas de crecimiento en sorbitol y la germinación.

### III.9. El gen *nox-2* es necesario para la germinación de las ascosporas.

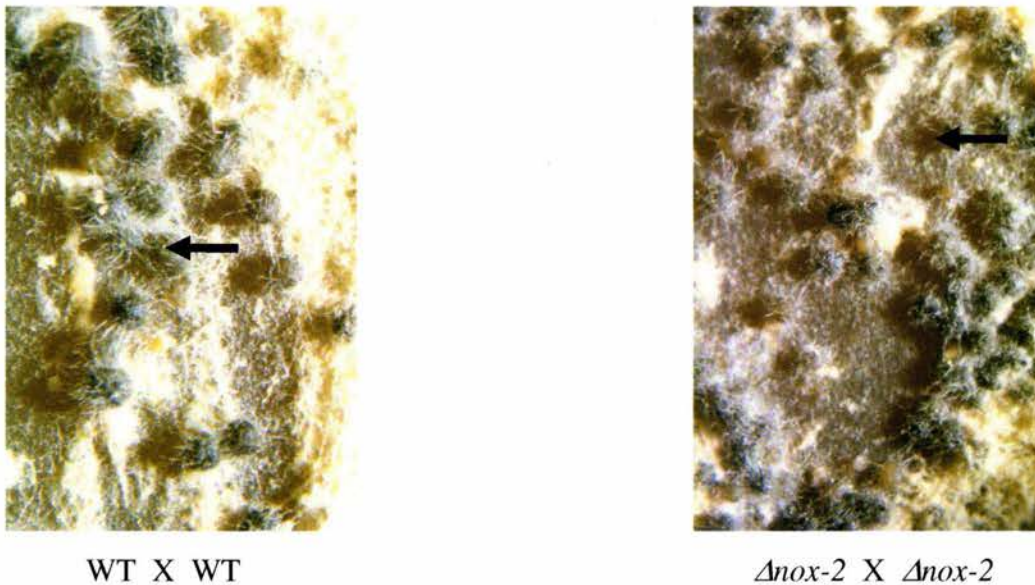
El hecho de obtener tan poca progenie  $\Delta nox-2$  (resistente a higromicina), nos llevó a buscar directamente la progenie mutante, plaqueando las ascosporas de la cruce de TKA1b con una cepa silvestre, en medio selectivo con higromicina. De esta manera encontramos 9 hijos más *hph*<sup>+</sup>, pero se sembraron más de 3000 ascosporas. Estos nuevos hijos se analizaron por hibridación tipo Southern (dato no mostrado) y también tenían la interrupción  $\Delta nox-2$  (Tabla 2). Esto nos confirmó que la progenie  $\Delta nox-2$  resistente a higromicina es recuperable, pero en muy baja frecuencia. En la progenie  $\Delta nox-2$  analizada en la Tabla 2 se muestra que 6 hijos crecen bien en sorbitol y 3 crecen mal, con lo cual también corroboramos el hallazgo de que el fenotipo de mal crecimiento en sorbitol segrega independientemente de la interrupción  $\Delta nox-2$ .

**Tabla 2. Análisis de la progenie *hph*<sup>+</sup> de las cruces entre la cepa TKA1b ( $\Delta nox-2$ ) y la cepa silvestre 74-OR8-1a.** El crecimiento en sorbitol 1.2 M se describe como bueno (B) o malo (M). El resultado de la hibridación tipo Southern se expresa como WT si la cepa resultó silvestre y  $\Delta nox-2$  si tenía la interrupción del gen *nox-2*. En la columna “Higromicina” se indica si la cepas resultaron resistentes (R) o sensibles (S) a higromicina. El sexo se expresa como “a” o “A”. n.d. no determinado. En la columna “Cruza” la cepa que aparece a la izquierda actuó como componeten femenino y la que está a la derecha como masculino.

Cepa	Higromicina	Sorbitol 1.2 M	Southern	Genotipo	Cruza
CNCKA-KA1	R	B	$\Delta nox$	Ino <sup>-</sup> sexo a	TKA1b x 74-OR8-1a
CNCKA-KA2	R	M	$\Delta nox$	Ino <sup>-</sup> sexo a	TKA1b x 74-OR8-1a
CNCKA-AN1	R	B	$\Delta nox$	Ino <sup>-</sup> sexo a	TKA1b x 74-OR8-1a
CNCKA-AN2	R	M	$\Delta nox$		74-OR8-1a x TKA1b
CNCKA-AN3	R	M	$\Delta nox$	His <sup>-</sup>	74-OR8-1a x TKA1b
CNCKA-AN4	R	B	$\Delta nox$	His <sup>-</sup>	TKA1b x 74-OR8-1a
CNCKA-AN5	R	B	$\Delta nox$	His <sup>-</sup>	74-OR8-1a x TKA1b
CNCKA-AN6	R	B	$\Delta nox$	His <sup>-</sup> Ino <sup>-</sup>	74-OR8-1a x TKA1b
CNCKA-AN7	R	B	$\Delta nox$	Ino <sup>-</sup>	TKA1b x 74-OR8-1a

Como en *N. crassa* existen dos sexos separados, para analizar el ciclo sexual de la mutante  $\Delta nox-2$  con precisión, era muy importante realizar una cruce entre dos cepas  $\Delta nox-2$ . Para

esto teníamos que obtener dos cepas hijas de TKA1b de sexos diferentes. Decidimos no emplear la cepa TKA1b, debido a la presencia de otra mutación no relacionada con  $\Delta nox-2$ . Así, la cruce  $\Delta nox-2$  X  $\Delta nox-2$  se llevó a cabo utilizando dos cepas hijas de TKA1b “limpias”, capaces de crecer bien en sorbitol y con la interrupción  $\Delta nox-2$  corroborada por hibridación tipo Southern (Tablas 1 y 2). Como muestra la Fig. 21, la cruce  $\Delta nox-2$  X  $\Delta nox-2$  produce peritecios normales que comienzan a aparecer después de las 24 horas de la fertilización. Luego, aproximadamente a los 10 días de la fertilización, los peritecios comienzan a ser visibles en la tapa de la caja de Petri, con la apariencia de un polvo negro (dato no mostrado).



**Figura 21. La cepa  $\Delta nox-2$  produce peritecios normales en una cruce homocigota.** Se señalan los peritecios que se forman después de una cruce sexual entre dos cepas  $\Delta nox-2$  (CNCKA-Z y CNCKA-KA1) y entre dos cepas silvestres (RPNCR3A y 74-OR8-1a). La cepa que actuó como receptora se sembró en un medio SC y a los 8 días se fertilizó con una suspensión de conidios de la cepa donadora. Las fotografías se tomaron a los 5 días de la fertilización.

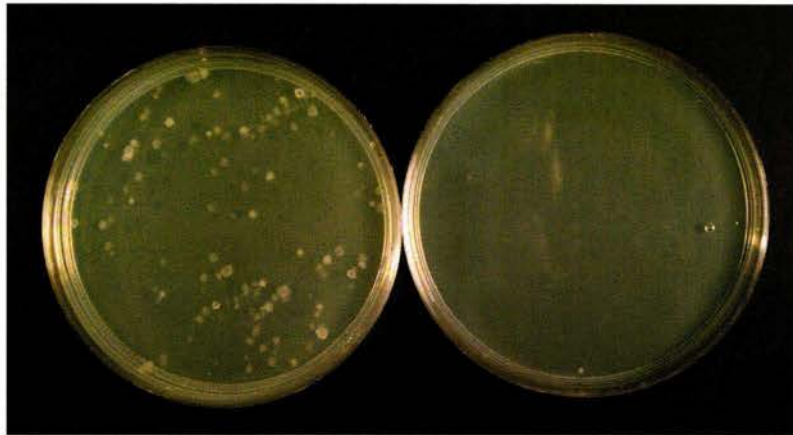
Para analizar la progenie de esta cruce y de otras como control, las ascosporas se colectaron a los 14 días de la fertilización en agua estéril y se dejaron hidratando por una noche. Posteriormente se activaron a 60°C por 30 minutos y se plaquearon en un medio de cultivo sin higromicina para obtener colonias aisladas. Como se observa en la Tabla 3, luego de 40 horas de incubación a 30°C encontramos que el 55% de las ascosporas de la cruce entre dos

cepas silvestres había germinado. Al mismo tiempo, solamente el 16% de las ascosporas provenientes de la crucea WT X  $\Delta nox-2$  había germinado, mientras que ninguna de las ascosporas de la crucea  $\Delta nox-2$  X  $\Delta nox-2$  germinaron (Fig. 22 y Tabla 3), aún después de tiempos muy prolongados de incubación. La ausencia de germinación en las ascosporas de la crucea  $\Delta nox-2$  X  $\Delta nox-2$  se observó con o sin la activación de las mismas por calor. Este hallazgo nos mostró que el gen *nox-2* se requiere para la germinación de las ascosporas y explica nuestros resultados iniciales en los que en una crucea heterocigota entre una cepa  $\Delta nox-2$  y una cepa silvestre, recuperábamos progenie mutante con muy baja frecuencia. Nuestros resultados demuestran que la NADPH oxidasa NOX-2 de *N. crassa* es esencial para la viabilidad y/o la germinación de las ascosporas y sugiere que las especies reactivas generadas por NOX-2 juegan un papel fundamental en estos procesos.

**Tabla 3. Las ascosporas de una crucea  $\Delta nox-2/\Delta nox-2$  no germinan.** Se realizaron cruces sexuales y a los 14 días de haberse realizado la fertilización, se colectaron las ascosporas con agua estéril, se dejaron hidratando una noche y se activaron a 60°C por 30 minutos. Luego, de una dilución se plaquearon en un medio de cultivo para obtener colonias aisladas. Después de una incubación a 30°C por 40 horas, las ascosporas germinadas y las no germinadas se contaron bajo el microscopio. La crucea 1 se realizó entre las cepas silvestres RPNCR3A y 74-OR8-1a, la crucea 2 entre RPNCR3A y CNCKA-KA1 y la crucea 3 entre las dos cepas  $\Delta nox-2$  CNCKA-Z y CNCKA-KA1.

Cruza	Ascosporas contadas	% de germinación
1) WT X WT	336	55%
2) WT X $\Delta nox-2$	263	16%
3) $\Delta nox-2$ X $\Delta nox-2$	209 *	0%

(\*) Adicionalmente se sembraron aproximadamente 1800 ascosporas más del mismo lote, las cuales tampoco germinaron. También se probaron las ascosporas de otras cruces entre otras cepas  $\Delta nox-2$ .



WT X WT

*Δnox-2* X *Δnox-2*

**Figura 22. Las ascosporas de una cruza *Δnox-2/Δnox-2* no germinan.** Se realizaron cruza sexuales y a 14 los días de haberse realizado la fertilización, se colectaron las ascosporas con agua estéril, se dejaron hidratando una noche y se activaron a 60°C por 30 minutos. Luego se hizo una dilución conveniente y se plaquearon en un medio de cultivo sin higromicina. La fotografía se tomó a las 72 horas de incubación a 30°C. La cruza entre cepas silvestres (WT) se realizó con RPNCR3A y 74-OR8-1a y la cruza entre dos cepas *Δnox-2* con CNCKA-Z y CNCKA-KA1.



#### IV. DISCUSION.

- *N. crassa* posee dos genes *nox* que se expresan diferencialmente.

Hasta hace poco tiempo no se conocían las NADPH oxidasas (Nox) en microorganismos. El trabajo de Lara y colaboradores (2003) demostró que una mutante en la NADPH oxidasa NoxA en el hongo filamentoso *A. nidulans* estaba bloqueada en la formación de los cleistotecios, los cuerpos fructíferos en los que se desarrollan las ascosporas durante el ciclo sexual. Las Nox están presentes en los hongos filamentosos, pero ausentes en los hongos unicelulares como *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Candida albicans* y *Cryptococcus neoformans*. Las Nox de hongos son de una talla semejante a gp91phox (550-600 aa) y poseen una estructura de dominios similar. Algunos hongos como *A. nidulans* y *A. fumigatus* tienen una sola NADPH oxidasa, mientras que *Magnaporthe grisea*, *F. graminearum*, *P. chrysosporium* y *N. crassa* poseen dos Nox. El análisis filogenético (Lara-Ortiz *et al.*, 2003) de estas Nox mostró que forman dos grupos divergentes que se han clasificado como las subfamilias NoxA y NoxB (Fig. 7 y 8).

En este trabajo hemos abordado el análisis de NOX-2 de *N. crassa* para entender la función de esta enzima y las ERO que ella produce, en la fisiología del hongo. En eucariotes complejos, distintas NOX se expresan en diferentes tejidos. En nuestro trabajo hemos encontrado que el RNAm de *nox-2* se acumula en los conidios o esporas asexuales intactas y luego también se expresa en el micelio, con una tendencia al aumento durante la fase estacionaria del crecimiento. El RNAm de *nox-1* no está presente en los conidios intactos, a diferencia del micelio, donde sí se encuentra expresado (Fig. 9). No hemos visto ningún fenotipo de la cepa  $\Delta$ *nox-2* durante el crecimiento vegetativo, pero el hecho de que el RNAm de *nox-2* se acumule durante el crecimiento, sugiere que NOX-2 pueda tener alguna función en esas condiciones, que aún no hemos detectado.

Aunque el fenotipo de la mutante  $\Delta$ *nox-2* se manifiesta en el ciclo sexual, no fue posible extraer RNA de esas condiciones. Aparentemente las estructuras sexuales como los peritecios y las ascosporas son muy resistentes y la extracción del RNA resulta difícil. Será necesario optimizar las condiciones de extracción para verificar si el RNAm de *nox-2* está presente durante el ciclo sexual y en las ascosporas. En *A. nidulans* hay una fuerte inducción del gen *noxA* en condiciones de carencia de nitrógeno y también durante el ciclo

sexual, que se induce por privación de O<sub>2</sub> (Lara-Ortiz *et al.*, 2003). En *N. crassa* el ciclo sexual se induce en condiciones de bajo nitrógeno, por lo que es posible que *nox-2* se induzca por privación de nitrógeno.

Cuando revisamos la expresión de *nox-2* en algunas condiciones de estrés, encontramos que los niveles del RNAm de *nox-2* se abaten considerablemente en presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y menadiona, un agente productor de superóxido (Fig. 10a). Parece lógico que una célula reprima la expresión de una enzima que produce ERO en condiciones en que éstas están incrementadas, lo que pareciera una regulación negativa. En las células de mamíferos se ha encontrado también una regulación negativa mediada por las ERO, pero a nivel de la actividad de la NADPH oxidasa. Es conocido que la GTPasa Rac activa a la NADPH oxidasa, Kovacic y colaboradores (2001) probaron que en las células endoteliales el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> promueve la degradación proteolítica de Rac, y el DPI, un inhibidor de la NADPH oxidasa, bloquea dicha degradación (Kovacic *et al.*, 2001). Esto sugiere que en las células endoteliales las ERO producidas por una NADPH oxidasa disminuyen la estabilidad de Rac, una proteína que activa el ensamblaje y la función de la propia NADPH oxidasa. En el caso de *N. crassa* no conocemos otras proteínas que regulen a NOX-2, pero hemos visto que de manera análoga, las ERO apagan a la NADPH oxidasa, aunque a nivel de expresión genética. En *A. nidulans*, se sabe que la cinasa MAP SakA transduce señales de estrés oxidativo y reprime la expresión de *noxA* (Kawasaki *et al.*, 2002; Lara-Ortiz *et al.*, 2003). En condiciones restrictivas de carbono también hemos visto una disminución importante en el RNAm de *nox-2* (Fig. 10b). La limitación de carbono de alguna manera conduce al estrés oxidativo por la falta de poder reductor. Podría suceder que la expresión de *nox-2* dependa de un factor de transcripción inactivo en condiciones de oxidación. La baja disponibilidad de NADPH, el substrato de la reacción, también podría estar regulando la expresión del gen *nox-2*.

Por otro lado revisamos la acumulación del RNAm de *nox-1* en una mutante  $\Delta$ *nox-2* (Fig. 13) y encontramos que la falta de *nox-2* no altera los niveles de expresión de *nox-1*, por lo que creemos que estas dos NADPH oxidasas se regulan de manera independiente y ninguna parece estar supliendo la función de la otra.

- **Interrupción del gen *nox-2*.**

Para la interrupción del gen *nox-2* realizamos una transformación por fusión de protoplastos de *N. crassa*, según el método publicado por Pratt y Aramayo (2002). Ellos plantean que pueden mejorar la eficiencia de la transformación (30%) por 20 veces cuando emplean el gen tóxico *mat-a1* en el plásmido. En nuestro caso, aunque obtuvimos 20 transformantes, se analizaron 16, de las cuales sólo una tenía el evento esperado, por lo que la eficiencia fue del 6.25 %.

- **Detección de las proteínas Nox y de su actividad enzimática.**

Intentamos detectar las proteínas Nox con anticuerpos en extractos membranales de *N. crassa*, para posteriormente ensayar la inmunolocalización de las mismas. Empleamos anticuerpos contra las NADPH oxidasas de humano gp91*phox* (NOX2) y Mox1 (NOX1) (Santa Cruz Biotechnology), y encontramos que ambas reconocen proteínas diferentes, pero ninguna es NOX-2 (Fig. 16). Es necesario repetir estas determinaciones en una mutante  $\Delta$ *nox-1* para discernir si alguno de estos anticuerpos está reconociendo a NOX-1. Para medir la actividad enzimática de la NADPH oxidasa, empleamos la reducción de NBT en solución y en geles de poliacrilamida. Nuestros intentos por determinar la actividad en solución (Fig. 15) mostraron que una preparación membranal de *N. crassa* posee una actividad enzimática que reduce el NBT requiriendo NADPH ó NADH y que se inhibe por DPI y SOD. Por todas estas características pensábamos que se podía tratar de la actividad de la NADPH oxidasa NOX-1 ó NOX-2. Sin embargo, en una mutante  $\Delta$ *nox-2* no encontramos esta actividad disminuida, por lo que concluimos que la actividad que habíamos medido inicialmente no correspondía a NOX-2. Es posible que NOX-2 produzca muy poco superóxido, de manera que la técnica que estamos empleando para detectarla no sea suficientemente sensible. Se ha visto que las ERO que se producen con fines de señalización actúan a muy baja concentración (Cooper *et al.*, 2002). Por otro lado, podría ser que en las condiciones que hemos ensayado, aunque hay expresión del RNAm, no haya expresión de la proteína NOX-2. Ahora que hemos encontrado un fenotipo de la mutante

*Δnox-2* en el ciclo sexual, sería importante tratar de detectar la actividad de la proteína en esas condiciones y ensayar nuevos métodos para detectar ERO como es el colorante H<sub>2</sub>DCFDA que fluoresce al reaccionar con el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

*N. crassa* tiene otra NADPH oxidasa (NOX-1), por lo que no podemos descartar que esta Nox esté produciendo las ERO que hemos detectado o si provienen de otra fuente. En *A. nidulans* se encontró que las ERO que modificaban la actividad de algunas catalasas, eran inhibidas por el DPI (Navarro y Aguirre, datos no publicados), lo que indicó que este hongo podría tener una NADPH oxidasa. Sorpresivamente el mismo fenómeno se observó en la mutante *ΔnoxA*. Este hallazgo sugiere que hay otras fuentes de ERO en el hongo y que también se inhiben por el DPI. El DPI se ha empleado como inhibidor de las NADPH oxidasas, pero su especificidad no es absoluta. Este compuesto compite por el sitio de unión al FAD (O'Donnell *et al.*, 1993), por lo que también inhibe a otras flavoproteínas.

- **El ciclo sexual y la germinación de las ascosporas en *N. crassa*.**

Con el antecedente de que la NADPH oxidasa de *A. nidulans* era imprescindible para el ciclo sexual en este hongo (Lara-Ortiz *et al.*, 2003), decidimos analizar el ciclo sexual de una cepa *Δnox-2* de *N. crassa*. Encontramos que si se cruzan dos cepas *Δnox-2* se producen peritecios y ascosporas con morfología normal, pero luego, las ascosporas no germinan (Fig. 22). Este hallazgo explica por qué inicialmente habíamos encontrado una proporción tan baja de hijos mutantes en una cruce entre una cepa *Δnox-2* y una cepa silvestre. En estas cruces heterocigotas logramos encontrar muy pocos hijos (Tabla 1 y 2) después de haber sembrado miles de ascosporas. Nuestros resultados muestran que es muy difícil, aunque no imposible, germinar sin tener la NADPH oxidasa NOX-2. Una perspectiva muy interesante de este trabajo es probar si las ERO añadidas de forma exógena logran hacer germinar a las ascosporas. Si encontráramos algo así, podríamos conceder un papel directo a las ERO en la germinación.

En condiciones de limitación de nitrógeno *N. crassa* inicia el ciclo sexual con la producción de las estructuras sexuales femeninas llamadas protoperitecios. La fertilización se produce cuando el gameto masculino (generalmente conidios) del sexo opuesto se pone en contacto con la hifa tricógina que emana del protoperitecio. Entonces el protoperitecio aumenta de

tamaño y se transforma en el peritecio. Aquí ocurre la meiosis y la formación de ascosporas, que se almacenan en ascas y luego son disparadas fuera del peritecio.

Las proteínas G heterotriméricas transmiten señales externas a través de receptores de siete segmentos transmembranales que unen ligandos específicos, conduciendo a una gran variedad de respuestas fisiológicas. En *N. crassa* se ha encontrado la participación de las proteínas G en el ciclo sexual. *N. crassa* tiene tres genes que codifican las subunidades de la proteína G $\alpha$  (*gna-1*, 2 y 3) y uno de G $\beta$  (*gnb-1*). Una mutante  $\Delta$ *gna-1*, al igual que una mutante  $\Delta$ *gnb-1*, es infértil como hembra en una cruce sexual con una cepa silvestre, produciendo peritecios inmaduros y aberrantes (Ivey *et al.*, 1996; Yang *et al.*, 2002). La subunidad GNA-3 participa en la orientación de los peritecios, lo que es importante para la eficiente liberación de las ascosporas, ya que una mutante  $\Delta$ *gna-3* en una cruce homocigota o con una cepa silvestre, produce peritecios morfológicamente normales, pero sumergidos en el agar (Kays y Borkovich, 2004).

Las cascadas de cinasas MAP se han implicado en el control del crecimiento celular y de los procesos de diferenciación en diversos organismos eucariotes. Estas cascadas se inician con la activación de un receptor que conduce la señal río abajo y que conlleva a la fosforilación de una cinasa MPKKK, posteriormente a una cinasa MAPKK, que finalmente fosforila a una cinasa MAPK. La cinasa MAPK activada, fosforila a varias proteínas blanco que conducen a diversos eventos celulares. En hongos y levadura se ha encontrado que la vía de señalización por cinasas MAP regula diversos aspectos del ciclo sexual (Torres y Forman, 2003). En *N. crassa* se aisló una mutante en la cinasa MAPKKK NRC-1, que es homóloga a la cinasa STE11 y BYR2 de *S. cerevisiae* y *S. pombe*, respectivamente. En *N. crassa*, la mutante  $\Delta$ *nrc-1* es estéril cuando actúa como hembra en una cruce con una cepa silvestre, ya que no produce ni siquiera protoperitecios. Cuando esta cepa actúa como macho puede producir peritecios normales, pero las ascosporas  $\Delta$ *nrc-1* tienen una forma achatada peculiar y no germinan (Kothe y Free, 1998).

En este trabajo no encontramos diferencias en el comportamiento de una mutante  $\Delta$ *nox-2* si esta actúa como hembra o macho en una cruce sexual con una cepa silvestre, pero en cualquier caso las ascosporas mutantes tienen una muy baja frecuencia de germinación. En una cruce entre dos cepas  $\Delta$ *nox-2*, no encontramos ninguna ascospora que germinara. La interrupción  $\Delta$ *nox-2* no afecta la formación de peritecios y las ascosporas tienen una

morfología normal. La orientación de los peritecios en una mutante *Δnox-2* habría que analizarla con más profundidad. No hemos encontrado en la literatura una mutante con las características de *Δnox-2*, solamente afectada en la germinación de las ascosporas. Un dato importante es que las ascosporas de *N. crassa* requieren ser activadas por calor o algunas sustancias orgánicas para poder germinar. ¿Será posible que NOX-2 se active en esas condiciones?

- **¿Que función pueden tener las ERO producidas por NOX-2 durante la germinación de las ascosporas?**

Sabemos que NOX-2 se requiere para la viabilidad o la germinación de las ascosporas, pero no sabemos con exactitud que papel juegan allí las ERO producidas por esta Nox. Las esporas son estructuras latentes en las que el ciclo celular se encuentra detenido. Se conoce que las cascadas de cinasas MAP controlan el ciclo celular. Para la germinación es necesario liberar el bloqueo en el ciclo celular de las esporas. La NADPH oxidasa NOX-2 podría estar modulando alguna cascada de cinasas MAP que controle la germinación de las ascosporas. Se ha demostrado la participación de la NADPH oxidasa NOX4 en la inactivación de la fosfatasa PTP1b en la vía de señalización de la insulina en adipocitos (Mahadev *et al.*, 2004). NOX-2 podría actuar inactivando alguna fosfatasa de tirosina sensible a la oxidación, afectando así una cascada de cinasas MAP. Las fosfatasas de tirosina tienen una cisteína en el sitio activo que se puede oxidar y de esta manera se inactiva la enzima.

También se ha demostrado que en *A. thaliana* las ERO generadas por una NADPH oxidasa activan canales de calcio. En *A. nidulans* el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induce la movilización del calcio intracelular (Greene *et al.* 2002), por lo cual éste podría ser otro mecanismo mediante el cual NOX-2 regula la germinación o la viabilidad de las ascosporas.

Debido a las características morfológicas aparentemente normales de las ascosporas mutantes y porque algunas pocas ascosporas *Δnox-2* provenientes de cruza heterocigotas han podido germinar, proponemos una función reguladora para NOX-2, más que una estructural. Sin embargo, no podemos descartar que las ERO producidas por NOX-2 puedan contribuir a la morfología normal de la ascospora. En *C. elegans* las ERO

producidas por una DOUX estabilizan la matriz extracelular de la cutícula del gusano (Edens *et al.*, 2001). Es posible que una ascospora  $\Delta nox-2$  esté dañada en algún aspecto morfológico indistinguible para nosotros.

Para completar el estudio del papel de las NADPH oxidasas en el hongo *N. crassa* establecimos una estrategia para interrumpir el gen *nox-1*. Se obtuvo el plásmido pNCKA-8 en un trabajo conjunto con la alumna de Licenciatura en Biología Nallely Cano (Facultad de Ciencias, UNAM) y transformamos una cepa de *N. crassa*. Actualmente las transformantes obtenidas están siendo analizadas. La caracterización de una mutante  $\Delta nox-1$  e incluso la obtención de un doble mutante  $\Delta nox-1\Delta nox-2$  permitirá un análisis más completo de la función de estas dos enzimas en la diferenciación de este hongo. Por otro lado, también se podrá discriminar el origen de las ERO que hemos detectado en este trabajo y que no parecen provenir de NOX-2.

En 1990 Aguirre y Hansberg publicaron un trabajo sobre el papel de las ERO en la diferenciación de microorganismos. En él, proponen a la diferenciación como un proceso que se lleva a cabo en respuesta a un estado hiperoxidante. Nuestro trabajo muestra que las ascosporas de una cepa que carece de una enzima que produce ERO no pueden germinar, sugiriendo que también se requiere de las ERO para regresar del estado diferenciado al estado de crecimiento. En *N. crassa* hay diversas evidencias de que se producen ERO en las etapas de diferenciación del ciclo asexual (Hansberg *et al.*, 1993; Hansberg, 1996; Lledias *et al.*, 1999; Michan *et al.*, 2003). El ciclo sexual no ha sido estudiado en este sentido, siendo éste el primer trabajo que relaciona las ERO con el ciclo sexual en este hongo.

## V. CONCLUSIONES

- *N. crassa* posee dos genes que codifican para las NADPH oxidasas NOX-1 y NOX-2 que se expresan de manera diferencial en las esporas asexuales y durante el crecimiento.
- El nivel de RNAm de *nox-2* se regula negativamente en condiciones de elevación de especies reactivas del oxígeno y en carencia o fuentes pobres de carbono.
- La interrupción del gen *nox-2* no afecta notablemente ni el crecimiento vegetativo ni la reproducción asexual en *N. crassa*.
- No detectamos la actividad enzimática de NOX-2 por reducción de NBT en las condiciones ensayadas, pero encontramos otras actividades en la célula capaces de reducir al NBT.
- Dos anticuerpos contra NADPH oxidasas humanas no reconocen a NOX-2 en las condiciones ensayadas, pero reconocen otras proteínas. Posiblemente NOX-1 sea una de ellas.
- La proteína NOX-2 no se requiere para la formación de los cuerpos fructíferos (peritecios) ni las ascosporas, pero es esencial para la viabilidad o la germinación de éstas.



## VI. REFERENCIAS

- Ago, T., Kuribayashi, F., Hiroaki, H., Takeya, R., Ito, T., Kohda, D., and Sumimoto, H. (2003) **Phosphorylation of p47phox directs phox homology domain from SH3 domain toward phosphoinositides, leading to phagocyte NADPH oxidase activation.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 4474-4479.
- Aguirre, J., and Hansberg, W. (1986) **Oxidation of *Neurospora crassa* glutamine synthetase.** *J Bacteriol* 166: 1040-1045.
- Aguirre, J., Rodriguez, R., and Hansberg, W. (1989) **Oxidation of *Neurospora crassa* NADP-specific glutamate dehydrogenase by activated oxygen species.** *J Bacteriol* 171: 6243-6250.
- Babior, B.M. (1999) **NADPH oxidase: an update.** *Blood* 93: 1464-1476.
- Babior, B.M. (2002) **The leukocyte NADPH oxidase.** *Isr Med Assoc J* 4: 1023-1024.
- Babior, B.M., Lambeth, J.D., and Nauseef, W. (2002) **The neutrophil NADPH oxidase.** *Arch Biochem Biophys* 397: 342-344.
- Babior, B.M. (2004) **NADPH oxidase.** *Curr Opin Immunol* 16: 42-47.
- Banfi, B., Maturana, A., Jaconi, S., Arnaudeau, S., Laforge, T., Sinha, B., Ligeti, E., Demaurex, N., and Krause, K.H. (2000) **A mammalian H<sup>+</sup> channel generated through alternative splicing of the NADPH oxidase homolog NOH-1.** *Science* 287: 138-142.
- Banfi, B., Molnar, G., Maturana, A., Steger, K., Hegedus, B., Demaurex, N., and Krause, K.H. (2001) **A Ca<sup>2+</sup>-activated NADPH oxidase in testis, spleen, and lymph nodes.** *J Biol Chem* 276: 37594-37601.
- Banfi, B., Clark, R.A., Steger, K., and Krause, K.H. (2003) **Two novel proteins activate superoxide generation by the NADPH oxidase NOX1.** *J Biol Chem* 278: 3510-3513.
- Banfi, B., Tirone, F., Durussel, I., Knisz, J., Moskwa, P., Molnar, G.Z., Krause, K.H., and Cox, J.A. (2004) **Mechanism of Ca<sup>2+</sup> activation of the NADPH oxidase NOX5.** *J Biol Chem*.
- Berlett, B.S., and Stadtman, E.R. (1997) **Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress.** *J Biol Chem* 272: 20313-20316.
- Biberstine-Kinkade, K.J., DeLeo, F.R., Epstein, R.I., LeRoy, B.A., Nauseef, W.M., and Dinauer, M.C. (2001) **Heme-ligating histidines in flavocytochrome b(558): identification of specific histidines in gp91(phox).** *J Biol Chem* 276: 31105-31112.
- Bloomfield, G., and Pears, C. (2003) **Superoxide signalling required for multicellular development of *Dictyostelium*.** *J Cell Sci* 116: 3387-3397.
- Bolotina, V.M., Najibi, S., Palacino, J.J., Pagano, P.J., and Cohen, R.A. (1994) **Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle.** *Nature* 368: 850-853.
- Boraso, A., and Williams, A.J. (1994) **Modification of the gating of the cardiac sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-release channel by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and dithiothreitol.** *Am J Physiol* 267: H1010-1016.
- Borkovich, K.A., Alex, L.A., Yarden, O., Freitag, M., Turner, G.E., Read, N.D., Seiler, S., Bell-Pedersen, D., Paietta, J., Plesofsky, N., Plamann, M., Goodrich-Tanrikulu, M., Schulte, U., Mannhaupt, G., Nargang, F.E., Radford, A., Selitrennikoff, C., Galagan, J.E., Dunlap, J.C., Loros, J.J., Catcheside,

- D., Inoue, H., Aramayo, R., Polymenis, M., Selker, E.U., Sachs, M.S., Marzluf, G.A., Paulsen, I., Davis, R., Ebbole, D.J., Zelter, A., Kalkman, E.R., O'Rourke, R., Bowring, F., Yeadon, J., Ishii, C., Suzuki, K., Sakai, W., and Pratt, R. (2004) **Lessons from the genome sequence of *Neurospora crassa*: tracing the path from genomic blueprint to multicellular organism.** *Microbiol Mol Biol Rev* 68: 1-108, table of contents.
- Brakemeier, S., Eichler, I., Knorr, A., Fassheber, T., Kohler, R., and Hoyer, J. (2003) **Modulation of Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel in renal artery endothelium in situ by nitric oxide and reactive oxygen species.** *Kidney Int* 64: 199-207.
- Brar, S.S., Corbin, Z., Kennedy, T.P., Hemendinger, R., Thornton, L., Bommarium, B., Arnold, R.S., Whorton, A.R., Sturrock, A.B., Huecksteadt, T.P., Quinn, M.T., Krenitsky, K., Ardie, K.G., Lambeth, J.D., and Hoidal, J.R. (2003) **NOX5 NAD(P)H oxidase regulates growth and apoptosis in DU 145 prostate cancer cells.** *Am J Physiol Cell Physiol* 285: C353-369.
- Broillet, M.C. (2000) **A single intracellular cysteine residue is responsible for the activation of the olfactory cyclic nucleotide-gated channel by NO.** *J Biol Chem* 275: 15135-15141.
- Cadenas, E., and Davies, K.J. (2000) **Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging.** *Free Radic Biol Med* 29: 222-230.
- Cai, H., Griendling, K.K., and Harrison, D.G. (2003) **The vascular NAD(P)H oxidases as therapeutic targets in cardiovascular diseases.** *Trends Pharmacol Sci* 24: 471-478.
- Cheng, G., Cao, Z., Xu, X., Meir, E.G., and Lambeth, J.D. (2001) **Homologs of gp91phox: cloning and tissue expression of Nox3, Nox4, and Nox5.** *Gene* 269: 131-140.
- Cooper, C.E., Patel, R.P., Brookes, P.S., and Darley-Usmar, V.M. (2002) **Nanotransducers in cellular redox signaling: modification of thiols by reactive oxygen and nitrogen species.** *Trends Biochem Sci* 27: 489-492.
- Dangl, J.L., and Jones, J.D. (2001) **Plant pathogens and integrated defence responses to infection.** *Nature* 411: 826-833.
- Davies, K.J. (1995) **Oxidative stress: the paradox of aerobic life.** *Biochem Soc Symp* 61: 1-31.
- Davis, A.R., Mascolo, P.L., Bunger, P.L., Sipes, K.M., and Quinn, M.T. (1998) **Cloning and sequencing of the bovine flavocytochrome b subunit proteins, gp91-phox and p22-phox: comparison with other known flavocytochrome b sequences.** *J Leukoc Biol* 64: 114-123.
- Davis, R.H., and de Serres, F.J. (1970) **Genetic and microbiological research techniques for *Neurospora crassa*.** *Methods Enzymol* 17: 79-143.
- Davis, R.H., and Perkins, D.D. (2002) **Timeline: *Neurospora*: a model of model microbes.** *Nat Rev Genet* 3: 397-403.
- Dev, K., and Maheshwari, R. (2003) **Silencing of hygromycin phosphotransferase (hph) gene during sexual cycle and its reversible inactivation in heterokaryon of *Neurospora crassa*.** *Curr Microbiol* 47: 220-225.
- Dinauer, M.C., Orkin, S.H., Brown, R., Jesaitis, A.J., and Parkos, C.A. (1987) **The glycoprotein encoded by the X-linked chronic granulomatous disease locus is a component of the neutrophil cytochrome b complex.** *Nature* 327: 717-720.
- Droge, W. (2002) **Free radicals in the physiological control of cell function.** *Physiol Rev* 82: 47-95.

- Dupuy, C., Ohayon, R., Valent, A., Noel-Hudson, M.S., Deme, D., and Virion, A. (1999) **Purification of a novel flavoprotein involved in the thyroid NADPH oxidase. Cloning of the porcine and human cDNAs.** *J Biol Chem* 274: 37265-37269.
- Edens, W.A., Sharling, L., Cheng, G., Shapira, R., Kinkade, J.M., Lee, T., Edens, H.A., Tang, X., Sullards, C., Flaherty, D.B., Benian, G.M., and Lambeth, J.D. (2001) **Tyrosine cross-linking of extracellular matrix is catalyzed by Duox, a multidomain oxidase/oxidoreductase with homology to the phagocyte oxidase subunit gp91phox.** *J Cell Biol* 154: 879-891.
- Enroth, C., Eger, B.T., Okamoto, K., Nishino, T., and Pai, E.F. (2000) **Crystal structures of bovine milk xanthine dehydrogenase and xanthine oxidase: structure-based mechanism of conversion.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 10723-10728.
- Finkel, T. (2003) **Oxidant signals and oxidative stress.** *Curr Opin Cell Biol* 15: 247-254.
- Foreman, J., Demidchik, V., Bothwell, J.H., Mylona, P., Miedema, H., Torres, M.A., Linstead, P., Costa, S., Brownlee, C., Jones, J.D., Davies, J.M., and Dolan, L. (2003) **Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulate plant cell growth.** *Nature* 422: 442-446.
- Foster, M.W., McMahon, T.J., and Stamler, J.S. (2003) **S-nitrosylation in health and disease.** *Trends Mol Med* 9: 160-168.
- Galagan, J.E.e.a. (2003) **The genome sequence of the filamentous fungus *Neurospora crassa*.** *Nature* 422: 859-868.
- Garcia, M.X., Alexander, H., Mahadeo, D., Cotter, D.A., and Alexander, S. (2003) **The *Dictyostelium discoideum* prespore-specific catalase B functions to control late development and to protect spore viability.** *Biochim Biophys Acta* 1641: 55-64.
- Geiszt, M., Kopp, J.B., Varnai, P., and Leto, T.L. (2000) **Identification of renox, an NAD(P)H oxidase in kidney.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 8010-8014.
- Geiszt, M., Kapus, A., and Ligeti, E. (2001) **Chronic granulomatous disease: more than the lack of superoxide?** *J Leukoc Biol* 69: 191-196.
- Geiszt, M., Lekstrom, K., Witta, J., and Leto, T.L. (2003) **Proteins homologous to p47phox and p67phox support superoxide production by NAD(P)H oxidase 1 in colon epithelial cells.** *J Biol Chem* 278: 20006-20012.
- Greene V, Cao H, Schanne FA, Bartelt DC. (2002) **Oxidative stress-induced calcium signalling in *Aspergillus nidulans*.** *Cell Signal.* May;14(5):437-43.
- Groom, Q.J., Torres, M.A., Fordham-Skelton, A.P., Hammond-Kosack, K.E., Robinson, N.J., and Jones, J.D. (1996) **rbohA, a rice homologue of the mammalian gp91phox respiratory burst oxidase gene.** *Plant J* 10: 515-522.
- Halliwell, B., and Gutteridge, J.M.C. (1999) **Free radicals in biology and medicine.** Oxford ; New York: Oxford University Press.
- Hansberg, W., and Aguirre, J. (1990) **Hyperoxidant states cause microbial cell differentiation by cell isolation from dioxygen.** *J Theor Biol* 142: 201-221.
- Hansberg, W., de Groot, H., and Sies, H. (1993) **Reactive oxygen species associated with cell differentiation in *Neurospora crassa*.** *Free Radic Biol Med* 14: 287-293.

- Hansberg, W. (1996) **A hyperoxidant state at the start of each developmental stage during *Neurospora crassa* conidiation.** *Cienc Cult* 48: 67-74.
- Harrison, D.G., Cai, H., Landmesser, U., and Griendling, K.K. (2003) **Interactions of angiotensin II with NAD(P)H oxidase, oxidant stress and cardiovascular disease.** *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 4: 51-61.
- Hoyal, C.R., Gutierrez, A., Young, B.M., Catz, S.D., Lin, J.H., Tschlis, P.N., and Babior, B.M. (2003) **Modulation of p47PHOX activity by site-specific phosphorylation: Akt-dependent activation of the NADPH oxidase.** *Proc Natl Acad Sci US A* 100: 5130-5135.
- Ignarro, L.J. (1990) **Nitric oxide. A novel signal transduction mechanism for transcellular communication.** *Hypertension* 16: 477-483.
- Ignarro, L.J. (1991) **Signal transduction mechanisms involving nitric oxide.** *Biochem Pharmacol* 41: 485-490.
- Ivey, F.D., Hodge, P.N., Turner, G.E., and Borkovich, K.A. (1996) **The G alpha i homologue gna-1 controls multiple differentiation pathways in *Neurospora crassa*.** *Mol Biol Cell* 7: 1283-1297.
- Kawasaki, L., Sanchez, O., Shiozaki, K., and Aguirre, J. (2002) **SakA MAP kinase is involved in stress signal transduction, sexual development and spore viability in *Aspergillus nidulans*.** *Mol Microbiol* 45: 1153-1163.
- Kays, A.M., and Borkovich, K.A. (2004) **Severe impairment of growth and differentiation in a *Neurospora crassa* mutant lacking all heterotrimeric G alpha proteins.** *Genetics* 166: 1229-1240.
- Keller, T., Damude, H.G., Werner, D., Doerner, P., Dixon, R.A., and Lamb, C. (1998) **A plant homolog of the neutrophil NADPH oxidase gp91phox subunit gene encodes a plasma membrane protein with Ca<sup>2+</sup> binding motifs.** *Plant Cell* 10: 255-266.
- Kochevar, I.E. (2004) **Singlet oxygen signaling: from intimate to global.** *Sci STKE* 2004: pe7.
- Kothe, G.O., and Free, S.J. (1998) **The isolation and characterization of nrc-1 and nrc-2, two genes encoding protein kinases that control growth and development in *Neurospora crassa*.** *Genetics* 149: 117-130.
- Kovacic, H.N., Irani, K., and Goldschmidt-Clermont, P.J. (2001) **Redox regulation of human Rac1 stability by the proteasome in human aortic endothelial cells.** *J Biol Chem* 276: 45856-45861.
- Kwak, J.M., Mori, I.C., Pei, Z.-M., Leonhardt, N., Torres, M.A., Dangl, J.L., Bloom, R.E., Bodde, S., Jones, J.D.G., and Schroeder, J.I. (2003) **NADPH oxidase AtrbohD and AtrbohF genes function in ROS-dependent ABA signaling in *Arabidopsis*.** *EMBO J.* 22: 2623-2633.
- Lalucque, H., and Silar, P. (2003) **NADPH oxidase: an enzyme for multicellularity?** *Trends Microbiol* 11: 9-12.
- Lambeth, J.D., Cheng, G., Arnold, R.S., and Edens, W.A. (2000) **Novel homologs of gp91phox.** *Trends Biochem Sci* 25: 459-461.
- Lara-Ortiz, T., Riveros-Rosas, H., and Aguirre, J. (2003) **Reactive oxygen species generated by microbial NADPH oxidase NoxA regulate sexual development in *Aspergillus nidulans*.** *Mol Microbiol* 50: 1241-1255.

- Lehninger, A.L., Nelson, D.L., and Cox, M.M. (2000) *Lehninger principles of biochemistry*. New York: Worth Publishers.
- Li, J.M., and Shah, A.M. (2003) **ROS generation by nonphagocytic NADPH oxidase: potential relevance in diabetic nephropathy.** *J Am Soc Nephrol* 14: S221-226.
- Lledias, F., and Hansberg, W. (1999) **Oxidation of human catalase by singlet oxygen in myeloid leukemia cells.** *Photochem Photobiol* 70: 887-892.
- Lledias, F., Rangel, P., and Hansberg, W. (1999) **Singlet oxygen is part of a hyperoxidant state generated during spore germination.** *Free Radic Biol Med* 26: 1396-1404.
- Lledias, F., and Hansberg, W. (2000) **Catalase modification as a marker for singlet oxygen.** *Methods Enzymol* 319: 110-119.
- Loubradou, G., and Turcq, B. (2000) **Vegetative incompatibility in filamentous fungi: a round about way of understanding the phenomenon.** *Res Microbiol* 151: 239-245.
- Mahadev, K., Motoshima, H., Wu, X., Ruddy, J.M., Arnold, R.S., Cheng, G., Lambeth, J.D., and Goldstein, B.J. (2004) **The NAD(P)H oxidase homolog Nox4 modulates insulin-stimulated generation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and plays an integral role in insulin signal transduction.** *Mol Cell Biol* 24: 1844-1854.
- Martindale, J.L., and Holbrook, N.J. (2002) **Cellular response to oxidative stress: signaling for suicide and survival.** *J Cell Physiol* 192: 1-15.
- Martinez, G.R., Loureiro, A.P., Marques, S.A., Miyamoto, S., Yamaguchi, L.F., Onuki, J., Almeida, E.A., Garcia, C.C., Barbosa, L.F., Medeiros, M.H., and Di Mascio, P. (2003) **Oxidative and alkylating damage in DNA.** *Mutat Res* 544: 115-127.
- Matalon, S., Hardiman, K.M., Jain, L., Eaton, D.C., Kotlikoff, M., Eu, J.P., Sun, J., Meissner, G., and Stamler, J.S. (2003) **Regulation of ion channel structure and function by reactive oxygen-nitrogen species.** *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 285: L1184-1189.
- McCluskey, K. (2003) **The Fungal Genetics Stock Center: from molds to molecules.** *Adv Appl Microbiol* 52: 245-262.
- McCord, J.M. (2000) **The evolution of free radicals and oxidative stress.** *Am J Med* 108: 652-659.
- Meier, B., Jesaitis, A.J., Emmendorffer, A., Roesler, J., and Quinn, M.T. (1993) **The cytochrome b-558 molecules involved in the fibroblast and polymorphonuclear leucocyte superoxide-generating NADPH oxidase systems are structurally and genetically distinct.** *Biochem J* 289 ( Pt 2): 481-486.
- Michan, S., Lledias, F., Baldwin, J.D., Natvig, D.O., and Hansberg, W. (2002) **Regulation and oxidation of two large monofunctional catalases.** *Free Radic Biol Med* 33: 521-532.
- Michan, S., Lledias, F., and Hansberg, W. (2003) **Asexual development is increased in *Neurospora crassa* cat-3-null mutant strains.** *Eukaryot Cell* 2: 798-808.
- Moncada, S., and Higgs, E.A. (1995) **Molecular mechanisms and therapeutic strategies related to nitric oxide.** *FASEB J* 9: 1319-1330.
- Morad, M., and Suzuki, Y.J. (2000) **Redox regulation of cardiac muscle calcium signaling.** *Antioxid Redox Signal* 2: 65-71.

- Moreno, J.C., Bikker, H., Kempers, M.J., van Trotsenburg, A.S., Baas, F., de Vijlder, J.J., Vulsma, T., and Ris-Stalpers, C. (2002) **Inactivating mutations in the gene for thyroid oxidase 2 (THOX2) and congenital hypothyroidism.** *N Engl J Med* 347: 95-102.
- O'Donnell, B.V., Tew, D.G., Jones, O.T., and England, P.J. (1993) **Studies on the inhibitory mechanism of iodonium compounds with special reference to neutrophil NADPH oxidase.** *Biochem J* 290 ( Pt 1): 41-49.
- Osiewacz, H.D. (2002) **Mitochondrial functions and aging.** *Gene* 286: 65-71.
- Paffenholz, R., Bergstrom, R.A., Pasutto, F., Wabnitz, P., Munroe, R.J., Jagla, W., Heinzmann, U., Marquardt, A., Bareiss, A., Laufs, J., Russ, A., Stumm, G., Schimenti, J.C., and Bergstrom, D.E. (2004) **Vestibular defects in head-tilt mice result from mutations in Nox3, encoding an NADPH oxidase.** *Genes Dev* 18: 486-491.
- Pallister, C.J., and Hancock, J.T. (1995) **Phagocytic NADPH oxidase and its role in chronic granulomatous disease.** *Br J Biomed Sci* 52: 149-156.
- Perkins, D.D., and Davis, R.H. (2000) **Neurospora at the millennium.** *Fungal Genet Biol* 31: 153-167.
- Pratt, R.J., and Aramayo, R. (2002) **Improving the efficiency of gene replacements in *Neurospora crassa*: a first step towards a large-scale functional genomics project.** *Fungal Genet Biol* 37: 56-71.
- Reeves, E.P., Lu, H., Jacobs, H.L., Messina, C.G., Bolsover, S., Gabella, G., Potma, E.O., Warley, A., Roes, J., and Segal, A.W. (2002) **Killing activity of neutrophils is mediated through activation of proteases by K<sup>+</sup> flux.** *Nature* 416: 291-297.
- Sagi, M., and Fluhr, R. (2001) **Superoxide production by plant homologues of the gp91(phox) NADPH oxidase. Modulation of activity by calcium and by tobacco mosaic virus infection.** *Plant Physiol* 126: 1281-1290.
- Saitoh, M., Nishitoh, H., Fujii, M., Takeda, K., Tobiume, K., Sawada, Y., Kawabata, M., Miyazono, K., and Ichijo, H. (1998) **Mammalian thioredoxin is a direct inhibitor of apoptosis signal-regulating kinase (ASK) 1.** *Embo J* 17: 2596-2606.
- Sambrook, J., and Russell, D.W. (2001) **Molecular cloning: a laboratory manual.** Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sauer, H., Wartenberg, M., and Hescheler, J. (2001) **Reactive oxygen species as intracellular messengers during cell growth and differentiation.** *Cell Physiol Biochem* 11: 173-186.
- Shimohama, S., Tanino, H., Kawakami, N., Okamura, N., Kodama, H., Yamaguchi, T., Hayakawa, T., Nunomura, A., Chiba, S., Perry, G., Smith, M.A., and Fujimoto, S. (2000) **Activation of NADPH oxidase in Alzheimer's disease brains.** *Biochem Biophys Res Commun* 273: 5-9.
- Shiose, A., Kuroda, J., Tsuruya, K., Hirai, M., Hirakata, H., Naito, S., Hattori, M., Sakaki, Y., and Sumimoto, H. (2001) **A novel superoxide-producing NAD(P)H oxidase in kidney.** *J Biol Chem* 276: 1417-1423.
- Stadtman, E.R., and Berlett, B.S. (1998) **Reactive oxygen-mediated protein oxidation in aging and disease.** *Drug Metab Rev* 30: 225-243.
- Stamler, J.S., Lamas, S., and Fang, F.C. (2001) **Nitrosylation. the prototypic redox-based signaling mechanism.** *Cell* 106: 675-683.

- Suh, Y.A., Arnold, R.S., Lassegue, B., Shi, J., Xu, X., Sorescu, D., Chung, A.B., Griending, K.K., and Lambeth, J.D. (1999) **Cell transformation by the superoxide-generating oxidase Mox1.** *Nature* 401: 79-82.
- Sumbayev, V.V. (2003) **S-nitrosylation of thioredoxin mediates activation of apoptosis signal-regulating kinase 1.** *Arch Biochem Biophys* 415: 133-136.
- Suzuki, Y.J., Forman, H.J., and Sevanian, A. (1997) **Oxidants as stimulators of signal transduction.** *Free Radic Biol Med* 22: 269-285.
- Suzuki, Y.J., Cleemann, L., Abernethy, D.R., and Morad, M. (1998) **Glutathione is a cofactor for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-mediated stimulation of Ca<sup>2+</sup>-induced Ca<sup>2+</sup> release in cardiac myocytes.** *Free Radic Biol Med* 24: 318-325.
- Takeya, R., Ueno, N., Kami, K., Taura, M., Kohjima, M., Izaki, T., Nunoi, H., and Sumimoto, H. (2003) **Novel human homologues of p47phox and p67phox participate in activation of superoxide-producing NADPH oxidases.** *J Biol Chem* 278: 25234-25246.
- Torres, M., and Forman, H.J. (2003) **Redox signaling and the MAP kinase pathways.** *Biofactors* 17: 287-296.
- Torres, M.A., Dangl, J.L., and Jones, J.D. (2002) **Arabidopsis gp91phox homologues AtrbohD and AtrbohF are required for accumulation of reactive oxygen intermediates in the plant defense response.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 517-522.
- Ueda, S., Masutani, H., Nakamura, H., Tanaka, T., Ueno, M., and Yodoi, J. (2002) **Redox control of cell death.** *Antioxid Redox Signal* 4: 405-414.
- Varela D, Simon F, Riveros A, Jorgensen F, Stutzin A. (2004) **NAD(P)H oxidase-derived H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> signals chloride channel activation in cell volume regulation and cell proliferation.** *J Biol Chem.* Apr 2;279(14):13301-4.
- Vignais, P.V. (2002) **The superoxide-generating NADPH oxidase: structural aspects and activation mechanism.** *Cell Mol Life Sci* 59: 1428-1459.
- Yang, Q., Poole, S.I., and Borkovich, K.A. (2002) **A G-protein beta subunit required for sexual and vegetative development and maintenance of normal G alpha protein levels in *Neurospora crassa*.** *Eukaryot Cell* 1: 378-390.
- Yang, S., Madyastha, P., Bingel, S., Ries, W., and Key, L. (2001) **A new superoxide-generating oxidase in murine osteoclasts.** *J Biol Chem* 276: 5452-5458.
- Zekry, D., Epperson, T.K., and Krause, K.H. (2003) **A role for NOX NADPH oxidases in Alzheimer's disease and other types of dementia?** *IUBMB Life* 55: 307-313.

1 CGATGGTACCGGACGGCAACGACTTGCCGGCGTTGGGACCTTGTGTGCCCGGCTCATCGG  
61 GCTGACCCTCCCCGCGTTACGCTAGTTGTGGTCATGCTGAAGAGTGACCCAGGGCATGC  
121 ATGCTTCCAAGTCTCAAACTGAACTGAGGCGATAACGGGCTGGTTTGAGAGTTCGGCGC  
(KpNOX-2)  
181 TTAGAAGTTTGGGTTGAGGTTGCACGGGATCGAGCCCGTACAATGAACAATAACCCGATG  
241 GCAACAAGGCCTCCTTCATGGTTGTTGCGCTTTGGAATCGAAAACCAAACCAGACATTTA  
301 CCAAAAGCACGAACCAGTTCTTGATTCCGGTGTCCAGATCTGATCATGGAACAATCCAAA  
361 TTTGAATGGAGAACCTAAGGGTTGCGAAGACGTCTCTTTCTGGGCATTGCAATGCTTCAG  
421 TTGAGACTCGCTGCTCGGGCCTTGAGAGAGCCCCTAAAGTAGAACGCCAAGACTTGCAAG  
481 ACTCCCCTATCAAATGTGTATGATCCTGGCCGAAACGGGGAATGCAACACGGGCTGAAC  
541 CGAATGAGCAGCCTTTGACCAATCACAGCACAGTAGCATGATCTTTATGGGGTCTCTGAG  
601 CCAATGTGGCCATGTCTCCAAGTCTCAGAGTCTTTGCAGTCTTCAAGTTCAGTTGTCTG  
661 TGTGTCTCCGTCTCCGAACAACGTAACGTCTTGATCCCATCCGCTCGACCGGGCAGTC  
721 TACCAAAGAGTACGGTCTGAAGCATATTGGTTCAGACAGGAGAAGCTGGTTATGCATCCA  
781 GAATGGCGCCATATATTACCTGCCACTTCACGCCAGGCACTTCTCTTGTAGGTTGCTGCC  
841 GCGAATGCCCTGTTCAAACACACTGGTCTTCTCGGGCGCCACACGAGGCACAGAAACAG  
901 ATCTCGGCGTTAAAGCGACTTGACTGGAGAGACACGGAAAACCTGCCGTCCGGTTCGAGTC  
961 ACTTGTGTGTTCATTTCGCTGTGGCGGGCACTAAAGCACTGAGAGTGCCTGGTGTCTCC  
1021 GTGGTAGCACCCATTGCTTGCTAACAACGCCAGTGACACGTTTCGGCAGGGTCGCTCGTTT  
1081 CAACACTGACGAGCCTGGGTCTGAAGTTGCATAGGATCCCATGCTTTTCGATCATTCGATT  
1141 TTCTCGGTTTTCTTTTTCTCATTTCTCTTTGATGGTCCCCTGAAAAGCCCCTGGGAGGTTT  
1201 CAGACTTGGGAAAGCCTCAGTCCCTGGTCCATACAACTCTACGTCACTTCAGTCTGTGCC  
1261 CCCAAACACTCTGTGAGTCATTTCTTCTGCTTGTTTATTCTGTTGCCCTCTTTCTCTT  
1321 TTCATCTACTGAGTTAACACACTTTGGGTGTTTTTGGCATTGAGGCTTCCGTTCTCGGG  
1381 TAGGTGAAAGAGAAACAAGCCGCCAGGTGCAGGCATTTCGTAGTACAGGTATGATGTACCA  
1441 GAAATCGCCTCATGTTTTATGATTCTCCGACTTTGGTCCGCTTGGGGCACTGTCTTAACC  
1501 ATATCCTTCTCCACATCCCGTGCTCCGCCTAGCCTCTTTCCCTTTTCTGCAGAGGTTT  
1561 ATTCACTTGGAGCTTGAATTGCTGACCGACACCCTTTAACGTGGCAGTTACAGGCTCA  
1621 TACCATTACATTTCTTTCACAGACAATCTTGTTATCATTCTCGTCTCTCACTCACTTAATA  
1681 CTCGTGTCTCTCGATCAGTTCAGCAGGCTCTGACTCCCAGGACCAATCCATCAGAATTC  
1741 AACAACTATTTGCAACTTGCTTGAGTGGAAACGGAAAGACGAAACCTCCTACCAGGGGGT  
1801 CTACGACGACATACATCTGAAGGGCTGAGAAGGGAGTGAATTTGTCAAGTTCGACGGAGA  
1861 CAAGGGTTGGAATACGAACATCACACACAAATATTGCGACGACAACGAAAGCAAAACACC

1 M S Y G G Y D L Y R S N T D S S I E K  
1921 CAAGATGAGTTACGGAGGGTACGACCTGTACAGGTGCAACACGGATTTCGTGATCGAAA

20 P S E R S R W T P L T R M L L S G E M T  
1981 GCCGTGAGAGGTTCAAGATGGACGCCACTTACTCGCATGCTACTGTGGGTGAAATGAC

40 Q E R Q K E L S P R E K F D R W M V N E  
2041 GCAGGAAAGGCAAAGGAGCTGAGTCCAAGGGAAAAGTTCGACCGATGGATGGTCAACGA

60 G Y R R I  
2101 AGGCTATCGACGAATgtaagcacaacctttactgtcccttggaccgccgatggcttgtt  
(nox2-1)

65 F V F V F M V L  
2161 gggacgaggaagagaatggaatgctgactgttacagCTTCGTCTTCGTCTTTATGGTGC

73 H A I V F A F G F V N Y A V K D N L Q I  
2221 TCCACGCCATCGTCTTTGCCTTTGGCTTCGTTAACTACGCCGTCAAAGACAACCTACAAA

93 A R D T F G P T Y M I A R S A A L V L H  
2281 TAGCGCGGGATACGTTTGGACCGACATATATGATTGCAAGATCGGCAGCGCTGGTTCTGC



113 V D V A L V L F P V C R T L I S L A R Q  
2341 ACGTCGATGTTGCCCTGGTCCTTTTCCCCGTCTGCCGAACGCTCATCTCGCTCGCAAGAC

133 T P L N G I I Q F D K N I T F H I T T A  
2401 AGACTCCTCTGAACGGCATCATCCAATTCGACAAGAACATTACCTTCCACATCACGACAG

153 W S I F F W S W V H T I A H W N N F A Q  
2461 CATGGTCCATCTTCTTCTGGTCTGGGTGCACACCATTGCCCACTGGAACAACCTTTGCC

173 I A A K N N L G I Y G W L L A N F V S G  
2521 AGATTGCAGCCAAGAACAACCTCGGTATCTACGGCTGGCTGTTGGCCAACCTTTGTCTCGG

193 P G W T G Y I M L I A L T G M V I T S V  
2581 GCCCCGTTGGACTGGCTATATCATGTTGATCGCGCTGACAGGTATGGTGATCACTTCGG

213 E K T R R A N Y E R F W Y T H H M F I I  
2641 TCGAAAAGACAAGACGGGCGAACTACGAGCGGTTCTGGTACACACACCACATGTTTCATCA

233 F F F F W S I H G A F C M I Q P D F A P  
2701 TCTTCTTCTTTTTCTGGTCCATCCACGGTGCCTTCTGCATGATCCAGCCCCACTTTGCGC

253 F C I S V G T T A I G V F W Q Y W M Y G  
2761 CTTTCTGCATTTCCGTCGGCACCACGGCCATCGGTGTGTTCTGGCAGTACTGGATGTACG

273 G F A Y L A E R I A R E V R G K H K T Y  
2821 GAGGATTTGCCTATCTCGCCGAGCGCATTGCCCGGAGGTCCGTGGCAAGCACAAGACGT

293 I S K V V Q H P S N V C E I Q I K K E N  
2881 ACATCTCCAAGGTTGTCCAGCACCCAGCAACGTGTGCGAGATCCAGATCAAGAAGGAGA

313 T K T R A G Q Y I F F C C P A V S L W Q  
2941 ACACCAAGACCCGCGCCGGCCAGTACATCTTCTTTTGTGCCCGGCTGTATCCCTGTGGC

333 Y H P F T L T S A P E E D Y I S I H V R  
3001 AGTACCATCCCTTACCCTCACGAGCGCGCCAGAGGAGGACTACATCTCGATCCACGTAC

353 V V G D F T R Q L A E T L G C E F D N K  
3061 GTGTCGTTGGTGATTTTACCAGGCAACTTGCCGAGACTTTGGGGTGCGAATTCGACAACA

373 K K G D T S K V V G V S Q E N D E V D P  
3121 AGAAGAAGGGAGACACGTCCAAGGTCGTTGGCGTCAGCCAGGAGAACGACGAAGTTGATC

393 A L R R V L P R V Y V D G P F G S A S E  
3181 CCGCTCTCCGCGGTGTTCTTCCCCGTGTGTACGTCGATGGACCGTTCGGCTCCGCCTCCG

413 D V F K Y E V S V L V G A G I G V T P F  
3241 AAGACGTGTTCAAGTACGAGGTGTCCGTCCTGGTCCGGCGCCGGTATCGGCGTGACCCCT

433 A S I L K S I W Y R M N Y P Q Q K T R L  
3301 TCGCCTCCATCCTCAAGTCGATCTGGTATCGCATGAACTACCCGCAACAAAAGACGCGGC

453 S K V Y F F W V C R D F G S F E W F R S  
3361 TGAGCAAGGTGTA CT TCTTCTGGGTCTGCAGAGATTTCCGGCTCGTTCGAGTGTTCCGCT

473 L L L A I E A Q D V D H R I E I H T Y L  
3421 CTCTGTTGTTGGCTATCGAGGCCCAAGATGTGCACCACCGCATCGAGATCCACACGTACC

493 T A K I K I D D A T N I M I N D A N A D  
3481 TGACGGCCAAGATCAAGATTGACGATGCGACCAACATCATGATCAATGATGCCAACGCCG  
(NotP3394)  
513 K D T I T G L R S P T N F G R P N W D M  
3541 ATAAGGATACCATTACTGGCTTGAGGTGCGCGACGAACCTTTGGCCGTCCGAACCTGGGATA  
533 I F R G I R K L H A P G E A G V F F C G  
3601 TGATCTTTAGGGGTATCAGGAAATTGCATGCTCCGGGCGAGGCTGGCGTGTCTTCTGCG  
553 P K G L G S S L H I F C N K Y S E P G  
3661 GTCCCAAGGGACTGGGCAGCTCGCTGCACATCTTTTGAACAAGTATAGTGAGCCTGGgt  
(nox2-2)  
3721 aagttcatggttcttttgtggtggacttgcaacggaagaccgctaacatcttgattag  
572 F H F V W G K E N F \*  
3781 TTTCCACTTTGTTTGGGGCAAGGAGAAGTCTAAGACTTCACCCTGGTTTCTGTCCCCCT  
3841 TACCCTGTTCACTCAATAACCTCAGTATGAGGCACGATCTACTAAATCATTCTGCCTTT  
3901 TATGCCATAGTATATGAGCATGTTTGGACGGCGATGACTGCGAAATTTGCTCGTTACCTG  
3961 TTTACCTCTTTATGTGCCAGTTATACCAATTATTGTTTCCAGGTAATGGAGAAGCTCGA  
4021 GGTATTTAGGAAATTTGTTCAAGACGTTATGTTGTCAAGAAACCATAAGATATTTGTGTT  
4081 CCTTTGCAATCAAATTTGAAATCGCATCAGAAAGTGTCTCCTTGAAGAAACACAAGCAT  
4141 GAAGAAGAAGACACAACCTTGATCTTTCAACCCCTTGGCTTCGAGTAAACGTCCAACCCTA  
4201 ACCCGTAGTTGTCCGAGCATCACTCCAATATGAGAGCACACACACGCAGGGATTCTAAGT  
4261 GCCCACATTTACCATCGCGAAAGAGGTGCGTCTCCAGGCAGGCAATCCGGTCTTCAGCA  
4321 GCTTCAGCGCGTCAATTCCACTGGACGGACGCGGAAAGCCTCCTCTCGTTTCCCCTCACA  
4381 AAGTGACATCACCTACCTTCAAGAGACCAAGATACCTCCGTCCCCTGTCGAACAACAACC  
4441 TACTGTACTTTGACTTTCTCCAATTTCTGCACGGAATCCGCCCCGACTTACCACCTTGTC  
4501 CAATCTCGAACCCGGAATCGCATGAATAACAATCGCAAAGATGGGTATTAACAGCTTTT  
4561 TTCGGTCATCAAAGATGAAGCGCCTGACGCCATCAAGGAGGGTGAGATCAAGAATCAGTT  
4621 CGGTCGCAAGGTTGCCATTGTGAGTTTTATGTCATTTAATCAATGCACTCTTTCTCTTC  
4681 AAAATATGCTAACATTTACCTTCTTTACAGGATCGGTACGACTCCCCCGCCCCACCA  
4741 CAACCCCGACTCGATCATGAAGGAGAAAAAACAACGTAACCTACCGTACCATA  
4801 ATCGCTGACATCATAACCTCCTCCCTAAACGTTATACAGCTCCATGAGCATCTACAGCTT  
4861 CCTAATCGCCGTCCGCTCCGATGGCCAACAATAATGAACGAGGCCGGCGAAACCACGTC  
4921 GCATCTAATGGGCATGTTCTACCGCACCTACGAATGGTCGACAACGGCATCAAGCCGCT  
4981 TTATGTATTCGACGGCGCGCCGCCAAACTCAAGTCCGGGGAGCTAGCCAAGCGGTTCCA  
5041 GCGCAAGCAGGAAGCCACCGAAGGGCTGGAGGAGGCCAAAGAAACCGGCACGGCCGAGGA  
5101 CGTGGAGAAGTTCAGTCGGAGAACGGTCCGCGTCACACGCGAGCATAATGCCGAGTGCCA  
5161 GAAGTTGTTGAAGTTGATGGGCATCCCCTACATTGTGGCGCCACCGAGGCGGAGGCGCA  
5221 ATGCGCAGTGCTGGCGGGCGGGCAAGGTGTATGCGGCTGCCAGCGAGGATATGGATAC  
5281 GCTGTGCTTCAACGCGCCGATTTTGTCTTAGGCATTTGACGTTTAGCGAGCAGAGGAAGGA  
5341 GCCGATTCAGGAAATCCATTTGGAGAAGGTGTTGGAGGGGTTGGGTATGGAGAGGAAGCA  
5401 AGTATGTTTTCCCCCCTGCCTTTTGTCTTTCGGGCTATCAAAAAATACTGCGATATG  
5461 CTGACAGCACCTCTTTTACAGTTCATCGACCTCTGCATTCTCCTTGGCTGCGACTACCT  
5521 CGACCCCATCCCCAAAGTCGGACCCAGCACAGCGCTCAAGCTGATCCGCGAGCACGGCAC  
5581 ACTGGAGAAGGTGGTGAATGGATGAAGGGCGACCCCAAGGGCCGCTACCAAATCCCAGA  
(NOX-2Nt)  
5641 GGACTGGCCGTTTGGAGACGCGCGCACGCTCTTCTTCGAGCCGGACGTGCGGCCCGCCGA