



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

CARACTERIZACIÓN DE LOS SISTEMAS DE DOS COMPONENTES DE
NEUROSPORA CRASSA

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Doctor en Ciencias

PRESENTA:

CARLOS ARTURO BARBA OSTRIA

TUTOR PRINCIPAL

DR. DIMITRIS GEORGELLIS

INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

COMITÉ TUTOR

DR. LUIS SERVÍN GONZÁLEZ

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

DR. ROBERTO CORIA ORTEGA

INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

MÉXICO, D. F. Julio, 2013



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.

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo se llevó a cabo bajo la dirección del Dr. Dimitris Georgellis en el laboratorio 226 Norte del Departamento de Genética Molecular del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Agradezco a los miembros de mi Comité Tutor los doctores: Dimitris Georgellis, Luis Servín González y Roberto Coria Ortega, por los consejos y la asesoría brindada a lo largo de este proyecto.

Agradezco la colaboración asesoría y asistencia técnica de la M en C. Claudia Rodríguez Rangel. Se reconoce el apoyo de Pedro Guadalupe Hernández Trujillo, auxiliar del laboratorio 226 Norte del Instituto de Fisiología Celular.

Agradezco a los miembros del jurado por la revisión de esta tesis, los doctores: Georges Dreyfus Cortés, Bertha González Pedrajo, Enrique Merino Pérez, Patricia Coello Coutiño y Guillermo Aguilar Osorio.

El sustentante gozó de una beca para realizar los estudios de doctorado otorgada por el CONACYT (Becario No. 176903).

Este trabajo fue apoyado por el CONACYT con el donativo 178033 y por la DGAPA con el donativo del PAPIIT IN206412.

INDICE

Contenido	Pág
Resumen	5
Abstract	6
Lista de figuras	7
Introducción	8
Sistemas de dos componentes	10
Sistemas de dos componentes en procariontes	14
El sistema EnvZ/OmpR	16
El sistema ArcB/ArcA	19
Sistemas de dos componentes en eucariontes	23
SDC en levaduras y hongos filamentosos	25
SDC en otras levaduras	28
SDC en hongos filamentosos	30
Especificidad en SDC	37
Regulación cruzada y cross-talk	39
Determinantes estructurales de la especificidad CS-RR	41
Mecanismos alternativos implicados en la especificidad	42
<i>Neurospora crassa</i> como modelo de estudio	45
Planteamiento del Problema	49
Hipótesis	50
Objetivo General	50
Objetivos Particulares	50
Materiales y Métodos	51
Resultados y Discusión	57
I. Resultados publicados	57
II. Resultados no publicados	
Los SDC de <i>Neurospora crassa</i> participan en respuestas a diferentes tipos de estrés	60
La eliminación sencilla de CS o RR no afecta la germinación ni el crecimiento lineal de la mayoría de las cepas mutantes	60
OX-1 y RRG-2 son componentes esenciales de una vía de respuesta a estrés oxidativo en <i>N. crassa</i>	62
Especificidad en SDC	66
Los mRNA de varias CS, RR y HPt de <i>N. crassa</i> parecen expresarse en condiciones de crecimiento vegetativo	66
La respuesta a estrés oxidativo puede activarse independientemente de la CS OX-1	68
Las CS OS-1 y OX-1 activan dos vías de respuesta no redundantes	69
Discusión	71
SDC como reguladores del desarrollo	71
Respuestas a estrés y especificidad en SDC de <i>Neurospora crassa</i>	74
Conclusiones	77
Referencias	78
Apendice I	90
Artículo Publicado	90

RESUMEN

Como parte de sus funciones, los organismos perciben y responden a condiciones ambientales cambiantes. La percepción y procesamiento intracelular de estos estímulos se lleva a cabo por circuitos moleculares que detectan y amplifican las señales, permitiendo la generación de respuestas específicas. Un grupo de estos circuitos, conocido como sistema de dos componentes (SDC), se caracteriza por la transferencia de un grupo fosforilo de una proteína cinasa sensora de histidina (CS), a una proteína reguladora de la respuesta (RR). En procariontes, generalmente los SDC se encuentran organizados en pares CS-RR, esta organización implica que cada CS activa a su correspondiente RR favoreciendo la especificidad en la propagación de la señal así como en la respuesta resultante. A diferencia de lo que ocurre en los procariontes, en los hongos filamentosos se observa una interesante variación de la arquitectura de estos sistemas, que consiste en múltiples CS, una proteína intermediaria de transferencia de fosfato (HPt) y un número muy reducido de RR. Con este panorama, la interrogante de si cada señal genera una respuesta específica o diversos estímulos resultan en la misma respuesta, permanece incierta. Para explorar ambas posibilidades usamos como modelo de estudio al hongo filamentoso *Neurospora crassa* que tiene once CS, una proteína HPt, y dos RR. En este trabajo evaluamos mediante la caracterización fenotípica de cepas mutantes de *N. crassa* en las proteínas involucradas en los SDC, la participación de este grupo de proteínas de señalización en la regulación de algunos procesos de diferenciación y desarrollo, así como su papel en la respuesta a diferentes fuentes de estrés. Nuestros resultados demuestran, que diferentes condiciones ambientales son percibidas a través de CS y RR particulares que activan respuestas específicas. Además indican que algunas de estas CS regulan procesos de desarrollo de forma independiente al fosforrelevo con los RR.

ABSTRACT

The ability to respond to a vast array of environmental signals is vital for the growth and survival of microorganisms. The sensing and processing of these signals are carried out by molecular circuits within the cell, which detect, amplify and integrate these signals into a specific response. In prokaryotes, these molecular circuits based on the phosphotransfer between sensor kinase (SK) and response regulator (RR) proteins are typically organized by protein pairs that belong to the large family of two-component systems (TCS). This organization implies the activation of one RR by its cognate SK, favoring specificity. In contrast, in filamentous fungi multiple SK appears to relay signals to one intermediary protein (HPT) and a few RR. This scenario raises the question of whether each signal produces a specific output or if by the contrary many inputs could generate the same output. To explore this question we used *Neurospora crassa* as a model because it shows eleven SK, one HPT protein and two RR. In this work we evaluate the involvement of *N. crassa* TCS proteins in the regulation of developmental processes and stress responses. Our results demonstrate that different environmental stimuli are sensed by particular SK and generate specific responses. In addition they indicate that some SK regulate developmental processes independent of the phosphorelay pathway.

LISTA DE FIGURAS

Figura	Contenido	Pág
Figura 1	Esquema de las proteínas que forman parte de los sistemas de dos componentes	7
Figura 2	Paradigma de funcionamiento de los sistemas de dos componentes	9
Figura 3	Sistemas de dos componentes híbridos o de fosforrelevo	12
Figura 4	Sistema de dos componentes EnvZ/OmpR	16
Figura 5	Organización de dominios en el SDC ArcB/ArcA	18
Figura 6	Fosforrelevo en el SDC ArcB/ArcA	19
Figura 7	Regulación de la CS ArcB	21
Figura 8	SDC Sln1-Ypd1-Ssk1 Skn7 de <i>S. cerevisiae</i> en baja osmolaridad	25
Figura 9	SDC Sln1-Ypd1-Ssk1 Skn7 de <i>S. cerevisiae</i> en alta osmolaridad	26
Figura 10	Clasificación de las CS presentes en hongos filamentosos	30
Figura 11	Fosforilación no específica en SDC	36
Figura 12	Especificidad en los SDC PhoR/PhoB y VanS/VanR	37
Figura 13	Ciclo de vida de <i>Neurospora crassa</i>	43
Figura 14	SDC de <i>Neurospora crassa</i>	59
Figura 15	Germinación de mutantes sencillas de los SDC de <i>N. crassa</i>	56
Figura 16	Crecimiento de mutantes sencillas de los SDC de <i>N. crassa</i>	57
Figura 17	Las cepas $\Delta ox-1$ y $\Delta rrg-2$ son sensibles al estrés oxidativo	60
Figura 18	Las cepas $\Delta ox-1$ y $\Delta rrg-2$ muestran menor actividad de catalasa	61
Figura 19	El daño oxidativo es mayor en las cepas $\Delta ox-1$ y $\Delta rrg-2$	62
Figura 20	En el crecimiento vegetativo, se observan la mayoría de los mRNA de los SDC	64
Figura 21	La luz corrige la sensibilidad a estrés oxidativo de la cepa $\Delta ox-1$	65

INTRODUCCIÓN

Para sobrevivir, los organismos deben ajustar su fisiología en respuesta a múltiples parámetros ambientales entre los que destacan; cambios en la disponibilidad y el tipo de nutrientes, fluctuaciones de temperatura, variaciones en la cantidad y calidad de luz, oscilaciones en la osmolaridad, competencia por los recursos, entre otras. Todas estas variaciones ejercen una presión selectiva y por lo tanto las posibilidades de supervivencia de un organismo, dependen de su capacidad para responder en forma rápida y precisa. La adaptación a estos cambios está estrechamente ligada a la correcta percepción y transmisión de los estímulos así como a la generación de respuestas apropiadas y por lo tanto no es extraño que a lo largo de la evolución se hayan seleccionado sofisticados mecanismos de transducción de señales. Dada la enorme diversidad de información proveniente del ambiente, existe también una gran variedad de circuitos de transducción de señales. En eucariontes, por ejemplo, abundan las cascadas de señalización que involucran la fosforilación consecutiva de proteínas generalmente en residuos de treonina, tirosina y serina (cascadas de MAP cinasas). A diferencia de esto último, en procariontes existe una amplia red de sensores y efectores llamados sistemas de dos componentes (SDC), que transmiten señales a través de la fosforilación sucesiva de dos proteínas, una sensora y una reguladora en residuos conservados de histidina y aspartato respectivamente (Fig. 1) (158).

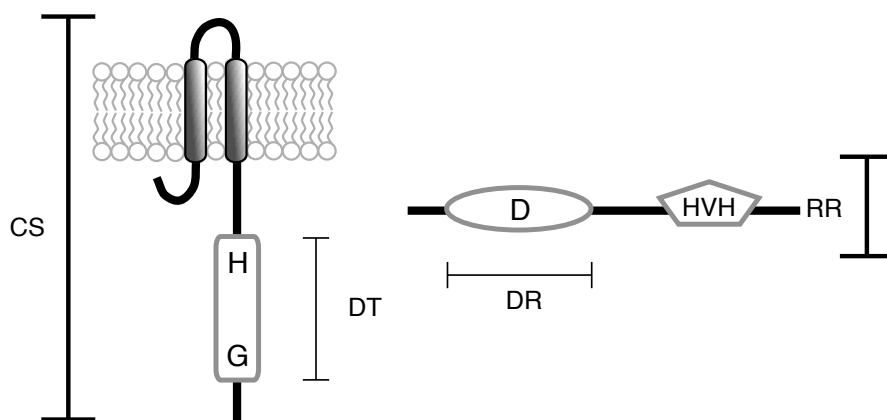


Fig. 1 Esquema de las proteínas que forman parte de los sistemas de dos componentes. Los sistemas de dos componentes están constituidos por una cinasa sensora (CS) que posee un dominio transmisor (DT) que incluye el residuo His conservado (H) y un dominio de unión a nucleótidos, importante para la unión de ATP. Los reguladores de respuesta (RR) poseen un dominio receptor (DR) en donde se encuentra el residuo Asp fosforilable (D), además normalmente poseen un dominio de unión a DNA tipo hélice-vuelta-hélice (HVH).

Los eventos bioquímicos necesarios para la transducción de señales de dos componentes, fueron establecidos por Ninfa y Magasanik para el sistema de NR (122), un sistema de regulación que controla la expresión genética en respuesta a la disponibilidad de nitrógeno en *Escherichia coli*. Al mismo tiempo, Ausubel y colaboradores encontraron similitudes de secuencia entre los componentes del sistema NR y los de muchos otros sistemas bacterianos que no se habían caracterizado a nivel bioquímico(124). Estas similitudes permitieron plantear la posibilidad de que estos otros sistemas operaran a través de un mecanismo de señalización similar al descrito para el sistema NR. Múltiples trabajos posteriores han confirmado esta idea, y la lista de sistemas de dos componentes se ha expandido incluyendo a cientos de sistemas distintos. Impulsado en buena medida por información generada en los múltiples proyectos de secuenciación masiva, el número de sistemas de dos componentes sigue creciendo y numerosos artículos de revisión han sido publicados sobre este tema (19, 39, 106, 133, 158).

Sistemas de dos componentes

El paradigma de funcionamiento de los SDC incluye la transferencia consecutiva de un grupo fosforilo entre un residuo His y un Asp presentes en dos proteínas; una proteína cinasa sensora de histidina (CS) que comúnmente se encuentra anclada a la membrana y una proteína normalmente citosólica, conocida como proteína reguladora de la respuesta (RR). La CS canónica está constituida por un dominio sensor localizado en el extremo N-terminal y un dominio transmisor localizado en el extremo C-terminal de la proteína. El dominio sensor monitorea el ambiente en búsqueda de estímulos y el dominio transmisor incluye grupos de residuos esenciales para la adecuada activación y regulación de la actividad de la CS. Algunos de estos residuos están involucrados en la unión a ATP (cajas G, N y F), la autofosforilación (caja H), la dimerización o la regulación de la actividad de cinasa. Por su parte el RR está constituido por un dominio receptor localizado en el extremo N-terminal en el que sobresale el residuo de aspartato y que cataliza la transferencia del grupo fosforilo de la histidina conservada en el dominio transmisor de la CS. Además los RR poseen un dominio efector en el extremo C-terminal. Existen diferentes dominios efectores pero la mayoría de los RR poseen un dominio de unión a DNA por lo que actúan como reguladores transcripcionales Fig. 2 (158). La señalización en los sistemas simples o canónicos inicia con la unión del estímulo a la CS, esta unión activa la autofosforilación de la CS en el residuo de His conservado, posteriormente el dominio receptor del RR cataliza la transferencia del grupo fosforilo al residuo de Asp conservado, lo que lo activa normalmente como regulador transcripcional. Se ha descrito que la mayoría de las CS dependiendo de la presencia de la señal activadora del sistema, son capaces

de actuar como cinasas o fosfatasa específicas de su RR por lo que se conocen como CS bifuncionales. En ausencia del estímulo las CS bifuncionales catalizan la desfosforilación de su RR correspondiente liberando Pi al medio (Fig. 2).

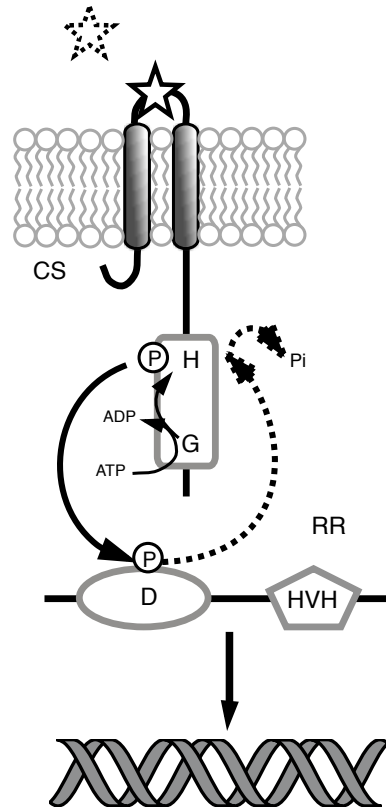


Fig. 2. Paradigma de funcionamiento de los sistemas de dos componentes. El estímulo (★) se percibe en el dominio sensor, lo que provoca la autofosforilación dependiente de ATP, en el residuo conservado de histidina (H). Posteriormente, el grupo fosfato se transfiere al residuo de aspartato (D) en el RR. La fosforilación del residuo de D causa su activación como factor de transcripción. En ausencia de la señal, la CS actúa como fosfatasa por lo que el grupo fosforilo se elimina del residuo D y se libera al medio como fosfato inorgánico (Pi).

Los elementos necesarios para la transferencia del grupo fosforilo, (dominio transmisor y dominio receptor), presentan homología lo que ha permitido identificar y agrupar a estas proteínas en distintos grupos filogenéticos (61). Las CS y los RR se consideran proteínas modulares (68, 132, 159) ya que a pesar de contar con dominios transmisores y/o receptores que exhiben una gran variedad de arreglos (pueden presentarse aislados, en pares, o en combinación con otros dominios así

como estar en una sola proteína o distribuidos en varias) (10), el mecanismo de fosforilación consecutiva His-Asp-His-Asp, se mantiene con todas estas configuraciones. Inclusive se ha demostrado que para el caso de algunas cinasas como ArcB, los dominios pueden adoptar la conformación catalíticamente activa aun en ausencia de unión covalente entre dominios contiguos (60). Esta propiedad ha sido muy útil en la caracterización del mecanismo de transducción y las propiedades bioquímicas de este sistema (5). La arquitectura modular de estos sistemas, ha permitido la divergencia de una amplia gama de circuitos de señalización que conservan la transferencia de grupos fosforilo entre residuos de histidina y aspartato como mecanismo fundamental, pero que presentan adaptaciones del esquema básico para cumplir con una función de señalización particular.

Además de los SDC hasta ahora mencionados, existen un importante número de sistemas conocidos como tripartitos, de fosforrelevo o híbridos, que incluyen CS híbridas (CSH). Estas CS se caracterizan porque además del dominio transmisor, tienen fusionado un dominio receptor similar al de las RR y un dominio intermediario en la transferencia (conocido como HPT) que contiene un residuo de histidina conservado. Se ha descrito que este dominio HPT puede encontrarse formando parte del mismo péptido o como una proteína independiente (10). Debido a esta particular organización en las CS híbridas, la transferencia del grupo fosforilo ocurre en varios pasos consecutivos (por lo que se llama fosforrelevo), primero entre los dominios de la CS híbrida y finalmente al dominio receptor de la RR. El fosforrelevo inicia cuando en respuesta a la percepción del estímulo, la CS

se autofosforila a expensas de ATP en la histidina conservada en el dominio transmisor primario (H1). Posteriormente, el grupo fosforilo se transfiere consecutivamente a los residuos conservados en los dominios receptor primario (D1), transmisor secundario (H2 o HPt) y finalmente al Asp conservado en el dominio receptor de la RR. La fosforilación del dominio receptor propaga un cambio conformacional que activa el dominio efector que finalmente regula la expresión génica en respuesta al estímulo (158) (Fig. 3). En ausencia del estímulo la RR es desfosforilada, ya sea por la misma CS (bifuncional) o por una fosfatasa independiente apagando así el sistema (Fig. 3). La participación de una fosfatasa independiente se considera una excepción a la regla ya que la gran mayoría de las CS son bifuncionales. Es aceptado para la gran mayoría de las CS, que en su estado activo como cinasas funcionan al menos como dímeros y que las reacciones de autofosforilación y transferencia del grupo fosforilo ocurren de forma intermolecular entre monómeros (158). A pesar de esto último y como ocurre con frecuencia, se han descrito excepciones a esta regla en las cuales la autofosforilación de la CS y los primeros pasos del fosforrelevo ocurren de forma intramolecular (134).

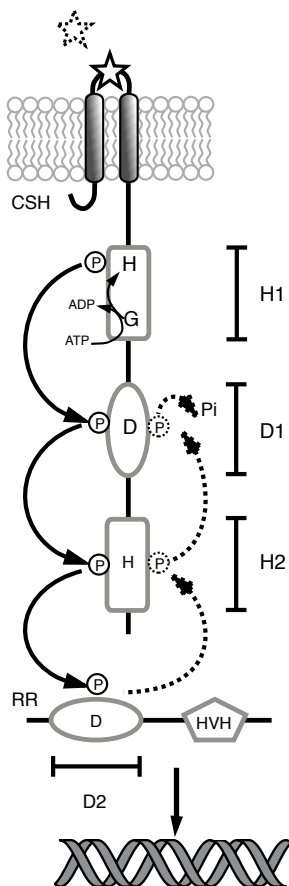


Fig. 3. Sistemas de dos componentes híbridos o de fosforrelevo. El estímulo (☆) se percibe en el dominio sensor de la cinasa sensora híbrida (CSH), lo que provoca la autofosforilación dependiente de ATP, en el residuo conservado de histidina (H) en el dominio transmisor primario (H1). Posteriormente, el grupo fosfato se transfiere al residuo de aspartato (D) en el dominio transmisor receptor (D1) y al dominio transmisor secundario (H2). Finalmente el grupo fosforilo se transfiere al residuo D conservado en el dominio receptor (D2) del RR activándolo como factor de transcripción. En ausencia de la señal, la CS actúa como fosfatasa por lo que el grupo fosforilo se elimina del residuo D y mediante un fosforrelevo reverso se libera al medio como fosfato inorgánico (Pi).

Sistemas de dos componentes en procariontes

Los SDC se encuentran entre los grupos de genes más representados en los genomas de bacterias y tanto los genes de CS como de RR constituyen las dos más grandes familias de genes parálogos en bacterias (55). Análisis realizados a partir de las secuencias genómicas de múltiples bacterias han revelado que el número total de SDC en un genoma típicamente crece siguiendo una proporción cuadrática en relación al tamaño del genoma (55). Los SDC están presentes en

864 de 899 genomas completos disponibles hasta 2011 (151). Entre los únicos grupos que carecen de SDC se encuentran especies de *Mycoplasma* y endosimbiontes como especies de *Amoebophilus* con genomas muy reducidos. Por otro lado, se ha descrito la existencia de una correlación entre el número de SDC con el ambiente en que los organismos se desarrollan. Así pues, generalmente organismos que deben sobrevivir en una gran diversidad de ambientes destinan una importante proporción de su genoma a genes involucrados con la regulación del metabolismo así como con circuitos de transducción de señales. Como ejemplo de esto último, la bacteria de vida libre *Myxococcus xanthus*, conocida por su complejo desarrollo multicelular codifica para 264 SDC (164). En contraposición, el patógeno intracelular *Mycobacterium leprae* TN, codifica solo para 10 (164). Dada la amplia distribución de los SDC entre diferentes grupos de bacterias es difícil rastrear con precisión el origen de estos sistemas de señalización y delimitar su evolución a través de diferentes grupos de bacterias. Por ahora las teorías más aceptadas indican que las bacterias han ampliado su repertorio de SDC a través de una combinación entre eventos de duplicación de genes así como de transferencia horizontal (32).

Los SDC bacterianos se han seleccionado como circuitos de percepción-respuesta a una amplia variedad de condiciones entre las que pueden nombrarse: osmolaridad (51), balance redox (105), disponibilidad de Mg^{2+} (62), asimilación de nitrógeno (122, 125) o presencia de solventes (92). Además están involucrados en la regulación de diversos procesos celulares como esporulación (69), resistencia a antibióticos (73), motilidad (25) o diferenciación (81). También se han implicado en

virulencia y colonización de hospederos (19). A continuación se describen algunos ejemplos representativos de los SDC de procariontes; un sistema simple, prototípico o de fosfotransferencia (EnvZ/OmpR de *Escherichia coli*) y uno híbrido o de fosforelevo (ArcB/ArcA de *Escherichia coli*).

El sistema EnvZ/OmpR de *Escherichia coli*

En *Escherichia coli*, dos porinas (OmpF y OmpC) regulan la difusión pasiva de moléculas pequeñas e hidrofóbicas a través de la membrana externa, permitiendo así la rápida adaptación de las células a cambios osmóticos. El sistema de dos componentes formado por la CS EnvZ y la RR OmpR desempeña un papel crucial en la regulación osmótica controlando de forma recíproca la expresión de los genes de las porinas OmpF y OmpC.

EnvZ/OmpR es un SDC formado por la CS EnvZ y el RR OmpR. EnvZ es una CS bifuncional que regula la relación OmpR/OmpR-P en respuesta a la osmolaridad del medio. EnvZ es una CS prototípica de 450 aminoácidos anclada a la membrana interna con dos hélices transmembranales en la que se distinguen varias regiones: un extremo N-terminal corto de localización citoplásmica, un dominio periplásmico de 115 aminoácidos que originalmente se creía involucrado con la percepción del estímulo. Posteriormente se demostró que esta región no es esencial para la percepción del estímulo en EnvZ. En mutantes en las que el dominio periplásmico de EnvZ se elimina o se sustituye parcial o totalmente por el dominio periplásmico de una CS no relacionada (PhoR en este caso), la osmoregulación y la producción de OmpC y OmpF es indistinguible de la

observada para la cepa con EnvZ silvestre (94). Finalmente posee un dominio citoplásmico grande (50) que contiene el dominio transmisor con el residuo His conservado en la posición 243 (144). OmpR por su parte, es una proteína citoplásmica que tiene el dominio receptor con el residuo de Asp conservado en la posición 55 (44). Además tiene como efector un dominio de unión a DNA tipo HVH. La fosforilación de OmpR aumenta su afinidad por los promotores de *ompF* y *ompC* (66) así como su interacción con la RNA polimerasa activando la transcripción. En baja osmolaridad, la actividad fosfatasa de EnvZ predomina por lo que OmpR se encuentra mayoritariamente defosforilada, activando la expresión de OmpF (Fig 4A). En alta osmolaridad en cambio, EnvZ se encuentra activa favoreciendo la acumulación de OmpR-P. En esta esa condición se reprime la expresión de OmpF mientras que se activa la de OmpC (Fig 4B). El mecanismo de regulación recíproca de los promotores de ambos genes ha sido descrito detalladamente (176). Existen cuatro sitios F (F1, F2, F3 y F4) y tres sitios C (C1, C2 y C3) en los promotores de *ompF* y *ompC* respectivamente. Las diferencias de afinidad de OmpR-P por estos sitios determinan la transcripción preferencial de *ompF* en condiciones de baja osmolaridad y *ompC* en alta.

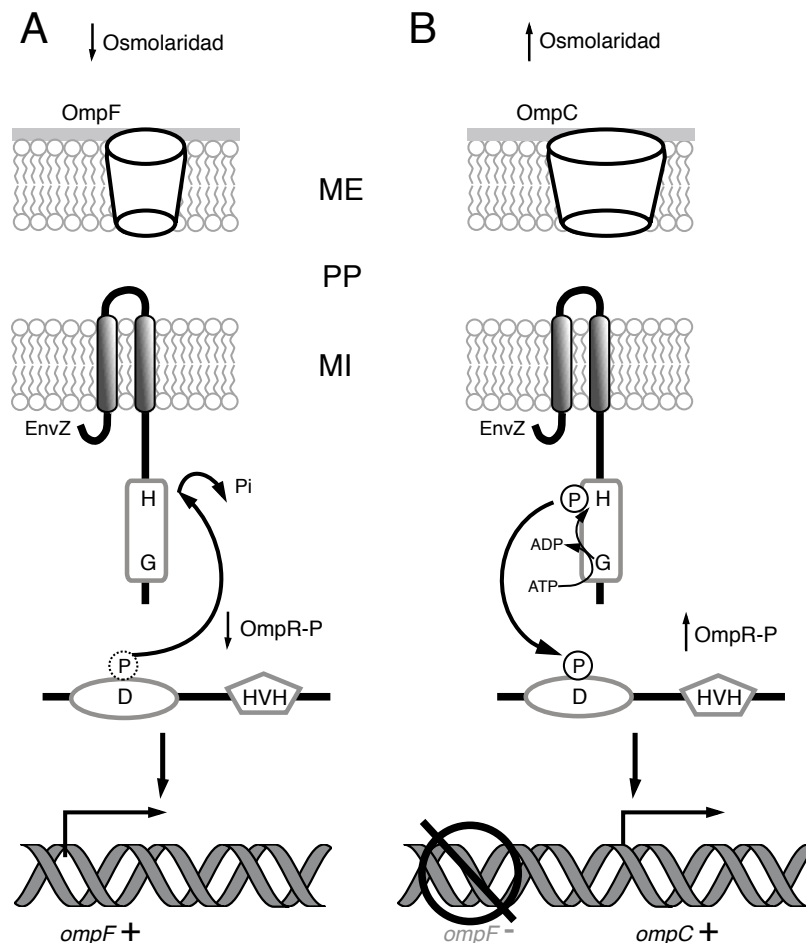


Fig. 4. Sistema de dos componentes EnvZ/OmpR. El sistema de dos componentes formado por la CS EnvZ y el RR OmpR controla la expresión de los genes de las porinas OmpF y OmpC. **A.** En baja osmolaridad, la actividad fosfatasa de EnvZ predomina por lo que OmpR se encuentra mayoritariamente defosforilada, activando la expresión de OmpF. **B.** En alta osmolaridad en cambio, EnvZ se encuentra activa como cinasa favoreciendo la acumulación de OmpR-P. En esta esa condición se reprime la expresión de OmpF mientras que se activa la de OmpC.

La regulación del tamaño de los poros de difusión pasiva de la membrana externa parece ser vital para *E. coli* ya que permite a la bacteria, adaptarse a dos condiciones ambientales con claras diferencias en lo que a osmolaridad se refiere: una en presencia de una alta concentración de nutrientes (alta osmolaridad) en el intestino de los animales a 37 °C y la otra con escasa fuente de nutrientes (baja osmolaridad) cuando se encuentra como organismo de vida libre. Se ha propuesto que en el caso de OmpF el mayor tamaño de poro es importante para la absorción

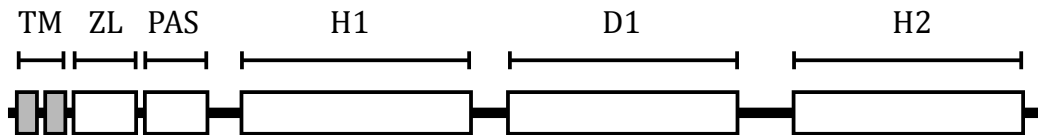
eficiente en medios con escasa fuente de nutrientes, mientras que el menor tamaño de poro de OmpC es importante para impedir el paso de sales biliares a través de la membrana externa ya que pueden resultar tóxicas para la bacteria (47).

El sistema ArcB/ArcA de *Escherichia coli*

El sistema de dos componentes Arc (anoxic redox control) es un sistema formado por la CS híbrida ArcB y la proteína reguladora de la respuesta ArcA. Este sistema tiene un papel fundamental en la compleja red de regulación que permite a las bacterias facultativas como *Escherichia coli* percibir variaciones en el estado redox del medio y adaptarse a estos cambios (71, 76-78). La CS bifuncional híbrida ArcB está constituida por varias regiones: un dominio periplásmico muy pequeño (16 aminoácidos), dos segmentos transmembranales que anclan la proteína a la membrana interna y una región citoplásmica de un poco más de 700 aminoácidos (77-778) que incluye la región linker y los tres dominios catalíticos. La región linker incluye varios segmentos necesarios para el adecuado funcionamiento y regulación de la actividad de ArcB entre los que se encuentran un zipper de leucinas funcional formado por las leucinas 73-80-87-94, 108-115 (126) y un dominio PAS. ArcB es una CS híbrida con tres dominios catalíticos: en la región N-terminal un dominio transmisor (H1) que incluye grupos de residuos conservados H, N, G1 y G2. La caja H incluye el sitio de autofosforilación (His 292) y las cajas N, G1 y G2 participan en la unión de nucleótidos. Un dominio receptor (D1) de 120 aminoácidos en la parte central, con el residuo Asp conservado en la posición 576 y un dominio de fosfotransferencia o transmisor secundario (HPt/H2) de 125

aminoácidos con la His conservada en la posición 717 (Fig 5) (75). ArcA está formada por un dominio receptor ubicado en el extremo N-terminal con el residuo Asp conservado en la posición 54 y un dominio de unión a DNA tipo hélice-vuelta-hélice en el C-terminal (Fig 5).

ArcB



ArcA

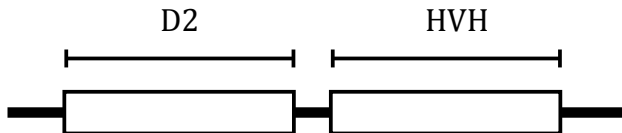


Fig. 5. Organización de dominios en el SDC ArcB/ArcA. El sistema de dos componentes formado por la CS ArcB y la RR ArcA regula la expresión genética en la transición aerobiosis/anaerobiosis. ArcB tiene dos hélices transmembrales (TM) un zipper de leucinas funcional y un dominio PAS en la región linker y tres dominios catalíticos (H1, D1 y H2). ArcA está formada por un dominio receptor (D2) y un dominio de unión a DNA tipo hélice-vuelta-hélice (HVH)

En condiciones de crecimiento aeróbico, ArcB se encuentra activa como fosfatasa, al pasar a condiciones anaeróbicas, ArcB se autofosforila en una reacción intramolecular (134), en un proceso amplificado por metabolitos producidos en condiciones anaeróbicas como D-lactato y acetato (58, 146) y transfosforila a ArcA mediante un fosforrelevo $H292 \rightarrow D576 \rightarrow H717 \rightarrow D54$ (60, 91). ArcA fosforilado reprime la expresión de muchos operones activos durante el metabolismo aeróbico y activa algunos operones importantes en la respiración microaeróbica y el metabolismo fermentativo (6, 63, 97, 101). El silenciamiento del sistema ocurre mediado también por ArcB, en ausencia de la señal, ArcB promueve la desfosforilación específica de ArcA-P mediante un fosforrelevo reverso

D54→H717→D576, finalmente el grupo fosforilo se libera al medio como fosfato inorgánico (Fig. 6) (57, 135).

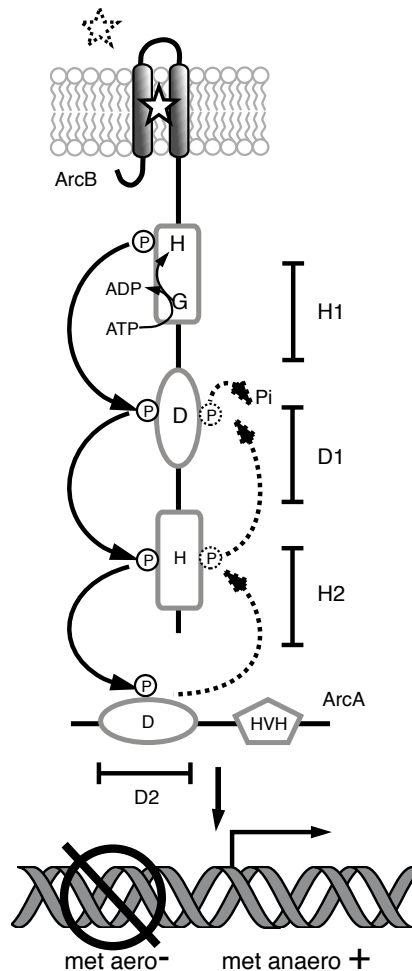


Fig. 6. Fosforrelevo en el SDC ArcB/ArcA. En presencia del estímulo, ArcB se autofosforila en el residuo His e inicia un fosforrelevo H1→D1→H2 (HPT). Posteriormente se transfiere el grupo fosforilo al Asp conservado en D2. ArcA-P reprime la expresión de operones involucrados en el metabolismo aeróbico y activa la de operones importantes para la transición aerobiosis/anaerobiosis.

En estudios previos, se ha demostrado que la posa de quinonas de la membrana interna es la señal silenciadora de la actividad cinasa de ArcB en condiciones aeróbicas (59). La formación de dos puentes disulfuro entre las cisteínas 180 y 241 en la región citoplásmica de ArcB es el mecanismo molecular involucrado en este silenciamiento. Se ha demostrado que al formarse los dos puentes disulfuro,

la actividad cinasa de ArcB se encuentra totalmente inhibida (104). Por otro lado con base en el análisis de los potenciales redox de diferentes grupos de quinonas, su efecto sobre la fosforilación de ArcB, así como experimentos que demuestran *in vivo* la importancia de las menaquinonas para la activación del sistema ArcB/ArcA recientemente se ha propuesto un modelo que resume la activación y desactivación de este sistema mediado por la posa de menaquinonas/ubiquinonas (Fig. 7) (7). En condiciones de crecimiento aeróbico o en la transición de anaerobiosis a crecimiento aeróbico, las ubiquinonas (UQ/UQH₂) son las quinonas mayoritarias en la cadena respiratoria de *E. coli*. Debido al flujo de electrones hacia el O₂ mediado por los citocromos (cit), la posa de ubiquinona se mantiene en estado oxidado, permitiendo la transferencia de electrones de las cisteínas reducidas de ArcB a UQ. Esto resulta en la formación de dos puentes disulfuro y el silenciamiento inmediato de la actividad cinasa de ArcB. En condiciones de crecimiento microaeróbico o en la transición de aerobiosis a anaerobiosis, la posa de quinonas es gradualmente sustituida por menaquinonas (MQ/MQH₂). El bajo potencial redox del par MQ/MQH₂ permite la transferencia de electrones del menaquinol (MQH₂) a los residuos de cisteína de ArcB lo que resulta en la ruptura de los puentes disulfuro y por lo tanto en la activación de la actividad cinasa de ArcB. La posa de menaquinol se restablece por el flujo de electrones de las NADH deshidrogenasas (NDH) (Fig. 7).

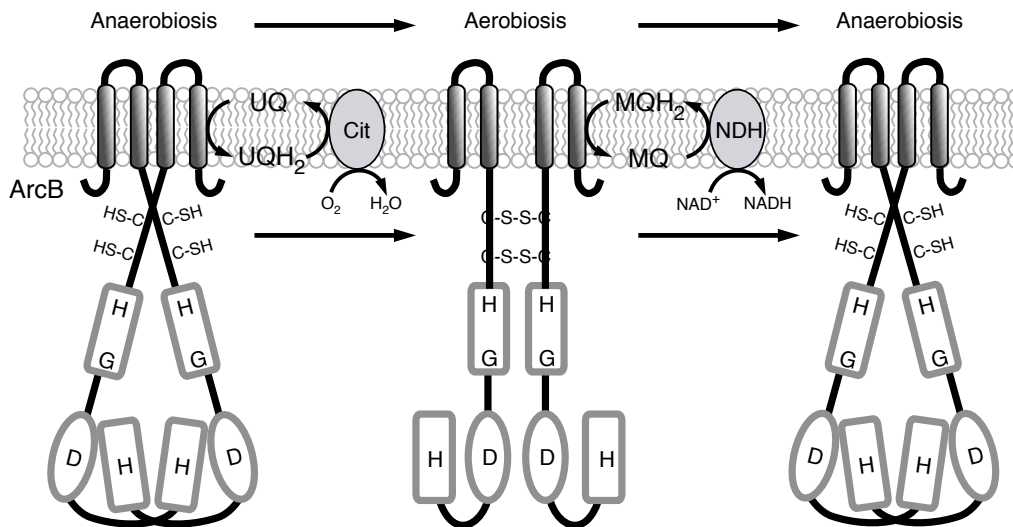


Fig. 7. Regulación de la CS ArcB. Reproducida de (7). La CS ArcB se inactiva durante la transición anaerobiosis/aerobiosis a través de la formación de los puentes disulfuro entre las cisteínas 180 y 241. En la transición aerobiosis/anaerobiosis, la ruptura de los puentes disulfuro lleva a la activación de ArcB.

Sistemas de Dos Componentes en eucariontes

A pesar de que estos sistemas de transducción se describieron originalmente en procariontes y han sido establecidos como uno de los mecanismos de señalización más frecuentes en bacterias, su existencia no es exclusiva de procariontes. Hace ya varios años, fueron descritos los primeros homólogos eucariontes de estos sistemas de transducción y hasta la fecha se han descrito y caracterizado en diversos grupos de hongos, plantas y mohos (37, 98, 165, 171, 172). De acuerdo con este análisis y con todo lo descrito previamente en otros estudios, este grupo de proteínas no se encuentra en ninguno de los linajes de los metazoos. A partir de análisis filogenéticos de la distribución de SDC en genomas eucariontes se ha llegado a la conclusión de que la adquisición de SDC ocurrió en múltiples eventos independientes de transferencia horizontal de bacterias a eucariontes antes de la división en los tres grandes dominios (89).

En eucariontes los SDC presentan una gran variedad de modificaciones y adaptaciones entre las que se incluyen el predominio de CS híbridas en prácticamente todos los SDC descritos (171). Por otro lado, a diferencia de lo que ocurre en gran parte de los sistemas bacterianos, las CS eucariontes son mayoritariamente citosólicas. Además, en todos los SDC eucariontes, para completar el fosforrelevo de CS a RR es necesaria la participación de una proteína intermediaria con un dominio HPt similar al que en gran parte de los sistemas bacterianos se encuentra fusionado a las CS híbridas, solo que en este caso se encuentra como una proteína independiente. Este arreglo de los dominios involucrados en el fosforrelevo se encuentra conservado en diferentes grupos de eucariontes (151, 171). Finalmente a nivel de los RR también existen modificaciones importantes. En diversos eucariontes se ha descrito que algunos RR en su estado fosforilado en lugar de unirse directamente al DNA y modificar la expresión de sus genes blanco, regulan la actividad de otros sistemas de señalización típicos de eucariontes como las MAPK. Como ejemplo, la vía de respuesta a estrés osmótico formada por las proteínas Sln1-Ypd1-Ssk1, en *Saccharomyces cerevisiae* regula la actividad de la MAPK Hog1 (Fig. 8) (102). Otros SDC que regulan la actividad de MAPK de forma similar a la de *S. cerevisiae*, se han descrito en diversas especies de hongos filamentosos y levaduras (14, 38, 84). Ejemplificando también las diferencias con los SDC procariontes, se ha descrito que en el RR Skn7 de *S. cerevisiae* es necesaria la presencia del dominio receptor pero no del residuo Asp conservado (65, 95). Otras adaptaciones que se han encontrado en eucariontes y que difieren con el paradigma descrito en SDC procariontes incluyen el sistema híbrido RdeA-RegA de *D. discoideum* que regula

los niveles de AMPc (162) y la CS híbrida DokA que puede ser regulada por fosforilación en un residuo de serina (127). En plantas los SDC se han diversificado y adaptado para formar parte de diversas vías de señalización en respuesta a etileno (157), citocinina (74, 129) o luz (175). También se ha descrito que están involucrados en procesos diversos como desarrollo de gametos, floración o regulación de ritmos circadianos (103, 107).

SDC en levaduras y hongos filamentosos

A partir de los múltiples proyectos de secuenciación genómica se han descubierto SDC en múltiples levaduras, hongos dimórficos y hongos filamentosos. Estos circuitos de señalización han sido implicados en respuesta al estrés osmótico (84, 138), y oxidativo (29, 121), control del ciclo celular (9, 41), respuestas a luz (rojo/rojo lejano) (23). También participan en la regulación del cambio entre los estadios de moho (no infectante) y levadura (patógeno) en hongos dimórficos (119) y regulan diversos procesos de virulencia en patógenos de plantas (96, 178) y animales (15, 38, 40, 150). El número de SDC, varía considerablemente entre grupos. En levaduras como *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans* o *Schizosaccharomyces pombe* existe un número reducido, en cambio hongos filamentosos como *Neurospora crassa* o *Cochliobolus heterostrophus* poseen un número significativamente mayor. Por otro lado, la presencia de CS híbridas y proteínas de transferencia intermediaria (HPt) en los diferentes grupos de hongos, sugiere que en estos organismos, el fosforrelevo ocurre a través de tres pasos consecutivos $H1 \rightarrow D1 \rightarrow H2(HPt) \rightarrow D2(RR)$.

El Sistema Sln1-Ypd1-Ssk1-Skn7 de Saccharomyces cerevisiae

El SDC más estudiado en eucariontes es el descrito en la levadura modelo *Saccharomyces cerevisiae*, constituido por la CS híbrida Sln1, la proteína intermediaria Ypd1 y los RR Ssk1 y Skn7. El funcionamiento de este sistema ha sido usado como modelo en otras especies, debido a la alta similitud de sus componentes con proteínas conservadas en diversos grupos de hongos filamentosos y levaduras. Sln1 es una CS híbrida de 1220 aminoácidos, anclada a la membrana por dos cruces transmembranales (residuos 23 a 46 y 334 a 354). Contiene además un dominio transmisor (573-928) y un dominio receptor (1089-1210). En condiciones de baja osmolaridad Sln1 se encuentra activa como cinasa y se autofosforila en el residuo de histidina conservado (H576) (102, 138). El grupo fosforilo se transfiere mediante un fosforrelevo al residuo de aspartato (D1144) y posteriormente al residuo de histidina conservado (H64) en la proteína intermediaria Ypd1, que consta de un único dominio similar al dominio HPt de las CS bacterianas. Finalmente, el grupo fosforilo se transfiere de Ypd1 al residuo de aspartato en el dominio receptor de los reguladores de respuesta Ssk1 (D554) y Skn7 (D427). Ssk1 en su estado fosforilado, no puede interactuar con los componentes corriente abajo en esta cascada de señalización y por lo tanto la vía de Hog1 se encuentra inactiva. Contrario a lo que ocurre para Ssk1, Skn7 en su estado fosforilado, activa la expresión de genes involucrados con la progresión del ciclo celular y el mantenimiento de la pared celular (Fig 8) (112, 113). El incremento en la osmolaridad y otras condiciones que reducen la turgencia celular disminuyen la actividad cinasa de Sln1 causando la acumulación de la forma desfosforilada de Sln1, Ypd1 y Ssk1. En su forma no fosforilada Ssk1 interactúa

con las MAPKKKs Ssk2 y Ssk22 que fosforilan a la MAPK Hog1 activándola (Fig 8).

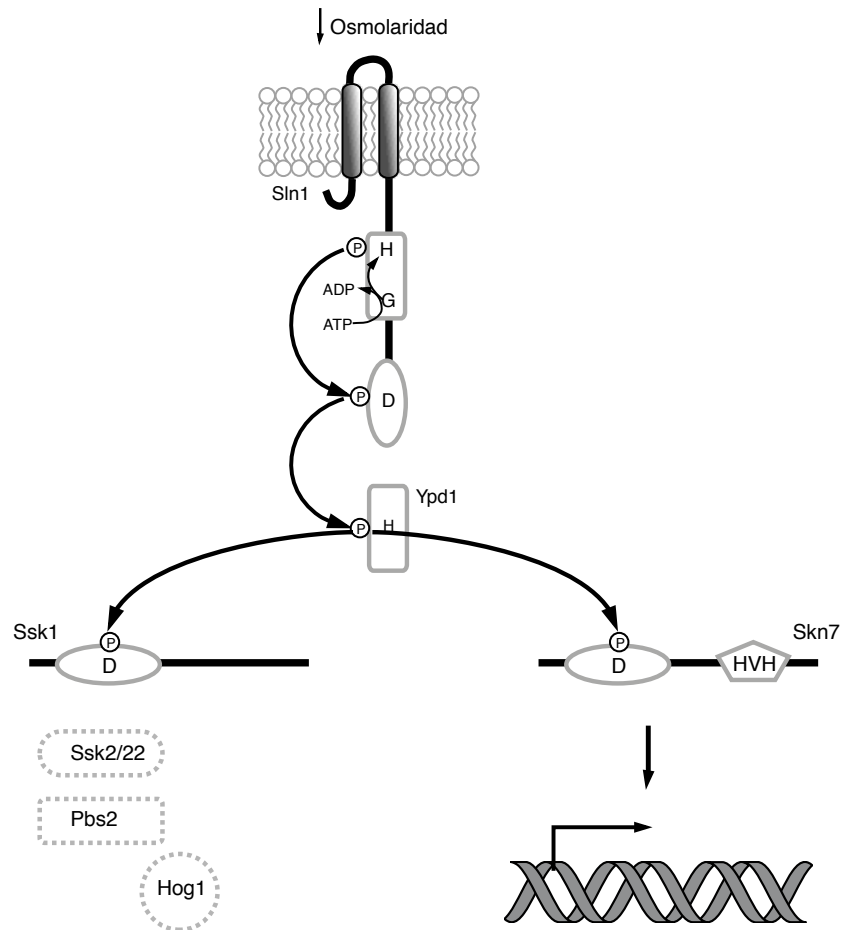


Fig. 8 Funcionamiento del SDC Sln1-Ypd1-Ssk1 Skn7 de *Saccharomyces cerevisiae* en condiciones de baja osmolaridad. En condiciones de baja osmolaridad, Sln1 está activo como cinasa por lo que fosforila a Ypd1 que fosforila a Ssk1 y Skn7. La fosforilación de Skn7 lo activa como factor de transcripción, a diferencia de esto último, Ssk1 en su forma fosforilada es incapaz de unirse a las MAPKKK Ssk2/22 y por lo tanto la vía de Hog1 se encuentra inactiva

Hog1-P regula la expresión de múltiples genes involucrados en respuesta a estrés osmótico como los relacionados con la síntesis de los solutos compatibles como trehalosa y glicerol. Cabe mencionar entre las particularidades de este sistema que su funcionamiento es inverso al de la mayoría de los sistemas de procariontes ya que en este sistema (al menos en el caso de la rama de Ssk1-Hog) la forma no fosforilada activa la vía de señalización corriente abajo. Las reacciones de

fosforilación-desfosforilación de los componentes del sistema Sln1-Ypd1-Ssk1, así como la cinética de estas reacciones han sido bien caracterizadas, y varios estudios proporcionan una descripción más detallada de esta vía (46, 70, 82, 85, 86) que se representa en las figuras 8 y 9.

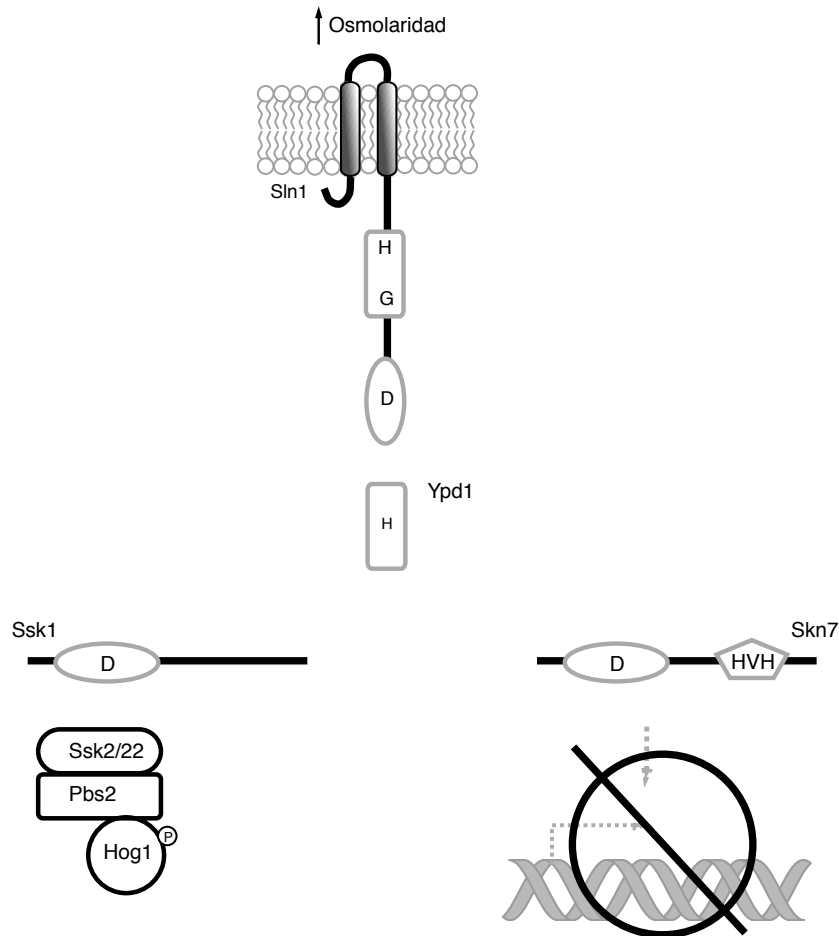


Fig. 9 Funcionamiento del SDC Sln1-Ypd1-Ssk1 Skn7 de *Saccharomyces cerevisiae* en alta osmolaridad. En condiciones de alta osmolaridad, Sln1 está inactivo como cinasa por lo que Ypd1 Ssk1 y Skn7 se encuentran desfosforiladas. Skn7 en su estado no fosforilado no puede unirse al DNA. Ssk1 en cambio, en su forma no fosforilada es capaz de unirse a las MAPKKK Ssk2/22 que activan corriente abajo la vía de MAPK Hog1.

SDC en otras levaduras

Además del sistema de respuesta a estrés osmótico de *S. cerevisiae* y sus homólogos, en levaduras como *Schizosaccharomyces pombe* o *Candida albicans* se han caracterizado varios SDC. En *S. pombe* existen tres CS (29) (Mak1, Mak2

y Mak3); una proteína HPt (Mpr1) y dos RR: Mcs4 y Prr1. Cabe mencionar que a pesar de que los RR de este sistema son homólogos de Ssk1 y Skn7 de *S. cerevisiae* (41, 128) las CS no presentan similitud de secuencia con Sln1, únicamente en los dominios catalíticos. Además ninguna de las CS de este organismo tienen dominios transmembranales y a diferencia de Sln1 poseen un dominio PAS. Mak2 y Mak3 además poseen un dominio GAF y un dominio de cinasa de serina y treonina (29). Se sabe que los dominios PAS y GAF están relacionados con la percepción de señales redox (11, 161).

En *S. pombe* se ha observado que Mak2 y Mak3 transmiten señales de estrés oxidativo hacia el RR Mcs4 a través de Mpr1, activando la vía homóloga de Hog1, llamada Spc1 o Sty1. Spc1 fosforila y activa a Atf1, que es un factor transcripcional clave para la inducción de genes involucrados en la respuesta antioxidante (29, 121). A diferencia de Mak2 y Mak3, Mak1 no es esencial para activar Spc1 en respuesta al estrés oxidativo sin embargo es necesaria para la expresión del gen de la catalasa citosólica (*ctt1*) y de la tiorredoxina reductasa (*trr1*). Además de la respuesta al estrés oxidativo, se ha observado que Mcs4 y Mpr1 se requieren para controlar la transición G2/M mediante la activación de la MAPK Spc1 (9, 117, 118). Prr1 además participa en el desarrollo sexual y asexual (118).

En *C. albicans* se han identificado también tres CS (CaSln1, Chk1 y CaNik1), una proteína HPt (CaYpd1) y dos RR homólogos de secuencia de Ssk1 y Skn7 de *S. cerevisiae* (CaSsk1 y CaSkn7). CaSln1 es la única proteína con regiones

transmembranales en este organismo y es homóloga en secuencia a Sln1 de *S. cerevisiae*. A pesar de esto y en contraste con el fenotipo letal observado en mutantes de esta CS en *S. cerevisiae*, la eliminación de Casln1 es viable (116). Además, a pesar de que la respuesta a estrés osmótico se regula por la vía de MAPK homóloga a Hog1 (149), Casln1 no parece estar involucrada en la regulación de esta vía de señalización. CaNik1 presenta alta identidad con NIK-1/OS-1, una CS conservada entre los hongos filamentosos y se caracteriza por poseer varios dominios HAMP cerca de su extremo N-terminal. Análisis mutacionales indican que las tres CS participan en el desarrollo de hifas en diversas condiciones de crecimiento (4, 156, 173). Por otro lado, derivado de algunos experimentos que demuestran interacciones genéticas y redundancia parcial entre las funciones de las tres CS, se ha sugerido que sus funciones pudieran estar relacionadas (173). Finalmente se ha determinado que CaHK1 es esencial para la virulencia de *C. albicans* en algunos modelos animales (31, 173). En hongos dimórficos como *B. dermatitis* e *H. capsulatum* se ha demostrado que una CS híbrida llamada DRK1, regula el dimorfismo, la transición de micelio a levadura y la expresión de genes relacionados con la virulencia (120).

SDC en hongos filamentosos

Además de los SDC descubiertos en levaduras y hongos dimórficos, homólogos de estos sistemas de señalización se han descrito en diversos hongos filamentosos. Los SDC en este grupo de organismos se caracterizan por mostrar una amplificación del número de CS comparado con los RR presentes.

Ejemplificando la arquitectura de estos circuitos de señalización, en los genomas de *Aspergillus nidulans* y *Neurospora crassa* se observa una relación CS:RR de 15:3 o 11:2 respectivamente (Tabla 1). Esta organización particular sugiere que en este grupo de organismos, los SDC podrían integrar múltiples señales en un conjunto limitado de respuestas (24, 151).

Tabla 1. Sistemas de dos componentes en genomas de hongos y otros organismos

Genoma	Número de genes			
	CS simple DT	CS híbrida DT+DR	HPt ^a	RR ^b
<i>Escherichia coli</i> MG1655	24	5	1	31
<i>Arabidopsis thaliana</i> ^c	1	7	5	22
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	0	1	1	2
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	0	3	1	2
<i>Giberella moniliformis</i>	0	16	1	3
<i>Cochliobolus heterostrophus</i>	0	21	1	3
<i>Botryotinia fuckeliana</i>	0	20	1	2
<i>Aspergillus nidulans</i>	0	15	1	3
<i>Neurospora crassa</i>	0	11	1	2

^a Dominio independiente de una CS

^b No se consideran los ortólogos de RIM15

^c No se incluyen secuencias divergentes

A pesar de que se han descrito SDC en diversos hongos filamentosos, en la gran mayoría de los casos no se ha estudiado detalladamente ni la función ni la estructura de los SDC en este grupo de organismos. En un análisis filogenético las CS de ascomicetos se han clasificado en 11 grandes grupos de acuerdo a la similitud de sus secuencia (38). Muchos de estos grupos contienen CS altamente conservadas en ascomicetos lo que sugiere que estas CS son necesarias para

funciones básicas para la mayoría de los ascomicetos (por ejemplo la percepción y respuesta a cambios osmóticos). Otros grupos incluyen CS que se han distribuido particularmente en algunas especies indicando que posiblemente estas cinasas han evolucionado para adaptarse a aspectos específicos del estilo de vida de algunas especies (Fig. 10) (38).

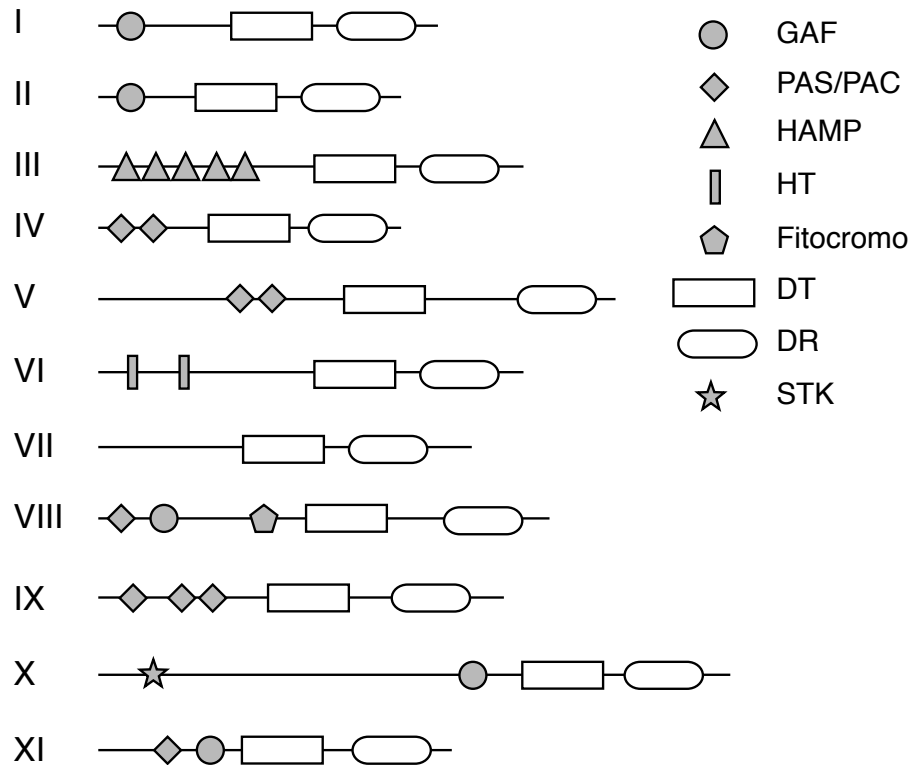


Fig. 10. Clasificación de las CS presentes en hongos filamentosos. Modificada de (38). Con base en la similitud de secuencia, las CS presentes en este grupo de organismos se clasifican en once grupos. Muchas de estas clases se encuentran representadas en múltiples especies de ascomicetos, en algunos casos existen varias proteínas de un mismo grupo en un genoma.

A diferencia de la gran diversidad de dominios sensores presentes en las CS de procariontes, el repertorio de en CS de hongos filamentosos es más reducido. A continuación se describen brevemente los dominios que con mayor frecuencia forman parte de las CS en estos organismos:

PAS/PAC

Son dominios ampliamente distribuidos en proteínas de organismos tan lejanos filogenéticamente como arqueas, bacterias, hongos, plantas, insectos y vertebrados. Normalmente se encuentran en proteínas que perciben cambios en la tensión de oxígeno, el potencial redox o la luz, entre otros (161).

HAMP

Estos dominios frecuentemente se encuentran en proteínas transmembranales que en bacterias actúan como sensores. En estas proteínas, el dominio HAMP se considera una región de enlace que transmite señales entre dominios mediante diversos cambios conformacionales (72, 179). Por otro lado, recientemente se ha descrito que en hongos filamentosos, repeticiones de estos dominios, actúan como interruptor para la actividad de un grupo de CS (110).

GAF

Son dominios presentes fosfodiesterasas reguladas por GMP cíclico (cGMP), algunas adenilil ciclasas, el factor de transcripción bacteriano fhIA y múltiples proteínas de señalización en todos los reinos. A pesar de que existen subdivisiones de estos dominios, todos tienen en común la unión, ya sea covalente o no covalente, de un conjunto muy diverso de pequeñas moléculas reguladoras (67).

Fitocromo

Son dominios presentes en fotorreceptores de diversos grupos de plantas

cianobacterias y hongos que permiten la unión covalente de cromóforos (bilinas) fundamentalmente en el rango de luz roja/roja lejana (600-800nm) (145).

STK

Son dominios que tienen los sitios catalíticos conservados que permiten la fosforilación de proteínas en residuos de treonina/serina/tirosina.

A continuación se enumeran y describen las funciones de las CS, HPt y RR estudiadas en hongos filamentosos. Una de las CS altamente conservada es la CS NIK-1/OS-1 de *Neurospora crassa* clasificada en el grupo III (38). Esta proteína citosólica posee los dominios transmisor y receptor y además se caracteriza por poseer en el extremo N-terminal repeticiones del dominio HAMP (el número varía entre 5 y 8 repeticiones dependiendo de la especie) (Fig 10). Se ha descrito, que la eliminación de esta CS causa un fenotipo de sensibilidad a alta osmolaridad, resistencia a fungicidas fenilpirrólicos y diversas alteraciones en la virulencia y la patogenicidad en varios patógenos de plantas (13, 114, 115, 168, 177) y otros hongos filamentosos. En *Cochliobolus heterostrophus* se ha descrito que además de la cinasa ortóloga a NIK-1/OS-1, los reguladores de la respuesta ortólogos a Ssk1 y Skn7 (*Chssk1* y *Chskn7* respectivamente), están involucrados en la resistencia a la alta osmolaridad y en la sensibilidad al fludioxonil (79). NikA, la proteína homóloga a NIK-1 en *A. nidulans* actúa corriente arriba de los RR SrrA y SskA en respuesta a fungicidas y para regular la esporulación asexual, pero a diferencia de lo que ocurre en la gran mayoría de los hongos filamentosos, es dispensable para la respuesta a estrés osmótico y oxidativo (167). El grupo VIII

incluye CS que en el extremo N-terminal presentan similitud con secuencias presentes en fitocromos de plantas y cianobacterias y que permiten la unión covalente con bilinas. En *Neurospora crassa*, dos CS (PHY-1 y PHY-2) presentan estos dominios. Además se ha demostrado *in vitro*, que un fragmento del extremo N-terminal de PHY-2 expresado y purificado puede unirse a biliverdina o ficocianobilina. Análisis de expresión demuestran que existen dos isoformas resultado de splicing alternativo y que la expresión de ninguno de los transcritos está regulada por luz. Por otro lado se ha demostrado que PHY-1 puede fosforilarse y que esta modificación no altera su localización citoplásmica (52). Para determinar *in vivo* las funciones de estas proteínas, en este mismo estudio se construyeron cepas en las que se eliminaron *phy-1*, *phy-2* y ambos genes. Sorprendentemente, ninguna de las mutantes mostró alteraciones evidentes en respuestas reguladas por luz (52) y solo presentaron cambios en la expresión de *con-10*, un gen que se usa como reportero en este tipo de respuestas (130). FphA de *Aspergillus nidulans* es otro miembro de este grupo de CS. Esta CS presenta en su extremo N-terminal un dominio PAS, una secuencia de localización nuclear, un dominio GAF y un dominio de fitocromo similar al que está presente en bacteriofitocromos (141). FphA al igual que PHY-1 y PHY-2 es capaz de unir biliverdina *in vitro*, pero a diferencia de lo observado en los fitocromos de *N. crassa*, *in vivo* FphA, actúa como un sensor de luz roja y reprime la reproducción asexual en respuesta a este estímulo (22). Los ensayos *in vitro* indican que FphA es una cinasa de histidina funcional; sin embargo, el relevo de fosfatos se lleva a cabo independientemente de la unión a biliverdina (28). FphA interactúa con los factores de transcripción LreA y LreB, homólogos de WC-1 y WC-2 de *N. crassa* y

además con el regulador VeA formando un complejo de localización nuclear (48, 141). LreB y VeA interactúan directamente con FphA y estas interacciones no dependen de las condiciones de luz (140). Todos estos datos relacionan a FphA con la respuesta a la luz y la regulación del desarrollo, aunque aún no se ha determinado a través de cual de los reguladores de respuesta se lleva a cabo esta señalización. El grupo IV de CS incluye a TcsA de *A. nidulans* que poseen además de los dominios transmisor y receptor, dos dominios PAS en su extremo N-terminal (Fig. 10). Cepas mutantes en TcsA presentan defectos en la conidiación; sin embargo, estos defectos se corrigen cuando las mutantes crecen en condiciones de alta osmolaridad o después de la propagación sucesiva de la cepa lo que sugiere que la función de esta proteína puede ser sustituida por la de otra CS (169). TcsB, es la CS ortóloga de Sln1 de *S. cerevisiae*, tiene dos dominios transmembranales en su extremo N-terminal (Fig 6), y es capaz de complementar una mutante en la cinasa Sln1 de *S. cerevisiae*. Sin embargo la ausencia de TcsB no produce (hasta donde se sabe), ningún fenotipo en *A. nidulans* (54). En algunos hongos filamentosos se ha estudiado el papel de las proteínas intermediarias (HPt). Se ha determinado que YpdA de *A. nidulans* resulta esencial ya que no es posible obtener mutantes que tengan eliminadas ambas copias del gene *ypdA* (167). Este mismo fenotipo se ha sugerido por indicios genéticos en *N. crassa* (16). Finalmente en diversos hongos se ha explorado el papel de los RR en estos circuitos de señalización. En *N. crassa* mutantes de RRG-1 (homólogo de Ssk1 de *S. cerevisiae*) son sensibles a estrés osmótico y resistentes a fungicidas fenilpirrólicos. De manera similar a otras mutantes en la vía de MAPK OS-1 ($\Delta os-4$, $\Delta os-5$, $\Delta os-2$) la $\Delta rrg-1$ no produce protoperitecios y por lo tanto se considera

estéril como cepa receptora en una cruce (84). En la cepa silvestre los niveles de OS-2P se elevan en respuesta a estrés osmótico o fludioxonil, en la $\Delta rrg-1$ no es posible detectar fosforilación (84). Análisis de una cepa con un cambio Asp-Asn en el sitio de fosforilación de RRG-1 indican que la fosforilación de esta proteína es necesaria solo para algunas de sus funciones (84). La proteína RRG-2, homóloga de Skn7 de *S. cerevisiae* ha sido escasamente estudiada en *N. crassa*, solo existe un estudio que involucra a este RR en la respuesta a estrés oxidativo (16). En *A. nidulans*, se sabe que SskA, es necesaria para la activación de la vía de MAPK SakA (53, 87) (homóloga de Hog1) en respuesta a estrés osmótico y oxidativo. SsrA (homóloga de Skn7) también participa en la respuesta a estrés osmótico pero está particularmente involucrada en la respuesta a estrés oxidativo. Ambos RR se requieren para una conidiación normal, debido posiblemente a que en mutantes de cualquiera de estas dos proteínas se observa una disminución de los niveles de mensajero de *brlA* (167), un gen esencial para la esporulación asexual en *Aspergillus nidulans* (1, 2, 139).

Especificidad en SDC

En los sistemas biológicos, un módulo se puede duplicar y modificar para ser utilizado en un contexto celular diferente del original. Este proceso a menudo implica la duplicación de genes, y como consecuencia resulta la evolución de grandes familias de genes (35). Sin embargo, la expansión de una familia de proteínas de señalización tiene un costo, las células deben mantener la especificidad entre las distintas vías y evitar interferencias no deseadas entre los componentes de una vía de señalización. Recientemente, derivado de los

proyectos de secuenciación masiva de genomas se ha revelado que las redes de señalización en las células están formadas por un pequeño número de familias de proteínas de señalización repetidas y diversificadas que permiten a los organismos ampliar sus capacidades de procesamiento de información sin tener que inventar nuevas modalidades de señalización. Los organismos que son capaces de sobrevivir en un amplio rango de ambientes, en general dedican una parte importante de su genoma a la transducción de señales y la regulación del metabolismo. Por ejemplo, *Myxococcus xanthus*, una bacteria de vida libre conocida por su complejo desarrollo multicelular y diferenciación codifica 264 SDC. En contraste, sólo 9 SDC están codificados en el genoma del patógeno humano estricto *Helicobacter pylori*.

Las CS y los RR son dos grandes familias de proteínas que conservan homología de secuencia y comparten semejanza estructural significativa. En las bacterias, múltiples SDC están presentes simultáneamente y con patrones de localización similares lo que aumenta la posibilidad de interacciones no específicas entre CS y RR. Una serie de estudios han proporcionado pruebas de que estas interacciones no específicas pueden ocurrir *in vitro* entre proteínas no correspondientes. Por ejemplo, se ha demostrado *in vitro* que las CS de *E.coli* CheA, EnvZ y PhoR pueden catalizar la fosforilación de reguladores de la respuesta no correspondientes (123, 155, 174).

Regulación cruzada y cross-talk

La regulación cruzada en sistemas de dos componentes ha sido definida como el control (bajo condiciones fisiológicas), de un RR por un sistema de regulación diferente, pudiendo o no ser también un sistema de dos componentes (170). De manera similar, el término crosstalk ha sido utilizado para describir las interacciones entre CS y RR no correspondientes pudiendo o no causar regulación cruzada (Fig. 11).

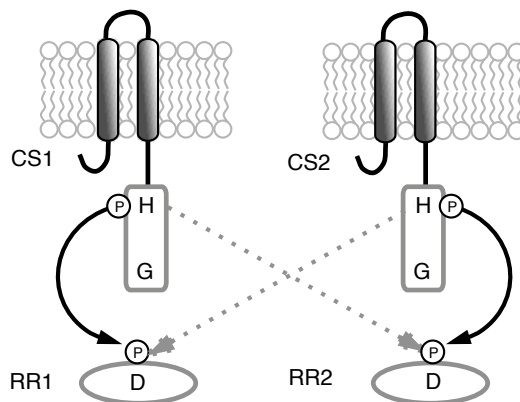


Fig. 11. Fosforilación no específica en SDC. Dos CS hipotéticas (CS1 y CS2) muestran preferencia para fosforilar a su RR correspondiente (flechas continuas), sin embargo dada la homología de secuencia entre homólogos ocasionalmente pueden también interactuar (aunque con menor afinidad) con otros RR y fosforilarlos de forma inespecífica (flechas puntuadas).

A pesar de las similitudes y la probabilidad de interacciones inespecíficas *in vitro*, múltiples evidencias experimentales demuestran que en condiciones fisiológicas, los sensores y las proteínas reguladoras de la respuesta, interactúan de forma muy específica. De acuerdo con esto y como se ha mencionado antes, en condiciones fisiológicas CS y RR muestran una alta especificidad en muchos de los casos en ambas direcciones (como cinasa y como fosfatasa). Prueba de ello es que la regulación cruzada en SDC se ha observado sólo después de introducir múltiples alteraciones genéticas. (Fig. 12). Además aún en condiciones *in vitro* las

CS muestran una marcada preferencia cinética por la proteína RR correspondiente (155).

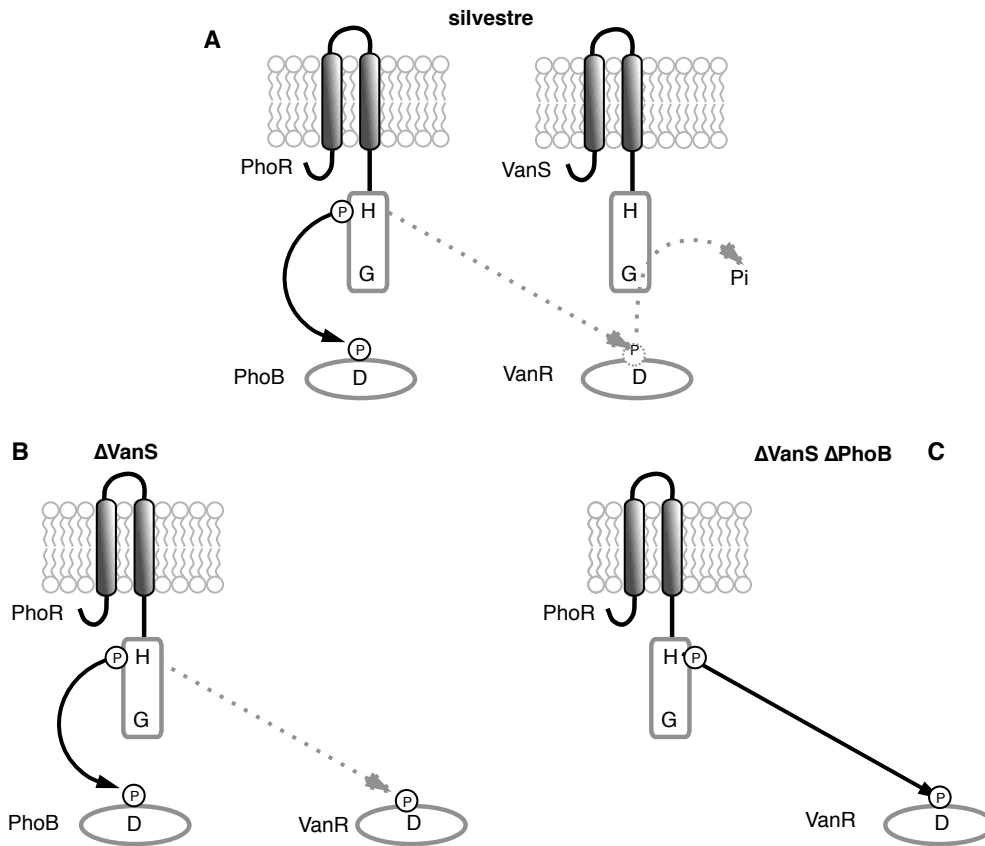


Fig. 12 Especificidad en los SDC PhoR/PhoB y VanS/VanR. **A.** En la cepa silvestre, PhoR muestra preferencia para fosforilar a PhoB y además VanS elimina la fosforilación inespecífica de VanR (proveniente de PhoR o acetil-P). **B.** En ausencia de VanS (Δ VanS), se incrementa la fosforilación inespecífica de VanR por ausencia de la actividad fosfatasa de VanS. **C.** En ausencia de VanS y PhoB, se incrementa la fosforilación inespecífica por la ausencia de competencia con PhoR y de actividad fosfatasa de VanS.

En eucariontes, la existencia de proteínas de andamiaje, la regulación espacial y temporal de la expresión así como las diferencias en los patrones de localización subcelular son los mecanismos más frecuentes para prevenir el efecto indeseable de interferencias entre los diferentes miembros de vías de señalización relacionadas (49, 153, 160). En procariontes, la especificidad de señalización

parece basarse principalmente en el reconocimiento molecular preciso entre pares CS-RR correspondientes.

Determinantes estructurales de la especificidad CS-RR

A pesar de que existen abundantes datos bioquímicos y genéticos relacionados con los SDC, poco se sabe sobre los factores que determinan la especificidad en la interacción entre pares correspondientes de CS y RR a nivel molecular. Estudios recientes han permitido empezar a entender algunos de los factores implicados en la especificidad en la interacción CS-RR. Se ha demostrado por ejemplo, que en *E. coli* para la pareja formada por la CS EnvZ y su regulador correspondiente (OmpR) es suficiente mutar un subconjunto de residuos en el dominio transmisor (EnvZ) o en el dominio receptor (OmpR), para cambiar por completo la especificidad de la interacción EnvZ-OmpR (34, 154). Por otro lado con un enfoque experimental similar se han podido identificar también los residuos determinantes de la especificidad de la interacción CheA-CheY en el sistema quimiotáctico de *Rhodobacter sphaeroides* y posteriormente realizar con éxito la reingeniería en la señalización y la fosfotransferencia en este circuito de señalización (20). Por otro lado, también con base en el estudio de los elementos estructurales que determinan la especificidad CS-RR, en un artículo recientemente publicado se describe que uno de los factores que en mayor medida afecta los procesos de evolución de los mecanismos de señalización en bacterias es la necesidad de evitar que ocurra cross-talk (35). Al comparar e intercambiar los residuos que determinan la especificidad de la CS PhoR entre α y γ -proteobacterias se demostró que estos residuos están sometidos a selección

negativa y que los cambios conservados entre los grupos evitan que ocurra cross-talk con vías de señalización parálogas que existen en particular en las α -proteobacterias (35). Por otro lado con la idea de identificar residuos involucrados en la especificidad CS-RR y debido al gran impacto que esta información tiene para el mejor entendimiento y posible manipulación de estos circuitos de percepción-respuesta, múltiples algoritmos bioinformáticos se han desarrollado (30, 34, 56, 111, 154). Finalmente, aunado a toda esta información, la resolución de la estructura de algunos complejos CS-RR (36) o partes de estos complejos (20), en diferentes conformaciones ha significado un importante avance para el entendimiento de estas interacciones y los determinantes estructurales de la especificidad CS-RR.

Mecanismos alternativos implicados en la especificidad

Además de la selectividad de las CS por sus RR correspondientes, pueden existir mecanismos complementarios para asegurar la especificidad de los SDC. Un ejemplo de este aislamiento de elementos que podrían causar crosstalk se ha descrito recientemente para SDC bacterianos (33). En este trabajo se describe que en CS híbridas, los dominios de cinasa aislados muestran una marcada disminución de la especificidad de fosfotransferencia en comparación con los dominios de cinasa de CS prototípicas; y además que el dominio receptor que en esta clase de CS se encuentra fusionado al dominio de cinasa, es necesario para evitar que ocurra crosstalk en estas vías de señalización.

En eucariontes, existen numerosos ejemplos en los que la especificidad está dictada por la localización espacial y temporal de las proteínas o la presencia de proteínas de andamiaje que dirigen y mantienen a las proteínas en regiones específicas de la célula, evitando así interferencia de proteínas localizadas en otras regiones (49, 153, 160). Aún a pesar de la ausencia de compartimientos delimitados por membrana, la localización subcelular podría desempeñar un papel similar en la especificidad de los SDC procariontes. Existen diversos reportes de CS y RR con localizaciones subcelulares diferenciales en bacterias (18, 26, 88), aunque apenas recientemente se ha empezado a entender la relevancia de estas diferencias con respecto a la especificidad en la señalización (8). Recientemente en *Caulobacter crescentus* se ha descrito un intrincado mecanismo de regulación del circuito de señalización formado por las cinasas DivL y CckA, el regulador de respuesta DivK y la fosfatasa de DivK, PleC en el cual la localización de varios de los componentes, es clave para la progresión y sincronización del ciclo celular bacteriano (163). En *Caulobacter*, la CS CckA es fundamental para la progresión del ciclo celular (80), ya que regula el estado de fosforilación de CtrA, un regulador de respuesta esencial (142), que controla directamente la expresión de cerca de 100 genes (93) y que en células en G1, se une al origen de replicación del cromosoma para inhibir la replicación del DNA (143). DivL es necesaria para la activación de CckA como cinasa, DivK en su forma fosforilada inhibe la actividad de CckA uniéndose a DivL. En etapas iniciales del ciclo celular, CckA está activa porque DivK se encuentra en su estado no fosforilado, sin embargo en etapas posteriores cuando los niveles de DivK fosforilado aumentan, la activación de CckA depende de su co-localización polar con la fosfatasa de DivK, PleC. Esta co-

localización crea un microambiente en el que CckA permanece activa fosforilando a CtrA y con ello permite la progresión y regulación normal del ciclo celular en *Caulobacter*. Otro ejemplo de la importancia de la localización diferencial en la señalización en SDC se presenta en el sistema que regula la producción de biofilm en *Bacillus subtilis*. El regulador maestro que controla la expresión de los genes involucrados con la síntesis de matriz es Spo0A, que es activado por fosforrelevo mediado por múltiples CS (83). En un estudio reciente se describe que las cuatro CS (KinA, KinB, KinC y KinD) contribuyen de forma parcialmente redundante para la formación del biofilm. Además, de acuerdo a este estudio, las CS se localizan diferencialmente formando parejas redundantes, KinA-KinB (que son redundantes entre sí) se encuentran activas principalmente en las regiones interiores (viejas) de la colonia mientras que KinC-KinD (que también cumplen con funciones similares) se encuentran activas en las regiones más externas (jóvenes) de la colonia (109). Finalmente, la importancia de la localización subcelular de CS en procariontes se ve reflejada también en resultados obtenidos en el laboratorio en los que la actividad y/o señalización mediada por algunos SDC, se ve afectada al eliminar genes que codifican para proteínas de función desconocida pero que tienen dominios homólogos a la flotilina-1 presente en eucariontes y que recientemente se han relacionado con la formación de estructuras similares a balsas lipídicas en membranas bacterianas (99). Además de la localización subcelular, la regulación temporal de la expresión podría también ser un mecanismo relevante en bacterias. En la actualidad, sin embargo, no existen reportes que describan la regulación temporal de componentes involucrados en la señalización mediada por SDC en procariontes.

***Neurospora crassa* como modelo de estudio**

Neurospora crassa es un hongo herotático (que requiere la interacción de los dos “mating types” o sexos y que por lo tanto no puede autofecundarse) del *phylum* Ascomicota. Es un aerobio estricto y crece vegetativamente en forma de hifas que se ramifican formando una red conocida como micelio. Las hifas tienen una estructura similar a un tubo parcialmente subdividido en compartimientos o septos que contienen muchos núcleos y permiten el movimiento de organelos y otros componentes celulares. En la naturaleza *N. crassa* es un saprófito de plantas y tradicionalmente se ha descrito como habitante de zonas tropicales y subtropicales. Sin embargo existen datos que indican la penetración de esta especie en regiones templadas especialmente en zonas relacionadas con la agricultura y las actividades humanas (137).

En el ciclo de vida de este organismo se observan claramente dos etapas. En su etapa asexual, la disminución de la cantidad de nutrientes disponibles o la desecación inducen en el micelio el proceso conocido como conidiación o macroconidiación. Este proceso, inicia cuando a partir de las hifas basales, se desarrollan hifas aéreas que darán origen a las conidias (esporas asexuales). Las conidias contienen en promedio cuatro núcleos haploides y están recubiertas de quitina. En condiciones de humedad germinan y dan origen nuevamente a hifas basales que se ramifican formando micelio. La fase sexual se induce (en condiciones de laboratorio) principalmente por reducción en la concentración de nitrógeno del medio. Al percibir este cambio en el medio, las hifas se diferencian y forman una estructura especializada llamada protoperitecio. En el interior de esta

estructura, existe una célula receptora o célula ascogonial. Debido a que *N. crassa* es un hongo heterotálico, además de la célula receptora es necesaria la presencia de una célula donadora. Finalmente para que se lleve a cabo la fecundación es necesaria la formación de una hifa especializada llamada tricogina, que permite que el núcleo de la célula donadora se traslade al interior del protoperitecio y fecunde a la célula receptora. Este es el único momento del ciclo de vida de *N. crassa* en que existe diploidia, el resto de las células son haploides. Posteriormente a partir de varias divisiones (primero meióticas y después mitóticas), se desarrollan ocho ascosporas por cada asca, provenientes cuatro de cada uno de los núcleos fusionados en el protoperitecio. Estas esporas son muy resistentes y a diferencia de las conidias presentan un solo núcleo haploide. Las ascas que contienen las ascosporas, son protegidas en estructuras llamadas peritecios. Las ascosporas son liberadas al aire y se activan a una temperatura aproximada de 60 °C o en presencia de furfural (aldehído derivado de subproductos del maíz, avena o trigo y que suele usarse como materia prima para la producción de polímeros de uso industrial). Una vez activadas, las ascosporas germinan formando hifas basales y finalmente micelio (Fig. 13).

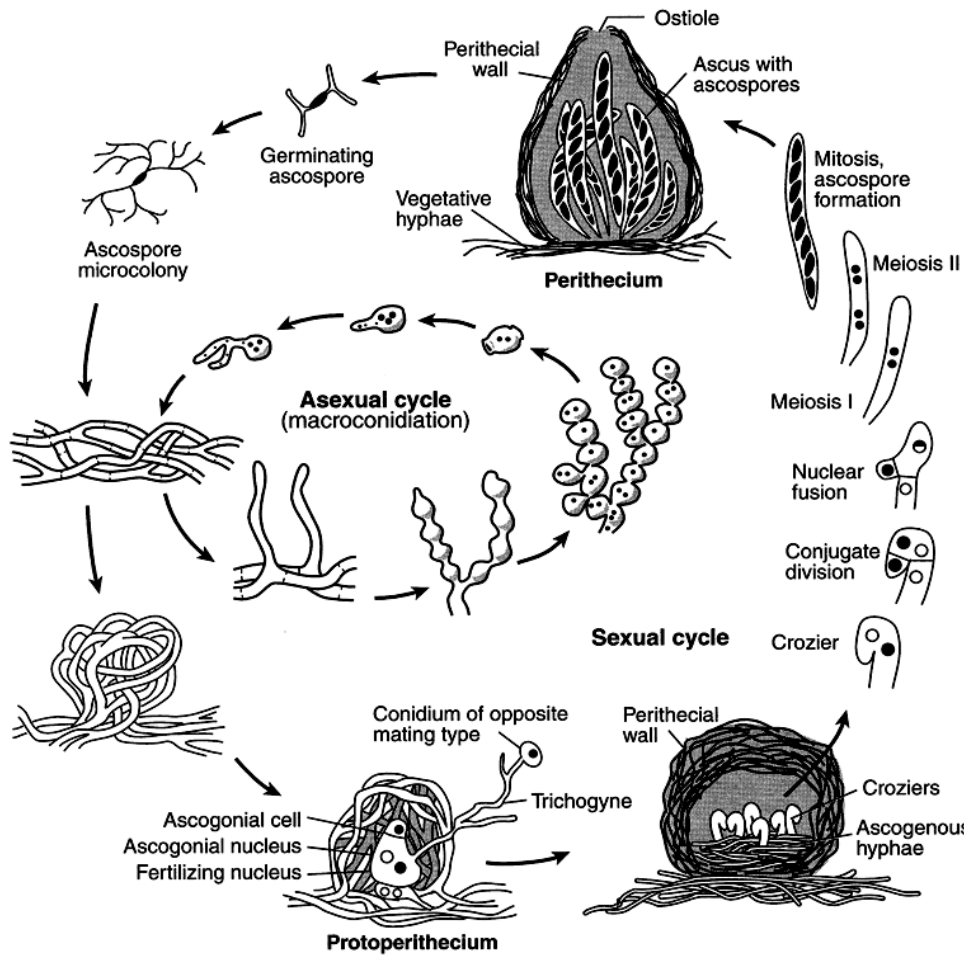


Fig. 13. Ciclo de vida de *Neurospora crassa*. Imagen tomada de (43). Detalles en texto

En *Neurospora* se han estudiado múltiples respuestas a estímulos luminosos entre las que se incluyen fototropismo de las hifas aéreas y los peritecios así como la eyección dirigida de las ascosporas liberadas del peritecio. Estas respuestas están correlacionadas en alguna medida con la existencia de un reloj biológico (43).

Neurospora crassa empezó a usarse como modelo de estudio durante la década de 1920 y adquirió fama a partir del trabajo de Beadle y Tatum, que desarrollaron en este modelo sus estudios de relación entre los genes y las proteínas que resultó en el premio Nobel en 1958. *N. crassa* se ha usado como modelo en

estudios de genética, bioquímica, biología del desarrollo y epigenética. Su genoma está secuenciado y es de acceso público desde 2003

(<http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/neurospora/MultiHome.html>).

Además, trabajar con *N. crassa* recientemente se ha facilitado, debido a los recursos facilitados por el Fungal Genetics Stock Center (FGSC), que incluyen un importante número de cepas silvestres y mutantes así como múltiples herramientas moleculares (108).

En particular, el análisis del genoma de *Neurospora crassa* muestra que en este hongo existen 11 genes que codifican para CS, uno para la única proteína intermediaria (HPT) y dos para reguladores de respuesta canónicos (Fig. 14).

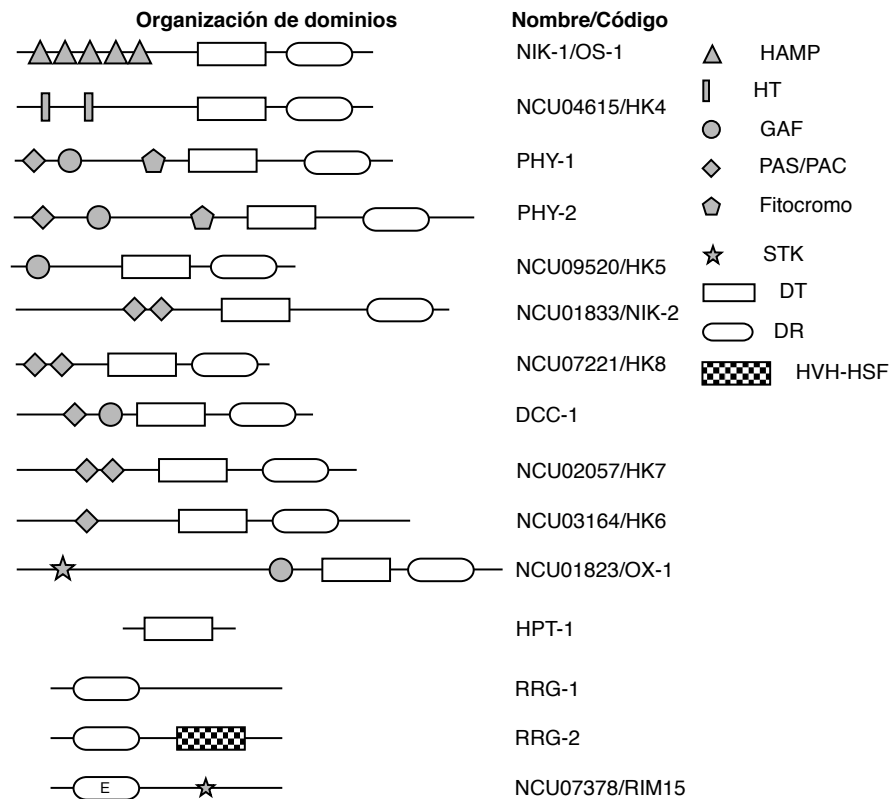


Fig. 14 SDC de *N. crassa*. *N. crassa* posee once CS, una proteína intermediaria (HPT-1), dos RR y una proteína con un DR que presenta un cambio D/E en el Asp conservado (NCU07378).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los sistemas de dos componentes se distribuyen ampliamente en procariontes así como en diferentes grupos de hongos, plantas, mohos mucilaginosos y amebas sociales. Notablemente, este grupo de proteínas no ha sido reportado hasta la fecha, en ningún linaje de metazoos. Algunos de estos sistemas de señalización se han caracterizado detalladamente en bacterias y hongos, como componentes esenciales de la respuesta a diferentes fuentes de estrés y/o como reguladores clave en procesos de desarrollo y diferenciación.

La organización de estos circuitos de señalización muestra interesantes modificaciones entre organismos. En los genomas de muchas bacterias se ha observado una relación cercana a 1:1 en cuanto al número de CS comparadas con los RR. Además se ha demostrado que a pesar de la alta identidad de secuencia entre proteínas homólogas, en muchos de estos sistemas los componentes son capaces de discriminar e interactuar específicamente con su par correspondiente, disminuyendo en gran medida la probabilidad de generación de respuestas no deseadas. En hongos filamentosos en cambio, existe un número mucho mayor de CS que de RR y además sobresale la existencia de una sola proteína intermediaria. En particular, el análisis del genoma de *Neurospora crassa* muestra que en este hongo existen 11 genes que codifican para CS, uno para la única proteína intermediaria (HPT) y dos para reguladores de respuesta canónicos.

Por otro lado, en este hongo se ha descrito solo un proceso (la respuesta al estrés osmótico) en el que el papel de este grupo de proteínas es esencial. La

arquitectura conservada entre los hongos filamentosos con múltiples CS que aparentemente convergen en HPt y escasos RR, plantea interrogantes sobre el funcionamiento de estos circuitos de señalización y su participación en la regulación de múltiples procesos celulares en este grupo de organismos. El conocimiento de otros procesos regulados por los SDC de *Neurospora crassa* proporcionará herramientas útiles para responder a muchas de éstas y otras interrogantes.

HIPÓTESIS

Si los SDC de *Neurospora crassa* participan en la regulación de respuestas a estrés y en procesos de desarrollo, entonces la eliminación sencilla de CS o RR causará fenotipos diferenciados entre las cepas mutantes y la silvestre.

Si en *Neurospora crassa* las CS activan vías de respuesta independientes, entonces la eliminación una CS no puede ser sustituida por la activación de otra.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la participación de los sistemas de dos componentes en respuestas a diferentes fuentes de estrés, así como en procesos de diferenciación y desarrollo que forman parte del ciclo de vida de *Neurospora crassa*.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Caracterizar el papel de CS y RR en respuestas a diferentes fuentes de estrés.
- Evaluar la participación de CS y RR en la regulación de procesos de desarrollo sexual y asexual.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas, medios, y condiciones de crecimiento

Las cepas usadas en este estudio se enlistan en la tabla 2.

Tabla 2

Nombre clave	mat Type	Origen
74-OR23-1VA	A	FGSC 2489
74-ORS-6a	a	FGSC 4200
NCU02815/OS-1/NIK-1	a	FGSC 11695
NCU04615/HK4	A	Este estudio
NCU04834/PHY-1	A	FGSC 11236
NCU05790/PHY-2	A	FGSC 11241
NCU09520/HK5	A	FGSC 11743
NCU01833/NIK-2	A	FGSC 11213
NCU07221/HK8	A	FGSC 11251
NCU00939/DCC-1	a	FGSC 13652
NCU02057/HK7	a	FGSC 11214
NCU03164/HK6	a	FGSC 11225
NCU01823/OX-1	A	FGSC 12020
NCU01895/RRG-1	A	FGSC 13363
NCU02413/RRG-2	A	FGSC 16195
NCU07378/STK-12	a	FGSC 11252
NCU06493/GNA-1	a	FGSC 12370
NCU05206/GNA-3	a	FGSC 11610
NCU08377/CR-1	a	FGSC 11514

A menos que se indique lo contrario, los experimentos se realizaron creciendo los cultivos a una temperatura constante de 30 °C. A continuación se enlistan la composición de los medios usados en este trabajo:

Medio "N" o Vogel

Es el medio mínimo de crecimiento de *Neurospora crassa* y en este trabajo se usó como medio sólido o líquido con glucosa (VG) o sacarosa (VS) como fuente de carbono. Para la preparación de un litro se mezclan los componentes en las cantidades indicadas y se esteriliza 15 min por autoclave.

Para 1 litro

Sales Vogel 50X	20 ml
Glucosa/sacarosa* 10X	100 ml (2 %)
H ₂ O destilada	880 ml
Agar**	15 g (1.5 %)

*La solución 10X de sacarosa o glucosa se esteriliza por filtración y se añade después de la esterilización por autoclave.

**Solo se añade si se desea preparar medio sólido

para 1 litro de sales 50X

H ₂ O	755 ml
Citrato de Na ₃ . 2H ₂ O	125 g
KH ₂ PO ₄	250 g
NH ₄ NO ₃	100 g
MgSO ₄ . 7 H ₂ O	10 g
CaCl ₂ .2H ₂ O (disuelto)	5 g
Solución de elementos traza	5 ml
Solución madre de biotina	2.5 ml

Esta solución se guarda a temperatura ambiente en botella ámbar o cubierta de aluminio y se añaden 3 ml de cloroformo para evitar la proliferación de microorganismos.

Para 100 ml de solución de elementos traza

Ácido cítrico . 1H ₂ O	5 g
ZnSO ₄ . 7H ₂ O	5 g
Fe(NH ₄) ₂ (SO ₄) ₂ . 6 H ₂ O	1 g
CuSO ₄ . 5H ₂ O	0.25 g
MnSO ₄ . 1 H ₂ O	0.05 g
H ₃ BO ₃ (anhidro)	0.05 g
Na ₂ MoO ₄ . 2 H ₂ O	0.05 g

Esta solución se guarda a temperatura ambiente en botella ámbar o cubierta de aluminio y se añaden 1 ml de cloroformo para evitar la proliferación de microorganismos.

Solución madre de biotina

Disolver 5 mg de biotina en 50 ml de etanol 50% y almacenar a 4 °C

Medio FGS

Para 1 litro

Sales Vogel 50X	20 ml
FGS 10X	100 ml (2%)
H ₂ O destilada	880 ml
Agar**	15 g (1.5 %)

*La solución 10X de FGS (fructosa/glucosa/sorbosa) se esteriliza por filtración y se añade después de la esterilización por autoclave.

**Solo se añade si se desea preparar medio sólido

FGS 10X para 500 ml

Fructosa (0.5 %)	2.5 g
Glucosa (0.5 %)	2.5 g
Sorbosa (20 %)	100 g

Medio N-modificado para desarrollo sexual

Se usó el medio modificado por Russo y colaboradores (147) para el estudio del ciclo sexual, se reduce diez veces la cantidad de NH_4NO_3 (de 100 a 10 g por litro) en las sales 50X.

Medio glucosa-arginina

Sales Vogel 50X	1X
Glucosa	0.1 %
Arginina	0.17 %
Biotina	50 ng/ml
Agar	1.5 %

Germinación

Se inocularon 1×10^6 esporas/ml en matraces Erlenmayer con medio VS líquido. Los matraces se incubaron con agitación durante dos horas para eliminar el efecto de la dormancia de las esporas y se contó con cámara de Neubauer la cantidad de esporas, considerando este valor el 100%. Después de 6 horas, se tomó otra alícuota y cuantificó el número de esporas con tubos germinales. Se ha determinado que en cepas silvestres, cerca del 90 % de las esporas germinan a este tiempo (152).

Crecimiento lineal

El crecimiento lineal se determinó en tubos de vidrio de 30 cm de largo y 1.5 cm de diámetro conocidos como tubos "race". Estos tubos se llenaron con 13 ml de medio VS sólido y se inocularon en un extremo con esporas (5×10^4) o micelio de las cepas a estudiar. Posteriormente cada 24 horas se marcó el borde de la colonia y se determinó la tasa de crecimiento en mm/hr o cm/día.

Crecimiento radial

Se inocularon esporas (5×10^4) o micelio en crecimiento exponencial en el centro de una caja de Petri con 20 ml de medio sólido (con glucosa o sacarosa como

fuelle de carbono). Se monitoreó el crecimiento de la colonia cada 12 horas hasta aproximadamente las 30 horas ya que a este tiempo la cepa silvestre llega al borde de la caja. Hasta antes de llegar al borde de la caja se considera crecimiento exponencial.

Cinética de producción de conidios

Estos ensayos se realizaron en tubos de ensaye de 15X1.5 cm con 2.5 ml de medio VG sólido. Se inocularon tres tubos por cada tiempo para cada cepa con 5×10^3 esporas en el centro de la superficie del medio. Los tubos se incubaron a 30 °C en oscuridad y se determinó el número de esporas cada 12 horas por conteo en cámara de Neubauer.

Ensayos de ritmicidad circadiana

Estos ensayos se realizaron en tubos "race" con 13 ml de medio glucosa-arginina. Los tubos se inocularon con micelio en crecimiento exponencial de las cepas a evaluar y se dejaron 24 en luz constante para sincronizar los cultivos. Posteriormente se incubaron a 25 °C con oscuridad constante. Cada 24 hrs. se marcó con luz de seguridad el borde de la colonia y se determinó el periodo usando la distancia entre las marcas (24 hrs) como referencia. El periodo se calculó como el tiempo promedio que tarda cada una de las cepas en recorrer la distancia entre el centro de una banda de conidiación y la siguiente en al menos 3 intervalos de 24 hrs.

Cuantificación de carotenos

La producción de carotenos se evaluó en cajas de Petri con 20 ml de medio N-sacarosa líquido suplementado con 0.2 % de Tween 80 para inhibir la formación de conidios. Las cajas se inocularon por duplicado con 1×10^6 esporas en el centro de la caja y se incubaron en oscuridad durante 36 hrs. Después de este tiempo una caja por cepa se mantuvo en oscuridad y la otra se iluminó con luz fluorescente (855 lux) durante 12 hrs. A continuación se determinó la concentración de carotenos con un protocolo descrito (12). Brevemente el micelio

se obtuvo, se eliminó el exceso de agua y se maceró en un mortero con nitrógeno líquido. Posteriormente se realizaron dos extracciones: una con 1 ml de acetona, después se evaporó la acetona y se extrajo nuevamente con 1ml de hexano. Finalmente se determinó en el espectrofotómetro la cantidad de carotenos contenidos en 0.1g de micelio leyendo la absorbancia máxima a 475nm.

Aislamiento de RNA

El RNA se extrajo con el método de Trizol a partir de micelio molido con nitrógeno líquido en mortero. Se determinó la integridad en gel de agarosa y la concentración en el nanodrop. Se trató con DNasa I libre de RNasa (NEB, M0303L).

RT-PCR

La síntesis de cDNA se hizo con el kit Superscript III First strand de Invitrogen, a partir del RNA obtenido con Trizol de acuerdo a las instrucciones del fabricante. La PCR se realizó usando las siguientes condiciones: 94 5', 25(94 30", 60 35", 72 30") 72 10'.

Aislamiento de proteínas

La extracción de proteínas se realizó a partir de micelio molido con nitrógeno líquido en mortero, en condiciones nativas (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 0.1 mM EDTA, 1 mM β -mercaptoetanol o DTT). Se determinó la concentración por el método de Bradford (27).

Actividad de catalasa en gel

Se inocularon 1×10^6 esporas/ml en matraces con 35ml de medio VS líquido, se incubaron a 30°C con agitación (200 rpm) durante 16 horas, en este punto se añadió el volumen necesario para alcanzar una concentración final de 10mM de H₂O₂ y 600 μ M de tert-butil hidroperóxido (TBHP). A las dos horas del tratamiento se obtuvo el micelio, se molió con nitrógeno líquido y se extrajeron las proteínas en condiciones nativas. Finalmente 15 μ g de cada una de las muestras se corrieron

en geles nativos y se reveló la actividad de catalasa con un método previamente descrito (64)

Determinación de carbonilación de proteínas

La determinación de carbonilación se realizó mediante un ensayo tipo dotblot de acuerdo a las condiciones indicadas por el fabricante (Oxyblot, Millipore).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

I. Resultados publicados

Barba-Ostria, C., Lledías-Martínez, F., Georgellis D. 2011. **The *Neurospora crassa* DCC-1, a putative histidine kinase, is required for normal sexual and asexual development and carotenogenesis.** Eukaryotic Cell, Dec;10 (12): 1733-9. Epub 2011 Nov 4

Resumen

Los sistemas de dos componentes son circuitos de transducción de señales presentes en bacterias, arqueas, plantas, mohos mucilaginosos, amebas sociales y hongos, que regulan respuestas a diferentes fuentes de estrés y que también participan en la regulación de algunos procesos de diferenciación. En este trabajo se caracterizó una cepa que carece del gen anotado con el código NCU00939 en el genoma del hongo filamentoso *Neurospora crassa* y que codifica para una proteína con homología a una cinasa sensora de histidina, a partir de este trabajo denominada DCC-1. Al evaluar el crecimiento vegetativo de la cepa $\Delta dcc-1$ se observó un incremento en la pigmentación naranja por lo que se evaluó la producción de carotenos. Se determinó que la cepa $\Delta dcc-1$ produce el doble de carotenos que produce la cepa silvestre después de ser iluminada y además produce carotenos en oscuridad, condición en la cual no se detectan carotenos en

la cepa silvestre. Además de la producción de carotenos se determinó que la cepa carente de *dcc-1* produce conidios en cultivos sumergidos y a tiempos cortos en medio rico con glucosa como fuente de carbono. En contraste, ambos procesos se encuentran inhibidos en la cepa silvestre. Finalmente y ya que como parte del proceso de conidiación es importante el desarrollo de hifas aéreas, se determinó que la cepa $\Delta dcc-1$ muestra menor elongación de hifas aéreas. Este resultado, al igual que la disminución de la tasa de crecimiento lineal pueden deberse a que la $\Delta dcc-1$ activa prematuramente el programa de conidiación. El hecho de que la eliminación de *dcc-1* causa desrepresión de la producción de carotenos y la conidiación, sugiere que en la cepa silvestre, DCC-1 actúa como un regulador negativo del desarrollo asexual. Se ha documentado ampliamente que en *N. crassa* la producción de conidios muestra un patrón cíclico regulado por el reloj circadiano. Se ha reportado que la proteína reguladora de la respuesta RRG-1, es parte de una de las vías que participan en la regulación de los ritmos circadianos, pero se desconoce que CS actúa iniciando esta cascada de señalización. Por lo que se decidió evaluar la participación de DCC-1 en la regulación de los ritmos circadianos. Interesantemente a diferencia de la cepa silvestre la $\Delta dcc-1$, muestra conidiación cíclica, pero no alteración en la duración del periodo por lo que se determinó que DCC-1 no participa en la regulación circadiana de la conidiación, sino que más bien en la cepa silvestre es responsable de enmascarar este fenotipo.

Una vez determinado el papel de esta CS en la regulación del desarrollo asexual, se evaluó su participación en la regulación del desarrollo sexual. La cepa mutante

puede actuar como donadora o receptora, pero como receptora muestra una localización alterada de los peritecios, que en lugar de ubicarse sobre la superficie del agar, como ocurre en la cepa silvestre, se distribuyen en el interior del medio. Finalmente intentando diseccionar la(s) vía(s) a través de la que DCC-1 ejerce su efecto, buscamos cepas con fenotipos similares. Varios grupos de mutantes mostraron similitud en uno o más fenotipos, pero inesperadamente, las cepas que mostraron mayor similitud a la $\Delta dcc-1$ son mutantes deficientes en la producción de AMP cíclico ($\Delta gna-1$ y $\Delta gna-3$), en las que se ha determinado que la adición exógena de este segundo mensajero, revierte varios fenotipos. Por este motivo, decidimos probar el efecto de la adición de AMPc en los fenotipos observados en la cepa $\Delta dcc-1$. Los defectos en la conidiación prematura, la sobreproducción de carotenos y la elongación de las hifas aéreas de la cepa mutante se corrigieron con la adición exógena de 2 mM de AMPc. Como se ha descrito para otras mutantes con fenotipos similares como $\Delta gna-1$ y $\Delta gna-3$. El resto de los fenotipos (tanto en la fase asexual como en la sexual), no se corrigen tras la adición de AMPc. Estos resultados indican que algunos de los efectos observados en la cepa mutante se deben a una deficiencia en los niveles de AMPc.

II. Resultados no publicados

Los SDC de *Neurospora crassa* participan en respuestas a diferentes tipos de estrés

La eliminación sencilla de CS o RR no afecta la germinación ni el crecimiento lineal de la mayoría de las cepas mutantes.

La presión selectiva para sobrevivir y propagarse en condiciones ambientales no siempre favorables, ha llevado a diferentes organismos a perfeccionar estrategias que incluyen la formación de estructuras de resistencia también llamadas esporas, que les permiten sobrevivir durante estos periodos (131). La germinación de las esporas asexuales (conidios) es un proceso complejo que se ha descrito detalladamente en *N. crassa* (152). Inicialmente para la caracterización de las cepas mutantes de CS o las RR se probó si la eliminación de alguna de estas proteínas tenía un efecto evidente sobre la germinación. Para ello se determinó el porcentaje de germinación de cada una de las mutantes a las 6 hrs en medio líquido con sacarosa como fuente de carbono y se comparó con la germinación alcanzada por la cepa silvestre a las 6 horas en las mismas condiciones. Las cepas mutantes no mostraron diferencias de germinación con la cepa silvestre (Fig. 15). Todas alcanzaron el porcentaje de germinación normal (85% a las 6 horas) como se ha reportado previamente para la cepa silvestre (152). Esto indica que en las condiciones analizadas, ninguna de las CS o RR tiene un papel esencial en la regulación del proceso de germinación.

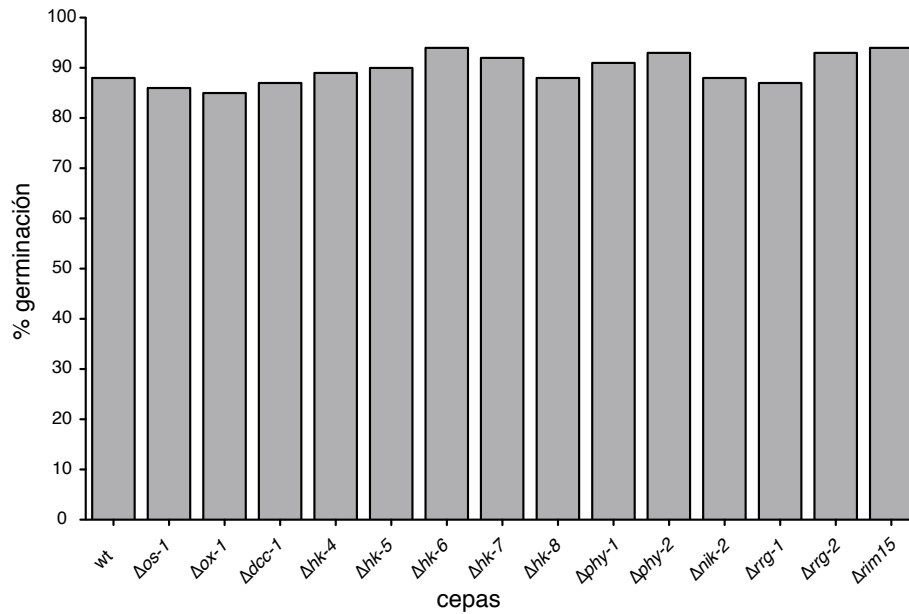


Fig. 15. Germinación de mutantes sencillas de los SDC de *N. crassa*. Se inocularon 1×10^6 esporas/ml de las cepas mutantes en matraces con VS líquido, se incubaron a 30 °C, durante 8 horas con agitación y se determinó el porcentaje de germinación.

También se evaluó el crecimiento vegetativo de las mutantes en medio sólido sin estrés, con sacarosa como fuente de carbono. A excepción de la cepa $\Delta dcc-1$ caracterizada en detalle en el artículo publicado (17), el resto de las cepas (incluida la silvestre), crecieron a razón de 8.5 cm/día (Fig. 16).

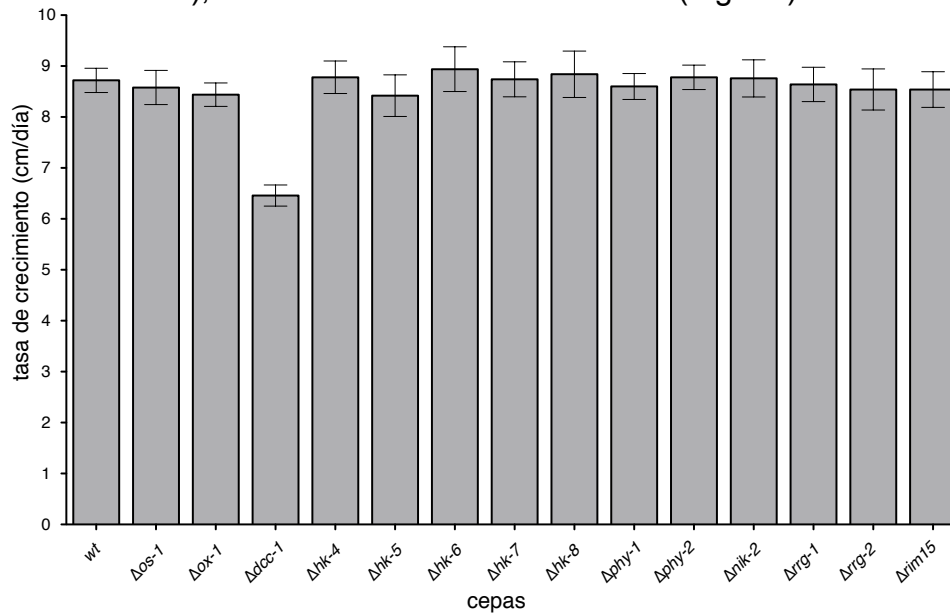
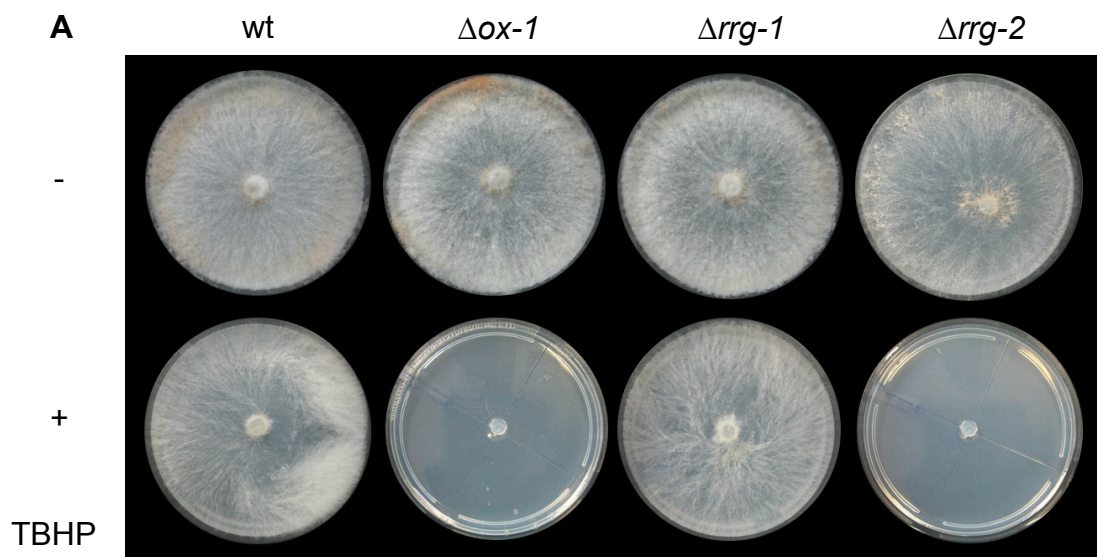


Fig. 16 Crecimiento de mutantes sencillas de los SDC de *N. crassa*. Micelio en fase exponencial de las cepas mutantes se inoculó en tubos “race” con medio VS, se monitoreó el crecimiento cada 24 horas. La tasa de crecimiento se determinó calculando el promedio de crecimiento de tres experimentos independientes \pm su desviación estándar.

OX-1 y RRG-2 son componentes esenciales de una vía de respuesta a estrés oxidativo en N. crassa

Los radicales libres de oxígeno se generan por factores ambientales y también como subproductos del metabolismo aeróbico normal (cadena de transporte de electrones y otros sistemas redox). Las células han desarrollado diversos mecanismos antioxidantes (100, 166), pero a veces los radicales libres se incrementan y se pierde el balance en la homeostasis de pro-oxidantes/anti-oxidantes lo que puede ocasionar daño oxidativo en proteínas, ácidos nucleicos o lípidos, entre otros componentes celulares. En algunos hongos se ha reportado la participación de los SDC en la regulación de la respuesta a estrés oxidativo (16, 90, 121, 148). En *N. crassa* se ha descrito que la proteína reguladora de la respuesta RRG-2 es importante para la respuesta a estrés oxidativo (16). Con base en el paradigma de los SDC, especulamos que al menos una CS debe participar en la percepción del estímulo y la activación de la cascada de señalización, sin embargo en *N. crassa* aún se desconoce cual de las 11 CS activa a RRG-2 en respuesta a estrés oxidativo. Para probar esta idea, se evaluó el efecto de la adición de *tert*-butil hidroperóxido (TBHP), un peróxido orgánico usado en diferentes modelos para inducir estrés oxidativo, sobre el crecimiento vegetativo de mutantes sencillas de las 11 CS codificadas en el genoma de *N. crassa* (Fig. 17). Si la hipótesis es correcta, se esperaría que al menos una de las cepas mutantes (la que actúa corriente arriba de RRG-2) será sensible al estrés oxidativo.

De acuerdo con esta hipótesis, la cepa mutante en el gen NCU01823, que codifica para una CS del grupo X que posee un dominio de cinasa de serina y treonina (Fig. 14) (en adelante referida como OX-1), fue incapaz de crecer en presencia de 500 μ M de TBHP (Fig. 18A). También se evaluó la sensibilidad de esta cepa mediante un ensayo en medio FGS, que restringe el crecimiento y permite la formación de colonias aisladas. Para este ensayo se inocularon aproximadamente 150 esporas/caja de las cepas silvestre $\Delta ox-1$, $\Delta rrg-1$ y $\Delta rrg-2$, en cajas de Petri con medio FGS adicionado con concentraciones crecientes (100 a 500 μ M) de TBHP, las cajas se incubaron a 30 °C durante 36 hrs y para cada cepa se comparó el número de colonias en cada caja con la caja control sin TBHP. En concordancia con los experimentos previos, en este ensayo se observó una mayor sensibilidad de las cepas $\Delta ox-1$ y $\Delta rrg-2$ (Fig. 17B).



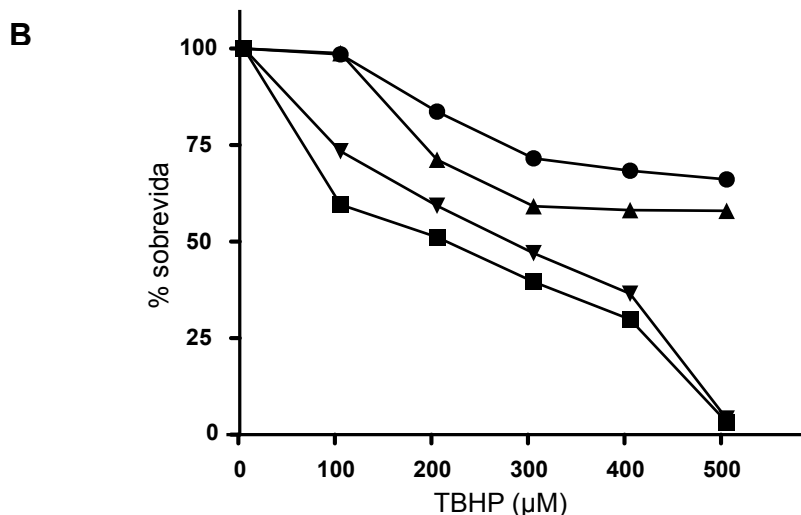


Fig. 18. Las cepas $\Delta ox-1$ y $\Delta rrg-2$ son sensibles al estrés oxidativo. **A.** Se inoculó micelio de las cepas wt, $\Delta ox-1$, $\Delta rrg-1$ and $\Delta rrg-2$ en cajas con VS (-) o adicionado con 500 μ M of TBHP (+). Las imágenes corresponden a 30 horas de incubación a 30 °C **B.** Se inocularon conidios (1×10^6 /ml) de las cepas silvestre (círculos), $\Delta ox-1$ (cuadros), $\Delta rrg-1$ (triángulos) y $\Delta rrg-2$ (triángulos invertidos) en matraces con medio VS líquido, se incubaron 2 horas con agitación (200 rpm), finalmente se plaquearon en cajas con medio FGS con concentraciones crecientes de TBHP. El % de sobrevivida se determinó comparando para cada cepa el número de colonias presentes con el número de colonias de la caja sin TBHP.

Dada la sensibilidad a estrés oxidativo de las cepas $\Delta ox-1$, y $\Delta rrg-2$, se decidió probar en geles de acrilamida la actividad de catalasa de extractos de estas cepas. A las 16 horas + 2 de estrés se observó que las mutantes $\Delta ox-1$ y $\Delta rrg-2$ no presentan actividad de catalasa-3 (la actividad mayoritaria en el micelio en crecimiento y en estrés oxidativo) Este resultado se repite usando como fuentes de estrés TBHP o H_2O_2 (Fig. 19), y permite al menos en parte, explicar la sensibilidad de estas mutantes al estrés oxidativo como resultado de una disminución de la actividad de enzimas antioxidantes.

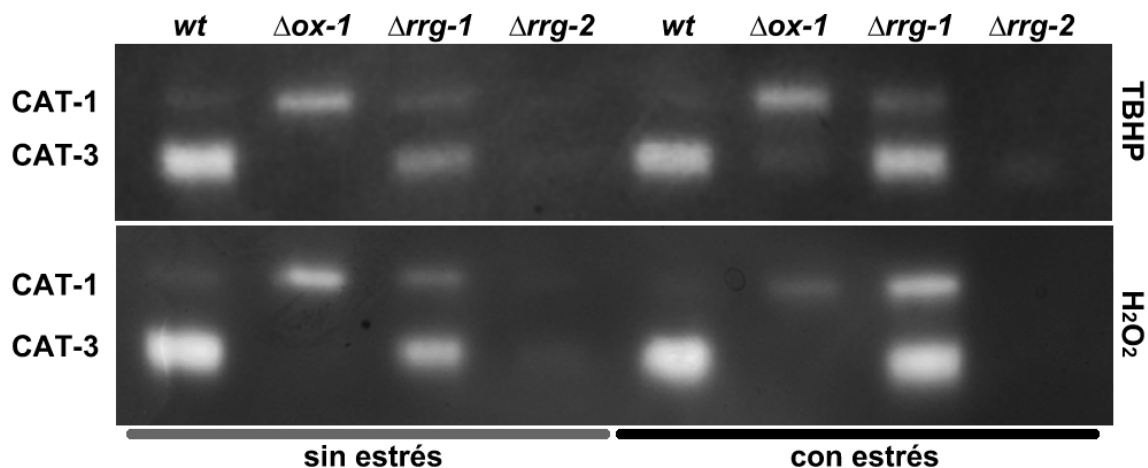


Fig. 19. Las cepas $\Delta ox-1$ y $\Delta rrg-2$ muestran menor actividad de catalasa. Se inocularon 3.5×10^7 esporas de la cepas silvestre, $\Delta ox-1$, $\Delta rrg-1$ y $\Delta rrg-2$, en matraces con medio VS líquido, se incubaron a 30°C con agitación durante 16 horas, posteriormente se añadió en cada caso el volumen necesario para alcanzar una concentración final de 10mM de H_2O_2 y $600\mu\text{M}$ de TBHP. Dos horas después del tratamiento se obtuvo el micelio, se molió con nitrógeno líquido y se extrajeron las proteínas. Se cargaron $15\mu\text{g}$ de proteína por carril en un gel de poliacrilamida en condiciones no desnaturizantes y se determinó la actividad de catalasa.

Finalmente para establecer los efectos celulares de la respuesta antioxidante deficiente de las cepas $\Delta ox-1$ y $\Delta rrg-2$ se evaluó el daño oxidativo de las proteínas, (en este caso el contenido de grupos carbonilo) en presencia de TBHP. El contenido de grupos carbonilo, resultado de la oxidación de residuos de arginina, lisina y treonina (16, 42, 45) es un marcador de estrés oxidativo ampliamente usado. Como se esperaba, el daño oxidativo inducido por el TBHP muestra un incremento sustancial en las cepas $\Delta ox-1$ y $\Delta rrg-2$ en comparación con el daño observado en estas mismas cepas sin el tratamiento (Fig. 20). Estos resultados indican que en *Neurospora crassa*, la CS OX-1 percibe y transmite señales de estrés oxidativo a la proteína reguladora de la respuesta RRG-2 por lo que la presencia de ambas proteínas resulta esencial para una respuesta antioxidante eficiente.

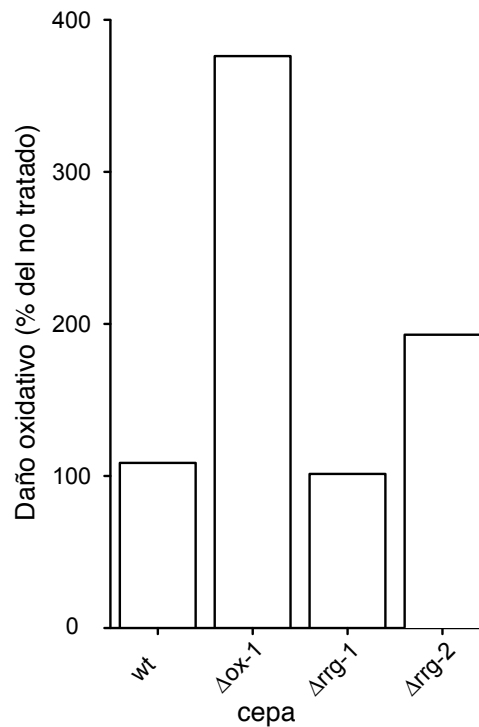


Fig. 20. El daño oxidativo es mayor en las cepas $\Delta ox-1$ y $\Delta rrg-2$. Se recuperaron 100-200 colonias/caja de la superficie de cajas con medio FGS y FGS+TBHP. Las colonias se molieron con nitrógeno líquido y los extractos se resuspendieron en Laemli buffer 1X (sin SDS), se centrifugaron y se cuantificó por Bradford la proteína en los sobrenadantes. Estos sobrenadantes se usaron para la determinación de grupos carbonilo en un ensayo tipo dot-blot de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Oxyblot, Millipore). El daño oxidativo de cada cepa, se presenta como porcentaje del extracto no tratado, siendo 100% el valor del extracto sin tratar. Este experimento se realizó dos veces con resultados similares.

Especificidad en SDC de *Neurospora crassa*

Las CS, RR y HPt de N. crassa se expresan simultáneamente en condiciones de crecimiento vegetativo.

En eucariontes, existen numerosos ejemplos en los que la especificidad está dictada por la localización espacial y temporal de las proteínas. Aunque en *N. crassa* se ha descrito que NIK-1/OS-1 se expresa específicamente durante el crecimiento vegetativo (3) y que PHY-1 se expresa constitutivamente en citoplasma (52), no se ha determinado la expresión del resto de los componentes de estos circuitos de señalización. Debido a que los fenotipos descritos para la

mayoría de las mutantes se caracterizaron en condiciones de crecimiento vegetativo, se decidió evaluar la expresión de todas las CS, HPt y ambos reguladores de respuesta en estas condiciones. Para esto, se seleccionaron oligonucleótidos que permitieran la amplificación de fragmentos de un tamaño aproximado de 400 pb. Se obtuvo RNA total con el método de Trizol, se sintetizó cDNA y se realizaron las PCR en las condiciones descritas. Aunque estos resultados son preliminares, en dos repeticiones independientes se observó que los mRNA de la mayoría de las CS, HPt y ambos reguladores de respuesta parecen estar presentes durante el crecimiento vegetativo (Fig. 21). Cabe recordar que debido a los múltiples niveles de regulación de la expresión la presencia de un mRNA no necesariamente correlaciona con el nivel de la proteína. Para confirmar este resultado por lo tanto, es necesario evaluar (aunque sea de forma relativa) el nivel de estas proteínas. En caso de confirmarse, este resultado implicaría la presencia simultánea de varios componentes incrementando el riesgo de cross-talk, por lo que deberían existir mecanismos alternativos que permitieran la interacción específica entre componentes y la generación de respuestas específicas.

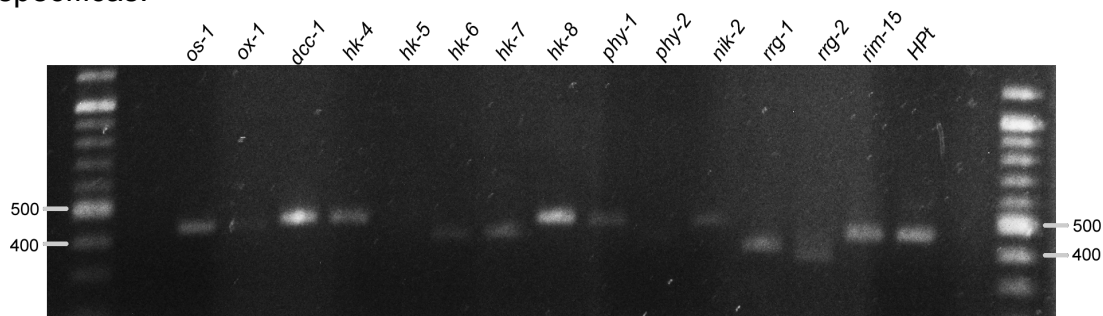


Fig. 21. Durante el crecimiento vegetativo, se observan la mayoría de los mRNA de los SDC. Se extrajo RNA de micelio de la cepa silvestre en crecimiento exponencial, se sintetizó cDNA usando 2.5µg de RNA de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Superscript III, Invitrogen) y se realizó la PCR con las siguientes condiciones 94 5', 25(94 30", 60 35", 72 30") 72 10'. Se observa un gel de agarosa-TBE al 1%, en cada carril se cargaron 5 µl de la reacción.

La respuesta a estrés oxidativo puede activarse independientemente de la CS OX-1

Se estableció previamente que la CS OX-1 activa una vía de respuesta estrés oxidativo. En el genoma de *N. crassa* existen dos CS con dominio de fitocromo (PHY-1 y PHY-2) y al menos cinco CS con dominios PAS que también se relacionan con la detección de cambios en la intensidad de luz, el estado redox, así como en el estado energético de la célula (21). Se diseñó un experimento pensando en que alguna de estas CS pudiera activar una vía común y afectar el fenotipo de sensibilidad a estrés oxidativo de la cepa $\Delta ox-1$. Para este ensayo se inocularon cuatro cajas con medio VS con micelio en fase exponencial de la cepa silvestre y $\Delta ox-1$, dos adicionadas con 500 μ M de TBHP y dos como control sin tratamiento. Una caja de cada grupo se creció en presencia de luz y la otra en oscuridad. Como se había observado previamente, cuando las cajas se incubaron en oscuridad, la mutante no creció en presencia de TBHP (Fig. 22). Sorpresivamente, cuando las cajas se incubaron en presencia de luz, la cepa mutante creció en presencia de TBHP al igual que la cepa silvestre (Fig. 22). Pensando en que tal vez la luz podría haber degradado el TBHP presente en el medio permitiendo con ello el crecimiento de la cepa mutante, se repitió el experimento pre-incubando las cajas 48 hrs con luz antes de ser inoculadas con micelio. Los resultados obtenidos previamente se confirmaron por lo que se descartó el efecto de la luz sobre el TBHP presente en las cajas.

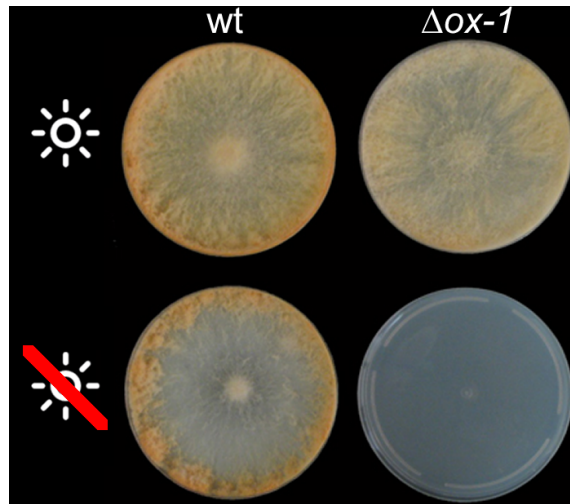


Fig. 22. La luz corrige la sensibilidad a estrés oxidativo de la cepa $\Delta ox-1$. Se inoculó micelio exponencial de las cepas silvestre y $\Delta ox-1$ en el centro de cajas con medio VS+TBHP. Una caja por cada cepa se mantuvo en oscuridad y la otra se incubó en presencia de luz constante.

Este resultado indica que independientemente de OX-1, la respuesta antioxidante puede ser activada por otro mecanismo dependiente de luz. Es importante resaltar que con este experimento no es posible asegurar que la respuesta antioxidante fue iniciada por una CS ya que diversos componentes celulares están involucrados con la percepción de la luz (como el complejo WC-1 WC-2). Adicionalmente, en *N. crassa* se ha documentado ampliamente que la luz induce respuestas antioxidantes como la síntesis de carotenos.

Las CS OS-1 y OX-1 activan dos vías de respuesta no redundantes

En diversos estudios se ha demostrado que la CS OS-1/NIK-1 y sus ortólogos en otros hongos filamentosos son necesarios para la activación de la vía de respuesta a estrés osmótico. Por otro lado, en este trabajo se determinó que la CS OX-1 junto con RRG-2 activa la respuesta a estrés oxidativo y que en condiciones de crecimiento vegetativo ambas CS están presentes. Con base en estos

resultados y en la idea de que con la arquitectura existente en *N. crassa* la activación de cualquiera de las CS llevaría a la fosforilación de los mismos componentes corriente abajo generando una respuesta común, se diseñó un experimento para intentar discernir si la activación de OS-1/OX-1 genera una respuesta específica en cada caso, o si por el contrario resulta en la activación de una respuesta común. Para esto se crecieron las cepas silvestre, $\Delta os-1$ y $\Delta ox-1$ en medio con estrés osmótico (NaCl 1M), oxidativo (TBHP 500 μ M) o ambos. Si ambas CS activan una respuesta común, se esperaría que la sensibilidad al estrés osmótico de la cepa $\Delta os-1$ se corrigiera si la respuesta común fuera activada por la rama de OX-1 en respuesta a estrés oxidativo, lo mismo se esperaría con la sensibilidad a estrés oxidativo de la cepa $\Delta ox-1$. Al evaluar el crecimiento de las cepas en presencia del estrés combinado se observó que solo la cepa silvestre fue capaz de crecer en presencia de ambos estímulos y que en ninguna de las cepas mutantes, la combinación de estímulos activó una respuesta común entre ambas vías de señalización (Tabla 4). Este experimento se repitió variando las concentraciones de NaCl y TBHP, los tiempos de adición de las fuentes de estrés y las condiciones de crecimiento sin que esto tuviera un efecto sobre el resultado. Los resultados de estos experimentos indican que OS-1 y OX-1 activan dos vías que generan respuestas no redundantes.

Tabla 4. Crecimiento de cepas mutantes con estrés combinado

Cepa	VS	NaCl	TBHP	NaCl esperado*	NaCl + TBHP
wt	+	+	+	+	+
$\Delta os-1$	+	-	+	+	-
$\Delta ox-1$	+	+	-	+	-

* En caso de que ambas CS activen una respuesta común

Discusión

SDC como reguladores del desarrollo

Los sistemas de dos componentes están presentes en diversos grupos de organismos con estilos de vida y condiciones de crecimiento muy diferentes. Estas diferencias se reflejan en modificaciones en la arquitectura, la organización de dominios, la localización o las respuestas reguladas por estos sistemas. En este trabajo se usó al hongo filamentoso *Neurospora crassa* como modelo para entender la participación de estos sistemas de señalización en la regulación de respuestas a diversas fuentes de estrés así como en diversos procesos de desarrollo. Inicialmente y debido a que se conocía muy poco (en algunos casos nada) de las posibles condiciones de activación de los SDC en este organismo, inicialmente se evaluó el crecimiento radial de las mutantes sencillas de CS y RR en ausencia y presencia de diversas fuentes de estrés y con modificaciones en la composición del medio de cultivo. Se usó el crecimiento radial como parámetro inicial, porque permite la identificación de fenotipos de sensibilidad y además permite evaluar cambios en la morfología de crecimiento, de manera rápida y eficiente (136).

Los fenotipos se seleccionaron con base en dos criterios principales. Por un lado que existieran reportes previos que sugirieran la participación de SDC en la regulación de la respuesta en otros organismos. También se tomó en cuenta la presencia de dominios GAF, PAS/PAC, HAMP, STK y fitocromos en las CS de *N. crassa*. En la tabla 5, se resumen las condiciones en las que se evaluó el crecimiento radial de las cepas así como los resultados obtenidos. En la mayoría

de los casos, no se observaron defectos en las cepas mutantes, lo que indica que ninguna de las CS resulta esencial para el crecimiento radial o la morfología normal del micelio en estas condiciones.

Tabla 5. Condiciones en las que se evaluó el crecimiento radial y la morfología colonial

Cepa	Condiciones																			
	Osm			Ox		Luz			pH		Temp		MG	FC		FLX	P	MP		
	K	N	S	H	T	A	R	V	H ⁺	OH	A	B		G	E			Co	Cu	
wt	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	
$\Delta os-1$	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
$\Delta ox-1$	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	
$\Delta dcc-1$	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	
$\Delta hk-4$	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	
$\Delta hk-5$	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	
$\Delta hk-6$	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	
$\Delta hk-7$	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	
$\Delta hk-8$	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	
$\Delta phy-1$	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	
$\Delta phy-2$	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	
$\Delta nik-2$	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	
$\Delta rrg-1$	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	
$\Delta rrg-2$	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	

N=NaCl, K=KCl, S=sorbitol, H=H₂O₂, T=TBHP, A=azul, R=roja, V=verde, H⁺=3, OH=9, A=45 °C, B=10 °C, G=glicerol, E=etanol, Co=CoCl₂, Cu=CuSO₄, Temp=temperatura, FC=fuente de carbono, FLX=fludioxonil, P=deficiencia de fosfato, MP= metales pesados

Únicamente la cepa $\Delta dcc-1$ mostró alteraciones en el crecimiento en ausencia de estrés. Se determinó que el incremento en la pigmentación observada en esta cepa, es causada por una mayor producción de carotenos así como a la formación temprana de conidios en medio con glucosa. Por otro lado, se demostró que la $\Delta dcc-1$ produce conidios en condiciones en las que en la cepa silvestre este proceso se reprime (oscuridad, cultivos sumergidos). Además, se observó una disminución de la longitud de las hifas aéreas. El incremento en la producción de conidios y carotenos en la cepa mutante indican que DCC-1 actúa como un regulador negativo del desarrollo sexual. Fenotipos similares a los de la cepa

$\Delta dcc-1$ se han reportado en otras cepas como la $\Delta gna-1$ y la $\Delta gna-3$ que carecen de reguladores de la actividad de la adenilato ciclasa por lo que producen menos AMPc. Estos fenotipos (excepto la conidiación sumergida) se corrigieron con la adición de AMPc, lo que sugiere que DCC-1 ejerce su efecto en estos procesos a través de la regulación de los niveles de AMPc. Finalmente DCC-1 también participa en el enmascaramiento de la conidiación cíclica y la regulación de la localización de peritecios en el desarrollo sexual, aparentemente por un mecanismo no relacionado con AMPc.

De acuerdo con el paradigma de funcionamiento de los SDC bacterianos, la activación de una CS, activa corriente abajo a un RR y con ello inicia una respuesta. Este esquema contempla que la respuesta es activada por el RR y por lo tanto es común que CS y RR que forman parte de una misma vía de respuesta, tengan fenotipos similares o relacionados. Interesantemente, ninguno de los fenotipos de la $\Delta dcc-1$ se observa en mutantes de RRG-1 o RRG-2 lo que sugiere que DCC-1 tiene un papel preponderante en la regulación de varios procesos esenciales para el desarrollo asexual (conidiación, enmascaramiento de la conidiación circadiana, elongación de las hifas aéreas y acumulación de carotenos) y el desarrollo sexual (localización de peritecios), por un mecanismo independiente al fosforrelevo DCC-1-HPt-RRG-1 RRG-2. Aunque esta posibilidad se había sugerido previamente con base en la organización de los SDC en *N. crassa* (24), este trabajo es el primer indicio de este fenómeno.

Respuestas a estrés y especificidad en SDC de Neurospora crassa

En diferentes organismos se ha descrito que los SDC son componentes importantes en la percepción y activación de vías de respuesta a estrés. En *Neurospora crassa* la CS OS-1 regula la activación de la respuesta a estrés osmótico y al fungicida de amplio espectro fludioxonil, presumiblemente a través de HPt y RRG-1. Además se ha reportado que RRG-2 está involucrada en la respuesta a estrés oxidativo. En este trabajo, la cepa $\Delta ox-1$ mostró sensibilidad a estrés oxidativo (TBHP 500 μ M), menor actividad de catalasa-3 y un incremento en el daño oxidativo ocasionado por TBHP comparado con la cepa silvestre. Estos resultados indican que la CS OX-1 actúa corriente arriba de RRG-2 en la respuesta a estrés oxidativo.

A partir de los resultados obtenidos se realizaron experimentos destinados a resolver la intrigante pregunta de si los SDC en hongos filamentosos integran múltiples estímulos en una respuesta común o si la activación de una CS genera una respuesta específica. Para esto y debido que en el genoma de *N. crassa* existen varias CS con dominios involucrados en la percepción de estímulos luminosos, se probó la influencia de la luz en el fenotipo de sensibilidad a estrés oxidativo de la cepa $\Delta ox-1$. La ausencia de OX-1 impide la percepción del estrés oxidativo lo que resulta en la sensibilidad de la cepa al TBHP, si la activación de cualquiera de las CS se refleja corriente abajo en la fosforilación de HPt y ambos RR, la activación de otra CS en ausencia de OX-1 debería activar la misma respuesta y por lo tanto corregir el defecto. Sorprendentemente, al incubar las cajas en presencia de luz, se observó que $\Delta ox-1$, antes incapaz de crecer con

TBHP creció en presencia del agente oxidante, y posteriormente se descartó el efecto de degradación del TBHP por la luz. Este resultado, podría en primera instancia interpretarse como un indicio de que estos circuitos de señalización integran diferentes estímulos para generar una respuesta global, sin embargo deben hacerse algunas precisiones. En *Neurospora crassa* se ha estudiado que la respuesta a estímulos luminosos, se asocia entre otros procesos, con la expresión de genes importantes para la síntesis de moléculas antioxidantes como carotenos y enzimas antioxidantes como catalasas (21). Estos efectos son mediados directamente por la unión al promotor del complejo formado por las proteínas WC-1 y WC-2. Ya que esta respuesta se activa independientemente a los SDC no se puede asumir necesariamente que la respuesta sea inducida por la activación de una CS diferente a OX-1 solo que la luz induce una respuesta antioxidante que corrige el defecto de la cepa $\Delta ox-1$. A partir de los resultados del experimento anterior y con la idea de responder a la misma pregunta, se intentó en ausencia de una CS inducir la activación de otra para evaluar si la activación de la segunda CS era capaz de corregir el efecto generado por la ausencia de la primera. Ya que se sabía que en ausencia de luz, los estímulos de estrés osmótico (NaCl 1M) y estrés oxidativo (TBHP 500 μ M), son percibidos por OS-1 y OX-1 respectivamente, se usaron éstas como condiciones de activación. Los resultados resumidos en la tabla 4, muestran que en ninguno de los casos, la activación de otra CS generó una respuesta redundante que corrigiera la sensibilidad a estrés osmótico u oxidativo de las cepas $\Delta os-1$ o $\Delta ox-1$ respectivamente.

Este resultado indica que al menos para estas dos CS, existe un mecanismo que permite a las células activar una respuesta diferente y por lo tanto no redundante en cada caso. Con base en el resultado previo de que los mRNA de la mayoría de las CS y RR se observan en crecimiento vegetativo y suponiendo que estos mRNA se traducen eficientemente, podría pensarse que en esta condición, la expresión diferencial de componentes no es un mecanismo que determine la especificidad. En procariontes se ha descrito que el principal mecanismo que favorece la especificidad en SDC es la capacidad de ambos componentes de reconocer a nivel molecular a su par correspondiente, sin embargo con la organización de CS y RR presente en hongos filamentosos esta opción parece poco probable. En eucariontes también se han descrito estrategias importantes en el mantenimiento de la especificidad en diversas vías de transducción de señales entre las que destacan la presencia de proteínas adaptadoras que capturan componentes de una vía y permiten la interacción específica solo entre los componentes unidos a la proteína adaptadora, evitando así las interacciones inespecíficas. Aunque esta estrategia permitiría la activación de respuestas específicas, no existen evidencias que indiquen si este mecanismo determina la especificidad de los SDC en *N. crassa*. El estudio de los SDC bacterianos ha demostrado que estos sistemas representan más que circuitos aislados de percepción y respuesta a estímulos, una red intrincada y dinámica con interconexiones en diferentes niveles. En *Neurospora crassa* por lo tanto, es plausible pensar que dependiendo de las necesidades de las células, estos sistemas podrían funcionar para integrar múltiples estímulos en un número limitado de respuestas o para responder específicamente a algunos estímulos.

La caracterización detallada a nivel estructural, bioquímico y genético de estos sistemas en bacterias ha permitido tener un panorama más completo de su funcionamiento y relevancia en diferentes grupos de procariontes. A pesar de las similitudes que existen con los SDC de procariontes, en grupos como plantas u hongos filamentosos, existen aún muchas interrogantes por esclarecer para entender detalladamente estos sistemas de señalización.

CONCLUSIONES

- En *Neurospora crassa* la CS DCC-1 regula diversos procesos importantes en las fases asexual (conidiación, enmascaramiento de la conidiación circadiana, elongación de las hifas aéreas y acumulación de carotenos) y sexual (localización de peritecios) de crecimiento.
- DCC-1 ejerce su efecto, al menos en parte, a través de la regulación de los niveles de AMPc por una vía que no incluye a RRG-1 ni RRG-2.
- La CS OX-1 actúa corriente arriba de RRG-2 para activar una vía de respuesta a estrés oxidativo.
- Las CS OS-1 y OX-1 parecen activar dos vías independientes y de respuesta específicas.

REFERENCIAS

1. **Adams, T. H., M. T. Boylan, and W. E. Timberlake.** 1988. *brlA* is necessary and sufficient to direct conidiophore development in *Aspergillus nidulans*. *Cell* **54**:353-362.
2. **Aguirre, J.** 1993. Spatial and temporal controls of the *Aspergillus brlA* developmental regulatory gene. *Mol Microbiol* **8**:211-218.
3. **Alex, L. A., K. A. Borkovich, and M. I. Simon.** 1996. Hyphal development in *Neurospora crassa*: involvement of a two-component histidine kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**:3416-3421.
4. **Alex, L. A., C. Korch, C. P. Selitrennikoff, and M. I. Simon.** 1998. COS1, a two-component histidine kinase that is involved in hyphal development in the opportunistic pathogen *Candida albicans*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**:7069-7073.
5. **Alvarez, A. F., and D. Georgellis.** 2010. In vitro and in vivo analysis of the ArcB/A redox signaling pathway. *Methods Enzymol* **471**:205-228.
6. **Alvarez, A. F., R. Malpica, M. Contreras, E. Escamilla, and D. Georgellis.** 2010. Cytochrome d but not cytochrome o rescues the toluidine blue growth sensitivity of *arc* mutants of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **192**:391-399.
7. **Alvarez, A. n. F., C. Rodriguez, and D. Georgellis.** 2013. Ubiquinone and menaquinone electron-carriers represent the Ying and Yang in the redox regulation of the ArcB sensor kinase. *Journal of Bacteriology*.
8. **Angelastro, P. S., O. Sliusarenko, and C. Jacobs-Wagner.** 2010. Polar localization of the CckA histidine kinase and cell cycle periodicity of the essential master regulator CtrA in *Caulobacter crescentus*. *J Bacteriol* **192**:539-552.
9. **Aoyama, K., H. Aiba, and T. Mizuno.** 2001. Genetic analysis of the His-to-Asp phosphorelay implicated in mitotic cell cycle control: involvement of histidine-kinase genes of *Schizosaccharomyces pombe*. *Biosci Biotechnol Biochem* **65**:2347-2352.
10. **Appleby, J. L., J. S. Parkinson, and R. B. Bourret.** 1996. Signal transduction via the multi-step phosphorelay: not necessarily a road less traveled. *Cell* **86**:845-848.
11. **Aravind, L., and C. P. Ponting.** 1997. The GAF domain: an evolutionary link between diverse phototransducing proteins. *Trends Biochem Sci* **22**:458-459.
12. **Arrach, N., T. Schmidhauser, and J. Avalos.** 2002. Mutants of the carotene cyclase domain of *al-2* from *Neurospora crassa*. *Molecular Genetics and Genomics* **266**:914-921.
13. **Avenot, H., P. Simoneau, B. Iacomi-Vasilescu, and N. Bataille-Simoneau.** 2005. Characterization of mutations in the two-component histidine kinase gene *AbNIK1* from *Alternaria brassicicola* that confer high dicarboximide and phenylpyrrole resistance. *Curr Genet* **47**:234-243.
14. **Bahn, Y. S.** 2008. Master and commander in fungal pathogens: the two-component system and the HOG signaling pathway. *Eukaryot Cell* **7**:2017-2036.
15. **Bahn, Y. S., K. Kojima, G. M. Cox, and J. Heitman.** 2006. A unique fungal two-component system regulates stress responses, drug sensitivity, sexual development, and virulence of *Cryptococcus neoformans*. *Mol Biol Cell* **17**:3122-3135.

16. **Banno, S., R. Noguchi, K. Yamashita, F. Fukumori, M. Kimura, I. Yamaguchi, and M. Fujimura.** 2007. Roles of putative His-to-Asp signaling modules HPT-1 and RRG-2, on viability and sensitivity to osmotic and oxidative stresses in *Neurospora crassa*. *Current Genetics* **51**:197-208.
17. **Barba-Ostria, C., F. Lledias, and D. Georgellis.** 2011. The *Neurospora crassa* DCC-1 Protein, a Putative Histidine Kinase, Is Required for Normal Sexual and Asexual Development and Carotenogenesis. *Eukaryot Cell* **10**:1733-1739.
18. **Batchelor, E., and M. Goulian.** 2006. Imaging OmpR localization in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **59**:1767-1778.
19. **Beier D, G. R.** 2006. Regulation of bacterial virulence by two-component systems. *Curr Opin Microbiol.* **9**:143-152.
20. **Bell, C. H., S. L. Porter, A. Strawson, D. I. Stuart, and J. P. Armitage.** 2010. Using structural information to change the phosphotransfer specificity of a two-component chemotaxis signalling complex. *PLoS Biol* **8**:e1000306.
21. **Belozerskaia, T. A., and N. N. Gessler.** 2006. [Oxidative stress and cell differentiation in *Neurospora crassa*]. *Mikrobiologiya* **75**:497-501.
22. **Blumenstein, A., K. Vienken, R. Tasler, J. Purschwitz, D. Veith, N. Frankenberg-Dinkel, and R. Fischer.** 2005. The *Aspergillus nidulans* phytochrome FphA represses sexual development in red light. *Curr Biol* **15**:1833-1838.
23. **Blumenstein A, V. K., Tasler R, Purschwitz J, Veith D, Frankenberg-Dinkel N, Fischer R.** 2005. The *Aspergillus nidulans* phytochrome FphA represses sexual development in red light. *Curr Biol.* **15**:1833-1838.
24. **Borkovich, K. A., L. A. Alex, O. Yarden, M. Freitag, G. E. Turner, N. D. Read, S. Seiler, D. Bell-Pedersen, J. Paietta, N. Plesofsky, M. Plamann, M. Goodrich-Tanrikulu, U. Schulte, G. Mannhaupt, F. E. Nargang, A. Radford, C. Selitrennikoff, J. E. Galagan, J. C. Dunlap, J. J. Loros, D. Catcheside, H. Inoue, R. Aramayo, M. Polymenis, E. U. Selker, M. S. Sachs, G. A. Marzluf, I. Paulsen, R. Davis, D. J. Ebbole, A. Zelter, E. R. Kalkman, R. O'Rourke, F. Bowring, J. Yeadon, C. Ishii, K. Suzuki, W. Sakai, and R. Pratt.** 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.
25. **Bourret, R. B., J. F. Hess, K. A. Borkovich, A. A. Pakula, and M. I. Simon.** 1989. Protein phosphorylation in chemotaxis and two-component regulatory systems of bacteria. *J Biol Chem* **264**:7085-7088.
26. **Boyd, J. M.** 2000. Localization of the histidine kinase PilS to the poles of *Pseudomonas aeruginosa* and identification of a localization domain. *Mol Microbiol* **36**:153-162.
27. **Bradford, M. M.** 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**:248-254.
28. **Brandt, S., D. von Stetten, M. Gunther, P. Hildebrandt, and N. Frankenberg-Dinkel.** 2008. The fungal phytochrome FphA from *Aspergillus nidulans*. *J Biol Chem* **283**:34605-34614.
29. **Buck, V., J. Quinn, T. S. Pino, H. Martin, J. Saldanha, K. Makino, B. A. Morgan, and J. B. A. Millar.** 2001. Peroxide Sensors for the Fission Yeast Stress-activated Mitogen-activated Protein Kinase Pathway. *Mol. Biol. Cell* **12**:407-419.

30. **Burger, L., and E. van Nimwegen.** 2008. Accurate prediction of protein-protein interactions from sequence alignments using a Bayesian method. *Mol Syst Biol* **4**:165.
31. **Calera, J. A., X. J. Zhao, F. De Bernardis, M. Sheridan, and R. Calderone.** 1999. Avirulence of *Candida albicans* CaHK1 mutants in a murine model of hematogenously disseminated candidiasis. *Infect Immun* **67**:4280-4284.
32. **Capra, E. J., and M. T. Laub.** 2012. Evolution of two-component signal transduction systems. *Annu Rev Microbiol* **66**:325-347.
33. **Capra, E. J., B. S. Perchuk, O. Ashenberg, C. A. Seid, H. R. Snow, J. M. Skerker, and M. T. Laub.** 2012. Spatial tethering of kinases to their substrates relaxes evolutionary constraints on specificity. *Mol Microbiol* **86**:1393-1403.
34. **Capra, E. J., B. S. Perchuk, E. A. Lubin, O. Ashenberg, J. M. Skerker, and M. T. Laub.** 2010. Systematic dissection and trajectory-scanning mutagenesis of the molecular interface that ensures specificity of two-component signaling pathways. *PLoS Genet* **6**:e1001220.
35. **Capra, E. J., B. S. Perchuk, J. M. Skerker, and M. T. Laub.** 2012. Adaptive mutations that prevent crosstalk enable the expansion of paralogous signaling protein families. *Cell* **150**:222-232.
36. **Casino, P., V. Rubio, and A. Marina.** 2009. Structural insight into partner specificity and phosphoryl transfer in two-component signal transduction. *Cell* **139**:325-336.
37. **Catlett, N. L., O. C. Yoder, and B. G. Turgeon.** 2003. Whole-genome analysis of two-component signal transduction genes in fungal pathogens. *Eukaryot Cell* **2**:1151-1161.
38. **Catlett, N. L., O. C. Yoder, and B. G. Turgeon.** 2003. Whole-Genome Analysis of Two-Component Signal Transduction Genes in Fungal Pathogens. *Eukaryotic Cell* **2**:1151-1161.
39. **Chang, C., and R. C. Stewart.** 1998. The Two-Component System : Regulation of Diverse Signaling Pathways in Prokaryotes and Eukaryotes. *Plant Physiol.* **117**:723-731.
40. **Chauhan, N., D. Inglis, E. Roman, J. Pla, D. Li, J. A. Calera, and R. Calderone.** 2003. *Candida albicans* Response Regulator Gene SSK1 Regulates a Subset of Genes Whose Functions Are Associated with Cell Wall Biosynthesis and Adaptation to Oxidative Stress. *Eukaryotic Cell* **2**:1018-1024.
41. **Cottarel, G.** 1997. Mcs4, a two-component system response regulator homologue, regulates the *Schizosaccharomyces pombe* cell cycle control. *Genetics* **147**:1043-1051.
42. **Dalle-Donne, I., G. Aldini, M. Carini, R. Colombo, R. Rossi, and A. Milzani.** 2006. Protein carbonylation, cellular dysfunction, and disease progression. *J Cell Mol Med* **10**:389-406.
43. **Davis, R. H.** 2000. *Neurospora: Contributions of a Model Organism.* Oxford University Press, New York.
44. **Delgado, J., S. Forst, S. Harlocker, and M. Inouye.** 1993. Identification of a phosphorylation site and functional analysis of conserved aspartic acid residues of OmpR, a transcriptional activator for ompF and ompC in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **10**:1037-1047.

45. **England, K., and T. Cotter.** 2004. Identification of carbonylated proteins by MALDI-TOF mass spectroscopy reveals susceptibility of ER. *Biochem Biophys Res Commun* **320**:123-130.
46. **Fassler, J. S., and A. H. West.** 2010. Genetic and biochemical analysis of the SLN1 pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods Enzymol* **471**:291-317.
47. **Ferrario, M., B. R. Ernstring, D. W. Borst, D. E. Wiese, 2nd, R. M. Blumenthal, and R. G. Matthews.** 1995. The leucine-responsive regulatory protein of *Escherichia coli* negatively regulates transcription of *ompC* and *micF* and positively regulates translation of *ompF*. *J Bacteriol* **177**:103-113.
48. **Fischer, R.** 2008. Developmental biology. Sex and poison in the dark. *Science* **320**:1430-1431.
49. **Flatauer, L. J., S. F. Zadeh, and L. Bardwell.** 2005. Mitogen-activated protein kinases with distinct requirements for Ste5 scaffolding influence signaling specificity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **25**:1793-1803.
50. **Forst, S., D. Comeau, S. Norioka, and M. Inouye.** 1987. Localization and membrane topology of EnvZ, a protein involved in osmoregulation of OmpF and OmpC in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **262**:16433-16438.
51. **Forst SA, R. D.** 1994. Signal transduction by the EnvZ-OmpR phosphotransfer system in bacteria. *Res Microbiol.* **145**:63-73.
52. **Froehlich, A. C., B. Noh, R. D. Vierstra, J. Loros, and J. C. Dunlap.** 2005. Genetic and Molecular Analysis of Phytochromes from the Filamentous Fungus *Neurospora crassa*. *Eukaryotic Cell* **4**:2140-2152.
53. **Furukawa, K., Y. Hoshi, T. Maeda, T. Nakajima, and K. Abe.** 2005. *Aspergillus nidulans* HOG pathway is activated only by two-component signalling pathway in response to osmotic stress. *Mol Microbiol* **56**:1246-1261.
54. **Furukawa, K., Y. Katsuno, T. Urao, T. Yabe, T. Yamada-Okabe, H. Yamada-Okabe, Y. Yamagata, K. Abe, and T. Nakajima.** 2002. Isolation and functional analysis of a gene, *tcsB*, encoding a transmembrane hybrid-type histidine kinase from *Aspergillus nidulans*. *Appl Environ Microbiol* **68**:5304-5310.
55. **Galperin, M. Y.** 2005. A census of membrane-bound and intracellular signal transduction proteins in bacteria: bacterial IQ, extroverts and introverts. *BMC Microbiol* **5**:35.
56. **Gao, R., Y. Tao, and A. M. Stock.** 2008. System-level mapping of *Escherichia coli* response regulator dimerization with FRET hybrids. *Mol Microbiol* **69**:1358-1372.
57. **Georgellis, D., O. Kwon, P. De Wulf, and E. C. Lin.** 1998. Signal decay through a reverse phosphorelay in the Arc two-component signal transduction system. *J Biol Chem* **273**:32864-32869.
58. **Georgellis, D., O. Kwon, and E. C. Lin.** 1999. Amplification of signaling activity of the arc two-component system of *Escherichia coli* by anaerobic metabolites. An in vitro study with different protein modules. *J Biol Chem* **274**:35950-35954.
59. **Georgellis, D., O. Kwon, and E. C. Lin.** 2001. Quinones as the redox signal for the arc two-component system of bacteria. *Science* **292**:2314-2316.
60. **Georgellis, D., Lynch, A. S., Lin, E. C.** 1997. In vitro phosphorylation study of the arc two-component signal transduction system of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **179**:5429-5435.
61. **Grebe, T. W., and J. B. Stock.** 1999. The histidine protein kinase superfamily. *Adv Microb Physiol* **41**:139-227.

62. **Groisman, E. A., E. Chiao, C. J. Lipps, and F. Heffron.** 1989. Salmonella typhimurium phoP virulence gene is a transcriptional regulator. Proc Natl Acad Sci U S A **86**:7077-7081.
63. **Gunsalus, R. P., and S. J. Park.** 1994. Aerobic-anaerobic gene regulation in Escherichia coli: control by the ArcAB and Fnr regulons. Res Microbiol **145**:437-450.
64. **Harris H, D. H.** 1976. Handbook of Enzyme Electrophoresis in Human Genetics. North-Holland Publis, Amsterdam.
65. **He, X. J., K. E. Mulford, and J. S. Fassler.** 2009. Oxidative stress function of the Saccharomyces cerevisiae Skn7 receiver domain. Eukaryot Cell **8**:768-778.
66. **Head, C. G., A. Tardy, and L. J. Kenney.** 1998. Relative binding affinities of OmpR and OmpR-phosphate at the ompF and ompC regulatory sites. J Mol Biol **281**:857-870.
67. **Ho, Y. S., L. M. Burden, and J. H. Hurley.** 2000. Structure of the GAF domain, a ubiquitous signaling motif and a new class of cyclic GMP receptor. EMBO J **19**:5288-5299.
68. **Hoch, J., Silhavy, TJ.** 1995. Two-Component Signal Transduction. ASM Press, Washington, DC.
69. **Hoch, J. A.** 1993. Regulation of the Phosphorelay and the Initiation of Sporulation in Bacillus Subtilis. Annual Review of Microbiology **47**:441-465.
70. **Horie, T., K. Tatebayashi, R. Yamada, and H. Saito.** 2008. Phosphorylated Ssk1 prevents unphosphorylated Ssk1 from activating the Ssk2 mitogen-activated protein kinase kinase kinase in the yeast high-osmolarity glycerol osmoregulatory pathway. Mol Cell Biol **28**:5172-5183.
71. **Hrabak, E. M., and D. K. Willis.** 1992. The lemA gene required for pathogenicity of Pseudomonas syringae pv. syringae on bean is a member of a family of two-component regulators. J Bacteriol **174**:3011-3020.
72. **Hulko, M., F. Berndt, M. Gruber, J. U. Linder, V. Truffault, A. Schultz, J. Martin, J. E. Schultz, A. N. Lupas, and M. Coles.** 2006. The HAMP domain structure implies helix rotation in transmembrane signaling. Cell **126**:929-940.
73. **Hutchings, M. I., H.-J. Hong, and M. J. Buttner.** 2006. The vancomycin resistance VanRS two-component signal transduction system of Streptomyces coelicolor. Molecular Microbiology **59**:923-935.
74. **Hwang, I., and J. Sheen.** 2001. Two-component circuitry in Arabidopsis cytokinin signal transduction. Nature **413**:383-389.
75. **Ishige, K., S. Nagasawa, S. Tokishita, and T. Mizuno.** 1994. A novel device of bacterial signal transducers. EMBO J **13**:5195-5202.
76. **Iuchi, S., and E. Lin.** 1995. Signal transduction in the Arc system for control of operons encoding aerobic respiratory enzymes. ASM Press, Washington, D.C.
77. **Iuchi, S., and E. C. Lin.** 1992. Purification and phosphorylation of the Arc regulatory components of Escherichia coli. J Bacteriol **174**:5617-5623.
78. **Iuchi, S., Z. Matsuda, T. Fujiwara, and E. C. Lin.** 1990. The arcB gene of Escherichia coli encodes a sensor-regulator protein for anaerobic repression of the arc modulon. Mol Microbiol **4**:715-727.
79. **Izumitsu, K., A. Yoshimi, and C. Tanaka.** 2007. Two-component response regulators Ssk1p and Skn7p additively regulate high-osmolarity adaptation and fungicide sensitivity in Cochliobolus heterostrophus. Eukaryot Cell **6**:171-181.

80. **Jacobs, C., I. J. Domian, J. R. Maddock, and L. Shapiro.** 1999. Cell cycle-dependent polar localization of an essential bacterial histidine kinase that controls DNA replication and cell division. *Cell* **97**:111-120.
81. **Jagadeesan, S., P. Mann, C. W. Schink, and P. I. Higgs.** 2009. A novel "four-component" two-component signal transduction mechanism regulates developmental progression in *Myxococcus xanthus*. *J Biol Chem* **284**:21435-21445.
82. **Janiak-Spens, F., P. F. Cook, and A. H. West.** 2005. Kinetic analysis of YPD1-dependent phosphotransfer reactions in the yeast osmoregulatory phosphorelay system. *Biochemistry* **44**:377-386.
83. **Jiang, M., W. Shao, M. Perego, and J. A. Hoch.** 2000. Multiple histidine kinases regulate entry into stationary phase and sporulation in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* **38**:535-542.
84. **Jones, C. A., S. E. Greer-Phillips, and K. A. Borkovich.** 2007. The Response Regulator RRG-1 Functions Upstream of a Mitogen-activated Protein Kinase Pathway Impacting Asexual Development, Female Fertility, Osmotic Stress, and Fungicide Resistance in *Neurospora crassa*. *Mol. Biol. Cell* **18**:2123-2136.
85. **Kaserer, A. O., B. Andi, P. F. Cook, and A. H. West.** 2009. Effects of osmolytes on the SLN1-YPD1-SSK1 phosphorelay system from *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemistry* **48**:8044-8050.
86. **Kaserer, A. O., B. Andi, P. F. Cook, and A. H. West.** 2010. Kinetic studies of the yeast His-Asp phosphorelay signaling pathway. *Methods Enzymol* **471**:59-75.
87. **Kawasaki, L., O. Sanchez, K. Shiozaki, and J. Aguirre.** 2002. SakA MAP kinase is involved in stress signal transduction, sexual development and spore viability in *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol* **45**:1153-1163.
88. **Kentner, D., and V. Sourjik.** 2006. Spatial organization of the bacterial chemotaxis system. *Curr Opin Microbiol* **9**:619-624.
89. **Koretke, K. K., A. N. Lupas, P. V. Warren, M. Rosenberg, and J. R. Brown.** 2000. Evolution of two-component signal transduction. *Mol Biol Evol* **17**:1956-1970.
90. **Krems, B., C. Charizanis, and K. D. Entian.** 1996. The response regulator-like protein Pos9/Skn7 of *Saccharomyces cerevisiae* is involved in oxidative stress resistance. *Curr Genet* **29**:327-334.
91. **Kwon, O., D. Georgellis, and E. C. Lin.** 2000. Phosphorelay as the sole physiological route of signal transmission by the arc two-component system of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **182**:3858-3862.
92. **Lau, P. C., Y. Wang, A. Patel, D. Labbe, H. Bergeron, R. Brousseau, Y. Konishi, and M. Rawlings.** 1997. A bacterial basic region leucine zipper histidine kinase regulating toluene degradation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**:1453-1458.
93. **Laub, M. T., S. L. Chen, L. Shapiro, and H. H. McAdams.** 2002. Genes directly controlled by CtrA, a master regulator of the *Caulobacter* cell cycle. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**:4632-4637.
94. **Leonardo, M. R., and S. Forst.** 1996. Re-examination of the role of the periplasmic domain of EnvZ in sensing of osmolarity signals in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **22**:405-413.
95. **Li, S., A. Ault, C. L. Malone, D. Raitt, S. Dean, L. H. Johnston, R. J. Deschenes, and J. S. Fassler.** 1998. The yeast histidine protein kinase, Sln1p,

- mediates phosphotransfer to two response regulators, Ssk1p and Skn7p. *EMBO J* **17**:6952-6962.
96. **Liu, W., P. Leroux, and S. Fillinger.** 2008. The HOG1-like MAP kinase Sak1 of *Botrytis cinerea* is negatively regulated by the upstream histidine kinase Bos1 and is not involved in dicarboximide- and phenylpyrrole-resistance. *Fungal Genet Biol* **45**:1062-1074.
 97. **Liu, X., and P. De Wulf.** 2004. Probing the ArcA-P modulon of *Escherichia coli* by whole genome transcriptional analysis and sequence recognition profiling. *J Biol Chem* **279**:12588-12597.
 98. **Loomis, W. F., G. Shaulsky, and N. Wang.** 1997. Histidine kinases in signal transduction pathways of eukaryotes. *J Cell Sci* **110 (Pt 10)**:1141-1145.
 99. **Lopez, D., and R. Kolter.** 2010. Functional microdomains in bacterial membranes. *Genes Dev* **24**:1893-1902.
 100. **Lushchak, V. I.** 2011. Adaptive response to oxidative stress: Bacteria, fungi, plants and animals. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* **153**:175-190.
 101. **Lynch, A. S., and E. C. Lin.** 1996. Transcriptional control mediated by the ArcA two-component response regulator protein of *Escherichia coli*: characterization of DNA binding at target promoters. *J Bacteriol* **178**:6238-6249.
 102. **Maeda, T., S. M. Wurgler-Murphy, and H. Saito.** 1994. A two-component system that regulates an osmosensing MAP kinase cascade in yeast. *Nature* **369**:242-245.
 103. **Makino, S., T. Kiba, A. Imamura, N. Hanaki, A. Nakamura, T. Suzuki, M. Taniguchi, C. Ueguchi, T. Sugiyama, and T. Mizuno.** 2000. Genes encoding pseudo-response regulators: insight into His-to-Asp phosphorelay and circadian rhythm in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* **41**:791-803.
 104. **Malpica, R., B. Franco, C. Rodriguez, O. Kwon, and D. Georgellis.** 2004. Identification of a quinone-sensitive redox switch in the ArcB sensor kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**:13318-13323.
 105. **Malpica R, S. G., Rodriguez C, Franco B, Georgellis D.** 2006. Signaling by the arc two-component system provides a link between the redox state of the quinone pool and gene expression. *Antioxid Redox Signal.* **8**:781-795.
 106. **Mascher, T., J. D. Helmann, and G. Unden.** 2006. Stimulus Perception in Bacterial Signal-Transducing Histidine Kinases. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **70**:910-938.
 107. **Matsushika, A., S. Makino, M. Kojima, and T. Mizuno.** 2000. Circadian waves of expression of the APRR1/TOC1 family of pseudo-response regulators in *Arabidopsis thaliana*: insight into the plant circadian clock. *Plant Cell Physiol* **41**:1002-1012.
 108. **McCluskey, K.** 2003. The Fungal Genetics Stock Center: From Molds to Molecules, p. 245-262. *In* J. W. B. Allen I. Laskin, and M. G. Geoffrey (eds.), *Advances in Applied Microbiology*, vol. Volume 52. Academic Press.
 109. **McLoon, A. L., I. Kolodkin-Gal, S. M. Rubinstein, R. Kolter, and R. Losick.** 2011. Spatial regulation of histidine kinases governing biofilm formation in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **193**:679-685.
 110. **Meena, N., H. Kaur, and A. K. Mondal.** 2010. Interactions among HAMP domain repeats act as an osmosensing molecular switch in group III hybrid histidine kinases from fungi. *J Biol Chem* **285**:12121-12132.

111. **Morcos, F., Lamanna, C., Chawla NV. and Izaguirre, J.** 2009. Determination of Specificity Residues in Two Component Systems using Graphlets, International Conference on Bioinformatics and Computational Biology (BIOCOMP), Las Vegas, Nevada, USA.
112. **Morgan, B. A., G. R. Banks, W. M. Toone, D. Raitt, S. Kuge, and L. H. Johnston.** 1997. The Skn7 response regulator controls gene expression in the oxidative stress response of the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J* **16**:1035-1044.
113. **Morgan, B. A., N. Bouquin, G. F. Merrill, and L. H. Johnston.** 1995. A yeast transcription factor bypassing the requirement for SBF and DSC1/MBF in budding yeast has homology to bacterial signal transduction proteins. *EMBO J* **14**:5679-5689.
114. **Motoyama, T., K. Kadokura, T. Ohira, A. Ichiishi, M. Fujimura, I. Yamaguchi, and T. Kudo.** 2005. A two-component histidine kinase of the rice blast fungus is involved in osmotic stress response and fungicide action. *Fungal Genet Biol* **42**:200-212.
115. **Motoyama, T., Ohira, T., Kadokura, K., Ichiishi, A., Fujimura, M., Yamaguchi, I. & Kudo, T.** . 2005. An Os-1 family histidine kinase from a filamentous fungus confers fungicide-sensitivity to yeast. *Curr. Genet.* **47**:298–306.
116. **Nagahashi, S., T. Mio, N. Ono, T. Yamada-Okabe, M. Arisawa, H. Bussey, and H. Yamada-Okabe.** 1998. Isolation of CaSLN1 and CaNIK1, the genes for osmosensing histidine kinase homologues, from the pathogenic fungus *Candida albicans*. *Microbiology* **144 (Pt 2)**:425-432.
117. **Nakamichi, N., H. Yamada, K. Aoyama, R. Ohmiya, H. Aiba, and T. Mizuno.** 2002. His-to-Asp phosphorelay circuitry for regulation of sexual development in *Schizosaccharomyces pombe*. *Biosci Biotechnol Biochem* **66**:2663-2672.
118. **Nakamichi, N., H. Yanada, H. Aiba, K. Aoyama, R. Ohmiya, and T. Mizuno.** 2003. Characterization of the Prr1 response regulator with special reference to sexual development in *Schizosaccharomyces pombe*. *Biosci Biotechnol Biochem* **67**:547-555.
119. **Nemecek JC, W. M., Klein BS.** 2007. Detection and measurement of two-component systems that control dimorphism and virulence in fungi. *Methods Enzymol.* **422**:465-487.
120. **Nemecek, J. C., M. Wuthrich, and B. S. Klein.** 2006. Global control of dimorphism and virulence in fungi. *Science* **312**:583-588.
121. **Nguyen, A. N., A. Lee, W. Place, and K. Shiozaki.** 2000. Multistep Phosphorelay Proteins Transmit Oxidative Stress Signals to the Fission Yeast Stress-activated Protein Kinase. *Mol. Biol. Cell* **11**:1169-1181.
122. **Ninfa, A. J., and B. Magasanik.** 1986. Covalent modification of the glnG product, NRI, by the glnL product, NRII, regulates the transcription of the glnALG operon in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**:5909-5913.
123. **Ninfa, A. J., E. G. Ninfa, A. N. Lupas, A. Stock, B. Magasanik, and J. Stock.** 1988. Crosstalk between bacterial chemotaxis signal transduction proteins and regulators of transcription of the Ntr regulon: evidence that nitrogen assimilation and chemotaxis are controlled by a common phosphotransfer mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **85**:5492-5496.

124. **Nixon, B. T., C. W. Ronson, and F. M. Ausubel.** 1986. Two-component regulatory systems responsive to environmental stimuli share strongly conserved domains with the nitrogen assimilation regulatory genes *ntrB* and *ntrC*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**:7850-7854.
125. **Nohno, T., S. Noji, S. Taniguchi, and T. Saito.** 1989. The *narX* and *narL* genes encoding the nitrate-sensing regulators of *Escherichia coli* are homologous to a family of prokaryotic two-component regulatory genes. *Nucleic Acids Res* **17**:2947-2957.
126. **Nunez Oreza, L. A., A. F. Alvarez, O. Arias, II, A. Torres Larios, and D. Georgellis.** 2012. The ArcB Leucine Zipper Domain Is Required for Proper ArcB Signaling. *PLoS One* **7**:e38187.
127. **Oehme, F., and S. C. Schuster.** 2001. Osmotic stress-dependent serine phosphorylation of the histidine kinase homologue DokA. *BMC Biochem* **2**:2.
128. **Ohmiya, R., C. Kato, H. Yamada, H. Aiba, and T. Mizuno.** 1999. A fission yeast gene (*prr1(+)*) that encodes a response regulator implicated in oxidative stress response. *J Biochem* **125**:1061-1066.
129. **Oka, A., H. Sakai, and S. Iwakoshi.** 2002. His-Asp phosphorelay signal transduction in higher plants: receptors and response regulators for cytokinin signaling in *Arabidopsis thaliana*. *Genes Genet Syst* **77**:383-391.
130. **Olmedo, M., C. Ruger-Herreros, E. M. Luque, and L. M. Corrochano.** 2010. A complex photoreceptor system mediates the regulation by light of the conidiation genes *con-10* and *con-6* in *Neurospora crassa*. *Fungal Genet Biol* **47**:352-363.
131. **Osharov, N., and G. S. May.** 2001. The molecular mechanisms of conidial germination. *FEMS Microbiol Lett* **199**:153-160.
132. **Parkinson, J. S., and E. C. Kofoid.** 1992. Communication modules in bacterial signaling proteins. *Annu Rev Genet* **26**:71-112.
133. **Parkinson, J. S., and E. C. Kofoid.** 1992. Communication Modules in Bacterial Signaling Proteins. *Annual Review of Genetics* **26**:71-112.
134. **Pena-Sandoval, G. R., and D. Georgellis.** 2010. The ArcB sensor kinase of *Escherichia coli* autophosphorylates by an intramolecular reaction. *J Bacteriol* **192**:1735-1739.
135. **Pena-Sandoval, G. R., O. Kwon, and D. Georgellis.** 2005. Requirement of the receiver and phosphotransfer domains of ArcB for efficient dephosphorylation of phosphorylated ArcA in vivo. *J Bacteriol* **187**:3267-3272.
136. **Pereira, R. C., and S. Said.** 2009. Alterations in growth and branching of *Neurospora crassa* caused by sub-inhibitory concentrations of antifungal agents. *Rev Argent Microbiol* **41**:39-44.
137. **Perkins, D., Turner, BC.** 1988. *Neurospora* from natural populations: Toward the population biology of a haploid eukaryote. *Exp Mycol* **12**:91-131.
138. **Posas, F., Wurgler-Murphy S. M., Maeda, T., Witten, E. A., Thai, T. C., and Saito, H.** 1996. Yeast HOG1 MAP kinase cascade is regulated by a multistep phosphorelay mechanism in the *SLN1-YPD1-SSK1* "two-component" osmosensor. *Cell* **86**:865-875.
139. **Prade, R. A., and W. E. Timberlake.** 1993. The *Aspergillus nidulans* *brlA* regulatory locus consists of overlapping transcription units that are individually required for conidiophore development. *EMBO J* **12**:2439-2447.

140. **Purschwitz, J., S. Muller, and R. Fischer.** 2009. Mapping the interaction sites of *Aspergillus nidulans* phytochrome FphA with the global regulator VeA and the White Collar protein LreB. *Mol Genet Genomics* **281**:35-42.
141. **Purschwitz, J., S. Muller, C. Kastner, M. Schoser, H. Haas, E. A. Espeso, A. Atoui, A. M. Calvo, and R. Fischer.** 2008. Functional and physical interaction of blue- and red-light sensors in *Aspergillus nidulans*. *Curr Biol* **18**:255-259.
142. **Quon, K. C., G. T. Marczynski, and L. Shapiro.** 1996. Cell cycle control by an essential bacterial two-component signal transduction protein. *Cell* **84**:83-93.
143. **Quon, K. C., B. Yang, I. J. Domian, L. Shapiro, and G. T. Marczynski.** 1998. Negative control of bacterial DNA replication by a cell cycle regulatory protein that binds at the chromosome origin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**:120-125.
144. **Roberts, D. L., D. W. Bennett, and S. A. Forst.** 1994. Identification of the site of phosphorylation on the osmosensor, EnvZ, of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **269**:8728-8733.
145. **Rockwell, N. C., Y. S. Su, and J. C. Lagarias.** 2006. Phytochrome structure and signaling mechanisms. *Annu Rev Plant Biol* **57**:837-858.
146. **Rodriguez, C., O. Kwon, and D. Georgellis.** 2004. Effect of D-lactate on the physiological activity of the ArcB sensor kinase in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **186**:2085-2090.
147. **Russo, V., Sommer, T. and Chambers, J. A. A.** 1985. A modified Vogel's medium for crossings, mating-type tests and the isolation of female-sterile mutants of *Neurospora crassa*. *Neurospora Newslett.* **32**:10-11.
148. **Saijo, T. M., Taiga, K. Izumikawa, T. Mihara, T. Takazono, K. Kosai, Y. Imamura, M. Seki, H. Kakeya, Y. Yamamoto, K. Yanagihara, and S. Kohno.** 2010. Skn7p Is Involved in Oxidative Stress Response and Virulence of *Candida glabrata*. *Mycopathologia* **169**:81-90.
149. **San Jose, C., R. A. Monge, R. Perez-Diaz, J. Pla, and C. Nombela.** 1996. The mitogen-activated protein kinase homolog HOG1 gene controls glycerol accumulation in the pathogenic fungus *Candida albicans*. *J Bacteriol* **178**:5850-5852.
150. **Santos, J. L., and K. Shiozaki.** 2001. Fungal histidine kinases. *Sci STKE* **2001**:re1.
151. **Schaller, G. E., S. H. Shiu, and J. P. Armitage.** 2011. Two-component systems and their co-option for eukaryotic signal transduction. *Curr Biol* **21**:R320-330.
152. **Schmit, J. C., and S. Brody.** 1976. Biochemical genetics of *Neurospora crassa* conidial germination. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **40**:1-41.
153. **Schwartz, M. A., and H. D. Madhani.** 2004. Principles of MAP kinase signaling specificity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Annu Rev Genet* **38**:725-748.
154. **Skerker, J. M., B. S. Perchuk, A. Siryaporn, E. A. Lubin, O. Ashenberg, M. Goulian, and M. T. Laub.** 2008. Rewiring the specificity of two-component signal transduction systems. *Cell* **133**:1043-1054.
155. **Skerker, J. M., M. S. Prasol, B. S. Perchuk, E. G. Biondi, and M. T. Laub.** 2005. Two-component signal transduction pathways regulating growth and cell cycle progression in a bacterium: a system-level analysis. *PLoS Biol* **3**:e334.
156. **Srikantha, T., L. Tsai, K. Daniels, L. Enger, K. Highley, and D. R. Soll.** 1998. The two-component hybrid kinase regulator CaNIK1 of *Candida albicans*. *Microbiology* **144 (Pt 10)**:2715-2729.

157. **Stepanova, A. N., and J. M. Alonso.** 2005. Arabidopsis ethylene signaling pathway. *Sci STKE* **2005**:cm4.
158. **Stock, A. M., V. L. Robinson, and P. N. Goudreau.** 2000. Two-Component Signal Transduction. *Annual Review of Biochemistry* **69**:183-215.
159. **Stock, J. B., A. J. Ninfa, and A. M. Stock.** 1989. Protein phosphorylation and regulation of adaptive responses in bacteria. *Microbiol Rev* **53**:450-490.
160. **Tatebayashi K, Y. K., Tanaka K, Tomida T, Maruoka T, Kasukawa E, Saito H.** 2006. Adaptor functions of Cdc42, Ste50, and Sho1 in the yeast osmoregulatory HOG MAPK pathway. *EMBO J.* **25**:797-803.
161. **Taylor, B. L., and I. B. Zhulin.** 1999. PAS domains: internal sensors of oxygen, redox potential, and light. *Microbiol Mol Biol Rev* **63**:479-506.
162. **Thomason, P. A., D. Traynor, G. Cavet, W. T. Chang, A. J. Harwood, and R. R. Kay.** 1998. An intersection of the cAMP/PKA and two-component signal transduction systems in *Dictyostelium*. *EMBO J* **17**:2838-2845.
163. **Tsokos, C. G., B. S. Perchuk, and M. T. Laub.** 2011. A dynamic complex of signaling proteins uses polar localization to regulate cell-fate asymmetry in *Caulobacter crescentus*. *Dev Cell* **20**:329-341.
164. **Ulrich, L. E., and I. B. Zhulin.** 2010. The MiST2 database: a comprehensive genomics resource on microbial signal transduction. *Nucleic Acids Res* **38**:D401-407.
165. **Urao, T., K. Yamaguchi-Shinozaki, and K. Shinozaki.** 2000. Two-component systems in plant signal transduction. *Trends Plant Sci* **5**:67-74.
166. **Valko, M., D. Leibfritz, J. Moncol, M. T. Cronin, M. Mazur, and J. Telser.** 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* **39**:44-84.
167. **Vargas-Perez, I., O. Sanchez, L. Kawasaki, D. Georgellis, and J. Aguirre.** 2007. Response regulators SrrA and SskA are central components of a phosphorelay system involved in stress signal transduction and asexual sporulation in *Aspergillus nidulans*. *Eukaryot Cell* **6**:1570-1583.
168. **Viaud, M., S. Fillinger, W. Liu, J. S. Polepalli, P. Le Pecheur, A. R. Kunduru, P. Leroux, and L. Legendre.** 2006. A class III histidine kinase acts as a novel virulence factor in *Botrytis cinerea*. *Mol Plant Microbe Interact* **19**:1042-1050.
169. **Virginia, M., C. L. Appleyard, W. L. McPheat, and M. J. Stark.** 2000. A novel 'two-component' protein containing histidine kinase and response regulator domains required for sporulation in *Aspergillus nidulans*. *Curr Genet* **37**:364-372.
170. **Wanner, B. L.** 1992. Is cross regulation by phosphorylation of two-component response regulator proteins important in bacteria? *J Bacteriol* **174**:2053-2058.
171. **Wuichet, K., B. J. Cantwell, and I. B. Zhulin.** 2010. Evolution and phyletic distribution of two-component signal transduction systems. *Curr Opin Microbiol* **13**:219-225.
172. **Wurgler-Murphy, S. M., and H. Saito.** 1997. Two-component signal transducers and MAPK cascades. *Trends Biochem Sci* **22**:172-176.
173. **Yamada-Okabe, T., T. Mio, N. Ono, Y. Kashima, M. Matsui, M. Arisawa, and H. Yamada-Okabe.** 1999. Roles of three histidine kinase genes in hyphal development and virulence of the pathogenic fungus *Candida albicans*. *J Bacteriol* **181**:7243-7247.

174. **Yamamoto, K., K. Hirao, T. Oshima, H. Aiba, R. Utsumi, and A. Ishihama.** 2005. Functional characterization in vitro of all two-component signal transduction systems from *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **280**:1448-1456.
175. **Yeh, K. C., and J. C. Lagarias.** 1998. Eukaryotic phytochromes: light-regulated serine/threonine protein kinases with histidine kinase ancestry. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**:13976-13981.
176. **Yoshida, T., L. Qin, L. A. Egger, and M. Inouye.** 2006. Transcription regulation of *ompF* and *ompC* by a single transcription factor, *OmpR*. *J Biol Chem* **281**:17114-17123.
177. **Yoshimi, A., M. Tsuda, and C. Tanaka.** 2004. Cloning and characterization of the histidine kinase gene *Dic1* from *Cochliobolus heterostrophus* that confers dicarboximide resistance and osmotic adaptation. *Mol Genet Genomics* **271**:228-236.
178. **Zhang, H., K. Liu, X. Zhang, W. Song, Q. Zhao, Y. Dong, M. Guo, X. Zheng, and Z. Zhang.** 2010. A two-component histidine kinase, *MoSLN1*, is required for cell wall integrity and pathogenicity of the rice blast fungus, *Magnaporthe oryzae*. *Curr Genet* **56**:517-528.
179. **Zhu, L., P. G. Bolhuis, and J. Vreede.** 2013. The HAMP signal relay domain adopts multiple conformational states through collective piston and tilt motions. *PLoS Comput Biol* **9**:e1002913.

The *Neurospora crassa* DCC-1 Protein, a Putative Histidine Kinase, Is Required for Normal Sexual and Asexual Development and Carotenogenesis

Carlos Barba-Ostria, Fernando Lledías and Dimitris Georgellis

Eukaryotic Cell 2011, 10(12):1733. DOI:
10.1128/EC.05223-11.

Published Ahead of Print 4 November 2011.

Updated information and services can be found at:
<http://ec.asm.org/content/10/12/1733>

These include:

REFERENCES

This article cites 41 articles, 20 of which can be accessed free at: <http://ec.asm.org/content/10/12/1733#ref-list-1>

CONTENT ALERTS

Receive: RSS Feeds, eTOCs, free email alerts (when new articles cite this article), [more»](#)

Information about commercial reprint orders: <http://ec.asm.org/site/misc/reprints.xhtml>
To subscribe to to another ASM Journal go to: <http://journals.asm.org/site/subscriptions/>

The *Neurospora crassa* DCC-1 Protein, a Putative Histidine Kinase, Is Required for Normal Sexual and Asexual Development and Carotenogenesis[∇]

Carlos Barba-Ostria,¹ Fernando Lledías,² and Dimitris Georgellis^{1*}

Departamento de Genética Molecular, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510 México D.F., México,¹ and Departamento de Biología Molecular de Plantas, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, 62250 Morelos, México²

Received 26 August 2011/Accepted 23 October 2011

Two-component signaling pathways based on phosphoryl group transfer between histidine kinase and response regulator proteins regulate environmental responses in bacteria, archaea, plants, slime molds, and fungi. Here we characterize a mutant form of DCC-1, a putative histidine kinase encoded by the NCU00939 gene of the filamentous fungus *Neurospora crassa*. We show that this protein participates in the regulation of processes such as conidiation, perithecial development, and, to a certain degree, carotenogenesis. Furthermore, DCC-1 is suggested to exert its effect by promoting cyclic AMP production, thereby placing this protein within the context of a signaling pathway.

Signal transduction by phosphorylation and dephosphorylation of cellular proteins plays pivotal roles in regulating numerous cellular processes in both prokaryotes and eukaryotes. In prokaryotes, signaling by phosphoryl group transfer reactions relies on two-component signal transduction (TCS) pathways that depend on histidine and aspartyl residues as phosphoryl group donors and acceptors (24, 26, 39, 43). The prototypical two-component system comprises two protein components, a sensor histidine kinase (HK) and its cognate response regulator (RR), that contain a transmitter domain with an invariant histidine residue and a receiver domain with an invariant aspartate residue, respectively. Signal reception by the HK is believed to propagate conformational changes in the protein that stimulate an ATP-dependent autophosphorylation at the conserved histidine residue. The phosphokinase then donates the phosphoryl group to the conserved aspartate residue in the receiver domain of the cognate RR, thereby rendering it functional, in general as a transcriptional regulator (26, 39). Upon cessation of signaling, both the cognate RR and the HK undergo dephosphorylation, which results in silencing of the system (11). Many TCS pathways, however, are more elaborate and operate through a phosphorelay (7, 12, 23, 28, 40). In these systems, signal transmission involves, in addition to the two above-mentioned domains, an extra receiver domain and a histidine-containing phosphotransfer domain (HPT) that can be fused to the HK or can be present as independent proteins (12, 17, 20, 28, 40). Such TCS pathways have also been found in plants, slime molds, and fungi (8, 13, 28). It is noteworthy that most bacterial sensor kinases possess only one transmitter domain, whereas the sensor kinases present in eukaryotic microorganisms or plants are almost exclusively mul-

tipartite kinases (8, 13, 28, 33). Curiously, the architecture of filamentous fungal TCS pathways provides another notable difference. Prokaryotic TCS pathways are typically organized in protein pairs, whereas in filamentous fungi, multiple HKs appear to share a single HPT protein to transduce signals to two RRs. For instance, the *Neurospora crassa* genome predicts 11 hybrid HKs, one HPT protein, and two canonical RRs, in addition to the RR protein encoded by the NCU07378 gene and homologous to *Saccharomyces cerevisiae* Rim15p, which lacks the conserved aspartate residue of its receiver domain (5).

A number of studies have addressed the functions and phenotypes of various TCS proteins in *N. crassa*. For instance, it has been shown that RRG-1 is involved in the activation of a mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway that regulates female fertility and responses to osmotic and fungicide stresses (18). On the other hand, RRG-2 is implicated in cell responses against oxidative stress during vegetative growth (4). Moreover, the HPT-1 protein has been suggested to play a central role in *N. crassa* viability because attempts to delete the corresponding gene have been fruitless (4). Finally, the function of the OS-1, PHY-1, and PHY-2 HKs has also been addressed in *N. crassa*. OS-1 has been shown to participate in the activation of the above-mentioned MAPK pathway (1, 18, 36) and therefore has been placed upstream of RRG-1 in the signaling cascade responsive to osmotic and fungicide stresses (18). PHY-1 and PHY-2 show sequence similarity to bacterio-phytochromes and plant phytochromes (5), and a bacterially expressed N-terminal fragment of PHY-2 was shown to covalently bind either biliverdin or phycocyanobilin *in vitro*, with the resulting holoprotein displaying red/far-red light photochromic absorption spectra and a photocycle. However, deletions of *phy-1* and *phy-2* cause no phenotypic defects (10), although they produce alterations in the expression of the light-responsive conidiation gene *con-10* (25).

Here we describe the results of experiments demonstrating that the protein encoded by the NCU00939 gene, a putative histidine

* Corresponding author. Mailing address: Departamento de Genética Molecular, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior s/n, Ciudad Universitaria, 04510 México D.F., México. Phone: (52) 55 5622 5738. Fax: (52) 55 5622 5611. E-mail: dimitris@ifc.unam.mx.

[∇] Published ahead of print on 4 November 2011.

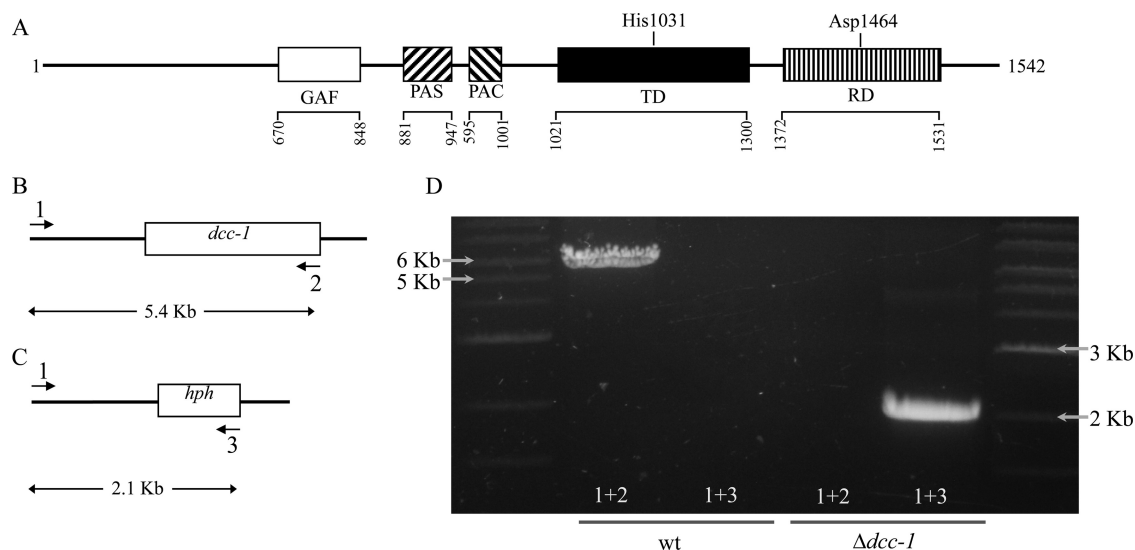


FIG. 1. Schematic representation of the NCU00939-encoded protein (hereafter referred to as DCC-1) and verification of NCU00939 gene deletion. (A) SMART analysis of the DCC-1 protein reveals the presence of GAF and PAS/PAC as sensing domains and transmitter (TD) and receiver (RD) domains with conserved histidine (H1031) and aspartate (D1464) residues. (B and C) Localization of the primers used for verification of the *dcc-1* deletion and the sizes of the expected PCR products in the wild-type and mutant strains. (D) Products obtained by PCR using primers 1 and 2 and chromosomal DNA from the wild-type (wt) strain (lane 2) or the *dcc-1* deletion mutant (lane 4) or primers 1 and 3 and DNA from the wild-type strain (lane 3) or the *dcc-1* deletion mutant (lane 5).

sensor kinase, participates in the regulation of asexual sporulation, perithecial development, and, to a certain degree, carotenogenesis. We therefore propose to coin the NCU00939-encoded protein DCC-1, for development and carotenogenesis control, and hereafter this protein will be referred to as DCC-1. Moreover, we provide experimental data indicating that DCC-1 most likely exerts its effect by promoting cyclic AMP (cAMP) production, thereby placing DCC-1 within the context of a signaling pathway that operates during conidiation and sexual development.

Probing for phenotypic differences in *N. crassa* HK mutants.

The *N. crassa* genome predicts 11 hybrid HKs, one HPT protein, and two canonical RRs (5). Although various studies have addressed the function of the RRs and HPT, only three HKs have been studied. To gain some insight into the TCS pathways and the functions of the various HK proteins, we pursued a phenotypic characterization of single HK deletion mutants. All strains were provided by the Fungal Genetics Stock Center (FGSC) (22), except the NCU04615 mutant, which was made in this study according to the previously published knockout procedure (9). All strains were confirmed by PCR (data not shown). For example, the *dcc-1* mutant (FGSC catalog no. 13652) was verified by PCR using primers 5'-AGCCGCAAG TGGGAGCTACAT-3' (placed upstream of the *dcc-1* gene and indicated as primer 1 in Fig. 1B and C), 5'-CCAATGCA TCTATGGCTCTCTATCGTAC-3' (placed within the *dcc-1* gene and indicated as primer 2 in Fig. 1B), and 5'-TTGGGC TTGGCTGGAGCTAGT-3' (placed within the *hph* gene and indicated as primer 3 in Fig. 1C). As shown in Fig. 1, primers 1 and 2 amplified a band of the expected size (5.4 kb) in the wild-type strain but not in the mutant strain (Fig. 1D, lanes 2 and 4). On the other hand, primers 1 and 3 amplified a band of the expected size (2.1 kb) in the mutant strain but not in the

wild-type strain (Fig. 1D, lanes 3 and 5), thereby confirming the replacement of the *dcc-1* gene with *hph*.

We observed that all mutants germinated and grew as well as the wild-type strain (FGSC catalog no. 2489) (data not shown), except for the $\Delta dcc-1$ mutant strain, which exhibited a slightly lower hyphal elongation rate (Fig. 2A). Moreover, although no defects in radial growth were observed in any of the mutants, a striking difference was noticeable in the *dcc-1* deletion strain. Orange pigmentation, representative of carotenoid accumulation, was observed over the entire surface of the plate inoculated with the *dcc-1* mutant strain, whereas in the case of the wild type, orange pigmentation was observed mainly at the center and near the edge of each plate (Fig. 2B). Because of these apparent differences, we decided to focus our efforts on the characterization of the *dcc-1* mutant strain. The *dcc-1* gene encodes a putative hybrid HK, which is conserved among Sordariomycetes but whose function is unknown. The SMART protein domain prediction program (21, 35) revealed the presence of GAF and PAS/PAC motifs as sensing or input domains and the conserved histidine and aspartate residues located at positions 1031 and 1464 in the transmitter and receiver domains, respectively (Fig. 1A).

Carotenes accumulate in the *dcc-1* mutant strain. Carotenoids are widespread terpenoid pigments synthesized by all photosynthetic organisms (6, 16), some heterotrophic bacteria (2), and fungi (3, 32). In *N. crassa*, the characteristic orange pigmentation of mycelia is caused by the accumulation of the xanthophyll neurospoxanthin and variable amounts of carotene precursors.

To test whether DCC-1 affects mycelial carotenoid accumulation, 1×10^6 wild-type or *dcc-1* mutant spores were inoculated into liquid Vogel's sucrose medium (VSM) plates supplemented with 0.2% Tween 80 as a wetting agent to avoid

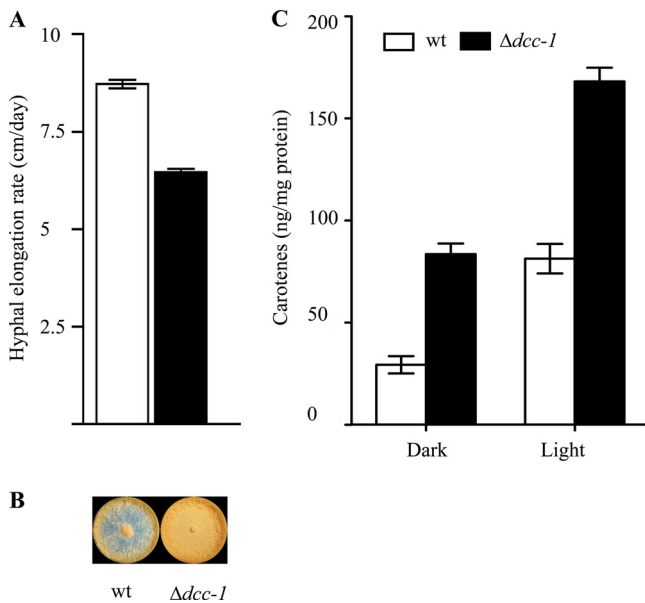


FIG. 2. Effect of DCC-1 on *N. crassa* vegetative growth and carotenoid accumulation. (A) The wild-type (wt) strain (open bars) and the *dcc-1* mutant (closed bars) were grown on VSM agar in race tubes. The apical elongation rate was monitored for 5 days and is expressed as cm/day. The experiment was repeated three times in its entirety, and the standard deviation is depicted. (B) The wild-type (left) and *dcc-1* mutant (right) strains were inoculated onto VGM plates. After 36 h of incubation in darkness, the plates were illuminated for 24 h. The images presented are representative of the growth of both strains in glucose-rich medium. (C) Duplicate cultures of the wild-type (open bars) and *dcc-1* mutant (closed bars) strains were inoculated into liquid VSM supplemented with 0.2% Tween. After incubation for 36 h in darkness, one of the cultures was illuminated for 24 h while the other one was kept in darkness. Carotenoids were extracted from 0.1 g of mycelia, and the absorbance at 475 nm was determined. The data, expressed as ng carotenes/mg protein, represent the average of three independent experiments, and the standard deviation is depicted.

conidiation (44). After 36 h of incubation in darkness, the cultures were divided into two groups; one was illuminated at 22°C with a fluorescent lamp (855 lx), and the other was maintained in darkness as a control. After 12 h of exposure to light, mycelia were collected, frozen in liquid nitrogen, and disrupted with a mortar and pestle. Acetone and hexane were used in consecutive extractions of total carotenoids from 0.1 g of frozen sample, and the maximal absorption at 475 nm was measured. It was found that after illumination, the *dcc-1* mutant produced 2-fold more carotenes than the wild-type strain (Fig. 2C). More interestingly, the *dcc-1* mutant accumulated significant amounts of carotenes even in darkness, in contrast to the wild-type strain, where no carotenoids were detected (Fig. 2C). It has to be noted that although the growth conditions were aimed to repress conidiation, a considerable amount of conidia was detected in the *dcc-1* deletion strain (data not shown), and therefore, the total amount of mycelial and conidial carotenoids is presented for this strain. Although the experiments described here cannot differentiate between a direct effect of DCC-1 on carotene regulation and an indirect effect through the activation of conidiation, this result suggests that DCC-1 plays a significant role in the pathway that controls carotenogenesis and even asexual sporulation.

The DCC-1 HK regulates conidiation of *N. crassa*. *N. crassa* is a filamentous fungus that has a complex life cycle due to its ability to produce both asexual (vegetative phase of growth) and sexual spores (38). During vegetative growth, *N. crassa* hyphae elongate, intertwine, and fuse, forming the mycelial network. Under carbon source deprivation and when a water-air interface exists, *N. crassa* enters its asexual developmental cycle, during which aerial hyphae differentiate from mycelia, generate chains of proconidia, and terminate with the septation of proconidia and the release of free mature conidia (macroconidia). We therefore argued that if the DCC-1 HK acts as a repressor of the process of conidiation, growing the *dcc-1* mutant on glucose-rich medium and incubating the plates in complete darkness should result in augmented conidiation. This was tested by inoculating Vogel's glucose medium (VGM) plates with 1×10^3 wild-type or mutant conidia, incubating the plates at 30°C in complete darkness, and harvesting and counting the conidia every 12 h. It was found that the mutant strain produced conidia as early as 12 h after inoculation, unlike the wild-type strain, in which conidia were detected after 48 h. Remarkably, even at 72 h after inoculation, the mutant strain produced approximately 3.5 times more conidia than the wild type (Fig. 3A).

As mentioned above, formation of aerial hyphae and subsequent conidiation require an air-water interface, and therefore conidiation does not occur in submerged cultures (37). Given the above-described phenotype of increased conidiation under growth-repressing conditions (glucose-rich medium and darkness), we asked whether the *dcc-1* mutant also produces conidia in submerged cultures. We therefore inoculated wild-type and mutant strains into VSM at 1×10^6 spores/ml and incubated the cultures at 30°C with agitation (200 rpm) in complete darkness. After 16 h of incubation, a sample of each strain was withdrawn and examined by light microscopy. As expected, no conidia were observed in submerged cultures of the wild type. In contrast, the mutant strain produced a significant amount of conidia (Fig. 3B). Also, the hyphae of the mutant strain appeared to be shorter than those of the wild-type strain (Fig. 3B). This is to be expected if the hyphae of the mutant strain were to enter the program of conidiation prematurely. This was tested by comparing the growth of the wild-type and mutant strains in standing liquid VSM cultures. As shown in Fig. 3C, the wild-type strain conidiated at the tip of the elongated aerial hyphae, whereas dense premature conidiation and no elongated aerial hyphae were observed in the mutant strain (Fig. 3C). Premature conidiation could also provide a plausible explanation of the above-described slower lineal growth of the *dcc-1* mutant (Fig. 2A). In view of the above results, it can be concluded that the *N. crassa* DCC-1 HK acts as a negative regulator of the asexual sporulation pathway, since its absence causes derepression of conidiation under non-sporulating conditions.

The DCC-1 HK is required for proper perithecial development in *N. crassa*. Given the significant role of DCC-1 as a negative regulator of sporulation during vegetative growth, we asked whether it also participates in the regulation of sexual development. Under conditions of nitrogen limitation, *N. crassa* enters a sexual life cycle during which vegetative hyphae initiate a sexual differentiation pathway to form the female reproductive structure (protoperithecium) (27, 30). The pro-

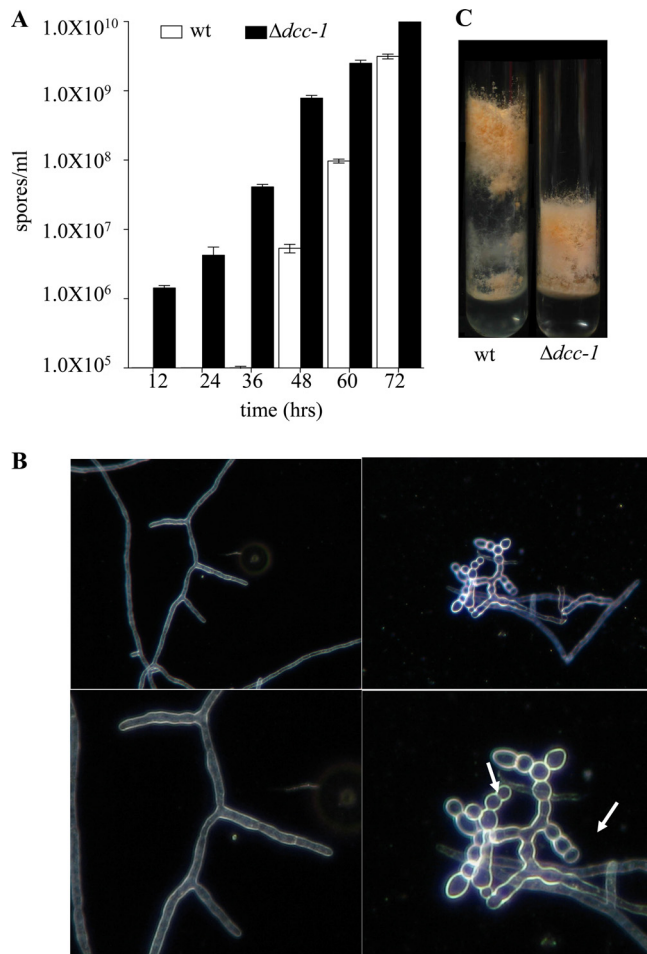


FIG. 3. Effect of DCC-1 on conidiation of *N. crassa*. (A) The wild-type (wt; open bars) and *dcc-1* deletion mutant (closed bars) strains were grown on VGM plates. Conidia were harvested and counted at the times indicated. The data, expressed as spores/ml, represent the average of three independent assays. (B) The wild type (left) and the *dcc-1* mutant (right) were grown in liquid VSM at 30°C with agitation (200 rpm). After 16 h of incubation in darkness, an aliquot was withdrawn and examined by light microscopy. Arrows indicate conidia formed by the mutant strain. (C) Cultures of the wild-type (left) and *dcc-1* mutant (right) strains were grown in standing liquid VSM cultures. After 3 days of incubation at 30°C in darkness, tubes were illuminated for 24 h and photographed.

toperithecium consists of a multicellular hypha (or ascogonium) enclosed within an aggregate of knotted vegetative hyphae. A specialized hypha (trichogyne) extends from the protoperithecium and fuses with a fertilizing (male) cell. *N. crassa* has two distinct mating types (*A* and *a*), and fusion with the opposite mating type is required for fertilization of the protoperithecium. After fertilization, the protoperithecium enlarges and differentiates to form a fruiting body (or perithecium) consisting of several specialized tissues from which the meiotic products (ascospores) are eventually ejected into the air (14, 29).

To test for possible effects of the DCC-1 HK on the processes of the *N. crassa* sexual cycle, the 74-ORS-6a (FGSC catalog no. 4200) wild-type and *dcc-1* mutant strains were inoculated as females onto 10-cm plates under nitrogen-limit-

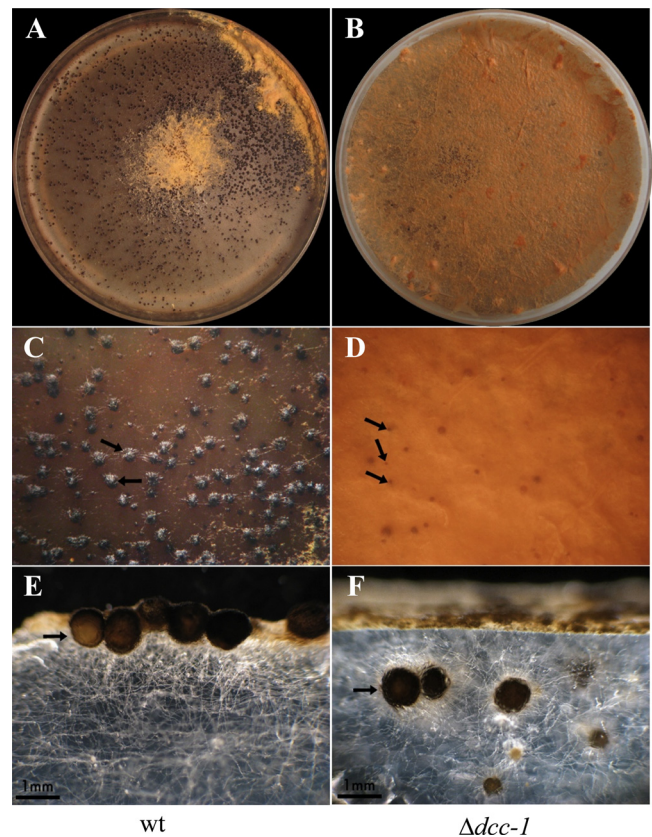


FIG. 4. DCC-1 is required for proper perithecial development in *N. crassa*. The 74-ORS-6a (FGSC catalog no. 4200) wild-type (wt; A, C, and E) and *dcc-1* mutant (B, D, and F) strains were inoculated as females onto Vogel's N modified agar plates. After 7 days of incubation at 25°C in the presence of light, the plates were inoculated with strain 74-OR23-1VA (FGSC catalog no. 2489) as the male, and 7 days later, the plates were examined. Representative pictures of the surface of the wild type (A, C) and the *dcc-1* mutant (B, D) are presented. The cross sections of the plates with the wild-type (E) and *Δdcc-1* mutant (F) strains are presented. Arrows indicate the localization of the perithecia formed.

ing conditions (Vogel's N modified medium [31]) and incubated at 25°C with constant light. At day 7 postinoculation, wild-type strain 74-OR23-1VA (FGSC catalog no. 2489) was inoculated as a male and the plates were incubated at 25°C with constant light. Seven days later, it was observed that, in contrast to the wild-type strain, which formed mature pigmented perithecia on the surface of the plate, only an insignificant number of small unpigmented mutant fruiting bodies were observed on the surface of the plate (Fig. 4A to D), suggesting that deletion of *dcc-1* leads to sterility. However, after careful inspection of the plates inoculated with the mutant strain, it was observed that an almost equal number of mature perithecia were formed, although they were submerged in the agar (Fig. 4F). This phenotype should result in the ascospores, if they were formed, remaining enclosed in the perithecia or being ejected into the agar but unable to be released into the air. To test whether mature and viable ascospores are produced in the *dcc-1* mutant, submerged perithecia were harvested from the agar and disrupted with a homogenizer to release the ascospores. Indeed, mature ascospores

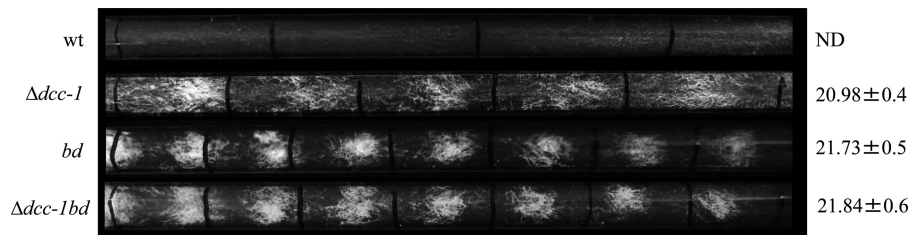


FIG. 5. DCC-1 deletion unmasks circadianly regulated conidiation of *N. crassa*. Circadianly regulated conidiation patterns of the wild-type (wt) and *dcc-1*, *bd*, and *dcc-1 bd* mutant strains were tested in race tubes. To entrain the cultures, tubes were kept for 24 h in constant light. Tubes were then shifted to constant darkness, and growth was monitored every 24 h. The periods of the *dcc-1*, *bd*, and *dcc-1 bd* mutant strains are expressed in hours. The wild-type strain period was not determined (ND).

able to germinate after heat activation and form colonies at percentages similar to those of the wild type were obtained (data not shown). It can therefore be concluded that although the DCC-1 HK does not affect ascospore production and viability, it is required for proper localization of perithecia.

Deletion of *dcc-1* results in unmasking circadianly regulated conidiation of *N. crassa*. Circadian oscillators, which respond to environmental signals such as light and temperature, are known to control the expression of various genes whose products are associated with cellular processes, including development (42). The most obvious and prominent circadianly controlled rhythm in *N. crassa* is that of conidiation, which forms a characteristic conidial banding-pattern on plates or in long glass culture tubes (race tubes). Also, it has been previously reported that RRG-1 of *N. crassa* functions in an output pathway to regulate circadian rhythmicity, although the upstream HK was not identified (41). Because of the intimate association of the DCC-1 sensor HK with the process of conidiation and the involvement of a two-component system protein (RRG-1) in the regulation of rhythmicity (2), we asked whether DCC-1 also affects this process. To test this, we assayed the *dcc-1* deletion strain for the formation of conidiation bands in race tubes with glucose-arginine medium. It has to be mentioned that the wild-type strain does not form the conidial banding pattern. This is because CO₂ levels become elevated during vegetative growth, and as a consequence, conidiation becomes suppressed, thereby masking the rhythmic banding pattern. Therefore, a *ras-1* mutant strain (FGSC catalog no. 1858), carrying a T79I substitution and referred to as a *bd* mutant (34), which is about 200-fold less sensitive to the CO₂ masking effect, is used for circadian rhythm studies.

Exponentially grown mycelia of the wild-type, *dcc-1*, *bd*, and *dcc-1 bd* mutant strains were inoculated at one side of the race tubes and incubated with illumination at 25°C for 24 h to entrain the cultures before a shift to constant darkness. The edge of the colony was marked every 24 h under a red security light, and the period was determined. It was found that the *dcc-1* deletion strain formed conidiation bands, although they were not as intense as those formed by the *bd* mutant strain (Fig. 5). This could be because the *dcc-1* mutant conidiates throughout the race tube, which causes a partial masking of the conidiation bands (Fig. 5). The period of the *dcc-1* mutant was found to be 20.98 ± 0.4 h, which is insignificantly shorter than the 21.73 ± 0.5 - and 21.84 ± 0.6 -h periods of the *bd* and the *dcc-1 bd* mutant strains, respectively (Fig. 5). Therefore, it can be concluded that the DCC-1 protein plays a role not in the

regulation of circadian rhythmicity but rather in the masking process of circadianly regulated conidiation.

Exogenous cAMP reverses the *dcc-1*-dependent differentiation phenotypes. To gain some insight into the pathway(s) through which *dcc-1* exerts its effect, we looked for mutant strains that exhibit phenotypes similar to the ones described for the *dcc-1* mutant strain. Interestingly, similar phenotypes have been described for mutants encoding proteins that are implicated in cAMP metabolism. For example, a *gna-3* (Gα3 subunit which, together with CR-1, participates in cAMP production) mutant shows dense premature conidiation and formation of short aerial hyphae, two phenotypes that are reversed by exogenous cAMP (19). Another phenotype due to Δ *gna-3* that is not reversed by exogenous cAMP is the formation of submerged perithecia (19). Considering the similar phenotypes of the *gna-3* and *dcc-1* mutants, the ability of cAMP to reverse the Δ *dcc-1*-dependent phenotypes was tested. It was found that addition of cAMP to solid VGM and standing liquid cultures resulted in a drastic reduction of premature conidiation (Fig. 6A and B) and improved aerial hypha elongation of the Δ *dcc-1* mutant (Fig. 6C). It should be mentioned that, as has been reported for the Δ *gna-3* strain (19), cAMP addition to submerged cultures does not reverse the conidiation phenotype of the Δ *dcc-1* mutant strain (data not shown). Furthermore, carotenoid accumulation in the mutant strain was reduced to wild-type levels (Fig. 6D) whereas conidiation was decreased approximately 2-fold when the liquid VSM containing 0.2% Tween 80 as a wetting agent was supplemented with cAMP (data not shown). It may therefore be concluded that DCC-1 participates in the regulation of asexual sporulation and carotenogenesis most likely by affecting cAMP metabolism in a pathway that may include GNA-3 and CR-1.

Finally, the effect of cAMP in circadianly regulated conidiation could not be tested because endogenous oscillations of the level of cAMP have been shown to be critical for clock-controlled conidiation (15). Also, as has been described for the Δ *gna-3* mutant (19), supplementation with cAMP did not restore the sexual defects (formation of submerged perithecia) of the Δ *dcc-1* mutant (data not shown).

Taken together, our findings strongly suggest that the DCC-1 protein of *N. crassa* plays a pivotal role in the pathways that regulate developmental processes such as conidiation and perithecial development and in the one responsible for masking circadianly regulated conidiation during vegetative growth and also, to a certain degree, affects carotenoid accumulation.

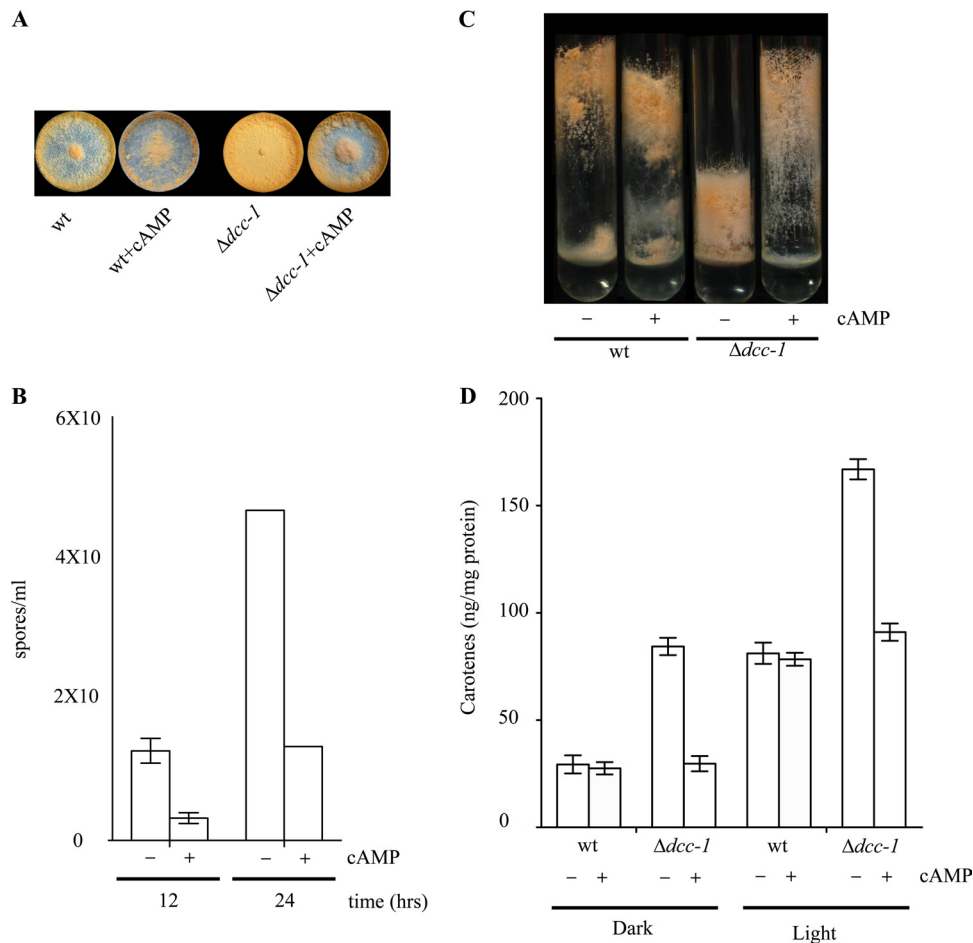


FIG. 6. Addition of cAMP restores the *dcc-1* mutant phenotypes. (A) The wild-type (wt; left) and *dcc-1* mutant (right) strains were inoculated into VGM with or without 2 mM cAMP. After 36 h of incubation in darkness, the plates were illuminated for 24 h. The images presented are representative of the growth of both strains in glucose-rich medium with or without cAMP. (B) The *dcc-1* deletion mutant was grown in darkness on VGM plates with or without cAMP. Conidia were harvested and counted at the times indicated. The data, expressed as spores/ml, represent the average of three independent assays, and the standard deviation is depicted. (C) Cultures of the wild-type and *dcc-1* mutant strains were grown in standing liquid VSM cultures with or without 2 mM cAMP. After 3 days of incubation at 30°C in darkness, tubes were illuminated for 24 h and photographed. (D) Duplicate cultures of the wild-type and *dcc-1* mutant strains were inoculated into liquid VSM with or without 2 mM cAMP. After incubation for 36 h in darkness, one of the cultures was illuminated for 24 h while the other one was kept in darkness. Carotenoids were extracted from 0.1 g of mycelia, and the absorbance at 475 nm was determined. The data, expressed as ng carotenoids/mg protein, represent the average of three independent experiments.

Conclusions. The *N. crassa* NCU00939 gene encodes a putative hybrid HK consisting of GAF and PAS/PAC as input domains, a transmitter domain with a conserved histidine residue at position 1031, and a receiver domain with a conserved aspartate residue at position 1464. Phenotypic analyses of a DCC-1 mutant strain (FGSC catalog no. 13652) indicate that this putative sensor HK negatively regulates the processes of conidiation and, to a certain degree, carotenogenesis and also has pronounced effects on the development of perithecia during the sexual life cycle. Moreover, DCC-1 appears to exert its effect by affecting cAMP metabolism in a pathway that includes GNA-3 and CR-1, thereby placing DCC-1 within the context of a signaling pathway that operates during conidiation and sexual development. Although this study provides some insight into the processes regulated by DCC-1, the scope of its control remains to be clarified and the other components participating in the same signaling cascade(s) have yet to be determined.

We thank Jorge Nieto-Sotelo for critically reading the manuscript and Claudia Rodríguez Rangel for technical assistance.

This work was supported by grants 80684 from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT); IN219709-3 from DGAPA, UNAM; and CRPMEX008-02 from ICGEB.

ADDENDUM IN PROOF

The observed phenotypes were found to segregate with the hygromycin B resistance gene (*hph*), indicating that they are the result of the deletion of the *dcc-1* gene.

REFERENCES

- Alex, L. A., K. A. Borkovich, and M. I. Simon. 1996. Hyphal development in *Neurospora crassa*: involvement of a two-component histidine kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**:3416–3421.
- Armstrong, G. 1997. Genetics of eubacterial carotenoid biosynthesis: a colorful tale. *Annu. Rev. Microbiol.* **51**:629–659.
- Avalos, J., and E. Cerdá-Olmedo. 2004. *Fungal carotenoid production*. Marcel Dekker, New York, NY.

4. **Banno, S., et al.** 2007. Roles of putative His-to-Asp signaling modules HPT-1 and RRG-2, on viability and sensitivity to osmotic and oxidative stresses in *Neurospora crassa*. *Curr. Genet.* **51**:197–208.
5. **Borkovich, K. A., et al.** 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.
6. **Britton, G., S. Liaaen-Jensen, and H. Pfander.** 2004. Carotenoids: handbook. Birkhäuser, Boston, MA.
7. **Burbulys, D., K. A. Trach, and J. A. Hoch.** 1991. Initiation of sporulation in *B. subtilis* is controlled by a multicomponent phosphorelay. *Cell* **64**:545–552.
8. **Catlett, N. L., O. C. Yoder, and B. G. Turgeon.** 2003. Whole-genome analysis of two-component signal transduction genes in fungal pathogens. *Eukaryot. Cell* **2**:1151–1161.
9. **Colot, H. V., et al.** 2006. A high-throughput gene knockout procedure for *Neurospora* reveals functions for multiple transcription factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**:10352–10357.
10. **Froehlich, A. C., B. Noh, R. D. Vierstra, J. Loros, and J. C. Dunlap.** 2005. Genetic and molecular analysis of phytochromes from the filamentous fungus *Neurospora crassa*. *Eukaryot. Cell* **4**:2140–2152.
11. **Georgellis, D., O. Kwon, P. De Wulf, and E. C. Lin.** 1998. Signal decay through a reverse phosphorelay in the Arc two-component signal transduction system. *J. Biol. Chem.* **273**:32864–32869.
12. **Georgellis, D., A. S. Lynch, and E. C. Lin.** 1997. In vitro phosphorylation study of the Arc two-component signal transduction system of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **179**:5429–5435.
13. **Grefen, C., and K. Harter.** 2004. Plant two-component systems: principles, functions, complexity and cross talk. *Planta* **219**:733–742.
14. **Harris, J. L., H. B. Howe, Jr., and I. L. Roth.** 1975. Scanning electron microscopy of surface and internal features of developing perithecia of *Neurospora crassa*. *J. Bacteriol.* **122**:1239–1246.
15. **Hasunuma, K., K. Funadera, Y. Shinohara, K. Furukawa, and M. Watanabe.** 1987. Circadian oscillation and light-induced changes in the concentration of cyclic nucleotides in *Neurospora*. *Curr. Genet.* **12**:127–133.
16. **Hirschberg, J.** 2001. Carotenoid biosynthesis in flowering plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* **4**:210–218.
17. **Hoch, J. A.** 1993. Regulation of the phosphorelay and the initiation of sporulation in *Bacillus subtilis*. *Annu. Rev. Microbiol.* **47**:441–465.
18. **Jones, C. A., S. E. Greer-Phillips, and K. A. Borkovich.** 2007. The response regulator RRG-1 functions upstream of a mitogen-activated protein kinase pathway impacting asexual development, female fertility, osmotic stress, and fungicide resistance in *Neurospora crassa*. *Mol. Biol. Cell* **18**:2123–2136.
19. **Kays, A. M., P. S. Rowley, R. A. Baasiri, and K. A. Borkovich.** 2000. Regulation of conidiation and adenyl cyclase levels by the Galpha protein GNA-3 in *Neurospora crassa*. *Mol. Cell. Biol.* **20**:7693–7705.
20. **Kwon, O., D. Georgellis, and E. C. Lin.** 2000. Phosphorelay as the sole physiological route of signal transmission by the arc two-component system of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **182**:3858–3862.
21. **Letunic, I., T. Doerks, and P. Bork.** 2009. SMART 6: recent updates and new developments. *Nucleic Acids Res.* **37**:D229–D232.
22. **McCluskey, K.** 2003. The Fungal Genetics Stock Center: from molds to molecules. *Adv. Appl. Microbiol.* **52**:245–262.
23. **Nguyen, A. N., A. Lee, W. Place, and K. Shiozaki.** 2000. Multistep phosphorelay proteins transmit oxidative stress signals to the fission yeast stress-activated protein kinase. *Mol. Biol. Cell* **11**:1169–1181.
24. **Nixon, B. T., C. W. Ronson, and F. M. Ausubel.** 1986. Two-component regulatory systems responsive to environmental stimuli share strongly conserved domains with the nitrogen assimilation regulatory genes *ntfB* and *ntfC*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **83**:7850–7854.
25. **Olmedo, M., C. Ruger-Herreros, E. M. Luque, and L. M. Corrochano.** 2010. A complex photoreceptor system mediates the regulation by light of the conidiation genes *con-10* and *con-6* in *Neurospora crassa*. *Fungal Genet. Biol.* **47**:352–363.
26. **Parkinson, J. S., and E. C. Kofoid.** 1992. Communication modules in bacterial signaling proteins. *Annu. Rev. Genet.* **26**:71–112.
27. **Perkins, D. D., and E. G. Barry.** 1977. The cytogenetics of *Neurospora*. *Adv. Genet.* **19**:133–285.
28. **Posas, F., et al.** 1996. Yeast HOG1 MAP kinase cascade is regulated by a multistep phosphorelay mechanism in the *SLN1-YPD1-SSK1* “two-component” osmosensor. *Cell* **86**:865–875.
29. **Raju, N.** 1980. Meiosis and ascospore genesis in *Neurospora*. *Eur. J. Cell Biol.* **23**:208–223.
30. **Raju, N.** 1992. Genetic control of the sexual cycle in *Neurospora*. *Mycol. Res.* **96**:241–262.
31. **Russo, V., T. Sommer, and J. A. A. Chambers.** 1985. A modified Vogel’s medium for crossings, mating-type tests and the isolation of female-sterile mutants of *Neurospora crassa*. *Neurospora Newsl.* **32**:10–11.
32. **Sandmann, G., and N. Misawa.** 2002. Fungal carotenoids. Springer-Verlag, Berlin, Germany.
33. **Santos, J. L., and K. Shiozaki.** 2001. Fungal histidine kinases. *Sci. STKE* **2001**(98):re1.
34. **Sargent, M. L., and D. O. Woodward.** 1969. Genetic determinants of circadian rhythmicity in *Neurospora*. *J. Bacteriol.* **97**:861–866.
35. **Schultz, J. R., F. Milpetz, P. Bork, and C. P. Ponting.** 1998. SMART, a simple modular architecture research tool: Identification of signaling domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**:5857–5864.
36. **Schumacher, M. M., C. S. Enderlin, and C. P. Selitrennikoff.** 1997. The Osmotic-1 locus of *Neurospora crassa* encodes a putative histidine kinase similar to osmosensors of bacteria and yeast. *Curr. Microbiol.* **34**:340–347.
37. **Springer, M. L.** 1993. Genetic control of fungal differentiation: the three sporulation pathways of *Neurospora crassa*. *Bioessays* **15**:365–374.
38. **Springer, M. L., and C. Yanofsky.** 1989. A morphological and genetic analysis of conidiophore development in *Neurospora crassa*. *Genes Dev.* **3**:559–571.
39. **Stock, A. M., V. L. Robinson, and P. N. Goudreau.** 2000. Two-component signal transduction. *Annu. Rev. Biochem.* **69**:183–215.
40. **Uhl, M. A., and J. F. Miller.** 1996. Integration of multiple domains in a two-component sensor protein: the *Bordetella pertussis* BvgAS phosphorelay. *EMBO J.* **15**:1028–1036.
41. **Vitalini, M. W., et al.** 2007. Circadian rhythmicity mediated by temporal regulation of the activity of p38 MAPK. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**:18223–18228.
42. **Vitalini, M. W., R. M. de Paula, W. D. Park, and D. Bell-Pedersen.** 2006. The rhythms of life: circadian output pathways in *Neurospora*. *J. Biol. Rhythms* **21**:432–444.
43. **Weiss, V., and B. Magasanik.** 1988. Phosphorylation of nitrogen regulator I (NRI) of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **85**:8919–8923.
44. **Zalokar, M.** 1954. Studies on biosynthesis of carotenoids in *Neurospora crassa*. *Arch. Biochem. Biophys.* **50**:71–80.