



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

INSTITUTO DE FISIOLÓGIA CELULAR
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

EL PAPEL DE LOS SISTEMAS DE RELEVO DE
FOSFATOS EN LA RESPUESTA AL ESTRÉS Y
LA DIFERENCIACIÓN CELULAR EN
Aspergillus nidulans

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
DOCTORA EN CIENCIAS (BIOQUÍMICAS)

P R E S E N T A:

M. en C. ITZEL AIDÉ VARGAS PÉREZ

TUTOR: DR DIMITRIS GEORGELLIS

MÉXICO, D.F

AGOSTO 2009



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.

Este trabajo se realizó en los laboratorios 226 norte (Dr. Dimitris Georgellis) y 107 oriente (Dr. Jesús Aguirre), en el departamento de Genética Molecular del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México. La alumna Itzel Aidé Vargas Pérez recibió un apoyo económico de CONACYT (Número de becario 183857)

Este trabajo fue posible gracias a los donativos del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT 47799-Q y 49667-Q) y de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico-UNAM (DGAPA, PAPIIT IN221106-3, IN201709/20 e IN228507-2).

Agradezco el apoyo técnico de la M. en C. Claudia Rodríguez, la Biol. Olivia Sánchez y el Dr. Pablo Rangel, durante la realización de este trabajo.

DEDICATORIAS

A Dios

Por la vida y todo lo que trae consigo: alegrías, tristezas, obstáculos y enseñanzas. Por la oportunidad de continuar haciendo ciencia. Por ponerme en el sitio adecuado con personas que me ayudaron a cumplir esta meta.

A mis padres Aidé y Esteban

Por darme la vida y apoyarme siempre en cada una de las metas que me he fijado en la vida y por su amor incondicional. Por acompañarme en esta aventura que apenas comienza. Sin ustedes esto no sería posible.

A mis hermanos Esteban, Alonso y Francisco

Por que a pesar de las diferencias, en los momentos en que su apoyo ha sido necesario nunca me han fallado y siempre han estado ahí.

A mis preciosas sobrinas Beatriz, Carmen y Lorena

Por sus sonrisas, sus travesuras y su alegría de vivir. Por que las adoro y sin ustedes mi vida no sería igual.

A mi tía Elena

Por ser un ejemplo de ganas de vivir a pesar de los obstáculos físicos , por su cariño y apoyo incondicional.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Dimitris Georgellis.

Por aceptar ser mi tutor. Por su apoyo para realizar el trabajo experimental. Por sus enseñanzas, consejos, comprensión y sobre todo por su paciencia durante la realización de mi trabajo experimental.

Al Dr. Jesús Aguirre Linares.

Por permitirme realizar parte de este trabajo en su laboratorio, por su asesoría y sus consejos durante la realización del mismo. Por todas sus enseñanzas y por la oportunidad de seguir haciendo ciencia.

A la Biol. Olivia Sánchez.

Por su asesoría técnica durante este trabajo, por sus consejos y enseñanzas. Por regalarme un poco de su tiempo para poder realizar este trabajo.

A la M. en C. Claudia Rodríguez.

Por su apoyo técnico durante la realización de este trabajo. Por ayudarme con este trabajo teniendo siempre el material y los reactivos necesarios.

A los miembros de mi comité tutorial y del jurado del examen: Dra. Carmen Gómez, Dr. Wilhelm Hansberg, Dr. Roberto Coria, Dra. Alejandra Covarrubias y Dr. Guillermo Aguilar

Por sus críticas y consejos durante las evaluaciones de este trabajo. Por la revisión de este trabajo y sus comentarios para mejorar la presentación del mismo

A mis amigos Jenny Arratia, Nallely Cano, José Luís Ramos, Vanessa Vega, Abraham Vidal , Adriana Hernández, Fernando Lara, Pablo Rangel, Jonathan Rodríguez, Gabriela Peña y Verónica Mondragón.

Por su apoyo en todos los aspectos. Por los momentos maravillosos que pasamos en el laboratorio y fuera de el. Por que el ambiente de trabajo tan agradable que se siente en el laboratorio ayuda muchísimo a que el trabajo avance.

A mis compañeros de los laboratorios 226 nte: Adrián, Carlos, Claudia, Everardo, Griselda, Luís, Oscar, Mauricio y Ricardo; 107 ote: Anet, Fabián y Martha; 103 ote: Gisell y Sammy.

Por formar parte de esta etapa de mi vida, su apoyo en este trabajo y por los momentos compartidos en el laboratorio.

A mis amigas Abril e Iliana , a mi amigo Carlos y a todos mis amig@s

Por su amistad sincera, por siempre estar dispuestos a escucharme y darme un consejo y por estar en esta importante etapa de mi vida apoyándome en todos los aspectos.

A todas las personas que he conocido en este camino, a las que se fueron y a las que aun permanecen en mi vida

Porque ninguna persona se cruza en nuestra vida por casualidad. Por que cada una de las experiencias vividas con ellas, buenas o malas, me dejaron muchas enseñanzas y me ayudaron a construir la persona que ahora soy.

RESUMEN

Todas las células detectan cambios en su ambiente y responden apropiadamente a dichos cambios. En los procariontes predominan sistemas de señalización conocidos como "Sistemas de dos componentes". Comúnmente estos sistemas constan de dos proteínas: una cinasa de histidina (HK), también conocida como cinasa sensora, la cual se autofosforila de forma dependiente de ATP en respuesta a un estímulo ambiental, y de un regulador de la respuesta (RR) al cual se transfiere el grupo fosfato produciendo un cambio, generalmente a nivel transcripcional, para responder al estímulo percibido. Estos sistemas de transducción ampliamente descritos en bacterias, también se han descrito en arqueas y en organismos eucariontes como los mohos mucilaginosos, las plantas y los hongos. En los hongos, los también llamados sistemas de relevo de fosfatos consisten de una o varias HKs híbridas, una proteína de transferencia de fosfatos (Hpt) y dos RRs. En *Saccharomyces cerevisiae* existe solo una HK, una proteína Hpt y dos RRs; mientras que en los hongos filamentosos, múltiples HKs parecen utilizar una sola proteína Hpt para el relevo de la señal a dos proteínas RRs.

En *Aspergillus nidulans*, el RR SskA media la activación de la MAP cinasa SskA en respuesta al estrés osmótico y oxidativo, mientras que la función del RR SrrA era desconocida. Utilizando un enfoque genético, caracterizamos al gen *srrA* como un nuevo miembro de la familia *skn7/prr1* y analizamos el papel de SrrA en el sistema de relevo de fosfatos formado por el RR SskA, la proteína Hpt YpdA y la cinasa sensora NikA. Encontramos que mientras que las mutantes que carecen de la proteína YpdA no son viables, las mutantes que carecen de SskA ($\Delta sskA$), SrrA ($\Delta srrA$) o de ambos reguladores ($\Delta srrA \Delta sskA$) son viables, pero están diferencialmente afectadas en las respuestas al estrés osmótico y oxidativo. Ambos RRs participan en la resistencia al estrés osmótico, pero una mutante $\Delta sskA$ es más sensible a este tipo de estrés, mientras que SrrA se requiere para la resistencia a bajas concentraciones de H_2O_2 y la inducción de la catalasa B por H_2O_2 . Por el contrario, ambos RR son requeridos para la sensibilidad al fungicida fludioxonil, la resistencia al calcofluor, la esporulación asexual y viabilidad de las esporas.

Nuestros resultados apoyan un modelo en el cual NikA actúa río arriba de SrrA y SskA para transmitir señales generadas por esta familia de fungicidas y para regular la esporulación asexual y la viabilidad de las esporas. En cambio, NikA no se requiere para responder al estrés osmótico u oxidativo. Estos resultados muestran diferencias importantes en la transmisión de señales de estrés entre los hongos y define un sistema de relevo de fosfatos involucrado en múltiples procesos celulares, incluyendo las respuestas al estrés oxidativo y osmótico, el mantenimiento de la pared celular, la sensibilidad a fungicidas, la reproducción asexual y la viabilidad de las esporas.

También estudiamos la función de los genes *srrB* y *srrC*, los cuales codifican para proteínas con un dominio receptor. SrrC no es esencial para la conidiación ni para la respuesta al estrés oxidativo u osmótico. SrrB, el cual es homólogo de Rim15 de *S. cerevisiae*, carece del Asp conservado en el dominio receptor y posee un dominio de cinasa de serina-treonina en su extremo N-terminal, se

requiere para la inducción de la catalasa B por H_2O_2 y por paraquat y para un crecimiento radial normal. La eliminación del dominio receptor de SrrB produce defectos en la esporulación asexual, el crecimiento radial y la respuesta al H_2O_2 y al estrés osmótico, así como defectos en la utilización de ciertas fuentes de carbono y de nitrógeno. Estos resultados sugieren que la presencia del dominio receptor podría jugar un papel regulando de forma negativa la actividad del dominio de cinasa de serina y treonina.

ABSTRACT

All living cells must sense changes in their environment and respond appropriately. In prokaryotes, often this is carried out by two-component signaling systems which are comprised by a histidine kinase (HK) and a response regulator (RR). Upon signal reception, the HK undergoes an ATP-dependent autophosphorylation at a conserved His residue, and subsequently transphosphorylates a conserved Asp residue in the cognate RR rendering it functional, in general as a transcriptional regulator. Although these signal transduction systems were first described in bacteria, now, they have also been found in archaea, and in some eukaryotes such as slime molds, fungi and plants. Two-component systems in fungi (also known as phosphorelay systems) consist of one or several hybrid HKs, a histidine containing phosphotransfer (HPT) protein, and two canonical RRs. For instance *Saccharomyces cerevisiae* has a single HK, one protein Hpt and two RRs. In filamentous fungi, multiple sensor kinases appear to use a single Hpt protein to relay signals to two RRs. In *Aspergillus nidulans*, the RR SskA mediates activation of the mitogen-activated protein kinase SakA in response to osmotic and oxidative stress, whereas the functions of the RR SrrA were unknown. We used a genetic approach to characterize the *srrA* gene as a new member of the *skn7/prr1* family and to analyze the roles of SrrA in the phosphorelay system composed of the RR SskA, the HPT protein YpdA, and the sensor kinase NikA. While mutants lacking the HPT protein YpdA are unviable, mutants lacking SskA ($\Delta sskA$), SrrA ($\Delta srrA$), or both RR ($\Delta srrA \Delta sskA$) are viable and differentially affected in osmotic and oxidative stress responses. Both RR are involved in osmostress resistance, but $\Delta sskA$ mutants are more sensitive to this stress, and only SrrA is required for H₂O₂ resistance and H₂O₂-mediated induction of catalase CatB. In contrast, both RR are individually required for fungicide sensitivity and calcofluor resistance and for normal sporulation and conidiospore viability. Our results support a model in which NikA acts upstream of SrrA and SskA to transmit fungicide signals and to regulate asexual sporulation (conidiation) and conidiospore viability. In contrast, NikA appears dispensable for osmotic and oxidative stress signaling. These results highlight important differences in stress signal transmission among fungi and define a phosphorelay system involved in oxidative and osmotic stress, cell wall maintenance, fungicide sensitivity, asexual reproduction, and spore viability. We also studied the role of *srrB* and *srrC* genes, which encode proteins with putative receiver domains. SrrC is not needed for conidation or for oxidative and osmotic stress response. SrrB, is an homologue of *S. cerevisiae* Rim15, which lacks the conserved aspartate in its receiver domain and contains a serine-threonine kinase domain at its N-terminus. We found that SrrB is required for the induction of catalase B by H₂O₂ and paraquat and for proper radial growth. The elimination of the receiver domain in SrrB resulted in defects in conidiation, in radial growth, as well as in sensitivity to H₂O₂ and osmotic stress, and defects in the use of some nitrogen and carbon sources. These results suggest that the receiver domain, could be play a negative role in regulating the activity of the serine-threonin kinase domain.

INDICE

AGRADECIMIENTOS	III
RESUMEN	IV
ABSTRACT	VI
INTRODUCCIÓN	1
Esquema general del sistema de dos componentes	1
Sistemas de dos componentes en bacterias	4
El sistema de dos componentes PhoP-PhoQ de <i>Salmonella</i>	4
El sistema de dos componentes ArcB-ArcA de <i>Escherichia coli</i>	5
El sistema de dos componentes Spo de <i>Bacillus subtilis</i>	7
Sistemas de dos componentes en los hongos	8
El sistema de dos componentes Sln1-Ypd1-Ssk1,Skn7 de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	10
Los sistemas de dos componentes de <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	12
Los sistemas de dos componentes de <i>Candida albicans</i>	13
Los sistemas de dos componentes en hongos filamentosos	14
Los sistemas de dos componentes de <i>Aspergillus nidulans</i>	16
HIPOTESIS	19
OBJETIVOS	20
Objetivo General	20
Objetivos Particulares	20
MATERIALES Y MÉTODOS	
Cepas de <i>Aspergillus nidulans</i> empleadas en este trabajo	21
Medios de cultivo y condiciones de crecimiento de <i>Aspergillus nidulans</i>	22
Eliminación de los genes <i>srrA</i> , <i>sskA</i> , <i>srrB</i> , <i>srrC</i> y <i>nikA</i>	22
Determinación del número de esporas / cm ²	23
Determinación de viabilidad de esporas	23
Actividad de catalasa en esporas y micelio tratado con H ₂ O ₂ y paraquat	24
Crecimiento en diferentes fuentes de carbono y de nitrógeno	24
Determinación del mRNA de <i>brlA</i>	24

RESULTADOS Y DISCUSIÓN	26
Parte I. Resultados Publicados	26
Parte II. Resultados sin publicar	31
El gen <i>srrB</i> codifica para una proteína ortóloga de Rim15	31
Eliminación del gen <i>srrB</i>	31
Eliminación del dominio receptor de la proteína SrrB	36
La eliminación total de SrrB o solamente el dominio receptor producen una disminución en el crecimiento radial, mientras que sólo la eliminación del dominio receptor de SrrB produce una disminución en la esporulación asexual	38
La eliminación del dominio receptor de SrrB provoca una disminución en el mRNA del gen <i>brlA</i>	38
La eliminación del dominio receptor de SrrB provoca sensibilidad a estrés osmótico	39
La eliminación de SrrB y del dominio receptor de SrrB afectan la inducción de la catalasa B en presencia de H ₂ O ₂ y paraquat pero sólo la eliminación del dominio receptor de SrrB solo afecta la sensibilidad al H ₂ O ₂	41
La eliminación del dominio receptor de SrrB afecta el crecimiento cuando se utiliza glicerol o etanol como fuentes de carbono o cuando se utiliza ácido úrico y prolina como fuentes de nitrógeno.	43
Eliminación del gen <i>srrC</i> .	45
SrrC no se requiere para la resistencia al H ₂ O ₂	47
SrrC no se requiere para la resistencia al estrés osmótico y tampoco esta involucrado en la sensibilidad al fungicida fludioxonil	48
DISCUSION GENERAL	50
CONCLUSIONES	58
PERSPECTIVAS	59
REFERENCIAS	60

INTRODUCCION

Todas las células perciben cambios en su ambiente y responden apropiadamente a dichos cambios. Los sistemas de transducción de señales funcionan como vías de procesamiento de estímulos externos para producir respuestas específicas que permiten adaptarse al estímulo percibido. Existe gran diversidad de estímulos y de respuestas, no obstante la célula presenta una cantidad limitada de estrategias moleculares para la señalización. La fosforilación de proteínas es una de las estrategias más ampliamente distribuidas en los seres vivos.

Muchas vías de señalización en los eucariontes involucran proteínas cinasas que se fosforilan así mismas o que fosforilan a otras proteínas blanco en residuos específicos de serina, treonina o tirosina y de esta forma regulan su actividad y la de las proteínas blanco. En los sistemas de señalización en los procariontes predomina un esquema diferente de fosforilación. Estas vías de señalización denominadas “sistemas de dos componentes” están constituidas por dos proteínas: una proteína cinasa de histidina (HK) y el regulador de la respuesta (RR) que se fosforilan en residuos de histidina y aspartato, respectivamente (Parkinson, 1995).

Estos sistemas predominan en las bacterias y también se han descrito en organismos eucariontes como los hongos y las plantas. Hasta la fecha no se han identificado proteínas del sistema de dos componentes en los genomas de humano, *Drosophila melanogaster* y *Caenorhabditis elegans* (West and Stock, 2001).

Esquema general del sistema de dos componentes

Inicialmente los sistemas de dos componentes se describieron como sistemas de dos proteínas bimodulares. La primera proteína, la HK, tiene un dominio sensor no conservado y un dominio transmisor con un residuo de histidina conservado. La segunda proteína, el RR, tiene un dominio efector no conservado y un dominio receptor con un residuo de aspartato conservado (Fig. 1).

En un sistema típico de dos componentes, un estímulo extracelular es detectado por la HK y sirve para modular la actividad de cinasa. La HK cataliza su autofosforilación de forma dependiente de ATP en un residuo conservado de His y posteriormente ocurre la transferencia del grupo fosfato al RR (Fig. 1) (Parkinson, 1995). La fosforilación del RR en el residuo conservado de Asp del dominio receptor generalmente activa al dominio efector del RR.

Existen diferentes tipos de dominios efectores pero frecuentemente estos son dominios de unión al DNA por lo tanto, la fosforilación del RR está acoplada a cambios en la transcripción.

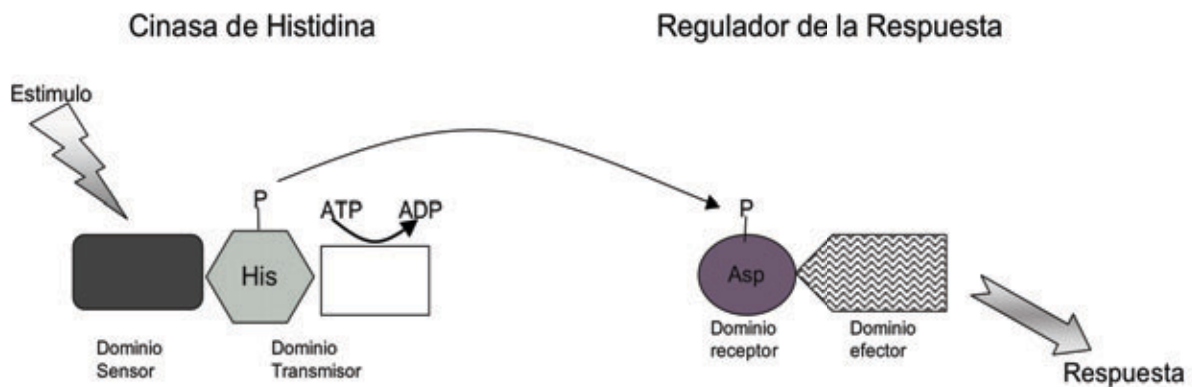


Figura 1. Esquema general de un sistema de dos componentes. Un sistema de dos componentes típico está compuesto por dos proteínas: una proteína sensora o cinasa de histidina (HK) y un regulador de la respuesta (RR). El estímulo es percibido en el dominio sensor, lo que provoca la activación de la cinasa, la cual se autofosforila a expensas de ATP en un residuo de histidina (His). Posteriormente, el grupo fosfato es transferido de la His de la HK al residuo de aspartato (Asp) en el RR. La fosforilación del residuo de Asp en el RR causa su activación. Un RR es generalmente un regulador de la transcripción que activa o reprime ciertos genes necesarios para dar una respuesta al estímulo percibido.

En algunos casos las cinasas de histidinas HKs son bifuncionales y pueden catalizar tanto la fosforilación como la desfosforilación del RR (Georgellis *et al.*, 1998; Pena-Sandoval *et al.*, 2005). Una variante común del sistema de dos componentes es conocida como relevo de fosfatos, es decir, que la transferencia del grupo fosfato se lleva a cabo en varios pasos, por ejemplo en *Bacillus subtilis* la esporulación está controlada por un sistema de relevo de fosfatos de 4 componentes (Fig. 2).

Un sistema de relevo de fosfatos usualmente esta integrado por más de dos proteínas. Estos sistemas generalmente tienen una HK híbrida que se autofosforila en un residuo de His en el dominio transmisor y que transfiere el grupo fosfato a un residuo de Asp del dominio receptor presente en la misma proteína. Posteriormente el grupo fosfato es transferido a una proteína de transferencia de fosfatos (Hpt) y por ultimo, el grupo fosfato es transferido al RR (Fig. 2).

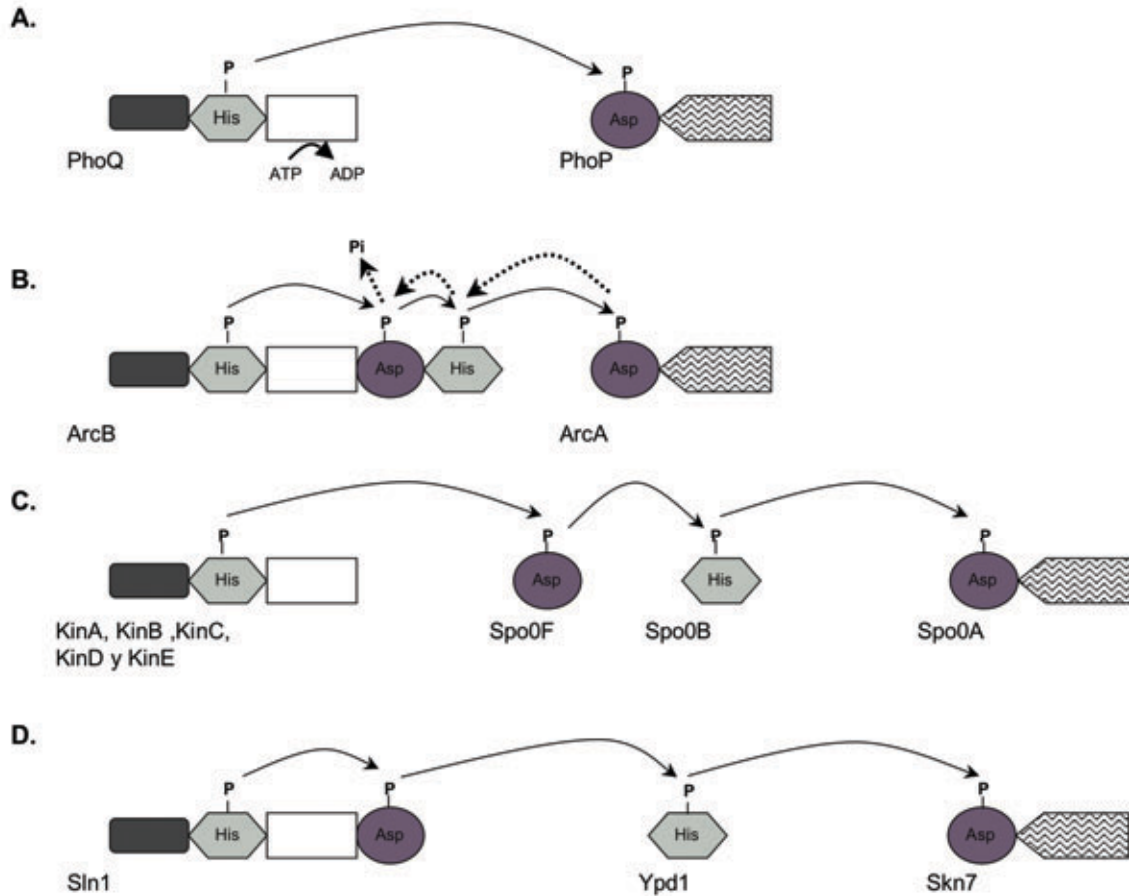


Figura 2. Ejemplos de sistemas de dos componentes. A) El sistema PhoP-PhoQ consta de dos proteínas entre las que se lleva a cabo la transferencia del grupo fosfato cuando el sistema se encuentra activo. Sin embargo existen otros sistemas más complejos donde ocurre más de un paso de transferencia del grupo fosfato, estos sistemas son conocidos como sistemas de relevo de fosfatos. B) En el sistema ArcB/ArcA de *Escherichia coli*, el relevo del grupo fosfato se lleva a cabo entre dos proteínas y éste se lleva a cabo en cuatro pasos. ArcB también tiene actividad de fosfatasa sobre ArcA-P, al cual desfosforila mediante un relevo de fosfato inverso (flechas punteadas). C) En *Bacillus subtilis*, la esporulación esta controlada por el sistema de dos componentes Spo, en donde el relevo de fosfatos se lleva a cabo entre cuatro proteínas. D) En el sistema Sn1.Ypd1-Skn7 de *Saccharomyces cerevisiae* el relevo de fosfatos se lleva a cabo entre tres proteínas.

Sistemas de dos componentes en bacterias

Los sistemas de dos componentes en bacterias participan en una gran cantidad de procesos fisiológicos como la quimiotaxis, la virulencia, la aerobiosis/anaerobiosis, la diferenciación celular, etc. (Stock *et al.*, 2000). A continuación se describen el sistema PhoP-PhoQ de *Salmonella*, como un ejemplo de un sistema de dos componentes clásico; el sistema ArcB-ArcA de *Escherichia coli*, como un sistema de relevo de fosfatos y el sistema Spo (esporulación) de *Bacillus subtilis*, como un ejemplo de relevo de fosfatos entre más de dos proteínas.

El sistema de dos componentes PhoP-PhoQ de *Salmonella*

El sistema PhoP-PhoQ se identificó por primera vez en *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. El sistema PhoP-PhoQ controla la virulencia mediante la adaptación a ambientes con bajas concentraciones de Mg^{2+} (Groisman *et al.*, 1989; Miller *et al.*, 1989) y regula una gran cantidad de actividades celulares en diversas bacterias Gram negativas. Este sistema consta de una proteína HK, PhoP, que se encuentra en la membrana plasmática y un RR, PhoQ, localizado en el citoplasma.

PhoP tiene en el carboxilo terminal (C-terminal) dos dominios transmembranales y una región periplásmica rica en residuos ácidos que podrían estar involucrados en la detección de cationes divalentes; como en el caso de *E. coli*, donde la región periplásmica rica en residuos ácidos esta implicada en la detección de Mg^{2+} (Waldburger and Sauer, 1996).

PhoQ tiene un dominio de unión a DNA y funciona como factor transcripcional que se activa cuando esta fosforilado. En condiciones de baja concentración de Mg^{2+} , se promueve la fosforilación de PhoQ por PhoP lo que activa la transcripción de genes que se requieren para el crecimiento en bajas concentraciones de Mg^{2+} (Fig. 3A). Las cepas mutantes en PhoP o PhoQ presentan virulencia atenuada que las hace incapaces de sobrevivir en macrófagos y son susceptibles a péptidos antimicrobianos, sales biliares y a pH bajo (Groisman, 2001).

El sistema de dos componentes ArcB-ArcA de *Escherichia coli*

ArcB-ArcA es un sistema de transducción complejo que tiene una función importante en la regulación del metabolismo energético a nivel transcripcional (Malpica *et al.*, 2006). En contraste con los sistemas de dos componentes típicos de bacterias, el sistema Arc presenta una reacción en cascada en cuatro pasos o relevo de fosfatos (Georgellis *et al.*, 1997; Kwon *et al.*, 2000). La cinasa de histidina ArcB esta anclada a la membrana plasmática por dos segmentos transmembranales separados por un puente periplásmico de 16 aminoácidos. En el dominio citoplásmico, ArcB tiene una región “linker” con una cremallera de leucinas y un dominio Per-Arnt-Sim (PAS). También posee tres dominios catalíticos: un dominio transmisor primario (H1) en el amino-terminal (N-terminal) con un residuo conservado de His, un dominio central receptor (D1) con un Asp conservado y un segundo dominio transmisor o dominio de transferencia de fosfatos (H2/Hpt) con un residuo conservado de His. Debido a estas características ArcB pertenece al grupo de cinasas híbridas que incluye a BarA, BgvS, LemA y TorS.

ArcA es un típico regulador de la respuesta constituido por un dominio de unión a DNA hélice-vuelta-hélice en la región C-terminal y un dominio receptor en el extremo N-terminal.

En condiciones anaeróbicas ArcB cambia su conformación, lo que provoca la activación de la actividad de cinasa y con ello la autofosforilación dependiente de ATP del residuo de His en H1. En seguida, el grupo fosfato es transferido del residuo de His en H1 al residuo conservado de Asp en D1 y para posteriormente ser transferido al residuo de His presente en H2/HPt. Después, el grupo fosfato es transferido al residuo de Asp presente en ArcA (Georgellis *et al.*, 1997; Kwon *et al.*, 2000). De esta forma se activa ArcA y se lleva a cabo la regulación transcripcional necesaria para la adaptación a condiciones anaeróbicas (Fig. 3B).

La autofosforilación de ArcB en condiciones anaeróbicas se incrementa en presencia de ciertos metabolitos tales como D-lactato, acetato y piruvato. Estos metabolitos aceleran la autofosforilación de ArcB y aumentan la transfosforilación de ArcA sin afectar la desfosforilación de ArcA-P (Georgellis *et al.*, 1999). Estudios

in vivo muestran que el D-lactato no actúa como la señal de activación pero sí tiene un papel importante como un efector que amplifica la actividad cinasa de ArcB (Rodriguez *et al.*, 2004).

En condiciones de aerobiosis, ArcB actúa como una fosfatasa específica de ArcA-P, al cual desfosforila mediante un relevo de fosfato reverso, es decir el grupo fosfato de ArcA-P se transfiere al residuo de His en H2 y posteriormente al Asp en D1 de ArcB y de ahí es liberado al medio (Fig. 2B) (Georgellis *et al.*, 1998; Pena-Sandoval *et al.*, 2005).

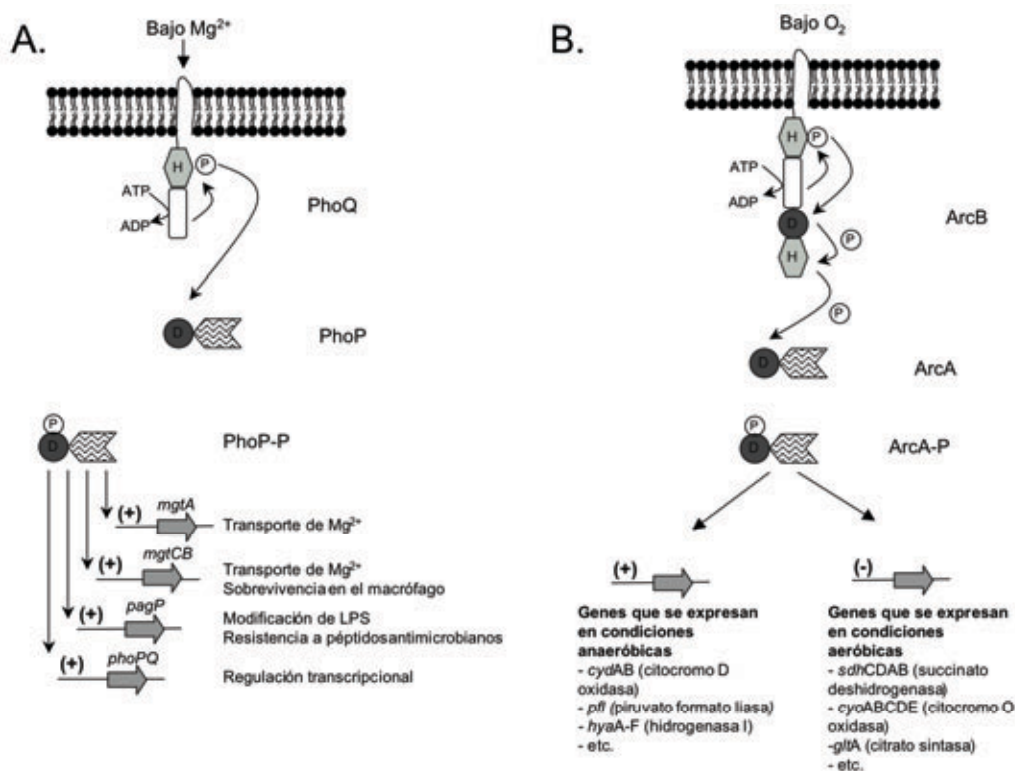


Figura 3. Sistemas de dos componentes en bacterias. A) El Sistema PhoP-PhoQ en *Salmonella* controla la virulencia mediante la adaptación a bajas concentraciones de Mg^{2+} . En presencia de bajas concentraciones de Mg^{2+} , PhoP se activa y se autofosforila en un residuo de histidina (H), el grupo fosfato es posteriormente transferido a un residuo de aspartado (D) en PhoQ. PhoQ-P activa la transcripción de los genes necesarios para el crecimiento en bajas concentraciones de Mg^{2+} . B) El sistema ArcB-ArcA se activa en condiciones de anaerobiosis. ArcB se activa y autofosforila en bajas concentraciones de O_2 . Posteriormente el grupo fosfato es transferido al dominio receptor de ArcB y en seguida al segundo dominio transmisor presente en ArcB. Por último, el grupo fosfato es transferido al Asp presente en ArcA. ArcA-P actúa como un factor transcripcional que regula diversos grupos de genes involucrados con el crecimiento en condiciones de baja concentraciones de O_2 .

Se ha reportado que las quinonas actúan como silenciadores de la actividad cinasa de ArcB en condiciones aeróbicas (Georgellis *et al.*, 2001). El mecanismo molecular del silenciamiento de ArcB por quinonas involucra la oxidación de dos residuos de cisteína en la región citoplásmica de ArcB, que participan en la formación de dos puentes disulfuro. En esta reacción, las quinonas participan como aceptores de electrones y es mediante la formación de los puentes disulfuro que se inhibe la actividad de cinasa de ArcB (Malpica *et al.*, 2004).

Aunque *arcA* y *arcB* fueron identificados como genes que regulaban la expresión del operon *sdh*, estudios posteriores revelaron que la mutación en *arcA* o *arcB* tenía efectos pleiotrópicos en la expresión de muchas enzimas involucradas en el metabolismo aeróbico como las enzimas del ciclo de los ácidos tricarbónicos, las enzimas de la degradación de ácidos grasos, algunas deshidrogenasas de flavoproteínas y la oxidasa de ubiquinona (Luchi and Lin, 1988). Estudios genéticos demuestran que alrededor de 30 operones, involucrados en el metabolismo redox están controlados por ArcA (Lynch and Lin, 1996). Sin embargo, de acuerdo con algunos análisis bioinformáticos y de microarreglos, son 300 operones los que se encuentran involucrados en la adaptación a la anaerobiosis (McGuire *et al.*, 1999).

El sistema de dos componentes Spo de *Bacillus subtilis*

El inicio de la esporulación en *Bacillus subtilis* es controlado por un sistema de transducción de señales de relevo de fosfatos (Hoch, 1993). El regulador principal de la entrada a la esporulación es la proteína de unión a DNA Spo0A. Spo0A regula la transcripción de diversos genes que funcionan en la fase estacionaria y están involucrados en el proceso de esporulación (Stragier and Losick, 1996). La actividad de Spo0A es controlada por un sistema que consiste de cinco proteínas HKs (KinA, KinB, KinC, KinD y KinE) y dos proteínas de transferencia de fosfatos (Spo0F y Spo0B). Spo0F tiene únicamente el dominio receptor, de tal manera que sólo funciona como un aceptor de fosfato de cualquiera de las HKs y aparentemente no tiene otra función que servir como

donador de fosfato para la producción de Spo0A-P. Esta última reacción es catalizada por Spo0B, el cual funciona como una fosfotransferasa (Hoch, 1995).

No se conoce cual es la señal que activa a las HKs. Sin embargo, se sabe que las HKs se autofosforilan y transfieren el grupo fosfato a Spo0F. Spo0F-P transfiere el grupo fosfato a Spo0B, el cual en un paso final de relevo de fosfatos transfiere el grupo fosfato a Spo0A (Fig. 2). Los niveles de Spo0A-P están controlados además por la actividad de fosfatasas que desfosforilan a Spo0F-P y a Spo0A-P (Perego and Hoch, 2002).

Spo0A-P se une a una secuencia de DNA conocida como “caja 0A”, donde actúa como represor de ciertos genes expresados en células vegetativas y como activador de genes involucrados en la esporulación. Algunos reportes indican que Spo0A regula 121 genes, de los cuales 40 se encuentran regulados positivamente y 81 se reprimen por Spo0A (Molle *et al.*, 2003)

Sistemas de dos componentes en los hongos

Por mucho tiempo se pensó que los sistemas de dos componentes eran exclusivos de los procariontes sin embargo, se han identificado sistemas de dos componentes en organismos eucariontes como los que se encuentran los hongos, las plantas y el moho mucilaginoso *Dyctyostelium*, en donde controlan un amplio número de procesos celulares (Brown and Firtel, 1998).

Los sistemas de dos componentes en los hongos (también llamados sistemas de relevo de fosfatos) tienen una o varias HK híbridas, una proteína de transferencia de fosfato (Hpt) y dos RRs . En *Saccharomyces cerevisiae* existe solo una HK, mientras que en otras levaduras como *Candida albicans* y *Schizosaccharomyces pombe* se han descrito tres HKs (Fig. 4). En contraste, el análisis del genoma de los hongos filamentosos indica que existen entre 11 y 21 HKs (Tabla 1) (Catlett *et al.*, 2003).

Tabla 1. Genes del sistema de dos componentes en hongos y otros organismos.

GENOMA	Número de genes			
	HK Simple	HK Híbrida	Hpt ^b	RR ^a
<i>Escherichia coli</i>	23	5 ^c	1	32
<i>Arabidopsis thaliana</i>	1	7	5	22
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	0	1	1	2
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	0	3	1	2
<i>Gibberella moniliformis</i>	0	16	1	3
<i>Cochiobolus heterotrofus</i>	0	21	1	3
<i>Botryonia fuckeliana</i>	0	20	1	2
<i>Neurospora crassa</i>	0	11	1	2

^a No se consideran los ortólogos de Rim15.

^b Dominio independiente que no forma parte de la HK.

^c En *E.coli* cuatro de las HKs son tripartitas, es decir el dominio Hpt es parte de la HK.

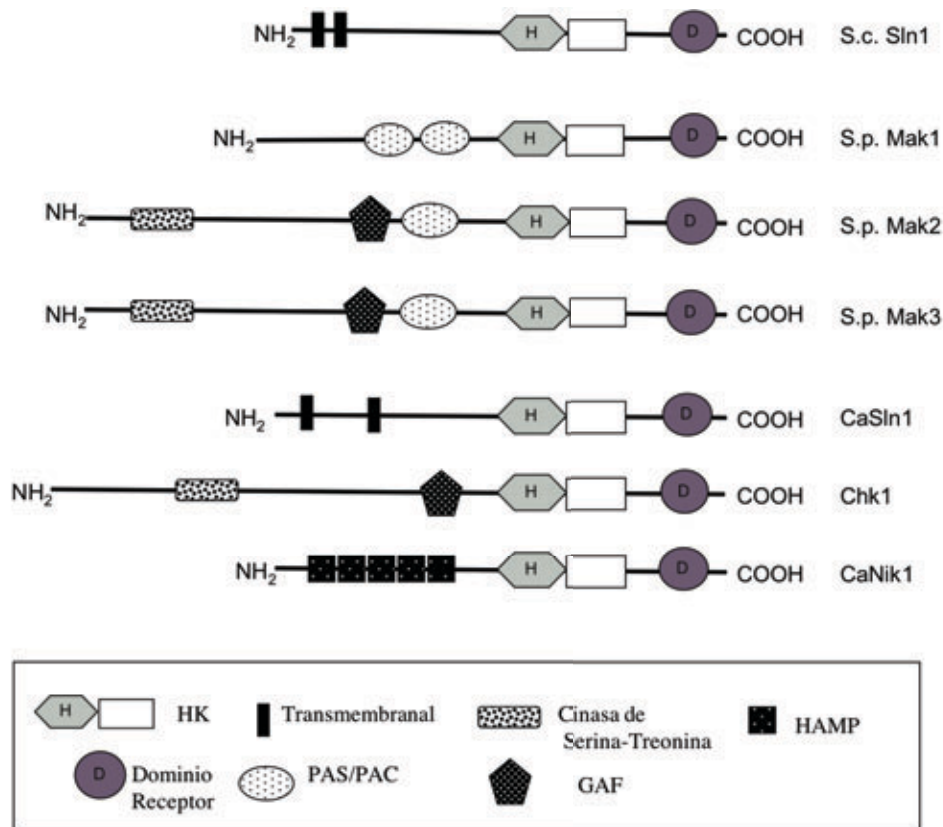


Figura 4. Cinasas de histidina en las levaduras *Saccharomyces cerevisiae* (S.c.), *Schizosaccharomyces pombe* (S.p.) y *Candida albicans* (Ca). H, Histidina; D, Aspartato.

El sistema de dos componentes Sln1-Ypd1-Ssk1,Skn7 de *Saccharomyces cerevisiae*

El sistema de dos componentes mejor caracterizado en hongos es el sistema de respuesta a estrés osmótico en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, el cual utiliza un sistema de relevo de fosfatos con una arquitectura similar al que regula la esporulación en *Bacillus subtilis*.

Sln1 fue la primera HK descrita en organismos eucariontes (Ota and Varshavsky, 1993). Sln1 se localiza en la membrana plasmática y es una HK híbrida que contiene un dominio transmisor y un dominio receptor (Fig. 4).

En condiciones de baja osmolaridad, Sln1 se encuentra activa y se autofosforila en el residuo de His presente en el dominio transmisor. Posteriormente el grupo fosfato se transfiere al residuo de Asp presente en el dominio receptor de Sln1 y de ahí al residuo de His en la proteína Ypd1. Finalmente el grupo fosfato es transferido de Ypd1 al residuo Asp presente en el dominio receptor de los RRs Ssk1 y Skn7 (Fig. 5A) (Li *et al.*, 1998; Posas *et al.*, 1996; Posas and Saito, 1997, 1998).

Cuando la levadura se encuentra en condiciones de alta osmolaridad, se inhibe la actividad de Sln1 y ésto hace que se acumule la forma no fosforilada de Ssk1, la cual activa la vía de la MAP cinasa (MAPK) Hog1 mediante la activación de las MAP cinasas-cinasas-cinasas (MAPKKK) Ssk2 y Ssk22. Ssk2 y Ssk22 fosforilan y activan a la MAP cinasa cinasa (MAPKK) Pbs2, la cual a su vez fosforila y activa a la MAPK Hog1 (Fig. 5B) (Posas and Saito, 1997, 1998).

La forma fosforilada de Hog1 activa genes involucrados en la respuesta y adaptación a la alta osmolaridad (Posas *et al.*, 2000). Hog1 regula la activación transcripcional por varios mecanismos; fosforila directamente y modifica las propiedades de varios factores transcripcionales (Alepuz *et al.*, 2003; de Nadal *et al.*, 2003; Proft *et al.*, 2001) lo que promueve el reclutamiento de la RNA polimerasa II (Alepuz *et al.*, 2003).

También se ha descrito que Hog1 se asocia a los promotores de los genes de respuesta a estrés y su presencia es importante para el reclutamiento de complejos proteicos necesarios para la modificación de la cromatina y con ello se

realice adecuadamente el inicio de la transcripción de los genes de respuesta a estrés (De Nadal *et al.*, 2004). El otro RR, Skn7, presenta un dominio de unión a DNA, semejante al del factor transcripcional Hsf1 de mamíferos y podría funcionar como un activador de forma parecida a los RR en bacterias (Brown *et al.*, 1994).

Se ha demostrado la transferencia de fosfato desde Sln1, a Ypd1 y a Skn7 sin embargo, Skn7 no se encuentra involucrado en la respuesta al estrés osmótico. Skn7 esta involucrado en la respuesta al estrés oxidativo mediante la inducción de genes como la tiorredoxina (TRX2) y la reductasa de tiorredoxina (Lee *et al.*, 1999; Morgan *et al.*, 1997). En el caso de la inducción de genes en respuesta a estrés oxidativo no se requiere de la fosforilación del residuo de Asp presente en el dominio receptor de Skn7, aunque se ha descrito que existe otro grupo de genes dependientes de Skn7, cuya expresión depende de la fosforilación del Asp por la vía Sln1-Ypd1 (Fig. 5A) (Li *et al.*, 1998).

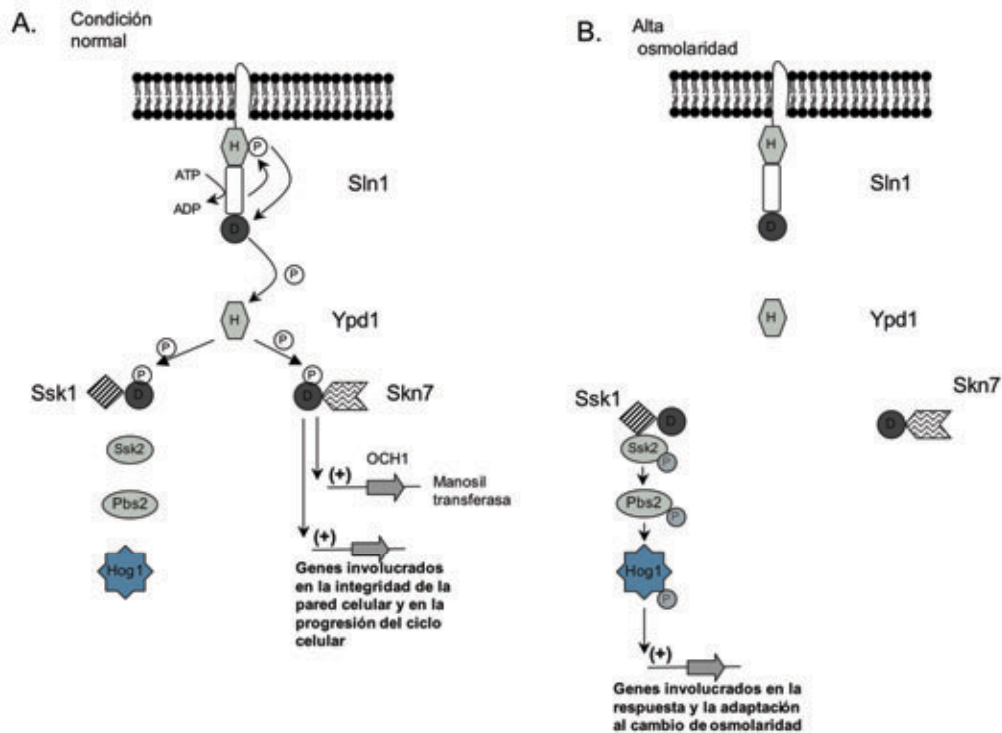


Figura 5. Sistema de dos componentes Sln1-Ypd1-Ssk1, Skn7 en *Saccharomyces cerevisiae*. A) En condiciones de baja osmolaridad, la cinasa Sln1 está activa y el grupo fosfato es transferido de Sln1 a Ypd1 y posteriormente a los reguladores de respuesta Ssk1 y Skn7. Ssk1 fosforilado no puede activar la cascada MAPK Hog1. B) En contraste, en alta osmolaridad Sln1 se inactiva y la forma no fosforilada de Ssk1 induce la activación de la cascada MAPK Hog1.

Los sistemas de dos componentes de *Schizosaccharomyces pombe*

En contraste con el sistema de dos componentes de *S. cerevisiae* en donde solo existe una HK, en la levadura *Schizosaccharomyces pombe* se han descrito tres HKs: Mak1, Mak2 y Mak3 (Buck *et al.*, 2001); una proteína Hpt, Mpr1 y dos RRs: Mcs4 y Prr1 los cuales son homólogos de los RRs, Ssk1 y Skn7 respectivamente (Cottarel, 1997; Ohmiya *et al.*, 1999).

Las proteínas HKs de *S. pombe* no presentan dominios transmembranales y además de contener el dominio transmisor y el dominio receptor, presentan otros dominios funcionales que no se encuentran en Sln1 de *S. cerevisiae* (Fig. 4). Estas HKs presentan uno o dos dominios PAS adyacentes al dominio de cinasa de histidina, los cuales se encuentran asociados con proteínas que responden a la luz y a condiciones redox. Mak2 y Mak3 contienen además un dominio GAF, el cual esta presente en factores transcripcionales que responden a condiciones redox en la célula y un dominio de cinasa de serina y treonina (Buck *et al.*, 2001).

A diferencia de *S. cerevisiae* donde el sistema está involucrado principalmente en la respuesta al estrés osmótico, en el caso de *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 de la MAPK Spc1 (también conocida como Sty1; homóloga de la MAPK Hog1). Spc1 fosforila y activa a Atf1, el cual es un factor de transcripción involucrado en la inducción de genes requeridos para la protección celular (Buck *et al.*, 2001; Nguyen *et al.*, 2000).

A diferencia de Mak2 y Mak3, Mak1 no se requiere para activar Spc1 en respuesta al estrés oxidativo sin embargo se ha observado que Mak1 se requiere para la expresión del gen de la catalasa citosólica (*ctt1*) y de la reductasa de tiorredoxina (*trr1*). Se ha propuesto que Mak1 podría estar regulando a Prr1, sugiriendo que Prr1 regula la expresión de genes inducidos por estrés oxidativo de forma independiente de la vía de Spc1 (Buck *et al.*, 2001).

Además de la respuesta al estrés oxidativo, se ha observado que Mcs4 y Mpr1 se requieren para controlar la entrada a la mitosis (o transición G2/M) mediante la activación de la MAPK Spc1 (Aoyama *et al.*, 2001; Nakamichi *et al.*, 2002; Nakamichi *et al.*, 2003).

Prr1 participa en el desarrollo sexual ya que se requiere para la expresión de los genes *ste11*, *mam2* y *mei2*, los cuales son necesarios para el inicio de la meiosis. Las mutantes que carecen de *prp1* y de *mcs4* no llevan a cabo la reproducción asexual y son estériles (Nakamichi *et al.*, 2003).

Los sistemas de dos componentes de *Candida albicans*

C. albicans es uno de los hongos patógenos más comunes en el humano. Dependiendo de las condiciones ambientales, este hongo puede adoptar diferentes morfologías en respuesta a un estímulo extracelular, por ejemplo pueden adoptar la forma de levadura o la forma de crecimiento en hifas. Se cree que estos cambios de morfología juegan un papel importante en la virulencia de *C. albicans*, particularmente en la adherencia a los tejidos y en la invasión del hospedero (Kojic and Darouiche, 2004). Se han identificado homólogos del sistema de dos componentes en *C. albicans* y algunos de los reportes han sugerido que estos sistemas están involucrados en la transición morfológica y en la patogénesis de esta levadura.

En *C. albicans* se han identificado tres proteínas HKs: CaSln1, CaNik1 y Chk1 (Alex *et al.*, 1998; Calera *et al.*, 1998; Nagahashi *et al.*, 1998); una proteína Hpt, CaYpd1 (Calera *et al.*, 2000a) y dos proteína RRs: CaSsk1 (Calera and Calderone, 1999c) y CaSkn7 (Singh *et al.*, 2004). CaSln1 es estructuralmente semejante a Sln1 de *S. cerevisiae*, es decir, una cinasa híbrida que presenta dos regiones transmembranales en el N-terminal (Nagahashi *et al.*, 1998). Chk1 no presenta dominios transmembranales pero en el extremo N-terminal presenta un dominio GAF y un dominio de cinasa de serina y treonina como en el caso de Mak2 y Mak3 de *S. pombe* (Calera *et al.*, 1998). CaNik1 no presenta dominios transmembranales y tiene una alta homología con la HK Nik1, una HK de *Neurospora crassa* que presenta en su extremo N-terminal cinco repetidos de dominios HAMP (Fig. 4) (Alex *et al.*, 1998).

A diferencia de lo que sucede en *S. cerevisiae*, en *C. albicans* CaSln1 y CaSsk1 no se requieren para percibir una alta osmolaridad. Sin embargo, Chk1 y CaSsk1 son esenciales para el cambio de crecimiento levaduriforme a crecimiento

filamentoso, ya que cepas que carecen de estos genes son incapaces de crecer como hifas en un medio que las induce (Calera and Calderone, 1999a; Calera *et al.*, 2000b). Chk1 se ha relacionado con las proteínas involucradas en la agregación celular o floculación; las cepas mutantes que carecen de Chk1 muestran una floculación excesiva (Calera and Calderone, 1999b); por otro lado se encontró que esta HK es esencial para la virulencia de *C. albicans* (Calera *et al.*, 1999).

CaNik1 no se requiere para la respuesta al estrés osmótico, en comparación con Nik1 de *N. crassa* (Alex *et al.*, 1998). Las mutantes en esta HK presentan una virulencia menor en comparación con la cepa silvestre. Un análisis de mutantes en las proteínas HKs sugiere la interacción entre ellas, ya que la eliminación de CaSln1 y CaNik1 es letal, lo que implica que existe una función esencial en la cual se requieren ambas cinasas (Calera *et al.*, 1999).

CaSsk1 y CaSkn7 participan en la respuesta al estrés oxidativo aunque existen diferencias en la función dependiendo del agente oxidante, además CaSsk1 también regula la expresión de proteínas estructurales de la pared celular y regula negativamente la expresión de Chk1 (Chauhan *et al.*, 2003; Singh *et al.*, 2004).

Los sistemas de dos componentes en hongos filamentosos

A diferencia de las levaduras en donde se encuentran entre uno y tres genes de HKs en su genoma, en los hongos filamentosos el número de HKs codificadas es mucho mayor (Catlett *et al.*, 2003).

El análisis del genoma en el hongo filamentoso *Neurospora crassa* predice la presencia de 11 HKs, una Hpt y dos 2 RRs (Tabla 1) (Catlett *et al.*, 2003). Una de las cinasas predichas en el análisis es similar a Sln1 de *S. cerevisiae*. Dos de las proteínas HKs parecen ser sensores de luz (NCU05790.1 y NCU04834.1) ya que estas cinasas contienen dominios similares a los de fitocromos de plantas y los bacteriofitocromo (Borkovich *et al.*, 2004). La eliminación de estos genes y los fenotipos de las mutantes correspondientes aún no ha sido reportada.

NIK-1/OS-1 es una de las primeras HKs descritas en hongos filamentosos (Alex *et al.*, 1996; Schumacher *et al.*, 1997). Esta HK híbrida presenta en el extremo N-terminal cinco dominios HAMP. Se sabe que hay ortólogos de NIK-1/OS-1 entre los eucariotas. Los dominios HAMP se encuentran en proteínas relacionadas con señalización, incluyendo HKs, ciclasas de adenilato, proteínas de quimiotaxis y fosfatasa. No se conoce cual es la función de estos dominios HAMP, sin embargo mutaciones en estos dominios provocan un fenotipo osmosensible (Catlett *et al.*, 2003).

NIK-1/OS-1 juega un papel importante en el desarrollo de las hifas. Las mutantes $\Delta nik-1/\Delta os-1$ presentan defectos morfológicos en el desarrollo de las hifas además se observa una disminución en la conidiación. Estas alteraciones se exageran cuando las mutantes se crecen en medio con alta osmolaridad. Estos fenotipos podrían deberse a defectos en la estructura de la pared celular (Alex *et al.*, 1996; Schumacher *et al.*, 1997).

NIK-2 es una cinasa híbrida que contiene dos dominios PAS en el extremo N-terminal, los cuales podrían estar involucrados en la detección de condiciones redox o presencia de luz, sin embargo, una mutante que carece de NIK-2 no exhibe ningún fenotipo cuando se crece bajo diferentes condiciones de estrés (Borkovich *et al.*, 2004).

Además de NIK-1/OS-1, otra proteína involucrada en la respuesta a estrés osmótico es el regulador de respuesta RRG-1. Este RR es el homólogo de Ssk1 de *S. cerevisiae* y activa la MAPK OS-2 (homóloga de la MAPK Hog1). Los fenotipos que presenta la mutante en RRG-1 sugieren que este regulador está involucrado en la integridad de la pared celular, en la respuesta al estrés osmótico y en la sensibilidad a fungicidas, ya que las cepas mutantes en RRG1 son osmosensibles y además resistentes al fludioxonil y al iprodione (Jones *et al.*, 2007).

RRG-2 es el homólogo de Skn7 en *S. cerevisiae*. La eliminación de RRG-2 provoca un incremento en la sensibilidad al tert-butil peróxido (t-BOOH), el cual causa estrés oxidativo (Banno *et al.*, 2007).

En diversos hongos se han descrito ortólogos de NIK-1/OS-1 (Catlett *et al.*, 2003). La remoción de la cinasa ortóloga de NIK-1/OS-1 de diversos hongos patógenos de plantas produce sensibilidad a alta osmolaridad y resistencia a fungicidas como el fludioxonil (Avenot *et al.*, 2005; Motoyama *et al.*, 2005; Viaud *et al.*, 2006; Yoshimi *et al.*, 2004; Yoshimi *et al.*, 2005).

En el hongo *Botrytis cinerea* la eliminación de la cinasa BOS1 provoca que el hongo sea menos virulento para su hospedero (Viaud *et al.*, 2006). En contraste en *Magnaporthe grisea* la supresión de la cinasa HIK1 no causa defectos en la patogenicidad del hongo a su hospedero (Motoyama *et al.*, 2005). En *Cochliobolus heterostrophus* se ha descrito que además de la cinasa ortóloga a NIK-1/OS-1, los reguladores de la respuesta Chssk1 y Chskn7 están involucrados en la resistencia a la alta osmolaridad y en la sensibilidad al fludioxonil; sin embargo, se requiere eliminar ambos reguladores para que el hongo sea completamente resistente al fludioxonil (Izumitsu *et al.*, 2007).

Los sistemas de dos componentes de *Aspergillus nidulans*

Aspergillus nidulans se encuentra muy relacionado con otras especies de *Aspergillus* de importancia médica e industrial y es un buen modelo genético para el estudio de la biología de los hongos y otros organismos eucariontes.

El análisis del genoma de *A. nidulans* predice 15 proteínas HKs, una proteína Hpt, YpdA y dos RRs clásicos llamados SrrA (En este trabajo; número de acceso del GenBank: AY168636) y SskA (Furukawa *et al.*, 2005). Además se predicen otras dos proteínas que presentan un dominio receptor llamados SrrB, el homólogo de Rim15 de *S. cerevisiae*, el cual carece del residuo de Asp conservado y SrrC, que carece de un dominio efector. (Hagiwara *et al.*, 2007).

De las 15 HKs que se predicen en el genoma de *A. nidulans*, solo se han estudiado tres HKs: TcsA, TcsB, FhpA.

TcsA fue la primera de las HKs descritas en *A. nidulans*. TcsA es una cinasa híbrida que presenta dos dominios PAS en su extremo N-terminal, los cuales podrían estar relacionados con la detección de la señal y la activación de la

cinasa de histidina (Fig. 6). TcsA no se requiere para el crecimiento vegetativo pero las mutantes que carecen de esta HK 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 HK puede ser sustituida por la de otra HK (Virginia *et al.*, 2000).

Por otra parte, TcsA se encuentra involucrada en la localización nuclear del factor transcripcional DevR ya que, en cepas mutantes que carecen de TcsA, DevR se localiza en el citoplasma mientras que en la cepa silvestre su localización es nuclear. Aún se desconoce cómo TcsA regula la localización de DevR (Tuncher *et al.*, 2004). La segunda HK descrita en *A. nidulans* fue TcsB, la cual es una cinasa híbrida con dos dominios transmembranales en su extremo N-terminal (Fig 6), capaz de complementar una mutante en la cinasa Sln1 en *S. cerevisiae*. Sin embargo, al eliminar TcsB no se producen defectos en el crecimiento en diferentes condiciones de estrés (Furukawa *et al.*, 2002).

La HK más ampliamente estudiada es FphA. Esta HK presenta en su extremo N-terminal un dominio PAS, una secuencia de localización nuclear, un dominio GAF y un dominio de fitocromo (Purschwitz *et al.*, 2008). FphA es capaz de unir biliverdina, actúa como un sensor de luz roja y reprime la reproducción asexual bajo condiciones de luz roja (Blumenstein *et al.*, 2005). Los ensayos *in vitro* indican que FphA es una HK funcional; sin embargo, el relevo de fosfatos se lleva a cabo independientemente de la unión a biliverdina (Brandt *et al.*, 2008). FphA forma parte de un complejo de proteínas que contienen a LreA y LreB, los cuales son factores transcripcionales homólogos de WC-1 y WC-2, componentes centrales del sistema sensor de luz en *Neurospora crassa* (Purschwitz *et al.*, 2009).

El regulador VeA también interactúa con FphA formando parte de este complejo que se encuentra en el núcleo, aunque no se sabe si la composición del complejo es siempre la misma o cambia bajo diferentes condiciones fisiológicas (Fischer, 2008; Purschwitz *et al.*, 2008). LreB y VeA interactúan directamente con FphA y estas interacciones no dependen de las condiciones de luz (Purschwitz *et*

al., 2009). 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 la respuesta a través de los cuales se lleva a cabo la señalización y se induce la respuesta al estímulo de luz.

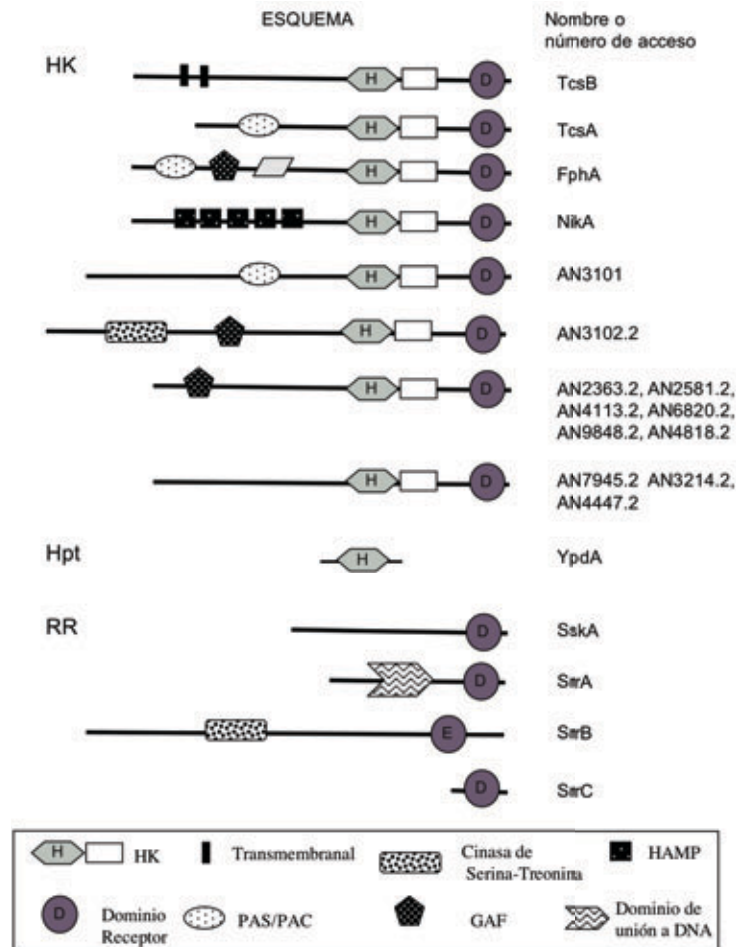


Figura 6. Proteínas de los sistemas de dos componentes identificadas por el análisis del genoma de *Aspergillus nidulans*. Se identificaron 15 proteínas HKs, una proteína Hpt y dos reguladores de respuesta clásicos SrrA y SskA, ortólogos de Skn7 y Ssk1 de *S.cerevisiae* respectivamente. Además de un ortólogo de Rim15 de *S. cerevisiae*. Se indica el número de acceso de la proteína o el nombre de la proteína que ya ha sido estudiada.

En condiciones de estrés osmótico y oxidativo el regulador de la respuesta SskA, es necesario para la activación de la vía de MAPK SskA (homóloga de Hog1) (Furukawa *et al.*, 2005; Kawasaki *et al.*, 2002).

HIPÓTESIS

Proponemos que la comparación de mutantes afectadas en una de las 15 HKs (NikA), la única proteína de transferencia YpdA y los reguladores de la respuesta nos proporcionará una visión general del tipo de funciones reguladas por los sistemas de relevo de fosfatos en *Aspergillus nidulans*.

OBJETIVOS

Objetivo General

Determinar el papel de la cinasa de histidina NikA, de la proteína de transferencia YpdA, y de las proteínas reguladoras de la respuesta en la transducción de señales de estrés y la diferenciación celular en *Aspegillus nidulans*

Objetivos Particulares

1. Eliminar los genes *srrA*, *sskA*, *srrB* y *srrC* los cuáles codifican reguladores de la respuesta en *A. nidulans*, y evaluar el efecto en la diferenciación celular (asexual y sexual) y en la resistencia al estrés (oxidativo y osmótico)

2. Eliminar el gen *ypdA*, el cual codifica para la única proteína de transferencia de fosfatos en *A. nidulans* y evaluar el efecto en la diferenciación celular (asexual y sexual) y en la resistencia al estrés (oxidativo y osmótico).

3. Eliminar el gen *nikA* que codifica para una cinasa de histidina (HK) y evaluar el efecto en la diferenciación celular (asexual y sexual) y en la resistencia al estrés (oxidativo y osmótico)

MATERIALES Y METODOS

Cepas de *Aspergillus nidulans* utilizadas en este trabajo.

A continuación se muestra la tabla de las cepas utilizadas en este trabajo. Se indica de donde se obtuvo la cepa y se describe el genotipo de cada una de las cepas.

Cepa	Genotipo	Referencia
CLK43	<i>pabaA1, yA2; veA1</i>	(Kawasaki <i>et al.</i> , 2002)
TOL1	<i>pabaA1, yA2, ΔargB::trpCΔB; Δsaka::argB; trpC801, veA1</i>	(Kawasaki <i>et al.</i> , 2002)
TLK12	<i>pabaA1, yA2; ΔcatB, veA1</i>	(Kawasaki <i>et al.</i> , 1997)
11035	<i>pyrG89; pyroA4; ΔnkuA::argB; riboB2; veA1</i>	M. Hynes; (Nayak <i>et al.</i> , 2006)
SRF200	<i>pyrG89; ΔargB::trpC pyroA4; veA1</i>	R. Fischer
TΔsrrA-pyrG(<i>ΔnkuA</i>)7	<i>pyrG89; ΔsrrA::AfpYrG; pyroA4; ΔnkuA::argB; riboB2; veA1</i>	Este trabajo, 11035 transformada con la construcción srrA-AfpYrG-srrA
TΔsrrA-pyrG9	<i>pyrG89, pabaA1; yA2; ΔsrrA::AfpYrG, veA1</i>	Este trabajo, CFL3 transformada con la construcción srrA-AfpYrG-srrA
TΔsskA-riboB (<i>ΔnkuA</i>)8	<i>pyrG89; pyroA4, ΔsskA::AfriboB; ΔnkuA::argB; riboB2; veA1</i>	Este trabajo, 11035 transformada con la construcción sskA-AfriboB-sskA
TΔsrrA-pyrG/ΔsskA-riboB (<i>ΔnkuA</i>)6	<i>pyrG89; ΔsrrA::AfpYrG; pyroA4, ΔsskA::AfriboB; ΔnkuA::argB; riboB2; veA1*</i>	Este trabajo, 11035 transformada con las construcciones srrA-AfpYrG-srrA y sskA-AfriboB-sskA
COSΔsrrA03	<i>pabaA1; yA2; ΔsrrA::AfpYrG; veA1</i>	Este trabajo, progenie de la cruce TΔsrrA-pyrG9 X TΔsskA-riboB (<i>ΔnkuA</i>)8
COSΔsskA02	<i>pabaA1, yA2, ΔsskA::AfriboB; veA1</i>	Este trabajo, progenie de la cruce TΔsskA-riboB (<i>ΔnkuA</i>)8 X CLK56
COSΔsrrA/ΔsskA02	<i>pabaA1, yA2; ΔsrrA::AfpYrG; ΔsskA::AfriboB; veA1</i>	Este trabajo, progenie de la cruce TΔsrrA-pyrG9 X TΔsskA-riboB (<i>ΔnkuA</i>)8
TΔnikA-pyrG(<i>ΔnkuA</i>)9	<i>pyrG89; ΔnikA::AfpYrG; pyroA4; ΔnkuA::argB; riboB2; veA1</i>	Este trabajo, 11035 transformada con la construcción <i>nikA</i> -AfpYrG- <i>nikA</i>
CIVΔnikA3	<i>pabaA1; yA2; ΔnikA::AfpYrG; veA1</i>	Este trabajo, progenie de la cruce TnikA-pyrG(<i>ΔnkuA</i>)9X CLK43
TΔsrrB-pyro(<i>ΔnkuA</i>)1	<i>pyrG89; pyroA4; ΔsrrB::AfpYrG; ΔnkuA::argB; riboB2; veA1</i>	Este trabajo, 11035 transformada con la construcción rim15-pyroAf-rim15D
TΔsrrC-pyrG (<i>ΔnkuA</i>)7	<i>pyrG89; ΔsrrC::AfpYrG; pyroA4; ΔnkuA::argB; riboB2; veA1</i>	Este trabajo, 11035 transformada con la construcción AN4134-AfpYrG-AN4134
CIVΔsrrB2	<i>pabaA1; yA2; ΔsrrB::AfpYrG; veA1</i>	Este trabajo, progenie de la cruce TsrrB-pyro(<i>ΔnkuA</i>)1 X CLK43
CIVΔsrrC4	<i>pabaA1; yA2; ΔsrrC::pyrG; veA1</i>	Este trabajo, progenie de la cruce TsrrC-pyrG (<i>ΔnkuA</i>)7 X CLK43
TΔsrrB RD pyro (<i>ΔnkuA</i>)4	<i>pyrG89; pyroA4; srrB ΔRD::AfpYrG; ΔnkuA::argB; riboB2; veA1</i>	Este trabajo, 11035 transformada con la construcción rim15D-AfpYrG-rim15D
CIVΔsrrB RD 4	<i>pabaA1; yA2; srrBΔRD::AfpYrG; veA1</i>	Este trabajo, progenie de la cruce TsrrB RD pyro (<i>ΔnkuA</i>)4 X CLK43

Medios de cultivo y condiciones de crecimiento de *Aspergillus nidulans*

Todas las cepas se crecieron en medio mínimo Käfer con glucosa al 1% suplementado con los requerimientos necesarios para cada cepa (Käfer, 1977). Para los medios sólidos se usó agar al 1.25%. Todos los medios de cultivo se esterilizaron en autoclave a 121°C durante 20 minutos. Las cepas crecidas en medio sólido se incubaron a 37°C y para el crecimiento en medio líquido se incubaron a 37°C a 300 rpm.

Para inocular medios de cultivo líquido se preparó una suspensión de esporas a partir de medio sólido sembrado a confluencia con esporas e incubado a 37°C durante 5 días. Las esporas se cosecharon agregando una solución de Tween 80 al 0.1% y raspando con una asa bacteriológica, la suspensión de esporas se centrifugó durante 5 minutos en una centrifuga clínica a velocidad media y las esporas se lavaron 4 veces con agua estéril. El número de esporas en la suspensión se determinó utilizando una cámara de Neubauer.

Para inocular medios de cultivo sólidos se inoculó en punto a partir de una colonia aislada utilizando un palillo de madera.

Los genotipos de la progenie derivada de cruza sexuales inicialmente fue determinado por morfología de la colonia y por pruebas de crecimiento en medio con sorbitol, H₂O₂ o con el fungicida fludioxonil. La eliminación de los genes se confirmó por hibridación tipo Southern o por análisis con PCR.

Se prepararon soluciones de trabajo de menadiona y fludioxonil, las cuales se esterilizaron por filtración. La menadiona, el fludioxonil, el H₂O₂, terbutil peróxido (t-BOOH), paraquat y calcofluor se adicionaron al medio cuando éste estaba a una temperatura de aproximadamente 50 °C. Para las condiciones de estrés osmótico se adicionó el sorbitol y el NaCl antes de esterilizar.

Eliminación de los genes de *srrA*, *sskA*, *srrB*, *srrC*, *ypdA* y *nikA*

Se utilizó la técnica de "Double Joint PCR" (Yu, *et al.* 2004) y los genes *pyrG*, *riboB* y *pyroA* de *Aspergillus fumigatus* como marcadores selectivos. Se transformó *A. nidulans* mediante la técnica de fusión de protoplastos (Yelton *et al.*, 1984) o mediante la técnica de conidias electrocompetentes (Sanchez, *et*

al. 1996), seleccionando transformantes protótrofos según el marcador selectivo utilizado.

Determinación de número de esporas/cm²

Las cepas a analizar se inocularon por punto las cepas a analizar en cajas Petri con medio mínimo mas suplementos, las cuales se incubaron a 37°C durante 6 días. Después de los 6 días, se midió el diámetro de la colonia y las esporas se cosecharon agregando una solución de Tween 80 al 0.1% y raspando con una asa bacteriológica Se lavó dos veces la caja y la suspensión de esporas se colocó en un tubo falcón. Las esporas se concentraron centrifugando en una centrífuga clínica durante 10 minutos a velocidad media. Se eliminó el sobrenadante y las esporas se resuspendieron en agua con un volumen conocido. Se determinó la cantidad de esporas/ml usando una cámara de Neubauer. El número de esporas por colonia fue posteriormente fue dividido entre el área de la colonia para obtener el número de esporas/cm².

Determinación de viabilidad de esporas.

Las cepas a analizar se inocularon por punto las cepas a analizar en cajas petri con medio mínimo mas suplementos, las cuales se incubaron a 37 °C durante 6 días. Después del día 6 se se cosecharon las esporas agregando una solución de Tween 80 al 0.1% y raspando con una asa bacteriológica. La caja se lavo dos veces y la suspensión de esporas se coloco en un tubo falcón de 50 ml. Se concentraron las esporas centrifugando en una centrífuga clínica durante 10 minutos a velocidad media. Se elimino el sobrenadante, las esporas se resuspendieron en agua con un volumen conocido. Se determinó la cantidad de esporas/ml usando una cámara de Neubauer. Las suspensiones de esporas se almacenaron a 4 °C durante 12 días. Se realizaron las diluciones requeridas para plaquear entre 150-250 esporas por caja. Las esporas se plaquearon a los días indicados. El porcentaje de sobrevivencia se calculó considerando el día 0 como el 100% de viabilidad.

Actividad de catalasa en esporas y micelio tratado con H₂O₂ y paraquat

Se cosecharon esporas de colonias incubadas durante 6 días a 37°C. Con la suspensión de esporas obtenidas se inocularon 50 ml de medio mínimo

mas suplementos con una concentración de esporas de 9×10^5 esporas/ml. El micelio se creció durante 8 horas y se trató con 0.5mM de H_2O_2 ó 4mM de paraquat como se describe en Kawasaki y col (1997).

Se obtuvieron extractos de proteínas de conidios y de micelio tratado con H_2O_2 usando un buffer de extracción que contenía HEPES 20 mM, DTT 1 mM pH 7.2. Para determinar la actividad de catalasa se cargaron 80 μ g de proteína en un gel nativo de poliacrilamida. La actividad de catalasa se reveló en el gel por el método descrito por Harris y Hopkins (1976).

Crecimiento en diferentes fuentes de carbono y nitrógeno.

Para el crecimiento en diferentes fuentes de carbono, se preparó medio mínimo Käfer pero se sustituyó la fuente de carbono utilizando fructosa, galactosa, arabinosa, xilosa, sorbitol, glicerol o etanol a una concentración de 1% como fuentes de carbono. También se utilizaron como fuente de carbono treonina o acetato de sodio a una concentración de 100mM. Para el crecimiento en diferentes fuentes de nitrógeno se preparó medio mínimo Käfer sustituyendo la fuente de nitrógeno por urea 5mM, prolina 10mM, ácido úrico 0.1%, fenilalanina 10mM y tartrato de amonio 5mM. Las cajas se inocularon por punto o con micelio proveniente de una colonia crecida durante 5 días obtenido con ayuda de un saca-bocados.

Determinación del mRNA de *brlA*

Para determinar la cantidad de mRNA de *brlA* se utilizaron cultivos conidiantes. Para estos cultivo se obtuvo una suspensión de esporas, que fueron lavadas con agua. Se inocularon 50 ml de medio liquido mas suplementos con una concentración de 5×10^5 esporas/ml. Los cultivos se crecieron 18 hrs. en agitación a 37°C. Para inducir la conidiación se filtraron 50 ml de cultivo con un embudo y la ayuda de una bomba de vacío; el micelio se expuso al aire sobre papel filtro Whatman No. 1 de 10 cm. de diámetro. Los papeles filtro con el micelio adherido se colocaron sobre charolas con medio sólido mas suplementos. Se cubrieron las charolas con papel aluminio permitiendo que el aire circulara libremente. Se tomaron muestras de micelio a las 0, 6, 12 y 24 horas después de colocar el micelio sobre las charolas. El RNA se extrajo utilizando TRIzol (Invitrogen). Se cuantifico el RNA y se corrio

un gel desnaturizantes de agarosa con formaldehído con 15µg de RNA. Posteriormente se realizó la transferencia a una membrana de nitrocelulosa con soporte de nylon Hybond-N (Amersham). El RNA se fijo la membrana con luz UV y posteriormente se hibridó utilizando una sonda para *brlA* marcada con ³²P.

RESULTADOS Y DISCUSION

Parte I. Resultados Publicados

Vargas-Perez, I., Sanchez, O., Kawasaki, L., Georgellis, D., and Aguirre, J. (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.

Resumen

Entre los eucariontes, sólo los mohos mucilaginosos, los hongos y las plantas presentan sistemas de transducción de dos componentes (también conocidos como sistemas de relevo de fosfatos). En los hongos filamentosos, diferentes cinasas sensoras (HK) parecen utilizar una sola proteína de transferencia de fosfatos que contiene histidina (Hpt) para el relevo de la señal a dos proteínas reguladoras de la respuesta (RR). En *Aspergillus nidulans*, el RR SskA media la activación de la MAP cinasa SakA en respuesta al estrés osmótico y oxidativo, mientras que la función del RR SrrA era desconocida. Utilizamos un acercamiento genético para caracterizar el gen *srrA* como un nuevo miembro de la familia *skn7/prr1* y para analizar el papel de SrrA en el sistema de relevo de fosfatos formado por el RR SskA, la proteína Hpt YpdA y la cinasa sensora NikA.

Nuestros resultados muestran que mientras las mutantes que carecen de la proteína YpdA no son viables, las mutante que carecen de SskA ($\Delta sskA$), SrrA ($\Delta srrA$) o de ambos reguladores ($\Delta srrA \Delta sskA$) son viables y están diferencialmente afectadas en la respuesta al estrés osmótico y oxidativo. Ambos RRs se encuentran involucrados en la resistencia al estrés osmótico, pero una mutante $\Delta sskA$ es más sensible a este estrés y solo SrrA se requiere para la resistencia al H_2O_2 y la inducción de la catalasa B por H_2O_2 .

En contraste, ambos RR son requeridos para la sensibilidad a fungicidas, la resistencia al calcofluor, y la normal esporulación y viabilidad de las conidias. Los defectos en la esporulación de $\Delta srrA$ y $\Delta sskA$ están relacionados con la disminución del mRNA del gen *brlA*. En contraste, los defectos en la viabilidad de las esporas no correlaciona con la actividad de la catalasa específica de esporas CatA. Nuestros resultados soportan un modelo en el cual NikA actúa río arriba de SrrA y SskA para transmitir las señales de exposición a fungicidas, para regular la esporulación asexual y viabilidad de las esporas. En contraste, nuestros datos indican que NikA no se requiere para el estrés osmótico y oxidativo.

Estos resultados ponen de manifiesto diferencias importantes en la transmisión de señales de estrés entre hongos y define un sistema de relevo de fosfatos involucrado en estrés oxidativo y osmótico, mantenimiento de la pared celular, sensibilidad a fungicidas, reproducción asexual y viabilidad de las esporas.

Anidulans Srra 627AA	1	-----	MD	2
Aclavatus EAW06880.1 628AA	1	-----	ME	2
Cimmitis EAS36385.1 631AA	1	-----	ME	2
Nfischeri EAW16497.1 622AA	1	-----	ME	2
Scerevisiae AAB69734.1 622AA	1	MSFSTINSNVNKTGDSNNNTTENSSTADLLGMDLLQEPRLMNTMQPNNSDMLHNNKTNVQQPAGN	70	
Spombe BAB16722.1 539AA	1	-----	-----	1
<hr/>				
Anidulans Srra 627AA	3	GGQTTSAAPSGNSDFVRKLYKMLEDPSYAEIVRWGDDGDSFVVLCEKFTKILPKHFKHSNFASFVR	72	
Aclavatus EAW06880.1 628AA	3	GGQTTTAAPAGNSDFVRKLYKMLEDPSYAEIVRWGDDGDSFVVLCEKFTKILPKHFKHSNFASFVR	72	
Cimmitis EAS36385.1 631AA	3	NTQSGGGTS-TGNSSSDFVRKLYKMLEDPSYAEIVRWGDDGDSFVVLCEKFTKILPKHFKHSNFASFVR	71	
Nfischeri EAW16497.1 622AA	3	GGQTTNTAPAGNSDFVRKLYKMLEDPSYAEIVRWGDDGDSFVVLCEKFTKILPKHFKHSNFASFVR	72	
Scerevisiae AAB69734.1 622AA	71	TNISSANAGAKAPANEFVRKLFRIENNEYPDIVTWTENGKSFVVLDTGKFTTHILPNHFKHSNFASFVR	140	
Spombe BAB16722.1 539AA	1	-----MPSSNGSSDFVRKLFNMLEEPEYRHLKWSGDSFIVLDTNEFTTILPKHFKHSNFASFVR	63	
<hr/>				
Anidulans Srra 627AA	73	QLNKYDFHKVFNNEENGQSPYQNAWEFKHPEFRANSKESLDNIRKAPAPRKAQAQAHDDSVPTQQIDL	142	
Aclavatus EAW06880.1 628AA	73	QLNKYDFHKVFNNEENGQSPYQNAWEFKHPEFRANSKESLDNIRKAPAPRKAQAQAHDDSVPTQQIDL	142	
Cimmitis EAS36385.1 631AA	72	QLNKYDFHKVFNNEETGQSPYQNAWEFKHPEFRADNKDGLDNIIRKAPAPRKPPOSQAEDSIPTQQIDL	141	
Nfischeri EAW16497.1 622AA	73	QLNKYDFHKVFNNEENGQSPYQNAWEFKHPEFRANSKESLDNIRKAPAPRKAQAQAHDDSVPTQQIDL	142	
Scerevisiae AAB69734.1 622AA	141	QLNKYDFHKVKRSPEERQRCCKYGEQSWEFQHFPEFRVHYGKGLDNIKRRIPAQRKVLDES---QKALLHF	207	
Spombe BAB16722.1 539AA	64	QLNKYDFHKV--HEGAPFYEGEAWFRHDDFQLHKKLLDNIRKAPSKANLANEN---TAPVIE	127	
<hr/>				
Anidulans Srra 627AA	143	LNQOIVAQOQQIQHLSDRYQNLTVDHQLMLQELMRVQTVLNHENVIHQVNNYLLSVARQRDGRKAAA	212	
Aclavatus EAW06880.1 628AA	143	LNQOIVAQOQQIQHLSDRYQNLTVDHQLMLQELMRVQTVLNHENVIHQVNNYLLSVARQRDGRKAAA	212	
Cimmitis EAS36385.1 631AA	142	MNQQIVAQOQQIQHLSDRYQNLTVDHQLMLQELMRVQTVLNHENVIHQVNNYLLSVARQRDGRKAAA	208	
Nfischeri EAW16497.1 622AA	143	LNQOIVAQOQQIQHLSDRYQNLTVDHQLMLQELMRVQTVLNHENVIHQVNNYLLSVARQRDGRKAAA	212	
Scerevisiae AAB69734.1 622AA	208	NSGTPNPNPSGSLNNESTETELLENTSKDAFGNLRVRVVKLQKELDMSKMSYATKVELKLN----	272	
Spombe BAB16722.1 539AA	128	LKQVDSILDFQKLLDRNLGLATSQYITLLKMFELKRGIESRDLMSLISVLCDELGSTQRANPGAM	197	
<hr/>				
Anidulans Srra 627AA	213	QAQVGASPSQVTP-----MDDGVSTP-----LQAASKLLSDNNAEVOENLVPVSESGEPP-KTG-	265	
Aclavatus EAW06880.1 628AA	213	FPAQGGQSSNINFGQ-----ADDVSAEP-----LQHASKLLNNNAEIQENLAGLETGEPF-KAAQ	268	
Cimmitis EAS36385.1 631AA	209	AFQGGQGGSELSPAQAQAQNDPASP-----LQHAKLLSENNSDIQENLSLESMEGEMQNRLPG	268	
Nfischeri EAW16497.1 622AA	213	FQAQGGQSSNINFGQ-----VDDMPSSP-----LQHASKLLNNNAEVOENLQAGMESVGEPS-KSAP	268	
Scerevisiae AAB69734.1 622AA	272	-----SKYNTVIESLITKTKINENLNENP-----	297	
Spombe BAB16722.1 539AA	198	FVPSHPLQELINAYQALAKGQVATSPQIQIPNQIQASATASSKNTVITNLGTAQPSLYNTPSSDYEL	267	
<hr/>				
Anidulans Srra 627AA	266	VVSTPTMETAPRR-VAPOFAAAATNPA-LVYPKMNGEIPVYVVGATNGIDPMYGEHVVNYPYVPPK-	332	
Aclavatus EAW06880.1 628AA	269	VVPTTLEAAPRNGVVRPPTAAGANPANLVYPKMNGEIPVYVVGATNGIDPMYGEHVVNYPYVPPK-	337	
Cimmitis EAS36385.1 631AA	269	AVPTPPLDQTRNGTRPPTSTGPAASA-MAPPKLNGDLEQVYVVGATNGIDPMYGDHINSIPYMPFK-	337	
Nfischeri EAW16497.1 622AA	269	VVSTPALEAGPRNGVVRPPTAAGANPNLLYPKMNGEIPVYVVGATNGIDPMYGEHVVNYPYVPPK-	337	
Scerevisiae AAB69734.1 622AA	297	-----TLCSTLANNGEVEIFGDNGR-----NETENTPATTATIQSNLNNTNNSPAT-	346	
Spombe BAB16722.1 539AA	268	ANQEKPAISMASAASNTLSNDNSLNPHAGSYPMYKFPQIQHPNPSPTTHLSDNASMAKSFVSI	337	
<hr/>				
Anidulans Srra 627AA	333	QDMD-RRQFFENR---KSNHVDPGMRSFRILLVEDDATCRQIGGKFLYSFSCEIDTALDGLAENKV	398	
Aclavatus EAW06880.1 628AA	338	CEVDDARRPVFNKR---KSTNVDPGVRSPHILLVEDDATCRQIGGKFLYSFSCEVIDTAFDGLAENKI	404	
Cimmitis EAS36385.1 631AA	338	ADPSDPRRQFVDRKKTGSTYADPGVRSPHILLVEDDQTCRQIGGKFLYSFSCEVIDTAFDGLAENKI	407	
Nfischeri EAW16497.1 622AA	338	CEVDDTRRQVFNKR---KSTNVDPGVRSPHILLVEDDATCRQIGGKFLYSFSCEVIDTAFDGLAENKI	404	
Scerevisiae AAB69734.1 622AA	347	STVSLQLPNLQNSLTPNAQNNVTLRKGFVLLVEDDAVSIQCSKFLRKYGCTVQVVSVDGLSAINSTL	416	
Spombe BAB16722.1 539AA	338	NSLAKASSVATSMSQMGAVPTTGLKQFRILLVEDDELSPMTIKFITSEDCQVVDVVDGIGAVNKA	407	
<hr/>				
Anidulans Srra 627AA	399	QDGSKYDLILMDIIMPNDLGSACHLIRQFDR-TPIIAMTSNIRSDDIQLYFQHGMDVLPKPFTRKSL	467	
Aclavatus EAW06880.1 628AA	405	QDGSKYDLILMDIIMPNDLGSACHLIRQFDR-TPIIAMTSNIRSDDIQLYFQHGMDVLPKPFTRKSL	473	
Cimmitis EAS36385.1 631AA	408	QDGSKYDLILMDIIMPNDLGSACHLIRQFDR-TPIIAMTSNIRSDDIQLYFQHGMDVLPKPFTRKSL	476	
Nfischeri EAW16497.1 622AA	405	QDGSKYDLILMDIIMPNDLGSACHLIRQFDR-TPIIAMTSNIRSDDIQLYFQHGMDVLPKPFTRKSL	473	
Scerevisiae AAB69734.1 622AA	417	EKYR-YDLVMDIIMPNDLGAATSIIVRSFQNETPIIAMTGNIMQDLITYLQHGMDILAKPFRDLDL	485	
Spombe BAB16722.1 539AA	408	NAGG-FDLILMDIFLIPNDLGLSVTCLIRQYDHTPIILAITSNISMNDAVTYENHGVTDLVLPKPFTRKSL	476	
<hr/>				
Anidulans Srra 627AA	468	EMLEKRLVH-LKTVPPQREGHQATTPTVIAGQSSAAQSVTIKEDTSSSQSPAAMTAWQSENFQFQMAA	536	
Aclavatus EAW06880.1 628AA	474	DMLEKRLVH-LKAIPOGMESSQPTAAVTMAQTSATQS--KED-SSFGQSQAAMNNQSPGQFGMTT	539	
Cimmitis EAS36385.1 631AA	477	NNLEKRLVH-LKNIPTAIDATQSAPTAIP-ONSATQS--VKEE-TTPGQSPGTSIGNQSPAQFPFGVSP	541	
Nfischeri EAW16497.1 622AA	474	DMLEKRLVH-LKTIPOGMESSQPTAIVPMAQTSATHS--VKED-SSPGHSPATSMNNQSPGQFGGL--	537	
Scerevisiae AAB69734.1 622AA	486	SILIRYKDRIPLCEQQLPFRNSSPQTHNSNTNANSFNPTINEQSLAMLQPDNDFTTFTVTRG----	548	
Spombe BAB16722.1 539AA	477	QLLKKQLLN-LLQADNSINMSDVPSTKEAKDDKAPVTFFYLENDAPMYEQMLQDPPQADLQHPH----	539	
<hr/>				
Anidulans Srra 627AA	537	VPANLQQVQGVYVYVYVYVYVYVYVYVYVYVYVYVYVYVYVYVYVYVYVYVYVYVYVYVYVYVYV	605	
Aclavatus EAW06880.1 628AA	540	VHPNLQQVPTQYVYVYVYVYVYVYVYVYVYVYVYVYVYVYVYVYVYVYVYVYVYVYVYVYVYVYV	606	
Cimmitis EAS36385.1 631AA	542	INVSIPNQFMQQAG-APATPFTIDNGGIOYGNQMGSMNVAA--APRTPHRRQISESSAGADHLAK	608	
Nfischeri EAW16497.1 622AA	537	---LQQVQPVYVYVYVYVYVYVYVYVYVYVYVYVYVYVYVYVYVYVYVYVYVYVYVYVYVYVYV	600	
Scerevisiae AAB69734.1 622AA	548	--ASISSAQHVQQGQEQHQIFHQVQQQHHNAITANARSDVAIPNLEHEINTVPHSSMGSFTQLPQSTL	616	
Spombe BAB16722.1 539AA	539	-----	-----	539
<hr/>				
Anidulans Srra 627AA	606	RQRMYAPQSQ-PMVGSMPATRT	627	
Aclavatus EAW06880.1 628AA	607	RPRMYAHPQS-PMINPVPATRT	628	
Cimmitis EAS36385.1 631AA	609	RQRMFATPANNTVVNPMQTRMP	631	
Nfischeri EAW16497.1 622AA	601	RPRMYAHPQS-PMVNTAQATRT	622	
Scerevisiae AAB69734.1 622AA	617	QENQLS-----	622	
Spombe BAB16722.1 539AA	539	-----	-----	539

Figura 1S. El gen *srrA* codifica para regulador de la respuesta de la familia de Skn7/Prr1. La secuencia de aminoácidos predicha para SrrA se alineó con las proteínas hipotéticas de *Aspergillus clavatus*, *Coccidioides immitis*, *Neosartorya fischeri*, Skn7 de *S. cerevisiae* y Prr1 de *S. pombe*. Las secuencias están identificadas por el nombre de la especie, seguido del nombre de la proteína o el número de acceso del Gen Bank y el tamaño de la proteína. Las barras rojas y negras indican el dominio de unión a DNA y el dominio receptor, respectivamente. La estrella indica el residuo conservado de aspartato en el

dominio receptor. La secuencia subrayada en *SrrA* indica los aminoácidos eliminados en la mutante $\Delta srrA$.

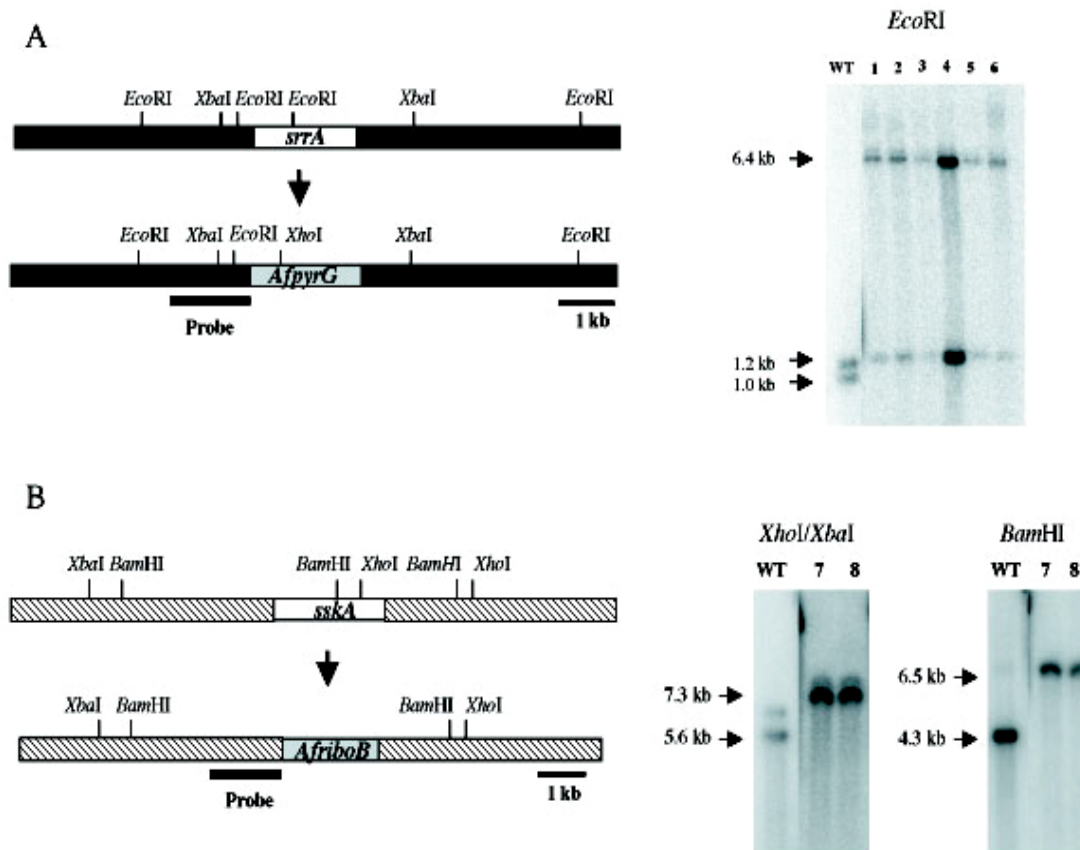


Figura 2S. Eliminación de los genes *srrA* y *sskA*. A). La construcción para la eliminación del gen *srrA* contiene el gen *AfpyrG* como marcador selectivo fue generada por “Double-Joint PCR” y usado para transformar las cepas 11035 y CFL3. Un evento de doble recombinación produce el reemplazo del marco de lectura del gen *srrA* por el gen del marcador selectivo *AfpyrG* (panel de la derecha). Para verificar la eliminación de *srrA*, el DNA de una cepa silvestre (WT) y de cepas transformantes PyrG^+ fue digerido con las enzimas de restricción *EcoRI* o *XhoI/XbaI* (no mostrada) y usado para el análisis de Southern Blot con la sonda indicada (panel de la derecha). Las transformantes que presentaron el evento de eliminación de *srrA* fueron seleccionadas. En patrón de restricción para la cepa WT corresponde de bandas de 1.0 y 1.2 kb, mientras que el patrón correspondiente a las cepas $\Delta srrA$ es de 1.2 y 6.4 kb B) La construcción para la eliminación de *sskA* contiene el gen *AfriboB* como marcador selectivo fue generado por “Double-Joint PCR” y usado para transformar las cepas 11035. Un evento de doble recombinación produce el reemplazo del marco de lectura *sskA* por el gen del marcador selectivo *AfriboB*. Para confirmar el evento de eliminación de *sskA*, el DNA de la cepa WT y de las transformantes Ribo^+ fue digerido con *XbaI/XhoI* y *BamHI* y usado para el análisis de Southern Blot con la sonda indicada (panel de la derecha). El DNA de la cepa WT digerido con *XbaI/XhoI* produce una banda de 5.6 kb mientras que el reemplazo con *AfriboB* resulta en una banda de 7.3 kb El patrón de digestión de la cepa silvestre con *BamHI* es de una banda de 4.3 kb, mientras el patrón de digestión correspondiente a las cepas $\Delta sskA$ es de 6.5 kb

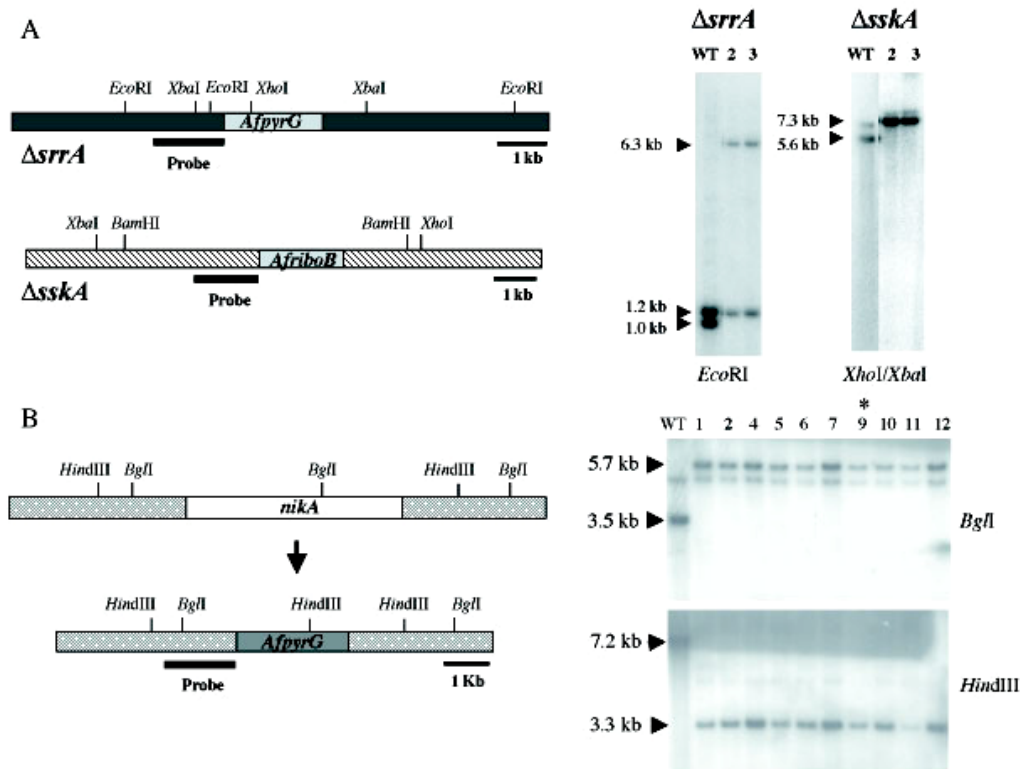


Figura 3S. Eliminación de los genes *srrA-sskA* y *nika*. A) Las construcciones *srrA-AfpyrG-srrA* y *sskA-AfriboB-sskA* fueron utilizadas para transformar simultáneamente la cepa 11035. Para confirmar ambos genes, el DNA de la cepa silvestre (WT) y de las transformantes *PyrG*⁺/*Ribo*⁺ fueron analizadas como en la figura 2S. B) La construcción para eliminar *nika* presenta el gen *AfpyrG* como marcador selectivo y fue generada por "Double Joint PCR" y usada para transformar la cepa 11035. Un evento de doble recombinación produce el reemplazo del gen *nika* por el gen del marcador selectivo *AfpyrG*. Para confirmar que *nika* fue eliminado, el DNA de la cepa WT y de las transformantes *PyrG*⁺ fue diferido con *BglII* y *HindIII* y se realizó el análisis de Southern Blot con la sonda indicada. El patrón de digestión con *BglII* esperado para la eliminación del gen *nika* es de dos bandas de los pesos moleculares indicados. El patrón de digestión con *HindIII* para la cepa WT es de una banda de 7.2 kb y para la cepa mutante es de una banda de 3.3 kb. La transformante 9 (asterisco) fue utilizada para experimentos posteriores.

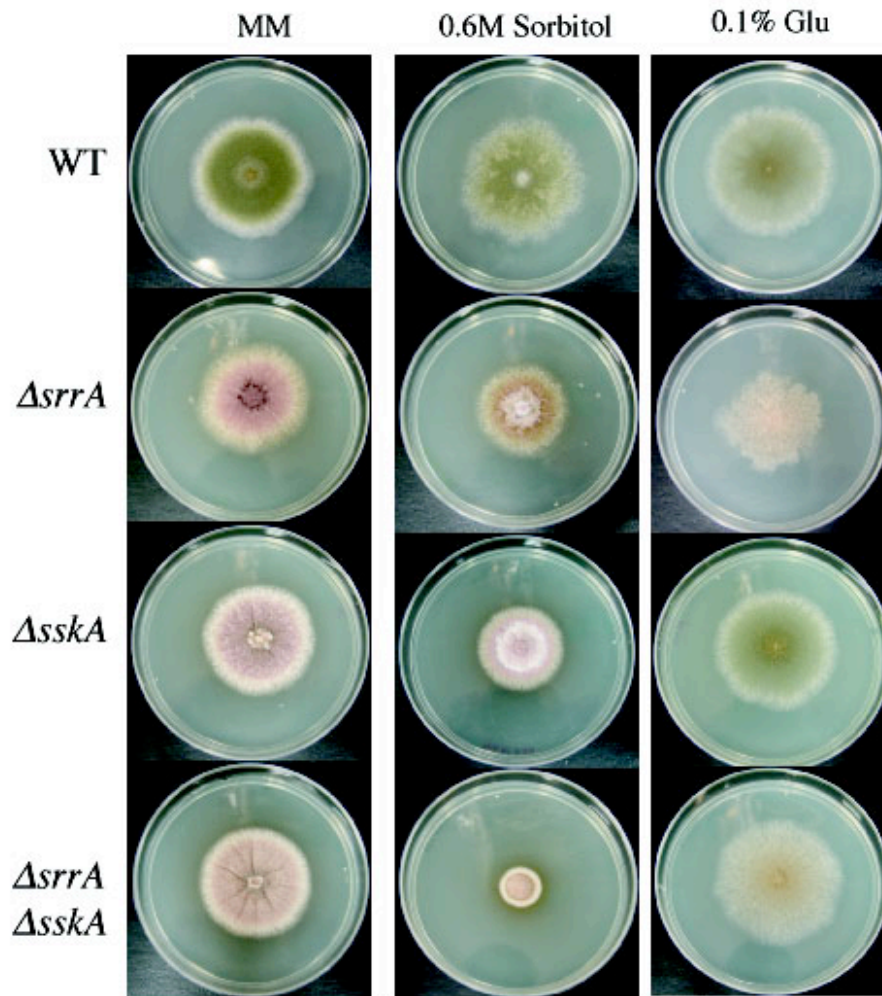


Figura 4S. Los defectos en la esporulación de las mutantes $\Delta srrA$ y $\Delta sskA$ son disminuidos bajo condiciones de crecimiento en alta osmolaridad y crecimiento en baja concentración de glucosa respectivamente. Las cepas 11035 (WT), T $\Delta srrA$ -pyrG7 ($\Delta srrA$), T $\Delta sskA$ -riboB8 ($\Delta sskA$) y T $\Delta srrA$ -pyrG/ $\Delta sskA$ -riboB8 ($\Delta srrA$ $\Delta sskA$) fueron inoculadas en punto en medio mínimo más suplementos con sorbitol 0.6M o medio mínimo con 0.1% de glucosa e incubadas a 37°C durante 6 días.

Parte II. Resultados sin publicar

El gen *srrB* codifica para una proteína ortóloga de Rim15

El análisis del genoma predice otras dos proteínas con dominio receptor, SrrB y SrrC. Se realizó el análisis de la secuencia del gen AN7572.2 (SrrB). Esta proteína tiene una identidad del 27% con la proteína Rim15 de *S. cerevisiae* (Fig. 7) (Bowdish *et al.*, 1995; Reinders *et al.*, 1998; Vidan and Mitchell, 1997). Sin embargo, al igual que en el caso de Rim15 de *S. cerevisiae*, SrrB no contiene el residuo de aspartato conservado en el dominio receptor, además presenta un dominio de cinasa de serina y treonina, el cual en Rim15 se encuentra interrumpido por una secuencia de 188 aminoácidos (Vidan and Mitchell, 1997). En Rim15 esta secuencia presenta un sitio de unión a proteínas 14-3-3 (Wanke *et al.*, 2005), sin embargo este sitio no está presente en SrrB, aunque se detectaron otros dos posibles sitios de unión a proteínas 14-3-3 (Fig. 7). La proteína Rim15 presenta en el extremo N-terminal un dominio PAS y un dominio de dedos de zinc (Wanke *et al.*, 2005), los cuales no parecen presentes en SrrB. Como se puede observar en el alineamiento, esta proteína se encuentra muy conservada en otros hongos, sin embargo, aunque aún no se ha descrito su función en hongos filamentosos.

Eliminación del gen *srrB*

Para determinar la función de SrrB, se eliminó la región codificante mediante la técnica de "Double Joint PCR" (Yu *et al.*, 2004), utilizando el gen *Afpyro* de *Aspergillus fumigatus* como marcador selectivo. Se utilizaron los tres productos de PCR 5'Rim15, 3'Rim15D y *pyroAf* como templados para obtener el producto de fusión que se utilizó para transformar *A. nidulans* mediante la técnica de fusión de protoplastos. Se usó la cepa 11035 y se seleccionaron transformantes protótrofos para piridoxina. Se obtuvieron 15 transformantes y se escogieron al azar nueve de ellas para analizarlas por hibridación tipo "Southern" y confirmar así el reemplazo del gen *srrB*. Se extrajo DNA genómico de las transformantes y se realizó una digestión con *Xba*I. Se utilizó como sonda el producto de PCR 5'Rim15 marcado con ³²P. La digestión con *Xba*I del DNA de la cepa silvestre (11035) generó un fragmento de 2.8 Kb en tanto que las transformantes en las que el gen *srrB* fue eliminado se obtuvo un

fragmento de 5.1 Kb (datos no mostrados). Esto confirmó que se eliminó aproximadamente el 80% del marco de lectura del gen *srrB*. Posteriormente se realizó la cruce de una de las mutantes obtenidas (T-1) con la cepa silvestre CLK43, para eliminar la mutación $\Delta nkuA$ y obtener la mutación $\Delta srrB$ en el mismo fondo genético que las mutantes de los otros reguladores de la respuesta. Se seleccionaron las mutantes de la cruce, por el fenotipo de menor crecimiento radial y por auxotrofia para ácido p-aminobenzóico (PABA). Se extrajo DNA de las mutantes seleccionadas y se realizó el análisis tipo "Southern" para confirmar la eliminación del gen *srrB*. Se extrajo DNA genómico de las cepas y se realizó una digestión con la enzima *EcoRI*. Se utilizó como sonda el producto de PCR 3'Rim15D marcado con ^{32}P . Como se muestra en la Fig. 8, la digestión con *EcoRI* del DNA de la cepa silvestre generó un fragmento de 5.8 Kb. En las cepas en donde se eliminó el gen *srrB* (C2, C4, C5, C6 y C7) se obtuvo un fragmento de 3.1 Kb de acuerdo con lo esperado para la eliminación del gen *srrB*. Como se muestra en la Fig. 8, se confirmó la eliminación del gen *srrB* en 3 de las cepas analizadas. Para la caracterización posterior, se trabajó con la cepa C2 en donde también se comprobó la ausencia de la mutación $\Delta nkuA$ mediante una reacción de PCR (dato no mostrado).

Afumigatus XP 755834.12058AA 1 MAGNGTSPAQFLAPPAVNTALRQEARGIDPKFPMPMTRSLSENREEREELKEAAEQTLNVIVDLDLDGRK 70
 Anidulans AN7572.2 2104AA 1 MAGNDAENVQYITPPAVNALRQEARSDVDPKLNLPTRTLSDTMRREERENLREAAEQTLNVIVDLDLDGRK 70
 Gmoniliformis AAR30133 1916 aa 1 MVS---PSGAI LAPPAVASLRQQT-----TAMERSLSQDIREEREELREAAEQTLNTIVDNLNDGTIK 61
 Nfischeri XP 001260964.1 2058A 1 MAGNGTSPAQFLAPPAVNTALRQEARGIDPKFPMPMTRSLSENREEREELKEAAEQTLNVIVDLDLDGRK 70
 Scerevisiae P43565 1770AA 1 MFNRSNTAGGSQAMKEGLGINKLSP-----ISSNSNPSLTSSNYEKYLQLATEKNPCMI LLELDGKVR 65

Afumigatus XP 755834.12058AA 71 WVSPSWRQVVGSCPESEIEGRMISDFLVD---NKTAFHDAIESMKEDDSRSRFRIRFSVRMGPESELKYSY 136
 Anidulans AN7572.2 2104AA 71 WVSPSWKQVVGDLDTIER-RLISDVLVD---NKSFAFLDAIESLKEDDSRSRFRIRFVSVGQLGDSVFKYAP 136
 Gmoniliformis AAR30133 1916 aa 62 WVSPSWTDVVGTFQFETVSG-LPISDLIVSD--NKNVFTVEVSMKKDDRSRHRVRFVAVNIGP-----LS 122
 Nfischeri XP 001260964.1 2058A 71 WVSPSWRQVVGTSPESEIEGRMISDFLVD---NKSFAFLDAIESMKEDDSRSRFRIRFVVRMGPESELKYSY 136
 Scerevisiae P43565 1770AA 66 YGSEFQNTITGVADDSGSSFTYADLILGSDQDKGVFQKATDMLMNDTSCITITKIKAAADYEGSAGCD 135

Afumigatus XP 755834.12058AA 137 EPRFVDTVTEE--SSEGSQPSKEVDN-CHDVLSMEGGQIMVFERTPDCTGHTMMMLRPFNQPREVTIDLP 203
 Anidulans AN7572.2 2104AA 137 APRFLKREQTDGADSAEESFSEMEEDGPAIINLEGGQIMVYDRTAEGVAHTMMMLRPFYKPREVTIDLP 206
 Gmoniliformis AAR30133 1916 aa 123 KLLPIDDLEND-----PENEQSH---AVDLEAQGIMVYDSVSGESHTMMMLRPFVIAPREIKIDLP 180
 Nfischeri XP 001260964.1 2058A 137 EPRFVDTVTEE--SSEGSQPSKEVDN-YHDVLSMGGQIMVFERTPDCTGHTMMMLRPFNQPREVTIDLP 203
 Scerevisiae P43565 1770AA 136 DESTITTELRAG---ILIRDGHTQLPSHTNIVVPEWNRSDIFYANMADQDMVYQLSNCDDIDIQLP 201

Afumigatus XP 755834.12058AA 204 PLLVSLGVGAEVLANYLTLTAEAAANEPDPSKYFAPNPVLCRICERQITPWWFEKHSDLCLQEHRAEMD 273
 Anidulans AN7572.2 2104AA 207 SSLVSLGVGAEVLANYLTVLAEAAANEPDQSKHFAPEVLCRICERQITPWWFEKHSDLCLQEHRAEMD 276
 Gmoniliformis AAR30133 1916 aa 181 NVIVDSLGSAGVLANYSYTLQAEGLDDPEQQEPPP--PVLCRICERQIPRWWFEKHTDCLQEHRAEMD 248
 Nfischeri XP 001260964.1 2058A 204 PLLVSLGVGAEVLANYLTLTAEAAANEPDPSKYFAPNPVLCRICERQITPWWFEKHSDLCLQEHRAEMD 273
 Scerevisiae P43565 1770AA 202 EEFAKTLGFGAKIFVQYIKRI RLEMIIDEFN--LFLPKMELCRVCENFVWNLLETHSQCCEHRTESL 269

Afumigatus XP 755834.12058AA 274 VQIAQENLNEHRHAIKVKVLDALAEARQSRPLAGETPSP--MPQPEYKGLAIGFSPAVSAPSSGNVSSSSA 341
 Anidulans AN7572.2 2104AA 277 VQIAQENLNEHRHAIKVKVLDALAEARQSRPLAGETPSP--MPQPEYKGLAIGFSPAVSAPSSGNVSSSSA 346
 Gmoniliformis AAR30133 1916 aa 249 VQMAQESLTHEHRSIVKVLDALEARKSRSLAG-DQTP--VPVAEYKGLPIGPPP-----STQSSP 305
 Nfischeri XP 001260964.1 2058A 274 VQIAQENLNEHRHAIKVKVLDALAEARQSRPLAGETPSP--MPQPEYKGLAIGFSPAVSAPSSGNVSSSSA 341
 Scerevisiae P43565 1770AA 270 IQLLHDLLEQQAIALNFTKDKSEYKGSIQVRSNNFLN---QVLDSRELQCADIDINFSEMPVDLYHS 335

Afumigatus XP 755834.12058AA 342 PCTPPRSREHSASDGGHARGSFVRRPLRTRIVELILDLCDTALEINMPVIKEPRGDSLCDPRTLSPQSE 411
 Anidulans AN7572.2 2104AA 347 PATPPRSRDQVSGSGHIRARSFAVRRPLARVVELILDLCDTALEINMPVLRSGDNGCEPRTMSPQSE 416
 Gmoniliformis AAR30133 1916 aa 306 GSSLPRSRERSG-GLGHTRRSFAIRRRQARIVELMLDCLDTAIEISTPAIKESSTQSGDPRFQSPQSE 374
 Nfischeri XP 001260964.1 2058A 342 PCTPPRSREHSASDGGHARGSFVRRPLRTRIVELILDLCDTALEINMPVIKEPRGDSLCDPRTLSPQSE 411
 Scerevisiae P43565 1770AA 336 LSTFQDNGNNNNNNNNNNN-----NNALLDQFPIQKDTVSLN--SYFQSPRTN 384

Afumigatus XP 755834.12058AA 412 SRISQVMQWQSPSSNTLEQQGLAALADTECVCKAKVDVIRHRRKIYEYAIRIRIEYTVWVEDCIAAL 481
 Anidulans AN7572.2 2104AA 417 SRISQVLQWQSPSSNTLEQQGLAALADTECVCKAKVDVIRHRRKIYEYAIRIRIEYTVWVEDCIAAL 486
 Gmoniliformis AAR30133 1916 aa 375 SRISQVLQWQSPSSNTLEQQGLAALADTECVCKAKVDVIRHRRKIYEYAIRIRIEYTVWVEDCIAAL 444
 Nfischeri XP 001260964.1 2058A 412 SRISQVMQWQSPSSNTLEQQGLAALADTECVCKAKVDVIRHRRKIYEYAIRIRIEYTVWVEDCIAAL 481
 Scerevisiae P43565 1770AA 385 HNIQNVTWQSRFFLNDQDPLGLLIIHDTLDLARKKVDVIRLDNAMTISLKIKNVNNYVQLIREQI 454

Afumigatus XP 755834.12058AA 482 SKAERIAAGQLSDSTCSSEDELPEPESVTAASSATANGS-----STAVWPPLSPQVTRQPTSTSAITMSM 546
 Anidulans AN7572.2 2104AA 487 RKAERIAAGQLSDSSS-SEDETPSEDTTSDPSASSAS-----ILVQAGHEP-----ELFPVSAITMSM 545
 Gmoniliformis AAR30133 1916 aa 445 RKAARIANGELDSTEEERLNSEYECQDTCDEGTGDDDIPEPLVSEPHQLLRQGESFTEPLSNFVLA 514
 Nfischeri XP 001260964.1 2058A 482 SKAERIAAGQLSDSTCSSEDELPEPESVTAASSATANGS-----STAVASPLSPQVTRQPTSTSAITMSM 546
 Scerevisiae P43565 1770AA 455 EINKHAILTHPNLRRSSIIFHSELPQIHSQQPEANLIY---SSSTPLQVHQDQASFEAMSKSHLEPIP 521

Afumigatus XP 755834.12058AA 547 RNTSERFQFPHT-EGRSSVAVSTGNSNPMCEPTPRSHRSTAGLLGTSQP----- 595
 Anidulans AN7572.2 2104AA 546 RNATDRFQSGHSSGKSSAAVSTGNSNPMCEPTPRSHKSVANLLGTSQP----- 595
 Gmoniliformis AAR30133 1916 aa 515 TALRQMNLSKNDKRSRPTIKARGFPMSQEGVVSPEASPMPLGSDPSSPATHSRHRHRRCSAAISDFVM 564
 Nfischeri XP 001260964.1 2058A 547 RNASERFQFPHT-EGRSSVAVSTGNSNPMCEPTPRSHRSTAGLLGTSQP----- 595
 Scerevisiae P43565 1770AA 522 FVPYSIEETPTANDIHPSPPLRSCNTVMKLETPPRKLDNSGLFSDAYLNADIIPNPSIESTISIDRDN 591

Afumigatus XP 755834.12058AA 595 --SRRGLSMVDLDAGEMSDS---SVLSSAFTG--AVRTESPASDR-----SLEKRRSLVLPGLSS 649
 Anidulans AN7572.2 2104AA 595 --SRRGLSMADIDSQSDS---SIVSSITG--AMRTDSHSDR-----SLEKRRSLVLPGLSS 649
 Gmoniliformis AAR30133 1916 aa 564 --DTRRDSVYLGDFLDSGG---FRSSSVASRNAPTESHISEFGDLRRAASRRRHRSLI LPGLSS 628
 Nfischeri XP 001260964.1 2058A 595 --SRRGLSMVDLDAGEMSDS---SVLSSAFTG--AVRTESPASDR-----SLEKRRSLVLPGLSS 649
 Scerevisiae P43565 1770AA 592 NTSRSGSMVKDYGIEATDRTSNTSERPSSSRRLGIRSRITPRKIEYSHVDNDRNEMLNDRDKDSL 661

Afumigatus XP 755834.12058AA 650 SPRRQPSPARMTTHSPLRMPVRLSSGAESLPSFIVS---PSTHASELAHYHRHRRRCSATSSDATK 716
 Anidulans AN7572.2 2104AA 650 SPRRQHSAPRVSGPHSLRMPVRLSSGAESLPSFIVS---PSSNLGELALHHRHRRRCSSTTSDDLPR 716
 Gmoniliformis AAR30133 1916 aa 628 -PHRQPSPARMPSPLR IKARGFPMSQEGVVSPEASPMPLGSDPSSPATHSRHRHRRCSAAISDFVM 697
 Nfischeri XP 001260964.1 2058A 650 SPRRQPSPARMPSPLRMPVRLSSGAESLPSFIVS---PSTHASELAHYHRHRRRCSATSSDVTK 716
 Scerevisiae P43565 1770AA 662 QPQPSVDTTITSTOATTTGTATNSNNTSNVLPRLMNTSISLTPRRGSPFNGLASHSQCNPSFKLHD 731

Afumigatus XP 755834.12058AA 716 -PFVSPHLTS-----ASQPQPRFAPPSPKDFEIIKPI 748
 Anidulans AN7572.2 2104AA 716 -PFVSPHLIT-----ASQPQPRFAPPSPKDFEIIKPI 748
 Gmoniliformis AAR30133 1916 aa 698 KPPSPRPLGAN-----QAPPQPRFAPPSPKDFEIIKPI 731
 Nfischeri XP 001260964.1 2058A 716 -PFVSPHLTS-----ASQPQPRFAPPSPKDFEIIKPI 748
 Scerevisiae P43565 1770AA 732 KSPISSPFIFSKDFLTPQHPGNIARTDSINNAMLTSPNMLPLLLATNQTQVKSPTPSIKDYILKPI 801

Afumigatus XP 755834.12058AA 749 KGAFSGVYLSKSKSTGEYFAI VLKKADMVAKNOVTNVKAERAIMMWSGESDFVAKLYWTFSSKDYLYLV 818
 Anidulans AN7572.2 2104AA 749 KGAFSGVYLSKSKKTGEYFAI VLKKADMVAKNOVTNVKAERAIMMWSGESDFVAKLYWTFSSKDYLYLV 818
 Gmoniliformis AAR30133 1916 aa 732 KGAFSGVYLSKSKSTGEYFAI VLKKADMVAKNOVTNVKAERAIMMWSGESDFVAKLYWTFSSKDYLYLV 801
 Nfischeri XP 001260964.1 2058A 749 KGAFSGVYLSKSKSTGEYFAI VLKKADMVAKNOVTNVKAERAIMMWSGESDFVAKLYWTFSSKDYLYLV 818
 Scerevisiae P43565 1770AA 802 KGAYGSVYLARKKLEGDYFAI VLKRSMDIAKNOVTNVKSERAIMMWSGDKPYVARLPASQNKDNLFLV 871

Afumigatus XP 755834.12058AA 819 MEYLNAGDCASLVKVLGGLPEWAKKYIAEVVLGVEHLHRSRGIHVRDLKPDNLLIDQKGLKLTDFGLSR 888
 Anidulans AN7572.2 2104AA 819 MEYLNAGDCASLVKVLGGLPEWTKKYIAEVVLGVEHLHRSRGIHVRDLKPDNLLIDQKGLKLTDFGLSR 888
 Gmoniliformis AAR30133 1916 aa 802 MEYLNAGDCASLVKVLGGLPEWAKKYIIEVVLGVEHLHRSRGIHVRDLKPDNLLIDQKGLKLTDFGLSR 871
 Nfischeri XP 001260964.1 2058A 819 MEYLNAGDCASLVKVLGGLPEWAKKYIAEVVLGVEHLHRSRGIHVRDLKPDNLLIDQKGLKLTDFGLSR 888
 Scerevisiae P43565 1770AA 872 MEYLPGGDLATLIKMMGYLPDQWAKQYLETIVGVNDMHONGIHHDLKPENLIDNAGHVKLTDFGLSR 941

Afumigatus XP_755834.12058AA 889 MGLVGRQKRVLSKSL-----EPAPDLKQGFPPRATSIASSRSASFDFQ-APGSPGSGTFLMTDPL 947
Anidulans AN7572.2 2104AA 889 MGLVGRQKRVLSKSL-----EQSGDILKQGSFPPRATSIASSRSASFDFQ-GSGSPGSGTFLMTDPL 947
Gmoniliformis AAR30133 1916 aa 872 LGLVGRQKRALNSNS-----DGTDDLKQGFPPRATSIASSRSASLDLHGHTHSFGTQPTQMTPEV 932
Nfischeri XP_001260964.1 2058A 889 MGLVGRQKRVLSKSL-----EPAPDLKQGFPPRATSIASSRSASFDFQ-APGSPGSGTFLMTDPL 947
Scerevisiae P43565 1770AA 942 AGLIRHKKFVPHKSLISSTSLPIDNPANNFTMNNNSNHSQLSLTPDSFTS DKKYQNRKSKSLGQQYVH 1011

Afumigatus XP_755834.12058AA 948 SGLNOPSYSFNSQGLSRQPSRRASG-YRSDSGGSE-----NLSAMFRNFSILTEGNETASLPPSSLP 1010
Anidulans AN7572.2 2104AA 948 AGSMPQPSYFNLSQGLSRQPSRRASG-YRSDSGGSE-----NLNAIFRTLSLNEG-ETPGAMP---IF 1006
Gmoniliformis AAR30133 1916 aa 933 G-SLAQPSYSFNSG-----QETRRVSGTHRSDSGGSE-----TLARMVTNFSLHDAEIASQNS----- 984
Nfischeri XP_001260964.1 2058A 948 SGLNOPSYSFNSQGLSRQPSRRASG-YRSDSGGSE-----NLSAIFRNFSILTEGNETASLPPSSLP 1010
Scerevisiae P43565 1770AA 1012 SEYSSTSNSHSTPFPSTNTVYVYPPYYRGRKDRSHGSSNIDLPAISLRSESQLSFLSLDITRSSTPLANE 1081

Afumigatus XP_755834.12058AA 1011 VPVPSSSNVAESESQSEAGESPRLYLPQPTLSNSVPLSTPPQSSMMPPL--MALFDPED--HNRRFVGT 1076
Anidulans AN7572.2 2104AA 1007 PPPPSDS-AHESEGGSEPAESPYLQPLQPTHSN-VSTGTPPQOTMMPPL--MALFDPED--HNRRFVGT 1070
Gmoniliformis AAR30133 1916 aa 985 VRSFLDEEAVAGSPDLPMSVSRMSNDSHVRNSLPLSN----MMFPF--MALFNPED--TNRRFVGT 1045
Nfischeri XP_001260964.1 2058A 1011 VPVPSSSNVAESESQSEAGESPRLYLPQPTLSNSVPLSTPPQSSMMPPL--MALFDPED--HNRRFVGT 1076
Scerevisiae P43565 1770AA 1082 TNSNANNIMRRKSLTENKSFNDLSSDAIAATNTNINNSNNISLSEAPSDLALFYPDDSKONKFFGT 1151

Afumigatus XP_755834.12058AA 1077 DYLAPEATINGLQGD-EMSDWWSLGCIMFEFLFGYPPFNAAPTDFEVFENILHQRINWPH----EAE-ELAS 1140
Anidulans AN7572.2 2104AA 1071 DYLAPEATINGLQGD-EMSDWWSLGCIMFEFLFGYPPFNAAPTDFEVFENILHRRINWPG----EVE-ELAS 1134
Gmoniliformis AAR30133 1916 aa 1046 DYLAPEATINGLQGD-EMSDWWSVGCILFEFLYGIFFHAGEAEVFNILARRKIQWPD----ENECPT 1110
Nfischeri XP_001260964.1 2058A 1077 DYLAPEATINGLQGD-EMSDWWSLGCIMFEFLFGYPPFNAAPTDFEVFENILHRRINWPH----EAE-ELAS 1140
Scerevisiae P43565 1770AA 1152 DYLAPEATINGLQGD-EMSDWWSVGCIFFEFLFGYPPFNAAPTDFEVFENILHRRINWPH----EAE-ELAS 1221

Afumigatus XP_755834.12058AA 1141 QEAIDLMKRLMTPRERIGANVGDKFPNGGAEIRSHWPFS DINWETLLEDKAQFVFNLENPEDTEYFDA 1210
Anidulans AN7572.2 2104AA 1135 PEADIDMKNLMAINPERIGANLEEKYFNGGAEIRSHWPFDIHWDTLLEDKAQFVFNLENPEDTEYFDA 1204
Gmoniliformis AAR30133 1916 aa 1111 EAKDLINKLLCMEPQRIGLGRDQKFASSGGAEIRHHPWFQDVNWTLLEDKAQFVFPQENPEDTEYFDA 1180
Nfischeri XP_001260964.1 2058A 1141 QEAIDLMKRLMTPRERIGANVDDKFPNGGAEIRSHWPFS DINWETLLEDKAQFVFNLENPEDTEYFDA 1210
Scerevisiae P43565 1770AA 1222 PEAKDLIEKLLVDEPAKRLG-----AKGIOEKDHPYFKNVWDHVVDEEASVPTICNPDTEYFDL 1284

Afumigatus XP_755834.12058AA 1211 RGATLQPAFAEELEGISQHVNT---AADRPHDALFKVRSQVNSMKRPLMPLHIPPVHRCSSRRRSEPA 1276
Anidulans AN7572.2 2104AA 1205 RGATLQPAFAEEDESSPQAPVTG---SYIDRPHDALFKVRSQVNSMKRPLMPLHIPPVHREPRSSRSEPS 1272
Gmoniliformis AAR30133 1916 aa 1181 RGAVLQSFPAEEMDQASPOSSAAGSEYAEARPHDALSRVRSQVNSINRKLMPHIPPVHRCSSRRRSEFV 1250
Nfischeri XP_001260964.1 2058A 1211 RGATLQPAFAEELEGISQHVNT---AADRPHDALFKVRSQVNSMKRPLMPLHIPPVHRCSSRRRSEPA 1276
Scerevisiae P43565 1770AA 1285 RKAELQDGGDDIENDNANILFGKHGINTVSELSAANLSPPLNHNKILSRKLSMNTNRRSSNNSSEPS-- 1352

Afumigatus XP_755834.12058AA 1277 LADDFGSSFSFKNLPLEKANKDVIQKLRQEAALQAQQRQYSSSIPQAIPTQGS-----AATSGFLE-- 1338
Anidulans AN7572.2 2104AA 1273 LADDFGNFAFKNLPLEKANKDVIQKLRQEAALQAQQRQSSNAGTQQQPOTQQTQATGTPPSGFLD-- 1340
Gmoniliformis AAR30133 1916 aa 1251 AMDDFGSSFSFKNLPLEKANKDVIQKLRQEAALQAQQRQYSSSIPQAIPTQGS-----PGSLE-- 1307
Nfischeri XP_001260964.1 2058A 1277 LADDFGSSFSFKNLPLEKANKDVIQKLRQEAALQAQQRQYSSSIPQAIPTQGS-----AATSGFLE-- 1338
Scerevisiae P43565 1770AA 1352 -VHDFGAHTFPVKNLSIASVLESVPGTYITPNGTGTTTSAKNSPNLKNLSLAIPPHMRDRSSKLNDS 1421

Afumigatus XP_755834.12058AA 1339 GSP-LPMPLQRTLSHNKGNRRSPSSLSQANSSPSRPQPSPLLQVQFSTGNHERRKTSGSSS-TNSH 1406
Anidulans AN7572.2 2104AA 1341 GSP-LPMSLQRTLQSKGNRRPASPSLSQANSSPSRPQPSPLLQVQFSTGNHERRKTSGSSSTTASH 1409
Gmoniliformis AAR30133 1916 aa 1308 GSPVLSNPVRTIISNAKATNRAQSPSPGGHTSASPNRAQPSPLLQVQFSTGNHERRKTSGSSSLSH 1377
Nfischeri XP_001260964.1 2058A 1339 GSP-LPMPLQRTLSHNKGNRRSPSSLSQANSSPSRPQPSPLLQVQFSTGNHERRKTSGSSS-TNSH 1406
Scerevisiae P43565 1770AA 1422 QTEFGSFPVRLNLSALDKANKDAINRLKSEHFEQGVHRRITSSALMGSSSDGSVSTPGSNANTSSGGK 1491

Afumigatus XP_755834.12058AA 1407 QS-SGFATGSDQGRMAN-IKLGS---SASSPIKIGRGG----THSPDKTPSG-HRQEIFPTTRARSO 1465
Anidulans AN7572.2 2104AA 1410 QS-SGSPQASADOT-RVANSNKFGS---ASSSPIKPNRVG----THSPDKSGPGRHRCAPSTRTRSO 1470
Gmoniliformis AAR30133 1916 aa 1378 QSTAAFLQPGSAFEPKVPVPSLQKAAATTVASPSVQSSRSAPPLSLSPQKTIPTPROSSSAGRSLSL 1447
Nfischeri XP_001260964.1 2058A 1407 QS-SGFATGSDQGRMAN-IKLGS---SASSPIKIGRGG----THSPDKTPSG-HRQEIFPTTRARSO 1465
Scerevisiae P43565 1770AA 1492 LKIHKPTISGSPSTFGTFFKTLFRSDS-FSTRYSYPERSISIDSSLRKRKGIIGDNQQTANSSDSPM 1560

Afumigatus XP_755834.12058AA 1466 TIGSQDGEFSSSLAKESYVAGHYKRRSQFLDISPSS--SDNEDPRTKALLKQVRRRQSSRRLSQINILDG 1533
Anidulans AN7572.2 2104AA 1471 TIGSQDGEFSSSLARETYVPGHKKRSQFLDVSFSS--SDNEDPRAKALLKQVRRRQSSRRLSQINFADG 1538
Gmoniliformis AAR30133 1916 aa 1448 TVGSSQSQ--DGSFVADSIHMHHRNRRSQVFDMSFSS--SDNEGERKHNALLRQVRRRQSSRRLSQINFADG 1513
Nfischeri XP_001260964.1 2058A 1466 TIGSQDGEFSSSLAKESYVAGHYKRRSQFLDISPSS--SDNEDPRTKALLKQVRRRQSSRRLSQINILDG 1533
Scerevisiae P43565 1770AA 1561 TKFKSPLSPANTTIVSSYFSRQVRLSKFSQRTNSDLAEESDRLQAIISRVNSLR-NRRRGGKSSSTS 1629

Afumigatus XP_755834.12058AA 1534 FFFRPLDVLICEDHVPVSRMVMERLFEKLCRCRTITAVNGAEMRYALSEVQFDIIMTEFKLPQVNGADLAR 1603
Anidulans AN7572.2 2104AA 1539 FFFRPLDVLICEDHVPVSRMVMERLFEKLCRCRTITAVNGAEMRYALSEVQFDIIMTEFKLPQVNGADVAR 1608
Gmoniliformis AAR30133 1916 aa 1514 PTFRPLDVLICEDHVPVSRMVMERLFEKLCRCRTIVSPNGSEAVRYSMSSEIKFIVTFLVYQLPQVNGADVAR 1583
Nfischeri XP_001260964.1 2058A 1534 FFFRPLDVLICEDHVPVSRMVMERLFEKLCRCRTITAVNGAEMRYALSEVQFDIIMTEFKLPQVNGADLAR 1603
Scerevisiae P43565 1770AA 1630 EIGYHMDVLCVCEPIRHRVRYTKDLENLCTVVSVGAGDELVSRAATGVSFDLINTALKLPKLGAIIDIVQ 1699

Afumigatus XP_755834.12058AA 1604 MVRETRSANRHTPIIAVYGYLKDLPETHHFDALIQKPTLTKLTKLCKFCQWKPPPKDYSPSQFFAGQ 1673
Anidulans AN7572.2 2104AA 1609 MVRETRSANRHTPIIAVYSYLKDLPEETHHFDALIEKPTLTKLTKLCKFCQWKPPPKDYSPSQFFAGQ 1678
Gmoniliformis AAR30133 1916 aa 1584 MIRETKNANSRHTPIIAVYKELQAPHYFDSLIEKPTLTKLTKLCKFCQWKPPPKDYSPSQFFAGQ 1653
Nfischeri XP_001260964.1 2058A 1604 MVRETRSANRHTPIIAVYGYLKDLPETHHFDALIQKPTLTKLTKLCKFCQWKPPPKDYSPSQFFAGQ 1673
Scerevisiae P43565 1770AA 1700 LLKQITNGANSTPIVAITNYFQEAATSRVDDVLEKPVKLDLKKLVAKYALKKSEQDEEHTLILSDSDET 1769

Afumigatus XP_755834.12058AA 1674 STRLHAALAANAQDQSPSTTSPGFVAVPSSSYRGSREDSIGSSYFGDMSIKAEHPLLVSR-PKDEW 1742
Anidulans AN7572.2 2104AA 1679 P-----PTQSDHSPSTTSSGFALVPSSSYRGSREESVSGSSYFGDMSIKAEHPLLVSR-PKDEW 1740
Gmoniliformis AAR30133 1916 aa 1654 G-----IRKANRLEDSPTSGSSIFASRLGNAMSSREDSITSSLFGDSESVTDELVVVSRKPTNED 1718
Nfischeri XP_001260964.1 2058A 1674 SALRHAALAANAQDQSPSTTSSGFVAVPSSSYRGSREDSIGSSYFGDMSIKAEHPLLVSR-PKDEW 1742
Scerevisiae P43565 1770AA 1770 H----- 1770

Afumigatus XP_755834.12058AA 1743 SSHPEGLGSDSSTP-KSSTDSSEYSSNAVFPFHLLHAASAPAAEPSPGKAKPRKQSSSESIKAKRQSL 1811
Anidulans AN7572.2 2104AA 1741 QG-TGGLGSEDSTSGGGSADNRAQNSTVFPFGLPHAAHSPALSPSGMITPRKQSSSESIKAKRQSL 1809
Gmoniliformis AAR30133 1916 aa 1719 EG---GLNITDNDASDPLRKG-----VPSLVAQSSAPAQMEHR-----PRNDKLRGRREP 1768
Nfischeri XP_001260964.1 2058A 1743 SSQPEGLGSDSSTP-KSATDSSEYSSNAVFPFHLLHAASAPAAEPSPGKAKPRKQSSSESIKAKRQSL 1811

<i>Afumigatus</i> XP_755834.1.2058AA	1812	EKKRYECAESG	DEDEELGNAPVRT	PSSRS	----	RS	HRPVSKLGVEMMRTNS	RGSVVSGSE	ELLRKERE	1876					
<i>Anidulans</i> AN7572.2 2104AA	1810	ERKRYECAESG	DEDEELGNLPSRTQ	SPRN	----	RASR	PGSKLGIEMMRTNS	RGSVISTSE	DALKKDK	1874					
<i>Gmoniliformis</i> AAR30133 1916 aa	1769	EHR	LEGTESADDEDEELG	SGREKHHGRNS	QQILSKAGL	PS	SKLGIEMMRANS	HD	SLTVGSE	----STPE	1834				
<i>Nfischeri</i> XP_001260964.1 2058A	1812	EKKRYECAESG	DEDEELGNAPVRT	PSSRS	----	RS	HRPVSKLGVEMMRTNS	RGSVVSGSE	ELLRKERE	1876					
<i>Scerevisiae</i> P43565 1770AA	1770	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	1770					
<i>Afumigatus</i> XP_755834.1.2058AA	1877	ALEK	GKNGE	SENAIESG	EPTSSSPSTCDVEDR	FDGLQ	ISHNT	IEERPDEEIS	PGHSPLPHGTDL	DSTPS	1946				
<i>Anidulans</i> AN7572.2 2104AA	1875	AGERS	SRSGS	DDADEHARDK	IRSGRS	--SLES	KFEDLNI	PEEAILPSIEDDL	SPRNSPSP	--LALASRA	1940				
<i>Gmoniliformis</i> AAR30133 1916 aa	1835	AVTQ	VVTT	PKEMETG	-----	-----	VLDGEV	VAEPTART	PP	-----	1866				
<i>Nfischeri</i> XP_001260964.1 2058A	1877	ALER	GKNGE	SENAIESG	EPTSSSPSTCDVEDR	FDRLQ	IYDNT	IEERPEEIS	PGHSPLPQGTDL	GSTPS	1946				
<i>Scerevisiae</i> P43565 1770AA	1770	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	1770					
<i>Afumigatus</i> XP_755834.1.2058AA	1947	AATRP	QQLSCSQH	DRRITE	IYGGTASQSPA	AKSSTETL	KKG	QVTPPI	IVSK	DEPGASAMILNT	SPRMS	2016			
<i>Anidulans</i> AN7572.2 2104AA	1941	LLT	SDTKPPCS	--RYIT	KIHKRADS	----	TASLES	PKRGQITP	PVVFP	SQSNPSEAYP	STPP	IVFDG	2002		
<i>Gmoniliformis</i> AAR30133 1916 aa	1866	-----	-----	-----	-----	-----	DAGL	KAEGVTP	----	NKEK	GDGTDSDAT	PRPLTVVK	1898		
<i>Nfischeri</i> XP_001260964.1 2058A	1947	AATRP	KRPPCSQH	DRGITE	IYRGTASQSSA	AKSSTETL	KKG	QVTPPI	IVSK	DEPSASAMILNT	SPRMS	2016			
<i>Scerevisiae</i> P43565 1770AA	1770	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	1770			
<i>Afumigatus</i> XP_755834.1.2058AA	2017	KDNL	GTDADDY	NRTT	SE	ATPRP	RHTP	SPNLDHDHT	PRP	SER	-----	2058			
<i>Anidulans</i> AN7572.2 2104AA	2003	PAD	SGPYQSL	TP	IP	DS	DATPRP	MHTPCPN	PDTEK	TPRPGRL	STWHWFQSR	KKPPQNL	LQDCC	IYMLASP	2072
<i>Gmoniliformis</i> AAR30133 1916 aa	1899	GDD	DC	-----	-----	-----	GND	GEATPR	TEK	-----	-----	-----	-----	1916	
<i>Nfischeri</i> XP_001260964.1 2058A	2017	KDNL	GTDVDY	DRTA	SE	ATPRP	RHTP	SPNLDLDHT	PRP	SER	-----	-----	-----	2058	
<i>Scerevisiae</i> P43565 1770AA	1770	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	1770	
<i>Afumigatus</i> XP_755834.1.2058AA	2058	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	2058	
<i>Anidulans</i> AN7572.2 2104AA	2073	MQC	ILTGT	ITYTVADAG	KERC	FPRLSAR	VRARE	-----	-----	-----	-----	-----	-----	2104	
<i>Gmoniliformis</i> AAR30133 1916 aa	1916	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	1916	
<i>Nfischeri</i> XP_001260964.1 2058A	2058	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	2058	
<i>Scerevisiae</i> P43565 1770AA	1770	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	1770	

Figura 7. El gen AN7572.2 (*srrB*) codifica para una proteína que presenta un dominio receptor característico de los reguladores de la respuesta. La secuencia de aminoácidos predicha para el gen AN7572.2 se alineó con proteínas hipotéticas de *Aspergillus fumigatus*, *Giberrella moniliformis*, *Neosartorya fischeri* y Rim15 de *S. cerevisiae*. Las secuencias están identificadas por el nombre de la especie seguidas del número de acceso de GenBank y el tamaño de la proteína. La línea negra punteada, indica el dominio PAS según Cameroni y col (2004). El cuadro azul indica el dominio de dedos de zinc presente en la proteína Rim15. El cuadro anaranjado indica el residuo de treonina importante para la interacción de Rim15 con proteínas 14-3-3. Los cuadros negros indican residuos predichos en la secuencia de la proteína de *A. nidulans* para la interacción con proteínas 14-3-3. (<http://scansite.mit.edu>) La barra roja indica el dominio receptor en tanto que la barra azul indica el dominio de cinasa de serina y treonina. El asterisco (*) indica el sitio donde debería encontrarse el aspartato conservado en el dominio receptor. **K** corresponde al residuo de lisina en el subdominio II de la cinasa, el cual es esencial para la unión de ATP. **D** corresponde al residuo de aspartato que se piensa es la base del sitio catalítico donde se lleva a cabo la reacción de transferencia del fosfato. Ambos residuos son necesarios para la función de Rim15 de *S. cerevisiae* (Vidan and Mitchell, 1997).

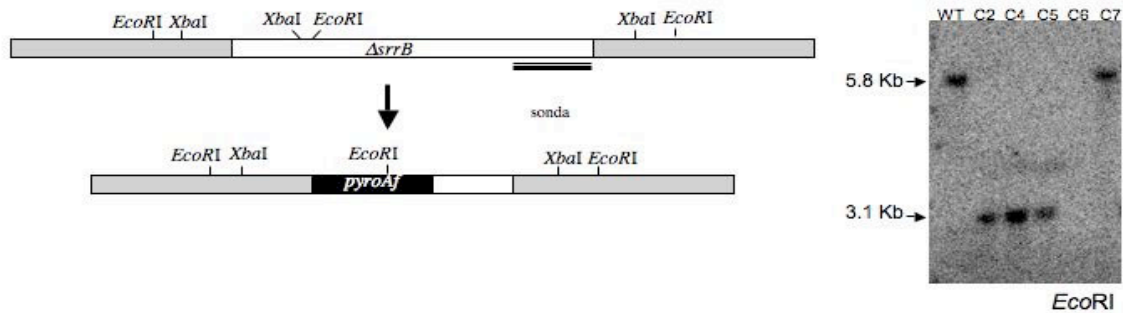


Figura 8. Eliminación del gen *srrB*. La construcción para eliminar *srrB* contiene el gen *Afpyro* como marcador selectivo y fue generada por “Double-joint PCR” y utilizada para transformar la cepa 11035. Un evento de doble recombinación produce el reemplazo del 80% del marco de lectura del gen *srrB* por el gen del marcador selectivo *pyroAf* (panel de la derecha). Para confirmar la eliminación del gen *srrB* se digirió el DNA de la cepa silvestre y de las cepas seleccionadas con la enzima de restricción *EcoRI* y se hibridó con la sonda indicada en el esquema.

Eliminación del dominio receptor de la proteína SrrB .

Para determinar si el dominio receptor (RD), que abarca del aminoácido 1543 al 1740, está involucrado en la transmisión de señales de estrés, se eliminó la región que codifica para el RD del gen *srrB*. Con esta construcción se eliminó el extremo C-terminal de SrrB a partir del residuo 1478. Se utilizaron los tres productos de PCR 5'Rim15D, 3'Rim15D y *pyroAf* como templados para obtener el producto de fusión que se utilizó para transformar *A. nidulans* mediante la técnica de fusión de protoplastos. Se usó la cepa 11035 y seleccionaron transformantes protótrofos para piridoxina. Se obtuvieron 10 transformantes (*srrB* Δ RD) de las que se escogieron al azar nueve para analizarlas por hibridación tipo “Southern” y así para confirmar la eliminación de la región que codifica para el dominio receptor del gen *srrB* (datos no mostrados). Para obtener la mutante *srrB* Δ RD en un fondo genético similar al resto de las mutantes de los reguladores de la respuesta SrrA y SskA, se realizó una cruce con una cepa silvestre (CLK43) y se seleccionaron de la progenie, cepas que fueran auxótrofas para PABA. Las cepas obtenidas se analizaron por hibridación tipo “Southern” para confirmar la eliminación del RD (Fig. 9). Se extrajo DNA genómico

de las cepas y se realizó una digestión con la enzima *EcoRI*. Se utilizó como sonda el producto de PCR 3'Rim15D marcado con ^{32}P . Como se muestra en la Fig. 9, la digestión con *EcoRI* del DNA de la cepa silvestre (WT) genera un fragmento de 6.0 Kb. En las cepas donde se eliminó la región que codifica para el RD del *srrB* se espera un fragmento de 2.7 Kb, el cual se obtuvo en seis de las doce cepas analizadas (Fig. 9). Para experimentos posteriores se utilizó la cepa 4.

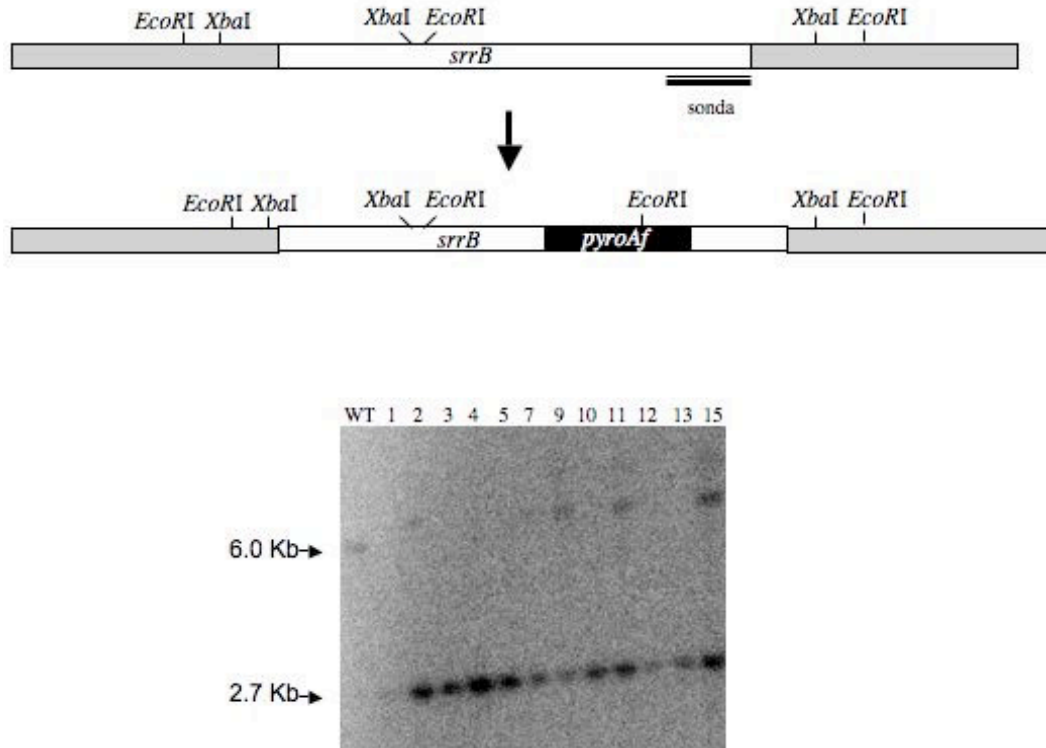


Figura 9. Eliminación del dominio receptor de *srrB*. La construcción para eliminar la región que codifica para el RD de *srrB* fue generada por "Double-joint PCR y contiene el gen *pyroAf* como marcador selectivo" y fue utilizada para transformar la cepa 11035. Un evento de doble recombinación produce el reemplazo de la región que codifica para el dominio receptor a del gen *srrB* por el gen del marcador selectivo *pyroAf* (panel superior). Para confirmar la eliminación de la región que codifica para el dominio receptor del gen *srrB*, se digirió el DNA de la cepa silvestre y de las cepas seleccionadas con la enzima de restricción *EcoRI* y se hibridó con la sonda indicada en el esquema.

Debido a que la construcción utilizada para realizar la eliminación del RD no presentaba un codón de término, se realizó el análisis de la secuencia de la construcción y se encontró un codón de paro en la construcción utilizada para la

eliminación del RD, sólo que se adiciona una secuencia de 9 aminoácidos (RTSDAGLLR) después del residuo 1478 de SrrB.

La eliminación total de SrrB o solamente del dominio receptor producen una disminución en el crecimiento radial, mientras que sólo la eliminación del dominio receptor de SrrB produce una disminución en la esporulación asexual.

Después de confirmar que se habían obtenido las cepas mutantes en las que se habían introducido las construcciones adecuadas para eliminar el gen *srrB* y o sólo la región correspondiente al RD de SrrB, se procedió con su caracterización. En la Fig. 10A, se puede observar que ambas mutantes presentan una disminución en el crecimiento radial con respecto a la cepa CLK43 (WT). Además, se observa que la mutante *srrB* Δ RD presenta una disminución en la cantidad de esporas. Por esta razón se llevó a cabo la cuantificación de esporas asexuales o conidiosporas. En la Fig. 10B, se observa que la mutante Δ *srrB* presenta un número de esporas/cm² semejante al de una cepa silvestre. Sin embargo, en el caso de la mutante *srrB* Δ RD se observa una disminución considerable (significativa) del número de esporas por unidad de área. En el hongo patógeno del maíz *Magnaporthe oryzae*, la eliminación del ortólogo de SrrB, provoca una disminución del 15% en el crecimiento radial en comparación con la cepa silvestre (Motoyama *et al.*, 2008), en tanto que en este caso se observó una disminución del crecimiento de alrededor del 30%. Otro estudio realizado en *A. nidulans* reporta que la eliminación de SrrB no produce ningún fenotipo visible (Hagiwara *et al.*, 2007).

La eliminación del dominio receptor de SrrB provoca una disminución en el nivel del mRNA del gen *brlA*

La esporulación asexual es completamente dependiente de la actividad del factor transcripcional BrlA, además los niveles del mRNA de *brlA* se han correlacionado con la morfología del conidióforo y la producción de esporas (Adams *et al.*, 1988). El mRNA de *brlA* no se encuentra presente antes de inducir la conidiación pero comienza a acumularse durante la conidiación. Debido a que la mutante *srrB* Δ RD presenta una disminución en la esporulación asexual se

determinaron los niveles del mRNA de *brlA*. Los resultados obtenidos indican que esta cepa se retrasa la aparición del mRNA, así como los niveles de este mRNA son más bajos en comparación con la cepa silvestre (11035) (Fig. 11). Esto correlaciona con la disminución en la esporulación asexual que se presenta en esta mutante.

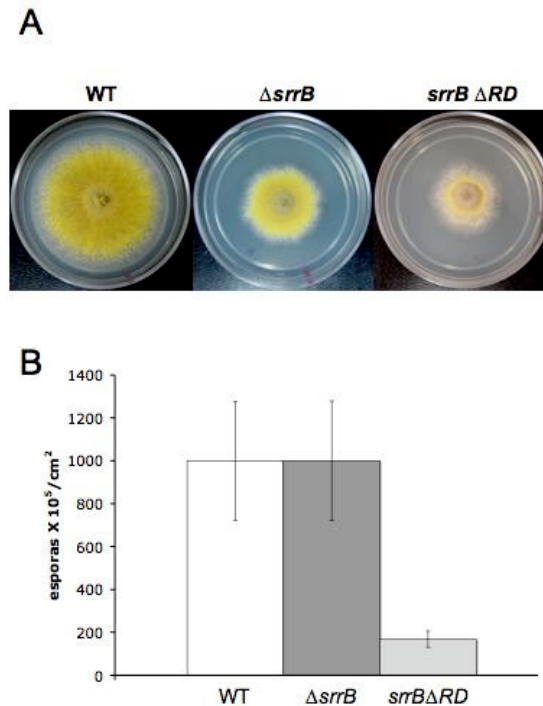


Figura 10. A) Las mutantes $\Delta srrB$ y *srrB* ΔRD presentan un menor crecimiento radial. Se inocularon por punto en medio mínimo más suplementos y se incubaron a 37°C durante 4 días. B) Sólo la mutante *srrB* ΔRD presenta una disminución en la producción de conidiosporas. Se inocularon por punto en medio mínimo más suplementos, se incubaron a 37°C durante 5 días después de lo cual se cuantificaron las esporas, las cuales se reportan en número de esporas/cm².

La eliminación del dominio receptor de SrrB provoca sensibilidad al estrés osmótico.

Para investigar el papel de SrrB en la respuesta al estrés osmótico, sembramos las mutantes $\Delta srrB$ y *srrB* ΔRD en presencia de NaCl (0.6 M) y sorbitol (1.2 M). Como se puede observar en la Fig. 12, la mutante *srrB* ΔRD es más sensible al estrés osmótico inducido por NaCl y sorbitol en comparación con la cepa WT e incluso con la cepa $\Delta srrB$, la cual no mostró sensibilidad a este estrés.

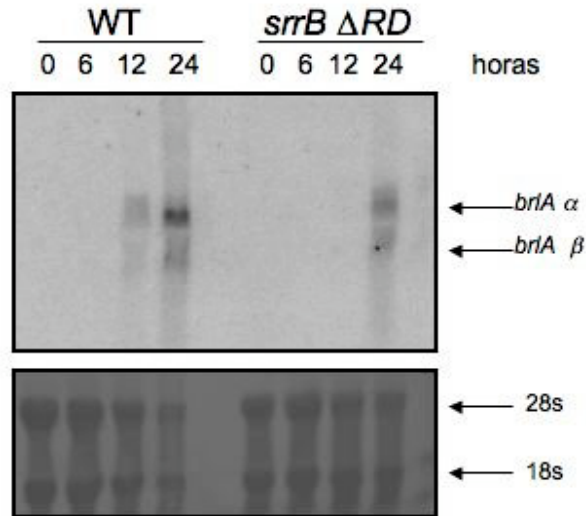


Fig. 11. El mRNA de *brlA* se encuentra disminuido en la mutante *srrB* Δ RD. Se crecieron las cepas en medio líquido durante 18 horas (tiempo 0 de conidiación) y se indujo la conidiación exponiendo el micelio al aire. Se extrajo el RNA de las muestras tomadas a los tiempos indicados. El RNA transferido en una membrana se hibridó con una sonda específica para *brlA*. En el panel superior se muestran los niveles de mRNA de *brlA*, en el panel inferior se muestra el RNA ribosomal (*rRNA*) como control de carga.

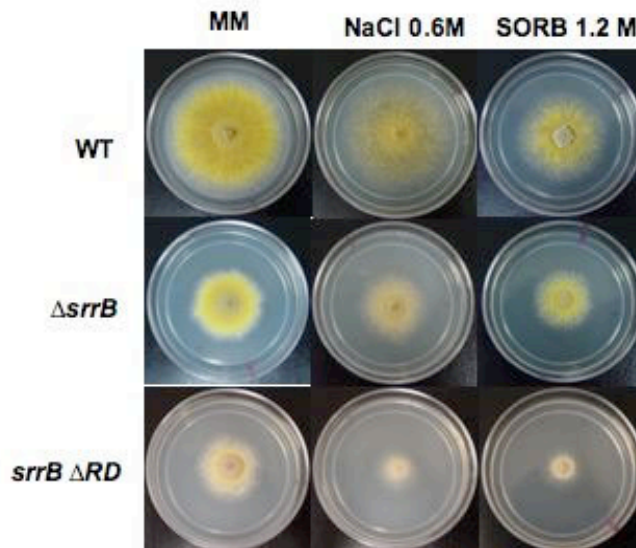


Figura 12. La mutante *srrB* Δ RD es más sensible al estrés osmótico. Esporas de las cepas se inocularon por punto en medio mínimo y se adicionó NaCl o sorbitol en las concentraciones indicadas. Se incubaron a 37°C durante 4 días.

La eliminación de SrrB y del dominio receptor de SrrB afectan la inducción de la catalasa B en presencia de H₂O₂ y paraquat pero sólo la eliminación del dominio receptor de SrrB afecta la sensibilidad al H₂O₂.

Para investigar el papel de SrrB en la respuesta al estrés oxidativo, se sembraron las mutantes $\Delta srrB$ y $srrB \Delta RD$ en medio con diferentes agentes oxidantes. Como se muestra en la Fig. 13, se observa que la mutante $srrB \Delta RD$ es más sensible al H_2O_2 en comparación con la cepa silvestre y la mutante $\Delta srrB$. (Fig. 13A). En estos experimentos se utilizó como control la mutante $\Delta srrA$, la cual sabemos que es muy sensible a la presencia de H_2O_2 (Vargas-Perez *et al.*, 2007).

En cambio, ambas mutantes en SrrB muestran una sensibilidad al t-BOOH similar a la de la cepa silvestre (Fig. 13B). Además la mutante $\Delta srrB$ es más sensible al paraquat, el cual induce la formación de anión superóxido (O_2^-). También se observa que la cepa $\Delta srrA$ es muy sensible al estrés inducido por paraquat, mientras que la mutante $\Delta catB$ muestra una ligera sensibilidad a los agentes oxidantes utilizados.

En función de los resultados de sensibilidad H_2O_2 y al paraquat que presentan las mutantes estudiadas, decidimos determinar la actividad de la catalasa B inducida por H_2O_2 y paraquat. Como se puede observar en la Fig. 14, en la cepa $\Delta srrB$ y $srrB \Delta RD$, la actividad de catalasa B muestra una menor inducción por H_2O_2 y paraquat, en comparación con la cepa WT. Como control se utilizó la cepa $\Delta srrA$, la cual sabemos que no induce la catalasa B en presencia de H_2O_2 (Vargas-Perez *et al.*, 2007). Como puede observarse en la Fig. 14, en esta mutante ($\Delta srrA$) tampoco se induce la catalasa B por el paraquat. En este experimento se usó como control una mutante que carece del gen $catB$ ($\Delta catB$) (Kawasaki *et al.*, 1997).

En un estudio realizado en 12 especies de hongos filamentosos se observó que la inducción de la catalasa ocurre cuando los distintos hongos son expuestos a H_2O_2 , pero no en presencia del paraquat (Angelova *et al.*, 2005). Sin embargo, podemos observar que en el caso de *A. nidulans*, ambos agentes oxidantes inducen la actividad de la catalasa B.

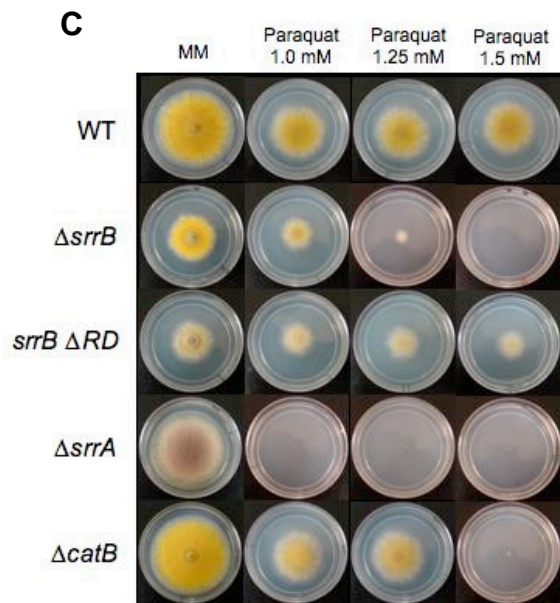
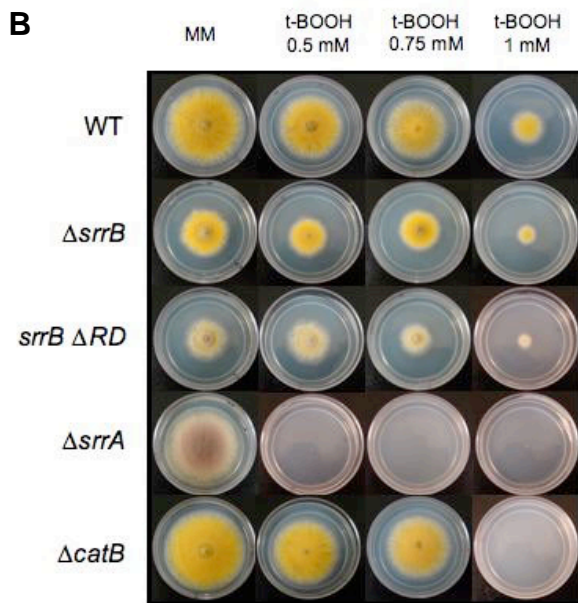
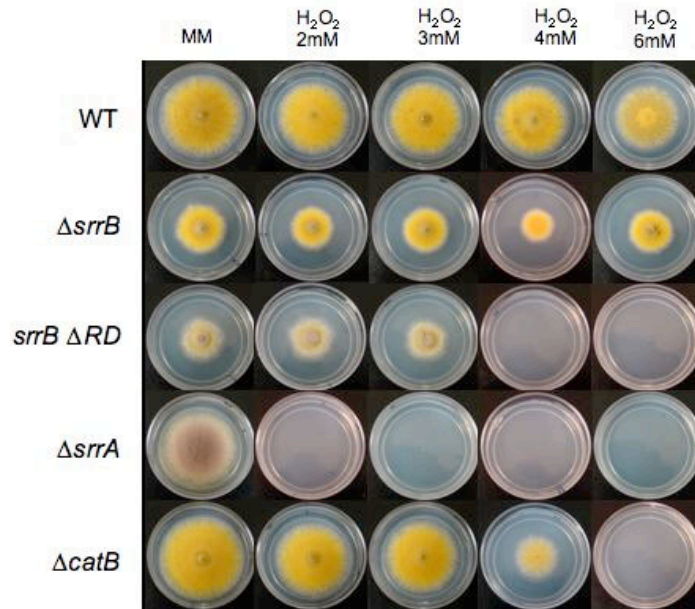


Figura 13. Sensibilidad de las mutantes $\Delta srrB$ y *srrB* ΔRD a diferentes agentes oxidantes. A) La mutante *srrB* ΔRD es sensible al H₂O₂. Se sembró por punto cajas que contenían H₂O₂ en las concentraciones indicadas. B) Las mutantes $\Delta srrB$ y *srrB* ΔRD no son sensibles al tert-butil peróxido (t-BOOH). Se sembraron por punto en cajas de medio mínimo que contenían t-BOOH en las concentraciones indicadas. C) La mutante $\Delta srrB$ es sensible al paraquat. Se sembraron por punto cajas de medio mínimo que contenían paraquat en las concentraciones indicadas. Todas las cajas se incubaron a 37°C durante 4 días.

Es interesante que aunque ambas mutantes son incapaces de inducir la catalasa B, sólo la mutante *srrB* ΔRD es sensible al H₂O₂, mientras que la mutante $\Delta srrB$ es sensible a paraquat. Estos resultados indican aunque SrrB se encuentra involucrado en la respuesta al estrés inducida por el paraquat y el H₂O₂ mediante la

inducción de la catalasa B, existen otros mecanismos involucrados en la respuesta a estos agentes oxidante que son independientes de SrrB.

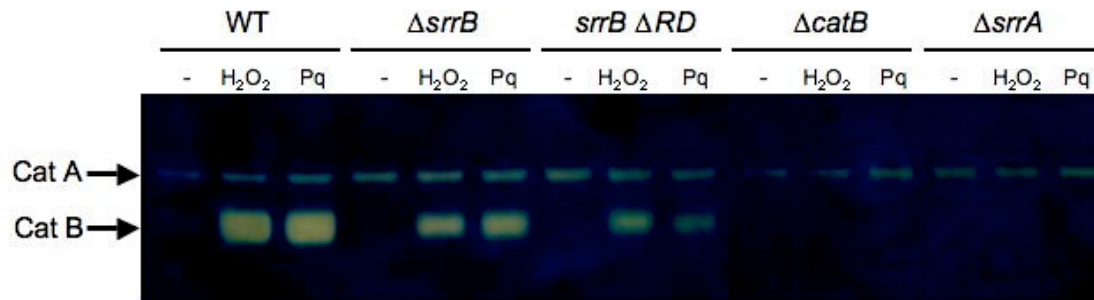


Fig. 14. Las mutantes $\Delta srrB$ y *srrB* ΔRD presentan una menor inducción de la actividad de catalasa B inducida en presencia del H_2O_2 y el paraquat. Se prepararon extractos de proteínas de micelio tratado con H_2O_2 . Se cargaron 80 μg de proteína en un gel de poliacrilamida en condiciones no desnaturizantes y se determinó la actividad de catalasa. El micelio se creció durante 8 horas y fue tratado con 0.5mM de H_2O_2 o 4mM de paraquat (Pq) durante 2 horas (Kawasaki *et al.*, 1997).

La eliminación del dominio receptor de SrrB afecta el crecimiento cuando se utiliza glicerol o etanol como fuentes de carbono o cuando cuando se utiliza ácido úrico o prolina como fuentes de nitrógeno.

Para determinar la participación de SrrB en la utilización de diversas fuentes de carbono o de nitrógeno, las mutantes $\Delta srrB$ y *srrB* ΔRD se crecieron en diferentes medios. Como puede observarse en la Fig. 15, mientras que la mutante $\Delta srrB$ crece en las fuentes de carbono probadas, la mutante *srrB* ΔRD no crece en etanol y muestra un menor crecimiento en glicerol como fuente de carbono. El experimento se llevó a cabo usando esporas o micelio para descartar que diferencias en el inóculo de esporas influyera en el crecimiento en las diferentes de carbono utilizadas. Se puede observar que aunque el crecimiento mejora cuando se inoculan los medios con micelio la mutante *srrB* ΔRD presenta menor crecimiento en etanol o glicerol.

En la Fig. 16, podemos observar que la mutante $\Delta srrB$ crece en las diferentes fuentes de nitrógeno utilizadas igual que la cepa WT, mientras que la mutante *srrB* ΔRD crece menos en prolina o ácido úrico en comparación con el crecimiento que ésta mutante muestra en las otras fuentes de nitrógeno. Además, la mutante *srrB*

ΔRD no sólo crece menos en estas condiciones si no que también presenta una coloración café y muy pocas esporas. Al igual que en el experimento con diferentes fuentes de carbono, se inocularon las cajas con esporas o con micelio para descartar que la cantidad de esporas influyera en el crecimiento en las diferentes de nitrógeno utilizadas. Se observó que cuando se inoculaba con micelio, la mutante *srrB* ΔRD mejoraba su crecimiento, en tanto que la esporulación se afecta en presencia de prolina o ácido úrico.

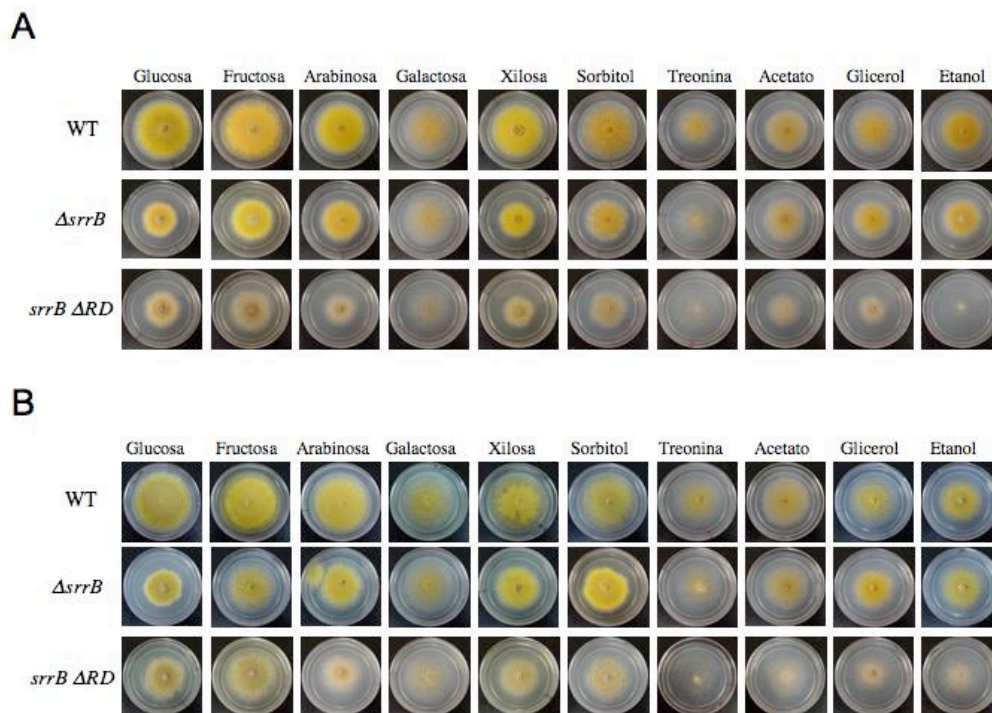


Figura 15. Crecimiento de las mutantes $\Delta srrB$ y *srrB* ΔRD en diferentes fuentes de carbono. La mutante *srrB* ΔRD presenta poco crecimiento utilizando etanol o glicerol como fuentes de carbono. A) Se inocularon con esporas o B) con micelio proveniente de una colonia de 5 días. Las cajas inoculadas se incubaron durante 4 días a 37°C.

Los fenotipos observados en la mutante *srrB* ΔRD nos sugieren el dominio receptor en esta proteína es importante para su función o su regulación. SrrB presenta un dominio de cinasa de serina y treonina, el cual podría estar controlado por el dominio receptor. La eliminación del dominio receptor podría provocar que la proteína adquiriera una actividad constitutiva de cinasa lo que explicaría las diferencias entre la eliminación de aproximadamente el 80% del ORF (mutante

$\Delta srrB$) y la eliminación de solo el dominio receptor (mutante $srrB \Delta RD$). Es decir la ausencia de SrrB es necesaria para la fosforilación y activación de proteínas que se requieren para un crecimiento radial normal y para la inducción de la catalasa B; sin embargo, la actividad constitutiva de SrrB provocaría la fosforilación y una probable inhibición de proteínas implicadas en la respuesta al estrés osmótico, en la respuesta al H_2O_2 y en la estabilidad del mRNA de *brlA*.

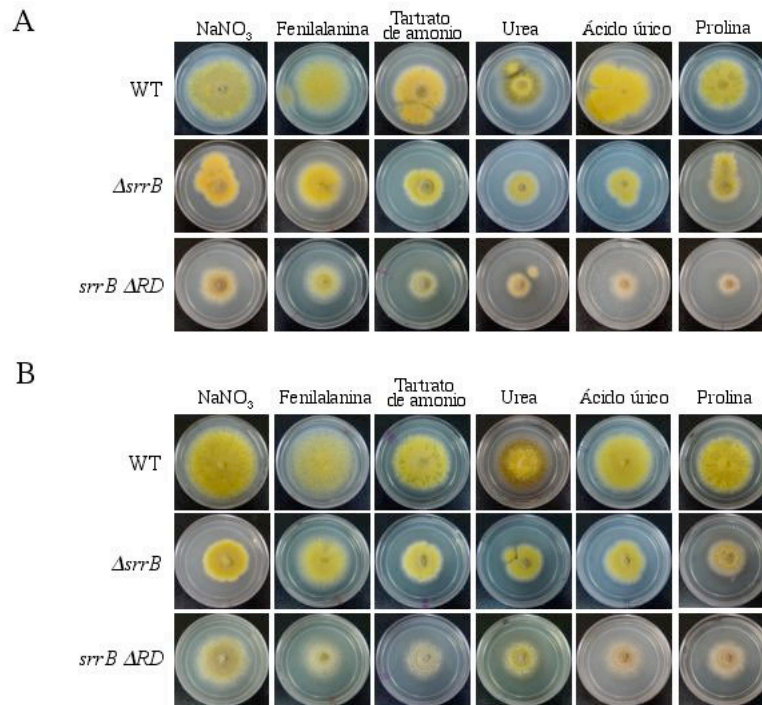


Figura 16 . Crecimiento de las mutantes $\Delta srrB$ y $srrB \Delta RD$ en diferentes fuentes de nitrógeno. La mutante $srrB \Delta RD$ presenta poco crecimiento utilizando prolina y ácido úrico como fuentes de nitrógeno. A) Se inocularon con esporas o B) con micelio proveniente de una colonia de 5 días. Se incubaron las cajas durante 4 días a 37°C.

Eliminación del gen *srrC*.

Otra de las proteínas con dominio receptor que se predice en el análisis del genoma de *Aspergillus nidulans* es SrrC (AN4134.3). Esta es una proteína de 171 aminoácidos que únicamente presenta el dominio receptor y que no tiene un dominio efector. Para determinar cuál es el papel de esta proteína decidimos eliminarla mediante la técnica de “Double Joint PCR” (Yu *et al.*, 2004), utilizando el gen *pyrG* de

Aspergillus fumigatus como marcador selectivo. Se utilizaron los tres productos de PCR 5'AN4134, 3'AN4134 y *pyrG* como templados para obtener el producto de fusión que se utilizó para transformar *A. nidulans* mediante la técnica de fusión de protoplastos utilizando la cepa 11035. No se obtuvieron transformantes por la técnica de fusión de protoplastos, por lo que decidimos realizar la transformación mediante la técnica de conidias electrocompetentes (Sanchez *et al.*, 1998), usando la cepa 11035 y seleccionando transformantes protótrofos de uridina y uracilo. Se obtuvieron 20 transformantes y se escogieron quince de ellas para analizarlas por hibridación tipo "Southern" para confirmar la eliminación del gen *srrC*. Se extrajo DNA genómico de las transformantes y se realizó una digestión con *PstI* y otra con *BamHI*. Se utilizó como sonda el producto de PCR 5'AN4134 marcado con ³²P. Como se muestra en la Fig. 17, la digestión con *PstI* del DNA de la cepa silvestre (11035) generó un fragmento de 2.8 kb En las transformantes en donde el gen *srrC* fue eliminado se generó un fragmento de 3.8 kb La digestión con *BamHI* del DNA de la cepa silvestre generó un fragmento de 4.9 kb En las transformantes con la eliminación del gen *srrC* se generó un fragmento de 2.2 kb Los resultados se confirmaron que el gen *srrC* fue eliminado en la mayoría de las transformantes analizadas excepto en las transformantes 13 y 15. Se realizó una cruce de la T- 7 con la cepa CLK43 para obtener la mutante $\Delta srrC$ en el mismo fondo genético de las mutantes en *NikA* y los otros reguladores de la respuesta y para eliminar el fondo $\Delta nkuA$. De la progenie obtenida se seleccionaron cepas auxotrofas a PABA. Se analizó por hibridación tipo Southern la eliminación de *srrC* (dato no mostrado).

SrrC no se requiere para la resistencia al H₂O₂

La eliminación de *SrrC* no produjo ningún fenotipo en medio mínimo (Fig. 19), por lo que quisimos determinar si esta proteína tenía alguna función en la respuesta al estrés inducido por H₂O₂. Como se puede observar en la Fig. 18, la mutante $\Delta srrC$ no es sensible a la exposición al H₂O₂ comparada con la cepa WT y con las mutantes en los otros reguladores de la respuesta, las cuales mostraron ser sensibles al H₂O₂. Sin embargo, existen diferencias entre la concentración a la cual cada una de las

mutantes de los reguladores de la respuesta es sensible. Mientras que la mutante $\Delta srrA$ es muy sensible a bajas concentraciones H_2O_2 , la mutante $\Delta sskA$ es sensible pero a concentraciones mas altas de H_2O_2 y en el caso de las mutantes de la proteína SrrB, solo la mutante en donde SrrB no tiene el RD es sensible a concentraciones altas de H_2O_2 como la mutante $\Delta sskA$.

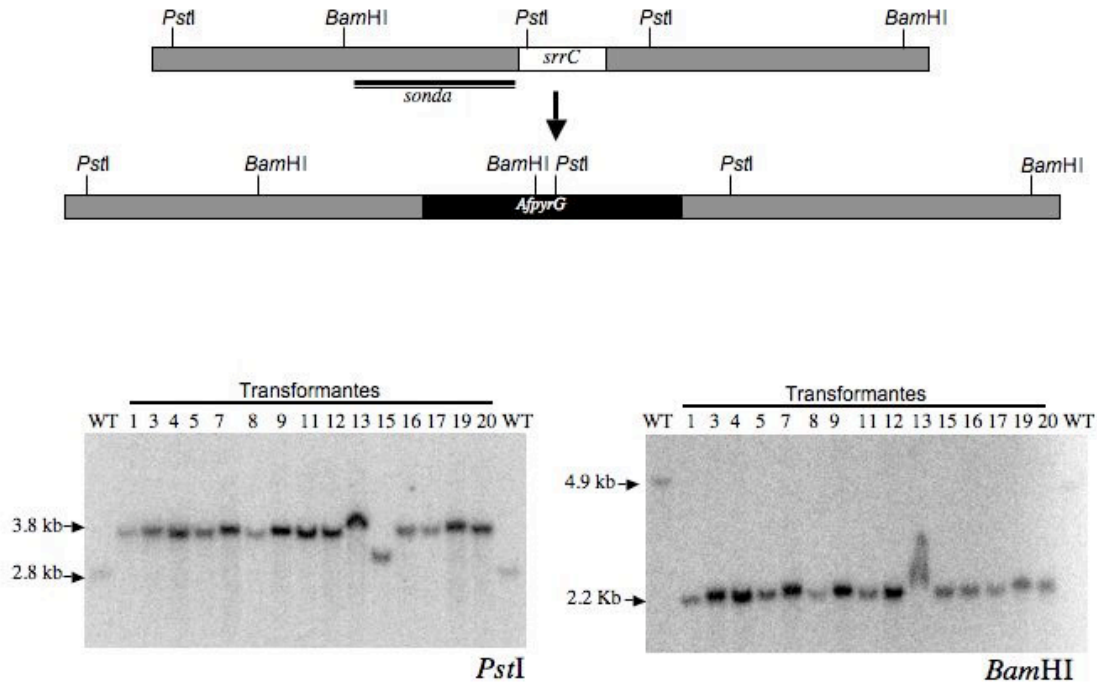


Figura 17. Confirmación de la eliminación del gen *srrC*. La construcción para la eliminación del gen *srrC* fue generada por "Double-Joint PCR" y contiene el gen *pyrG* como marcador selectivo y fue utilizada para transformar conidias electro competentes de la cepa 11035. Para confirmar la eliminación del gen *srrC* se digirió el DNA de la cepa silvestre y de las cepas seleccionadas con *PstI* y *BamHI* y se hibridó con la sonda indicada en el esquema.

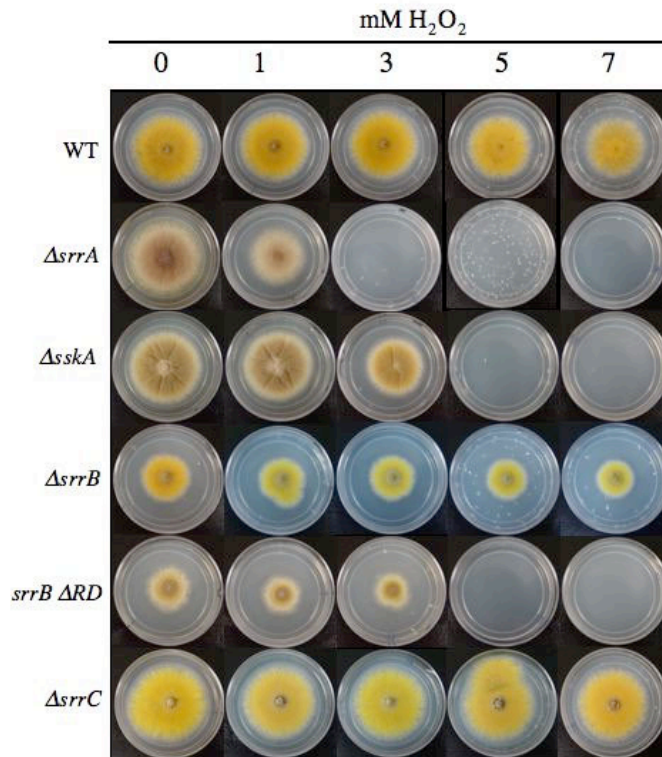


Figura 18. Fenotipo de las mutantes en los reguladores de respuesta de *A. nidulans* bajo diferentes concentraciones de H₂O₂. Se inocularon por punto cajas con MM con PABA mas H₂O₂ en las concentraciones indicadas. Se incubaron las cajas 4 días a 37°C.

SrrC no se requiere para la resistencia al estrés osmótico y tampoco esta involucrado en la sensibilidad al fungicida fludioxonil.

La eliminación de la proteína SrrC no provoca sensibilidad al estrés osmótico producido por sorbitol o NaCl (Fig. 19). Además de crecer igual que la cepa silvestre a bajas concentraciones de glucosa. También se puede observar que la mutante $\Delta srrC$ es tan sensible al fludioxonil como la cepa WT. Estos resultados nos indican que esta proteína no se encuentra involucrada en la respuesta al estrés osmótico y tampoco está involucrada en la sensibilidad al fludioxonil.

SrrC parece no estar involucrado con la respuesta al estrés oxidativo ni al estrés osmótico. Se requiere hacer más estudios para determinar si esta proteína se expresa y si es funcional, ya que solo presenta el dominio receptor y no existe otro dominio que pudiera funcionar como un dominio efector para llevar a cabo su

función, aunque quizás pueda interactuar con otras proteínas pero de cualquier forma, su función no parece esencial para el hongo.

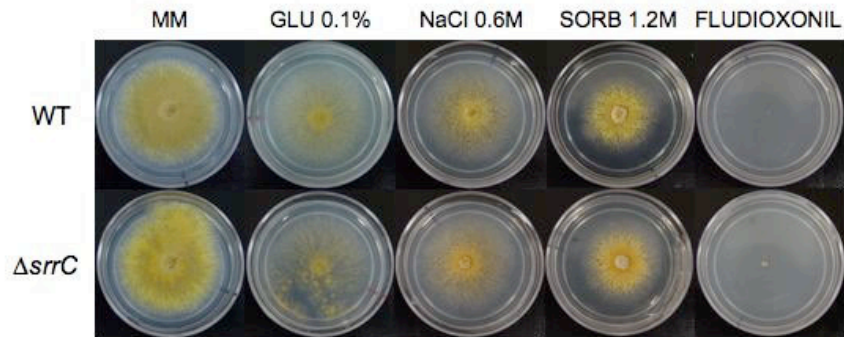


Figura 19. *SrrC* no se requiere para la respuesta al estrés osmótico y al fungicida fludioxonil. Se inocularon por punto cajas de MM con PABA mas NaCl y sorbitol en las concentraciones indicadas y 1 μ g/ml de fludioxonil. Se incubaron a 37 °C durante 4 días.

DISCUSION GENERAL

En este trabajo utilizamos un enfoque genético para analizar la función de los sistemas de relevo de fosfatos en la transmisión de señales de estrés y en el desarrollo en *Aspergillus nidulans*. Comenzamos con el análisis del genoma de *Aspergillus nidulans* buscando genes que codificaran para proteínas HKs, proteínas de transferencia de fosfatos o Hpt y proteínas reguladoras de la respuesta. El análisis del genoma de *A. nidulans* predice 15 proteínas HKs, 1 una proteína Hpt (YpdA) y dos RRs clásicos llamados SrrA (este trabajo; número de acceso del GenBank: AY168636) y SskA (Furukawa *et al.*, 2005). Además se predicen otras dos proteínas que presentan un dominio receptor propio de los RR llamadas SrrB y SrrC (Hagiwara *et al.*, 2007). SrrB es homólogo de Rim15 de *S. cerevisiae* y al igual que éste, carece del residuo de Asp conservado en el dominio receptor. SrrC por otro lado carece de un dominio efector (Fig. 6). De las 15 HKs identificadas, sólo tres han sido estudiadas en este hongo (Blumenstein *et al.*, 2005; Furukawa *et al.*, 2002; Virginia *et al.*, 2000).

Posteriormente se realizó la caracterización del gen *srrA* como un miembro de la familia *skn7/prr1* y se extendió el análisis para estudiar su relación con SskA y también la función de YpdA y la HK NikA como componentes río arriba, en este sistema.

En este trabajo se logró eliminar el gen *ypdA* y demostrar que esta mutación solo puede mantenerse en heterocariones. A pesar de lo complicado que resulta la interpretación de los resultados obtenidos de la caracterización de los heterocariones, debido justamente a su heterogenicidad genética, pudimos observar que el crecimiento de los heterocariones *ypdA⁻/ypdA⁺* se ve afectado bajo estrés osmótico pero no se afecta por estrés oxidativo, lo cual nos sugiere que YpdA juega un papel más importante en la respuesta al estrés osmótico que en la adaptación al estrés oxidativo. En analogía con el funcionamiento del sistema de *S. cerevisiae* en donde la eliminación de *ypd1* provoca una hiperactivación letal de Hog1 (Posas *et al.*, 1996), nosotros proponemos que la letalidad asociada a la eliminación de YpdA provoca la hiperactivación de las MAPK SakA y/o MpkC, una segunda MAPK presente en *Aspergillus*. El hecho de que la activación constitutiva de SakA y/o MpkC pueda producir letalidad es también apoyado por el hecho de que el fungicida

fludioxonil puede matar a *A. nidulans* y a otros hongos a través de la activación de la vía de estrés de MAPK (Kojima *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2002) y aquí mostramos que este fungicida también activa a SrrA.

También encontramos que los RRs SrrA y SskA están involucrados en la transducción de señales de estrés osmótico. No obstante que el crecimiento de la cepa silvestre y de la mutante $\Delta srrA$ son muy similares bajo este estrés, la función de $\Delta srrA$ en el estrés osmótico se infiere por el hecho de que una doble mutante $\Delta srrA \Delta sskA$ es más sensible al estrés osmótico que una mutante sencilla $\Delta sskA$.

Por otra parte encontramos que se requiere eliminar tanto a SrrA como a SskA, para mostrar resistencia al fludioxonil y que la eliminación del RR SskA y de la MAPK SskA no es suficiente para una resistencia completa al fludioxonil. Estos resultados contrastan con lo que sucede en *Neurospora crassa*, donde la eliminación de la MAPK OS-2 (Zhang *et al.*, 2002), del RR RRG-1 (Jones *et al.*, 2007) o de la HK OS-1 (Ochiai *et al.*, 2001) confiere resistencia total al fludioxonil. Dado que la mutante $\Delta nikA$ resultó resistente al fludioxonil, ésto indica que NikA juega un papel relevante en la transmisión de la señal causada por el fungicida hacia los RRs SrrA y SskA.

Por otro lado, la función de NikA en la respuesta al estrés osmótico no parece ser tan importante como lo es en otros hongos como *N. crassa*, en donde la mutación equivalente causa hipersensibilidad al estrés osmótico.

Además la mutante $\Delta nikA$ muestra una disminución en el crecimiento radial, lo cual sugiere que la función de NikA en el crecimiento radial no está mediada por SrrA y/o SskA, ya que las mutantes en estos RRs no presentan disminución en el crecimiento radial.

En lo que respecta a la función del sistema de relevo de fosfatos en la respuesta al estrés oxidativo, encontramos que SrrA se requiere para la resistencia al H_2O_2 y para la inducción de la catalasa B en respuesta al H_2O_2 . Esto es semejante a la función de los ortólogos de SrrA, Skn7 en *S. cerevisiae* y Prr1 en *S. pombe* en la respuesta al estrés oxidativo.

En cuanto a la diferenciación celular, SrrA, SskA y NikA contribuyen diferencialmente al desarrollo de las esporas asexuales y también a la viabilidad de estas esporas. El hecho de que las mutantes $\Delta srrA$ y $\Delta sskA$ sean sensibles al calcofluor sugiere que la biosíntesis de la pared celular se encuentra afectada, lo cual podría afectar la viabilidad de las esporas.

Los defectos en la esporulación en las mutantes $\Delta srrA$ y $\Delta sskA$ son mas drásticos que los observados en una mutante $\Delta nikA$, esto sugiere que las funciones de SrrA y/o SskA en la esporulación están reguladas por otra u otras HK.

Aunque no sabemos porqué la viabilidad disminuye en las mutantes que carecen de SrrA, SskA o NikA, la disminución en la cantidad de esporas estaría relacionada con la disminución en los niveles del mRNA de *brlA* durante la esporulación.

Tomando en conjunto estos resultados, proponemos un modelo para *A. nidulans*, en el cual la HK NikA transmite señales de estrés generado por el fungicida fludioxonil a la vía SskA-SakA y también al RR SrrA. NikA podría transmitir también señales de estrés osmótico a SrrA y SskA, pero otras HKs podrían también estar involucradas en la adaptación al estrés osmótico (Fig. 21B). NikA también parece estar involucrada en la transmisión de señales que contribuyen a la esporulación asexual y a la viabilidad de las esporas (Fig. 20). Además NikA parece tener un papel en el crecimiento radial de forma independiente de SrrA/SskA.

En nuestro modelo SrrA juega un papel importante en la respuesta al estrés oxidativo de forma independiente de NikA y probablemente de forma independiente de otros componentes del sistema de relevo de fosfatos (Fig. 21A). SrrA y SskA se requiere para la esporulación asexual normal y para mantener la viabilidad de las esporas. Finalmente SrrA y SskA muy probablemente están involucrados en la biosíntesis de la pared celular (Fig. 20).

Después de la caracterización de los RRs SrrA y SskA, decidimos analizar el papel de las otras dos proteínas que presentan un dominio receptor y que podrían ser parte de los sistemas de relevo de fosfatos.

Comenzamos con la caracterización de SrrB, un ortólogo de la proteína Rim15 de *S. cerevisiae*, la cual presenta en su extremo N-terminal un dominio de cinasa de serina y treonina. Sin embargo, la funcionalidad del dominio receptor en Rim15 no ha sido caracterizada. SrrB, al igual que Rim15, no presenta el Asp conservado en el dominio receptor, por lo que esta proteína no podría participar en el relevo de fosfatos. Sin embargo presenta un residuo de ácido glutámico (E) que podría dar a SrrB la propiedad de actuar como un regulador de la respuesta constitutivamente activo (Klose *et al.*, 1993; Nohaile *et al.*, 1997).

En el caso de SrrB trabajamos con dos mutantes diferentes, la mutante $\Delta srrB$ en la cual eliminamos el 80% del marco de lectura del gen *srrB* y la mutante *srrB* ΔRD , en la que eliminamos únicamente la región que codifica para el dominio receptor. SrrB juega un papel importante en el crecimiento radial, ya que en ambas mutantes existe una considerable disminución de este crecimiento. Este fenotipo coincide con lo que se observa cuando se elimina el ortólogo de SrrB en el hongo *Magnaporthe oryzae* (Motoyama *et al.*, 2008). Si el dominio receptor de SrrB pudiera ser fosforilado, NikA podría ser la HK que actúa río arriba de SrrB, ya que una mutante $\Delta nikA$ esta afectada en el crecimiento radial (Vargas-Perez *et al.*, 2007).

La eliminación de SrrB no provoca sensibilidad al estrés osmótico a diferencia de lo que se observa con la eliminación del ortólogo de *M. oryzae*, en donde la mutante $\Delta Morim15$ presenta una ligera sensibilidad a altas concentraciones de KCl (Motoyama *et al.*, 2008). En cuanto a la respuesta al estrés oxidativo, encontramos que las mutantes $\Delta srrB$ no son sensibles al H_2O_2 ni al t-BOOH, pero sí lo son al paraquat. Esto sugiere que SrrB se requiere para la respuesta a este agente oxidante. Sin embargo, a pesar de que no se observa sensibilidad al H_2O_2 , la actividad de catalasa B inducida por H_2O_2 se encuentra considerablemente disminuida, en comparación con la cepa silvestre.

Mientras que la mutante $\Delta srrB$ solo presenta sensibilidad al paraquat, la mutante *srrB* ΔRD presenta diversos fenotipos que no se ven en la mutante $\Delta srrB$. La mutante *srrB* ΔRD es sensible al estrés osmótico inducido por NaCl y sorbitol, además presenta sensibilidad al H_2O_2 , lo que correlaciona con la disminución en la

inducción de la catalasa B en presencia de H₂O₂. Además esta mutante presenta un crecimiento escaso cuando utiliza glicerol o etanol como fuentes de carbono y también cuando crece utilizando prolina o ácido úrico como fuentes de nitrógeno.

En *A. nidulans*, el catabolismo del etanol depende de dos enzimas: la deshidrogenasa de alcohol I (ADHI) codificada por el gen *alcA* y la deshidrogenasa de aldehído (AldDH) codificada por el gen *aldA*. Ambas enzimas y el regulador transcripcional AlcR son inducidos por la presencia del etanol (Felenbok, 1991). Aunque sólo *alcA* y *alcR* se requieren para la utilización del etanol, todos los genes de la vía están sujetos a la inducción por etanol y a la represión de regulador transcripcional CreA (Fillinger and Felenbok, 1996). Los defectos en el crecimiento de la mutante *srrB ΔRD* en presencia de etanol como fuente de carbono podrían estar relacionados con defectos en la inducción de los genes requeridos para la utilización del etanol.

En *A. nidulans*, la prolina puede ser utilizada como fuente de carbono y de nitrógeno. Un grupo de cinco genes (*prnA*, *prnX*, *prnD*, *prnB* y *prnC*) está involucrado en el metabolismo de la prolina. Uno de los principales puntos de control de esta vía es la expresión de gen *prnB*, el cual codifica para la permeasa de prolina (Hull *et al.*, 1989; Sophianopoulou and Scazzocchio, 1989). La mutante *srrB ΔRD* crece poco cuando utiliza prolina como fuente de nitrógeno y este defecto podría deberse a que los genes requeridos para el metabolismo de la prolina no se están expresando correctamente por lo que la mutante presenta deficiencias en el crecimiento cuando la prolina es la única fuente de nitrógeno.

Además de los fenotipos que presenta bajo estrés osmótico y de H₂O₂, la mutante *srrB ΔRD* presenta defectos en la esporulación asexual, ya que el número de esporas por área es menor en comparación con la cepa silvestre. Esta disminución correlaciona con la disminución del mRNA de *brlA*, el cual es un factor clave en la esporulación asexual en *A. nidulans*.

Los fenotipos observados en la mutante *srrB ΔRD* sugieren que la presencia del dominio receptor juega un papel importante en la regulación de esta proteína. SrrB presenta en su extremo N-terminal un dominio de cinasa de serina y treonina, el

cual podría activarse de forma constitutiva cuando no está presente el dominio receptor. Dado que el dominio receptor no tiene el aspartato conservado, no podemos explicar de que modo se está regulando la actividad de cinasa de SrrB. Se requieren más estudios para determinar cómo se regula la actividad de cinasa de serina y treonina de SrrB, así como determinar cuáles son las proteínas blanco del dominio de cinasa de SrrB.

En el único hongo filamentoso en el que se ha caracterizado la proteína ortóloga de Rim15 es el hongo patógeno de plantas *M. oryzae*. En este hongo, la eliminación de MoRIM15 provoca una disminución en el crecimiento, una ligera sensibilidad al estrés osmótico y una disminución en la virulencia del hongo (Motoyama *et al.*, 2008); sin embargo, no se conoce cuál es la función de MoRIM15 en este hongo.

SrrC es otra de las proteínas que se deduce de la secuencia del genoma de *A. nidulans* que presenta un dominio receptor. Genes que codifican para una proteína que presentan únicamente el dominio receptor se ha encontrado en los genomas de *C. heterotrofus* y *G. moniliformis*. Estos genes no parecen ser ortólogos entre sí y no se conoce su función en estos hongos (Catlett *et al.*, 2003). Decidimos eliminar el gen *srrC* y realizar la caracterización de la mutante. En ninguna de las condiciones probadas, encontramos un fenotipo para dicha mutante. SrrC por tener sólo el dominio receptor podría interactuar con otras proteínas o ser una proteína que funciona como una fosfatasa y que regule la actividad de los sistemas de relevo de fosfatos.

Aún falta hacer estudios para entender mejor el papel de SrrB y SrrC en *A. nidulans* y determinar si la actividad de estas proteínas se encuentra controlada por el relevo de fosfatos.

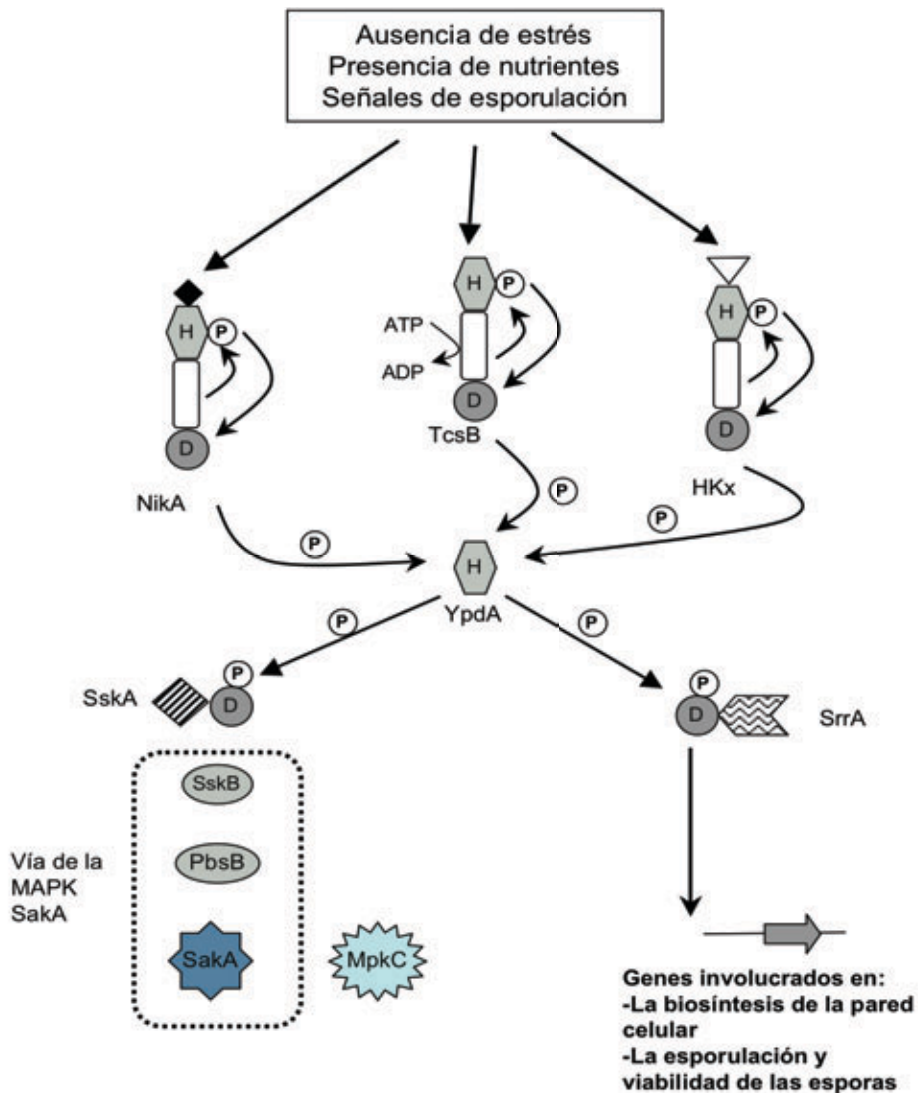


Figura 20. Modelo propuesto para la función de los sistemas de relevos de fosfatos en *Aspergillus nidulans* en ausencia de estrés. Las cinasas de histidina NikA, TcsA y probablemente otras HKs perciben señales (nutrientes, señales de esporulación, etc.), las cuales se requirieren para el crecimiento (mantenimiento de la pared celular, etc.) y la esporulación asexual. Las HKs que perciben estas señales se encuentran activas bajo estas condiciones, autofosforilandose en su residuo de His y transfiriendo el grupo fosfato al Asp presente en la misma HK. Posteriormente el grupo fosfato es transferido a YpdA y finalmente a los RR SrrA y SskA. Por analogía con lo que ocurre en *S. cerevisiae*, proponemos que cuando SskA está fosforilado no interactúa con la MAPKKK SskB y por lo tanto la vía de la MAPK Saka se encontraría inactiva. En cambio, SrrA fosforilado actuaría como un activador transcripcional para regular la expresión de los genes involucrados en la biosíntesis de la pared celular, la esporulación asexual y la viabilidad de las esporas.

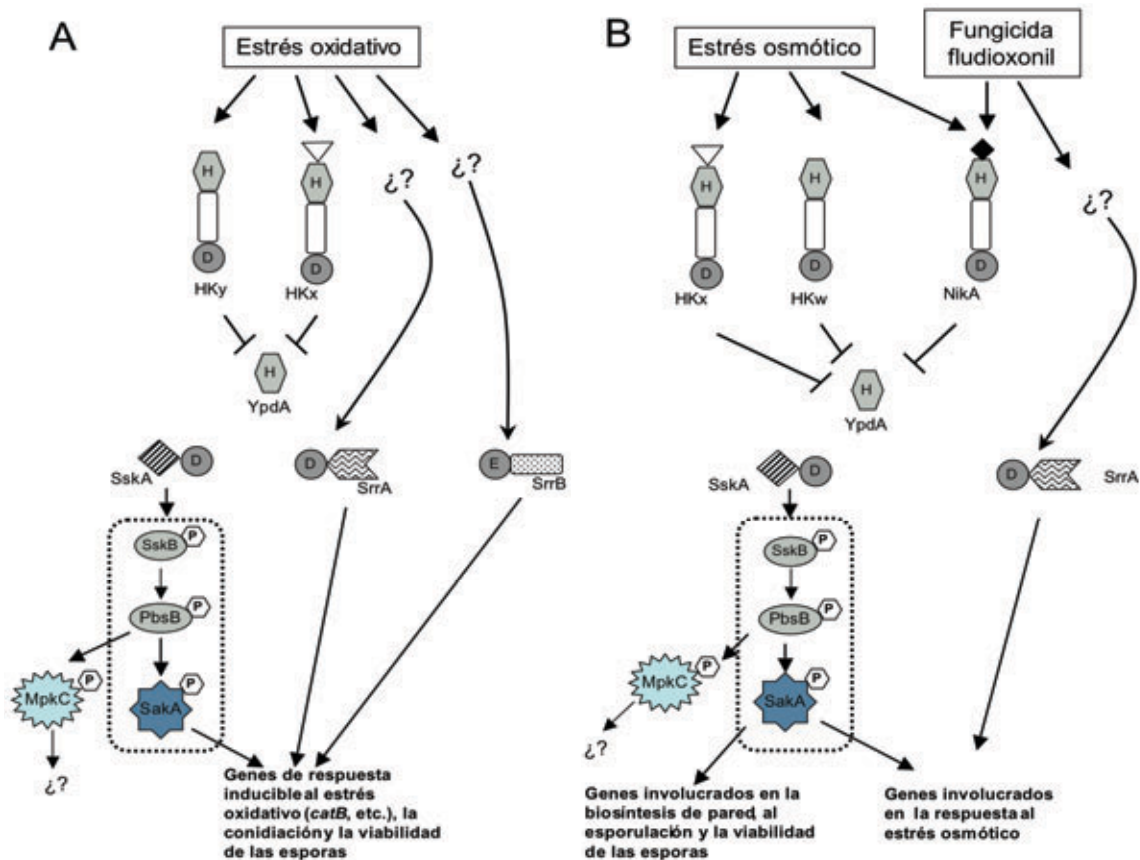


Figura 21. Modelo propuesto para la función de los sistemas de relevos de fosfatos en *Aspergillus nidulans* en condiciones de estrés oxidativo, estrés osmótico o en presencia de fludioxonil. A) SrrA se requiere para responder a bajas concentraciones de H_2O_2 y al paraquat y para la inducción de la catalasa CatB por H_2O_2 . Sin embargo, SrrB también se requiere parcialmente para la inducción de CatB. El RR SskA interviene en la respuesta a altas concentraciones de H_2O_2 , aunque en las concentraciones probadas, SskA no es necesario para la inducción de CatB por H_2O_2 . Aún no se conoce si alguna de las HKs presentes en *A. nidulans* detecta el H_2O_2 y el paraquat. Como sucede en *S. cerevisiae*, SrrA podría detectar el estrés oxidativo independientemente del sistema de relevo de fosfatos. SrrB no presenta el Asp que se fosforila en el dominio receptor y no se conoce como SrrB se relaciona con la inducción de CatB en presencia de H_2O_2 y paraquat. B) SrrA y SskA reciben señales de estrés osmótico, aunque SskA parece tener un papel más importante en la respuesta. La eliminación de SrrA provoca una disminución en la esporulación asexual y este defecto se remedia en condiciones de estrés osmótico, lo que sugiere que SskA puede reemplazar a SrrA en esas condiciones. En presencia del fungicida fludioxonil, la cinasa NikA transmite señales de estrés a los RR SskA y SrrA. La inactivación de NikA o la eliminación simultánea de SrrA y SskA confieren resistencia al fludioxonil. La letalidad del fludioxonil se debe a la activación constitutiva de la MAPK SakA. Proponemos que la eliminación de YpdA es letal porque también conduce a la activación permanente de SakA (y probablemente de MpkC).

CONCLUSIONES:

1. La eliminación de la proteína de transferencia YpdA causa letalidad en *A. nidulans*.
2. Los reguladores de la respuesta SrrA y SskA se requieren para la respuesta al estrés osmótico, así como para el mantenimiento de la integridad celular bajo condiciones normales y de alta osmolaridad. Además estos RRs participan en la acumulación del mRNA del gen *brlA*.
3. NikA, SrrA y SskA se requieren para la esporulación asexual, así como para la viabilidad de las esporas asexuales.
4. SrrA se requiere para la respuesta al estrés oxidativo inducido por el H₂O₂, el t-BOOH y el paraquat, así como para la inducción de la catalasa B por el H₂O₂ y el paraquat.
5. NikA, SrrA y SskA participan en la transducción de señales de estrés generadas por el fungicida fludioxonil. NikA transmite la señal de estrés a la vía SskA-SakA. SrrA es mediador de la acción de fludioxonil de forma independiente de SakA.
6. NikA y SrrB se requieren para el crecimiento radial.
7. SrrB se encuentra involucrado en la respuesta al estrés inducido por el H₂O₂ y el paraquat mediante la inducción de la catalasa B; sin embargo, existen mecanismos involucrados en la resistencia a estos agentes oxidantes, los cuales son independientes de SrrB.
8. La eliminación del dominio receptor de SrrB provoca fenotipos diferentes a la eliminación total de SrrB, que sugieren que el dominio receptor es necesario para su función o regulación.

PERSPECTIVAS

- Debido a la letalidad que se produce con la eliminación de YpdA, es necesario determinar si la eliminación de YpdA causa una activación constitutiva de SakA y MpkC. Analizar si la eliminación de YpdA en un fondo $\Delta sakA \Delta mpkC$ no provoca letalidad en *A. nidulans*.
- En *S. cerevisiae* se ha determinado que existen funciones que requieren el Asp conservado en el dominio receptor de Skn7 y otras funciones para las que es dispensable la presencia de este residuo (Brown *et al.*, 1994; Morgan *et al.*, 1997). Determinar cuáles de las respuestas mediadas por el RR SrrA requieren la fosforilación del Asp conservado.
- SrrA presenta un dominio de unión a DNA, lo cual sugiere que funciona como un factor transcripcional. Determinar cual es la secuencia consenso a la que se une SrrA, así como cuales son los genes regulados por SrrA en ausencia y en presencia de estrés.
- Dentro de la vía NikA-SrrA-SskA es necesario determinar si la eliminación de NikA resulta en la activación parcial de la vía de SakA. Determinar los niveles de fosforilación de SakA en una mutante $\Delta nikA$, así como generar mutantes $\Delta nikA \Delta sakA$ y $\Delta nikA \Delta sakA \Delta mpkC$.
- Para seguir estudiando la función de SrrB, es necesario generar nuevo alelos y comprobar la expresión de las proteínas mutantes. Generar mutantes puntuales en donde se sustituyan los residuos K771 y D883, los cuales equivalen a los residuos K823 y D936 que se requieren para la actividad de cinasa de Rim15 de *S. cerevisiae* (Vidan and Mitchell, 1997).
- Recientemente se reportó que en Skn7 la fosforilación de los residuos T437 y T499, los cuales se encuentran en el dominio receptor, se requieren para la respuesta al estrés oxidativo (He *et al.*, 2009), por ello sería interesante generar mutantes puntuales de SrrA en los residuos S421 y T432. Analizar la posible fosforilación de estos residuos en SrrA por SrrB

REFERENCIAS

- Adams, T.H., Boylan, M.T., and Timberlake, W.E. (1988) brlA is necessary and sufficient to direct conidiophore development in *Aspergillus nidulans*. *Cell* **54**: 353-362.
- Alepuz, P.M., de Nadal, E., Zapater, M., Ammerer, G., and Posas, F. (2003) Osmostress-induced transcription by Hot1 depends on a Hog1-mediated recruitment of the RNA Pol II. *Embo J* **22**: 2433-2442.
- Alex, L.A., Borkovich, K.A., and Simon, M.I. (1996) Hyphal development in *Neurospora crassa*: involvement of a two-component histidine kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 3416-3421.
- Alex, L.A., Korch, C., Selitrennikoff, C.P., and Simon, M.I. (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.
- Angelova, M.B., Pashova, S.B., Spasova, B.K., Vassilev, S.V., and Slokoska, L.S. (2005) Oxidative stress response of filamentous fungi induced by hydrogen peroxide and paraquat. *Mycol Res* **109**: 150-158.
- Aoyama, K., Aiba, H., and Mizuno, T. (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.
- Avenot, H., Simoneau, P., Iacomi-Vasilescu, B., and Bataille-Simoneau, N. (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.
- Banno, S., Noguchi, R., Yamashita, K., Fukumori, F., Kimura, M., Yamaguchi, I., and Fujimura, M. (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.
- Blumenstein, A., Vienken, K., Tasler, R., Purschwitz, J., Veith, D., Frankenberg-Dinkel, N., and Fischer, R. (2005) The *Aspergillus nidulans* phytochrome FphA represses sexual development in red light. *Curr Biol* **15**: 1833-1838.
- Borkovich, K.A., Alex, L.A., Yarden, O., Freitag, M., Turner, G.E., Read, N.D., Seiler, S., Bell-Pedersen, D., Paietta, J., Plesofsky, N., Plamann, M., Goodrich-Tanrikulu, M., Schulte, U., Mannhaupt, G., Nargang, F.E., Radford, A., Selitrennikoff, C., Galagan, J.E., Dunlap, J.C., Loros, J.J., Catcheside, D., Inoue, H., Aramayo, R., Polymenis, M., Selker, E.U., Sachs, M.S., Marzluf, G.A., Paulsen, I., Davis, R., Ebbole, D.J., Zelter, A., Kalkman, E.R., O'Rourke, R., Bowring, F., Yeadon, J., Ishii, C., Suzuki, K., Sakai, W., and Pratt, R. (2004) Lessons from the genome sequence of *Neurospora crassa*: tracing the path from genomic blueprint to multicellular organism. *Microbiol Mol Biol Rev* **68**: 1-108.
- Bowdish, K.S., Yuan, H.E., and Mitchell, A.P. (1995) Positive control of yeast meiotic genes by the negative regulator UME6. *Mol Cell Biol* **15**: 2955-2961.
- Brandt, S., von Stetten, D., Gunther, M., Hildebrandt, P., and Frankenberg-Dinkel, N. (2008) The fungal phytochrome FphA from *Aspergillus nidulans*. *J Biol Chem* **283**: 34605-34614.

- Brown, J.L., Bussey, H., and Stewart, R.C. (1994) Yeast Skn7p functions in a eukaryotic two-component regulatory pathway. *Embo J* **13**: 5186-5194.
- Brown, J.M., and Firtel, R.A. (1998) Phosphorelay signalling: new tricks for an ancient pathway. *Curr Biol* **8**: R662-665.
- Buck, V., Quinn, J., Soto Pino, T., Martin, H., Saldanha, J., Makino, K., Morgan, B.A., and Millar, J.B. (2001) Peroxide sensors for the fission yeast stress-activated mitogen-activated protein kinase pathway. *Mol Biol Cell* **12**: 407-419.
- Calera, J.A., Choi, G.H., and Calderone, R.A. (1998) Identification of a putative histidine kinase two-component phosphorelay gene (CaHK1) in *Candida albicans*. *Yeast* **14**: 665-674.
- Calera, J.A., and Calderone, R. (1999a) Histidine kinase, two-component signal transduction proteins of *Candida albicans* and the pathogenesis of candidosis. *Mycoses* **42 Suppl 2**: 49-53.
- Calera, J.A., and Calderone, R. (1999b) Flocculation of hyphae is associated with a deletion in the putative CaHK1 two-component histidine kinase gene from *Candida albicans*. *Microbiology* **145 (Pt 6)**: 1431-1442.
- Calera, J.A., and Calderone, R.A. (1999c) Identification of a putative response regulator two-component phosphorelay gene (CaSSK1) from *Candida albicans*. *Yeast* **15**: 1243-1254.
- Calera, J.A., Zhao, X.J., De Bernardis, F., Sheridan, M., and Calderone, R. (1999) Avirulence of *Candida albicans* CaHK1 mutants in a murine model of hematogenously disseminated candidiasis. *Infect Immun* **67**: 4280-4284.
- Calera, J.A., Herman, D., and Calderone, R. (2000a) Identification of YPD1, a gene of *Candida albicans* which encodes a two-component phosphohistidine intermediate protein. *Yeast* **16**: 1053-1059.
- Calera, J.A., Zhao, X.J., and Calderone, R. (2000b) Defective hyphal development and avirulence caused by a deletion of the SSK1 response regulator gene in *Candida albicans*. *Infect Immun* **68**: 518-525.
- Catlett, N.L., Yoder, O.C., and Turgeon, B.G. (2003) Whole-genome analysis of two-component signal transduction genes in fungal pathogens. *Eukaryot Cell* **2**: 1151-1161.
- Chauhan, N., Inglis, D., Roman, E., Pla, J., Li, D., Calera, J.A., and Calderone, R. (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. *Eukaryot Cell* **2**: 1018-1024.
- Cottarel, G. (1997) Mcs4, a two-component system response regulator homologue, regulates the *Schizosaccharomyces pombe* cell cycle control. *Genetics* **147**: 1043-1051.
- de Nadal, E., Casadome, L., and Posas, F. (2003) Targeting the MEF2-like transcription factor Smp1 by the stress-activated Hog1 mitogen-activated protein kinase. *Mol Cell Biol* **23**: 229-237.
- De Nadal, E., Zapater, M., Alepuz, P.M., Sumoy, L., Mas, G., and Posas, F. (2004) The MAPK Hog1 recruits Rpd3 histone deacetylase to activate osmoreponsive genes. *Nature* **427**: 370-374.
- Felenbok, B. (1991) The ethanol utilization regulon of *Aspergillus nidulans*: the alcA-alcR system as a tool for the expression of recombinant proteins. *J Biotechnol* **17**: 11-17.

- Fillinger, S., and Felenbok, B. (1996) A newly identified gene cluster in *Aspergillus nidulans* comprises five novel genes localized in the alc region that are controlled both by the specific transactivator AlcR and the general carbon-catabolite repressor CreA. *Mol Microbiol* **20**: 475-488.
- Fischer, R. (2008) Developmental biology. Sex and poison in the dark. *Science* **320**: 1430-1431.
- Furukawa, K., Katsuno, Y., Urao, T., Yabe, T., Yamada-Okabe, T., Yamada-Okabe, H., Yamagata, Y., Abe, K., and Nakajima, T. (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.
- Furukawa, K., Hoshi, Y., Maeda, T., Nakajima, T., and Abe, K. (2005) *Aspergillus nidulans* HOG pathway is activated only by two-component signalling pathway in response to osmotic stress. *Mol Microbiol* **56**: 1246-1261.
- Georgellis, D., Lynch, A.S., and Lin, E.C. (1997) In vitro phosphorylation study of the arc two-component signal transduction system of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **179**: 5429-5435.
- Georgellis, D., Kwon, O., De Wulf, P., and Lin, E.C. (1998) Signal decay through a reverse phosphorelay in the Arc two-component signal transduction system. *J Biol Chem* **273**: 32864-32869.
- Georgellis, D., Kwon, O., and Lin, E.C. (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.
- Georgellis, D., Kwon, O., and Lin, E.C. (2001) Quinones as the redox signal for the arc two-component system of bacteria. *Science* **292**: 2314-2316.
- Groisman, E.A., Chiao, E., Lipps, C.J., and Heffron, F. (1989) *Salmonella typhimurium* phoP virulence gene is a transcriptional regulator. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**: 7077-7081.
- Groisman, E.A. (2001) The pleiotropic two-component regulatory system PhoP-PhoQ. *J Bacteriol* **183**: 1835-1842.
- Hagiwara, D., Asano, Y., Marui, J., Furukawa, K., Kanamaru, K., Kato, M., Abe, K., Kobayashi, T., Yamashino, T., and Mizuno, T. (2007) The SskA and SrrA response regulators are implicated in oxidative stress responses of hyphae and asexual spores in the phosphorelay signaling network of *Aspergillus nidulans*. *Biosci Biotechnol Biochem* **71**: 1003-1014.
- He, X.J., Mulford, K.E., and Fassler, J.S. (2009) Oxidative stress function of the *Saccharomyces cerevisiae* Skn7 receiver domain. *Eukaryot Cell* **8**: 768-778.
- Hoch, J.A. (1993) The phosphorelay signal transduction pathway in the initiation of *Bacillus subtilis* sporulation. *J Cell Biochem* **51**: 55-61.
- Hoch, J.A. (1995) *Control of Cellular Development in Sporulating Bacteria by the Phosphorelay Two-Component Signal Transduction System*. Washington, DC.: ASM Press.
- Hull, E.P., Green, P.M., Arst, H.N., Jr., and Scazzocchio, C. (1989) Cloning and physical characterization of the L-proline catabolism gene cluster of *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol* **3**: 553-559.

- Iuchi, S., and Lin, E.C. (1988) *arcA* (*dye*), a global regulatory gene in *Escherichia coli* mediating repression of enzymes in aerobic pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**: 1888-1892.
- Izumitsu, K., Yoshimi, A., and Tanaka, C. (2007) Two-component response regulators Ssk1p and Skn7p additively regulate high-osmolarity adaptation and fungicide sensitivity in *Cochliobolus heterostrophus*. *Eukaryot Cell* **6**: 171-181.
- Jones, C.A., Greer-Phillips, S.E., and Borkovich, K.A. (2007) The response regulator RRG-1 functions upstream of a mitogen-activated protein kinase pathway impacting asexual development, female fertility, osmotic stress, and fungicide resistance in *Neurospora crassa*. *Mol Biol Cell* **18**: 2123-2136.
- Kawasaki, L., Wysong, D., Diamond, R., and Aguirre, J. (1997) Two divergent catalase genes are differentially regulated during *Aspergillus nidulans* development and oxidative stress. *J Bacteriol* **179**: 3284-3292.
- Kawasaki, L., Sanchez, O., Shiozaki, K., and Aguirre, J. (2002) SakA MAP kinase is involved in stress signal transduction, sexual development and spore viability in *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol* **45**: 1153-1163.
- Klose, K.E., Weiss, D.S., and Kustu, S. (1993) Glutamate at the site of phosphorylation of nitrogen-regulatory protein NTRC mimics aspartyl-phosphate and activates the protein. *J Mol Biol* **232**: 67-78.
- Kojic, E.M., and Darouiche, R.O. (2004) Candida infections of medical devices. *Clin Microbiol Rev* **17**: 255-267.
- Kojima, K., Takano, Y., Yoshimi, A., Tanaka, C., Kikuchi, T., and Okuno, T. (2004) Fungicide activity through activation of a fungal signalling pathway. *Mol Microbiol* **53**: 1785-1796.
- Kwon, O., Georgellis, D., and Lin, E.C. (2000) Phosphorelay as the sole physiological route of signal transmission by the *arc* two-component system of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **182**: 3858-3862.
- Lee, J., Godon, C., Lagniel, G., Spector, D., Garin, J., Labarre, J., and Toledano, M.B. (1999) Yap1 and Skn7 control two specialized oxidative stress response regulons in yeast. *J Biol Chem* **274**: 16040-16046.
- Li, S., Ault, A., Malone, C.L., Raitt, D., Dean, S., Johnston, L.H., Deschenes, R.J., and Fassler, J.S. (1998) The yeast histidine protein kinase, Sln1p, mediates phosphotransfer to two response regulators, Ssk1p and Skn7p. *Embo J* **17**: 6952-6962.
- Lynch, A., and Lin, E. (1996) *Response to molecular oxygen*. . Washington, DC: ASM Press.
- Malpica, R., Franco, B., Rodriguez, C., Kwon, O., and Georgellis, D. (2004) Identification of a quinone-sensitive redox switch in the ArcB sensor kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 13318-13323.
- Malpica, R., Sandoval, G.R., Rodriguez, C., Franco, B., and 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.
- McGuire, A.M., De Wulf, P., Church, G.M., and Lin, E.C. (1999) A weight matrix for binding recognition by the redox-response regulator ArcA-P of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **32**: 219-221.

- Miller, S.I., Kukral, A.M., and Mekalanos, J.J. (1989) A two-component regulatory system (phoP phoQ) controls *Salmonella typhimurium* virulence. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**: 5054-5058.
- Molle, V., Fujita, M., Jensen, S.T., Eichenberger, P., Gonzalez-Pastor, J.E., Liu, J.S., and Losick, R. (2003) The Spo0A regulon of *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* **50**: 1683-1701.
- Morgan, B.A., Banks, G.R., Toone, W.M., Raitt, D., Kuge, S., and Johnston, L.H. (1997) The Skn7 response regulator controls gene expression in the oxidative stress response of the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Embo J* **16**: 1035-1044.
- Motoyama, T., Kadokura, K., Ohira, T., Ichiishi, A., Fujimura, M., Yamaguchi, I., and Kudo, T. (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.
- Motoyama, T., Ochiai, N., Morita, M., Iida, Y., Usami, R., and Kudo, T. (2008) Involvement of putative response regulator genes of the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae* in osmotic stress response, fungicide action, and pathogenicity. *Curr Genet* **54**: 185-195.
- Nagahashi, S., Mio, T., Ono, N., Yamada-Okabe, T., Arisawa, M., Bussey, H., and Yamada-Okabe, H. (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.
- Nakamichi, N., Yamada, H., Aoyama, K., Ohmiya, R., Aiba, H., and Mizuno, T. (2002) His-to-Asp phosphorelay circuitry for regulation of sexual development in *Schizosaccharomyces pombe*. *Biosci Biotechnol Biochem* **66**: 2663-2672.
- Nakamichi, N., Yanada, H., Aiba, H., Aoyama, K., Ohmiya, R., and Mizuno, T. (2003) Characterization of the Prr1 response regulator with special reference to sexual development in *Schizosaccharomyces pombe*. *Biosci Biotechnol Biochem* **67**: 547-555.
- Nayak, T., Szewczyk, E., Oakley, C.E., Osmani, A., Ukil, L., Murray, S.L., Hynes, M.J., Osmani, S.A., and Oakley, B.R. (2006) A versatile and efficient gene-targeting system for *Aspergillus nidulans*. *Genetics* **172**: 1557-1566.
- Nguyen, A.N., Lee, A., Place, W., and Shiozaki, K. (2000) Multistep phosphorelay proteins transmit oxidative stress signals to the fission yeast stress-activated protein kinase. *Mol Biol Cell* **11**: 1169-1181.
- Nohaile, M., Kern, D., Wemmer, D., Stedman, K., and Kustu, S. (1997) Structural and functional analyses of activating amino acid substitutions in the receiver domain of NtrC: evidence for an activating surface. *J Mol Biol* **273**: 299-316.
- Ochiai, N., Fujimura, M., Motoyama, T., Ichiishi, A., Usami, R., Horikoshi, K., and Yamaguchi, I. (2001) Characterization of mutations in the two-component histidine kinase gene that confer fludioxonil resistance and osmotic sensitivity in the os-1 mutants of *Neurospora crassa*. *Pest Manag Sci* **57**: 437-442.
- Ohmiya, R., Kato, C., Yamada, H., Aiba, H., and Mizuno, T. (1999) A fission yeast gene (prr1(+)) that encodes a response regulator implicated in oxidative stress response. *J Biochem* **125**: 1061-1066.
- Ota, I.M., and Varshavsky, A. (1993) A yeast protein similar to bacterial two-component regulators. *Science* **262**: 566-569.

- Parkinson, J.S. (1995) *Genetic Approaches for signaling pathways and proteins*. Washington, DC.: ASM.
- Pena-Sandoval, G.R., Kwon, O., and Georgellis, D. (2005) Requirement of the receiver and phosphotransfer domains of ArcB for efficient dephosphorylation of phosphorylated ArcA in vivo. *J Bacteriol* **187**: 3267-3272.
- Perego, M., and Hoch, J.A. (2002) *Two-component system, phosphorelays and regulation of their activities by phosphatases*. Washington, DC.: American Society for Microbiology Press.
- 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.
- Posas, F., and Saito, H. (1997) Osmotic activation of the HOG MAPK pathway via Ste11p MAPKKK: scaffold role of Pbs2p MAPKK. *Science* **276**: 1702-1705.
- Posas, F., and Saito, H. (1998) Activation of the yeast SSK2 MAP kinase kinase by the SSK1 two-component response regulator. *Embo J* **17**: 1385-1394.
- Posas, F., Chambers, J.R., Heyman, J.A., Hoeffler, J.P., de Nadal, E., and Arino, J. (2000) The transcriptional response of yeast to saline stress. *J Biol Chem* **275**: 17249-17255.
- Proft, M., Pascual-Ahuir, A., de Nadal, E., Arino, J., Serrano, R., and Posas, F. (2001) Regulation of the Sko1 transcriptional repressor by the Hog1 MAP kinase in response to osmotic stress. *Embo J* **20**: 1123-1133.
- Purschwitz, J., Muller, S., Kastner, C., Schoser, M., Haas, H., Espeso, E.A., Atoui, A., Calvo, A.M., and Fischer, R. (2008) Functional and physical interaction of blue- and red-light sensors in *Aspergillus nidulans*. *Curr Biol* **18**: 255-259.
- Purschwitz, J., Muller, S., and Fischer, R. (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.
- Reinders, A., Burckert, N., Boller, T., Wiemken, A., and De Virgilio, C. (1998) *Saccharomyces cerevisiae* cAMP-dependent protein kinase entry into stationary phase through the Rim15p protein kinase. *Genes Dev* **12**: 2943-2955.
- Rodriguez, C., Kwon, O., and Georgellis, D. (2004) Effect of D-lactate on the physiological activity of the ArcB sensor kinase in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **186**: 2085-2090.
- Sanchez, O., Navarro, R.E., and Aguirre, J. (1998) Increased transformation frequency and tagging of developmental genes in *Aspergillus nidulans* by restriction enzyme-mediated integration (REMI). *Mol Gen Genet* **258**: 89-94.
- Schumacher, M.M., Enderlin, C.S., and Selitrennikoff, C.P. (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.
- Singh, P., Chauhan, N., Ghosh, A., Dixon, F., and Calderone, R. (2004) SKN7 of *Candida albicans*: mutant construction and phenotype analysis. *Infect Immun* **72**: 2390-2394.
- Sophianopoulou, V., and Scazzocchio, C. (1989) The proline transport protein of *Aspergillus nidulans* is very similar to amino acid transporters of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol* **3**: 705-714.
- Stock, A.M., Robinson, V.L., and Goudreau, P.N. (2000) Two-component signal transduction. *Annu Rev Biochem* **69**: 183-215.

- Stragier, P., and Losick, R. (1996) Molecular genetics of sporulation in *Bacillus subtilis*. *Annu Rev Genet* **30**: 297-241.
- Tuncher, A., Reinke, H., Martic, G., Caruso, M.L., and Brakhage, A.A. (2004) A basic-region helix-loop-helix protein-encoding gene (*devR*) involved in the development of *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol* **52**: 227-241.
- Vargas-Perez, I., Sanchez, O., Kawasaki, L., Georgellis, D., and Aguirre, J. (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.
- Viaud, M., Fillinger, S., Liu, W., Polepalli, J.S., Le Pecheur, P., Kunduru, A.R., Leroux, P., and Legendre, L. (2006) A class III histidine kinase acts as a novel virulence factor in *Botrytis cinerea*. *Mol Plant Microbe Interact* **19**: 1042-1050.
- Vidan, S., and Mitchell, A.P. (1997) Stimulation of yeast meiotic gene expression by the glucose-repressible protein kinase Rim15p. *Mol Cell Biol* **17**: 2688-2697.
- Virginia, M., Appleyard, C.L., McPheat, W.L., and Stark, M.J. (2000) A novel 'two-component' protein containing histidine kinase and response regulator domains required for sporulation in *Aspergillus nidulans*. *Curr Genet* **37**: 364-372.
- Waldburger, C.D., and Sauer, R.T. (1996) Signal detection by the PhoQ sensor-transmitter. Characterization of the sensor domain and a response-impaired mutant that identifies ligand-binding determinants. *J Biol Chem* **271**: 26630-26636.
- Wanke, V., Pedruzzi, I., Cameroni, E., Dubouloz, F., and De Virgilio, C. (2005) Regulation of G0 entry by the Pho80-Pho85 cyclin-CDK complex. *Embo J* **24**: 4271-4278.
- West, A.H., and Stock, A.M. (2001) Histidine kinases and response regulator proteins in two-component signaling systems. *Trends Biochem Sci* **26**: 369-376.
- Yelton, M.M., Hamer, J.E., and Timberlake, W.E. (1984) Transformation of *Aspergillus nidulans* by using a *trpC* plasmid. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**: 1470-1474.
- Yoshimi, A., Tsuda, M., and Tanaka, C. (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.
- Yoshimi, A., Kojima, K., Takano, Y., and Tanaka, C. (2005) Group III histidine kinase is a positive regulator of Hog1-type mitogen-activated protein kinase in filamentous fungi. *Eukaryot Cell* **4**: 1820-1828.
- Yu, J.H., Hamari, Z., Han, K.H., Seo, J.A., Reyes-Dominguez, Y., and Scazzocchio, C. (2004) Double-joint PCR: a PCR-based molecular tool for gene manipulations in filamentous fungi. *Fungal Genet Biol* **41**: 973-981.
- Zhang, Y., Lamm, R., Pillonel, C., Lam, S., and Xu, J.R. (2002) Osmoregulation and fungicide resistance: the *Neurospora crassa* *os-2* gene encodes a HOG1 mitogen-activated protein kinase homologue. *Appl Environ Microbiol* **68**: 532-538.