

R.

UNIVERSIDAD DE SEVILLA  
SECRETARIA GENERAL

T.S.  
584

Queda registrada esta Tesis Doctoral  
al folio 190 número 29 del libro  
correspondiente.

Sevilla, 20 ENE. 1988

El Jefe del Negociado de Tesis,

*E. de Joffe*

R. 9390



REGULACION DE LA BIOSINTESIS DE CAROTENOS  
DE PHYCOMYCES BLAKESLEEANUS

Trabajo realizado en el Departamento de Genética, Facultad de  
Biología, Universidad de Sevilla, para optar al grado de Doctor  
en Biología, por el Licenciado

EDUARDO RODRIGUEZ BEJARANO

Sevilla, 20 de enero de 1988

Director y ponente

*E. Cerdá Olmedo*

Prof. Enrique Cerdá Olmedo  
Catedrático de Genética de la  
Universidad de Sevilla



A mis padres por  
hacer posible mi  
deseo.

## INDICE

RESUMEN Y CONCLUSIONES .....	6
INTRODUCCION .....	9
EL ORGANISMO .....	10
Ciclos de vida .....	10
Ciclo asexual .....	10
Ciclo sexual .....	12
TERPENOIDES .....	12
CAROTENOIDES .....	13
Biosíntesis .....	13
Síntesis del fitoeno .....	14
Interconversiones de los carotenos .....	15
Análisis genético de la carotenogénesis .....	18
Mutantes de genes estructurales .....	18
Inhibidores .....	22
Carotenogénesis "in vitro" .....	23
Regulación .....	24
Mutantes de genes regulatorios .....	24
Activación química .....	27
Mutantes quimioinsensibles .....	28
Fotocarotenogénesis .....	29
Fotorreceptor .....	30
Mecanismo y niveles de regulación .....	30
Mutantes de la fotocarotenogénesis .....	32
Localización cromosómica de los genes de la carotenogénesis .....	32
ESTEROLES .....	34
Biosíntesis .....	34

MATERIAL Y METODOS .....	37
ESTIRPES .....	37
METODOS DE CULTIVO .....	40
Medios de cultivo .....	40
Condiciones de cultivo .....	40
Iluminación .....	41
MUTAGENESIS .....	41
ANALISIS DE CAROTENOS .....	41
Extracción .....	41
Separación cromatográfica .....	42
Identificación y cuantificación .....	43
ANALISIS DEL ERGOSTEROL .....	43
Extracción .....	43
Separación cromatográfica .....	43
Identificación y cuantificación .....	44
ANALISIS DE LA GLUCOSA .....	45
ANALISIS DEL RETINOL .....	46
MARCADO RADIATIVO .....	46
Separación de las fracciones radiactivas .....	46
Cuantificación de la radiactividad .....	47
RESULTADOS Y DISCUSION .....	48
ESTIMULACION DE LA CAROTENOGENESIS .....	48
Activación química .....	48
Estimulación química de los mutantes <u>car</u> .....	52
Efecto conjunto del retinol y el ftalato de dimetilo .....	56
Fotocarotenogénesis .....	58
Fotocarotenogénesis de la estirpe silvestre .....	58
Fotocarotenogénesis de los mutantes <u>car</u> .....	64
Efecto conjunto de la luz con el ftalato de dimetilo y el sexo .....	68
Correlación entre la síntesis de carotenos y esteroles .....	70
Papel del anabolismo y el catabolismo en la regulación .....	72

INHIBICION DE LA CAROTENOGENESIS .....	76
Inhibición química de la deshidrogenasa del fitoeno .....	76
Inhibición química de los mutantes <u>car</u> .....	78
Efecto conjunto de la luz y los inhibidores químicos .....	80
Un mutante verde .....	81
Análisis de carotenos .....	81
Efecto de la luz y reguladores químicos .....	82
Análisis por complementación .....	83
Búsqueda de nuevos mutantes .....	85
Naturaleza del mutante verde .....	87
 DISCUSION GENERAL .....	 88
Mecanismos de regulación de la carotenogénesis ..	88
Regulación por producto final .....	89
Mecanismo de la activación química .....	91
Mecanismo de activación de los inhibidores .....	93
Mecanismo de la activación por luz .....	94
Comentarios finales .....	97
 BIBLIOGRAFIA .....	 98
 AGRADECIMIENTOS .....	 105

## RESUMEN Y CONCLUSIONES

La biosíntesis de carotenoides en el hongo Phycomyces blakesleeanus está regulada por factores internos y externos (luz, sexo, ciertos compuestos químicos). En esta Tesis se describe el efecto de varios de estos factores externos sobre la síntesis de carotenos y esteroides. Se ha desarrollado un nuevo criterio genético que permite determinar si las estimulaciones producidas por los distintos agentes comparten los mismos mecanismos de acción. También se ha aislado y caracterizado bioquímica y genéticamente un mutante de la carotenogénesis de un nuevo tipo. A la luz de los resultados obtenidos se concluye que:

1. Existen al menos dos mecanismos de activación química, representados por el ftalato de dimetilo y el retinol. Los otros fenoles estudiados activan la carotenogénesis por el mismo mecanismo que el ftalato de dimetilo. La activación de la carotenogénesis por todos los agentes químicos depende de la función del gen carI.

2. La carotenogénesis se regula mediante un mecanismo de retroinhibición mediado por el producto del gen carS y el beta-caroteno. El retinol activa la carotenogénesis mediante el bloqueo de este mecanismo.

3. La difenilamina, además de inhibir la deshidrogenasa del fitoeno, produce una activación global de la síntesis de caroteno debido a la carencia de beta-caroteno que impide la retroinhibición de la ruta. Por el contrario, otro inbidor de la deshidrogenasa del fitoeno, el alcohol cinámico, activa la ruta por si mismo mediante el mismo mecanismo de estimulación que el ftalato de dimetilo.

4. La fotoestimulación de la carotenogénesis sólo se produce durante un cierto periodo del crecimiento. Al igual que las demás respuestas de Phycomyces a la luz, la activación debida a la luz es la suma de dos componentes que responden a distintos flujos luminosos.

5. Existen cuatro mecanismos independientes de activación representados por el retinol, el ftalato de dimetilo, el sexo y la luz.

6. La función génica carRA es esencial para la biosíntesis de caroteno en Phycomyces. La carotenogénesis de los mutantes carentes de esta función no se estimula por ninguna de las activaciones conocidas.

7. El metabolismo del beta-caroteno es insignificante tanto en el tipo silvestre como en un mutante carS. El incremento en la acumulación de beta-caroteno de los mutantes superproductores del gen carS no se debe a la ausencia de degradación o transformación del beta-caroteno, sino a una síntesis más activa del mismo.

8. Las variaciones de la carotenogénesis debidas a mutación o a estimulaciones externas no van acompañadas de las modificaciones correlativas en la acumulación de esteroides. Este resultado sugiere la regulación independiente de las rutas metabólicas correspondientes.

9. La carotenogénesis y la esterogénesis ocurren en distintos compartimentos celulares. La ausencia del producto del gen carS conlleva un aumento en la síntesis de mevalonato dedicado exclusivamente a la producción de beta-caroteno.

10. Se propone un modelo para explicar la regulación por producto final y por la luz en el cual los productos de los genes carA y carS juegan el papel central.

11. El fenotipo de la estirpe S442 no se debe a la alteración de una deshidrogenasa específica para el zeta-caroteno, sino a una mutación poco frecuente del gen carB, responsable de las cuatro deshidrogenaciones que convierten el fitoeno en licopeno.

## INTRODUCCION

Cuando acerqué mi ojo por primera vez al ocular de un microscopio, la visión que tuve me confundió. A mí, como a otros muchos niños, aquella experiencia me llenó en un primer momento de asombro y posteriormente de curiosidad. Durante algún tiempo mi obsesión fue colocar bajo el objetivo todo aquello que caía en mis manos especialmente si provenía de algún charco viejo y sucio. Me maravillaba la enorme cantidad de pequeñas cosas que aparecían "por arte de magia", moviéndose ininterrumpidamente hasta que la gota de agua se secaba. ¿Por qué estaban allí?, ¿por qué se movían?, ¿de qué se alimentaban?. Estas y otras muchas preguntas parecidas comenzaron a rondar en mi cabeza y me fueron introduciendo en el mundo de la Biología. Según fueron pasando los años mi interés por todo lo vivo fué en aumento y en especial por conocer las causas del comportamiento de los distintos organismos. Esta ha sido la razón principal que me llevó al estudio de la regulación de las funciones celulares que, sin duda, constituye uno de los campos de investigación más interesantes de la Biología actual.

Phycomyces blakesleeanus responde al modelo de organismo eucariótico idóneo para estudiar la regulación debido a su fácil manejo en el laboratorio. Además Phycomyces tiene un atractivo adicional para este tipo de investigaciones ya que presenta un comportamiento sensorial muy variado. Sus respuestas sensoriales, la biosíntesis de carotenos, el desarrollo sexual y la diferenciación, han sido los principales focos de interés para los investigadores durante los últimos 30 años. Los resultados obtenidos en estos estudios indican que Phycomyces es un organismo ideal para el desarrollo del conocimiento sobre la regulación en eucariotas.

## EL ORGANISMO

Phycomyces blakesleeanus es un hongo filamentoso y saprofito clasificado en la familia Mucoraceae, orden Mucorales y clase Cigomicetos. Todos sus aspectos biológicos han sido objeto recientemente de una amplia revisión (Cerdá-Olmedo y Lipson, 1987a).

### Ciclos de vida

Phycomyces presenta en el laboratorio dos ciclos de vida, uno asexual o vegetativo y otro sexual (Fig. 1).

#### Ciclo asexual

El ciclo de vida asexual incluye los estados de espora y de micelio. Las esporas de la estirpe silvestre NRRL1555 son de forma elipsoidal con un tamaño medio de 9  $\mu\text{m}$  de largo por 6  $\mu\text{m}$  de ancho. Contienen de 1 y 6 núcleos, aunque más del 80% son tri o tetranucleadas. Menos del 3% de las esporas inoculadas en medio mínimo germinan espontáneamente. Un breve choque térmico (Van Laere et al., 1980) o la exposición a determinados productos químicos (Van Laere et al., 1987) aseguran la germinación de la mayoría de las esporas. Tras la germinación las esporas producen un micelio de hifas cilíndricas multinucleadas y no tabicadas.

En medio sólido este micelio crece radialmente a razón de 2 cm diarios. A los tres días de crecimiento comienza a emitir hifas aéreas no ramificadas denominadas esporangióforos en cuyo extremo distal se forma una estructura esférica, el esporangio, que contiene aproximadamente  $10^5$  esporas (Cerdá-Olmedo y Lipson, 1987b). Estas esporas son liberadas al romperse la pared del esporangio cuando este tropieza con alguna superficie.

Los esporangióforos de Phycomyces han sido objeto de numerosos estudios por presentar una serie de tropismos y mecismos muy llamativos frente diversos estímulos externos.

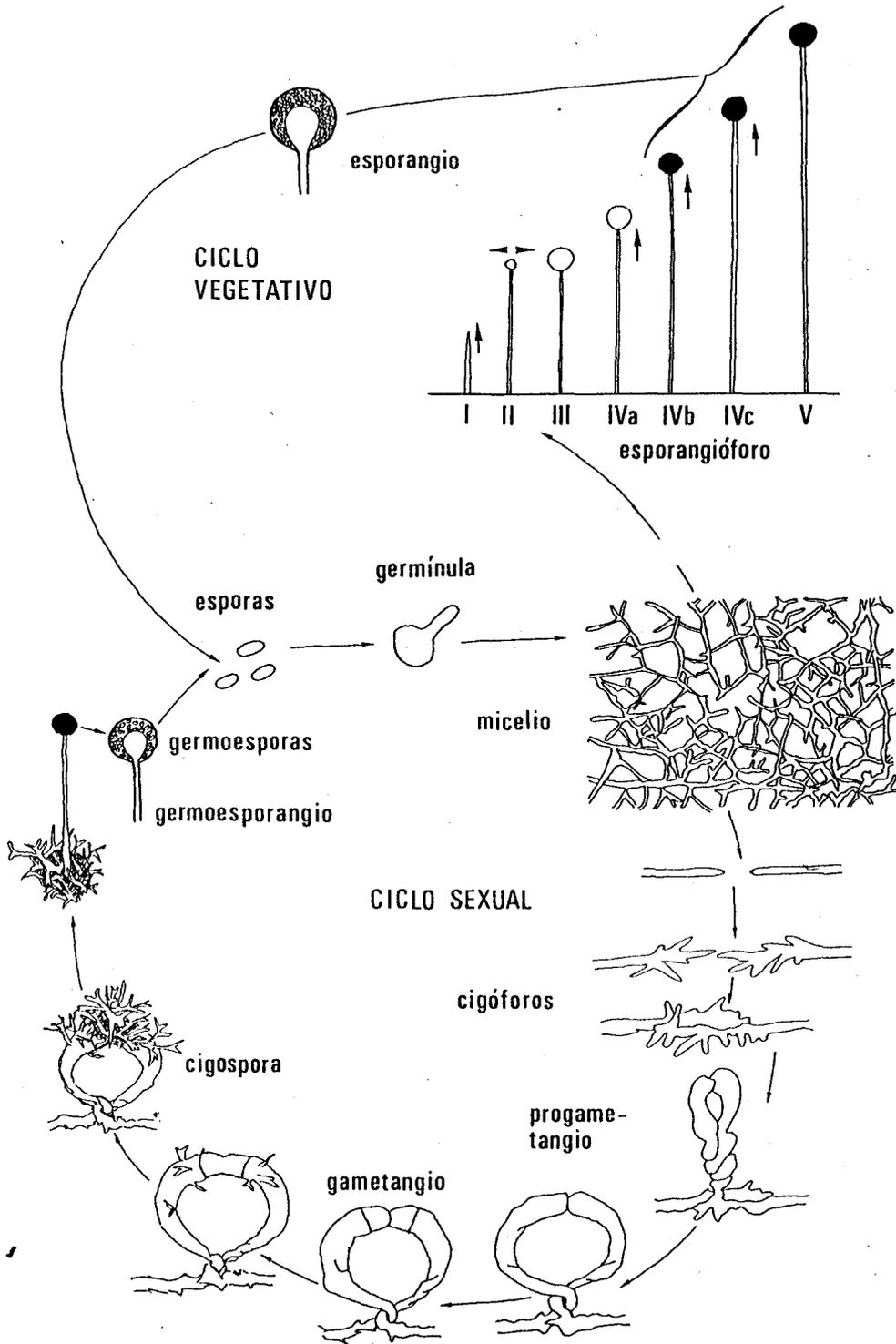


Figura 1. Ciclo asexual y sexual de *Phycomyces*. En la figura se muestran las distintas etapas del desarrollo de los esporangioforos, y de la formación de la cigospora (Cerdá-Olmedo y Lipson, 1987b).

## Ciclo sexual

P. blakesleeanus es una especie heterotálica cuyas estirpes se clasifican en dos tipos sexuales, denominados (+) y (-) morfológicamente idénticos (Blakeslee, 1904). El sexo de una estirpe, se reconoce por la ausencia o presencia de reacción sexual con estirpes patrón.

El desarrollo completo del ciclo sexual da lugar a una estructura muy característica denominada cigospora. Trás dos o tres meses de latencia la cigospora produce un esporangióforo (llamado germoesporangióforo), cuyo germoesporangio contiene aproximadamente  $10^3$  germoesporas. Las germoesporas se parecen mucho a las esporas del ciclo asexual y, generalmente, presentan de dos a cuatro núcleos. En condiciones apropiadas germinan dando lugar a un micelio vegetativo, que normalmente suele ser homocariótico, aunque a veces se forma un micelio heterocariótico.

Los micelios portadores de núcleos de los dos sexos (heterocarionte intersexual) tienen un aspecto muy diferente al descrito anteriormente para los micelios vegetativos. Carecen casi totalmente de esporangióforos, son de color amarillo más intenso que los parentales y están cubiertos de una hifas aéreas, engrosadas y retorcidas, denominadas pseudóforos (Blakeslee, 1906) que no se encuentran en micelios homocarióticos. A pesar de la presencia de núcleos de sexo opuesto, estos micelios no forman cigosporas.

## TERPENOIDES

Se denominan terpenos a un conjunto de compuestos químicos cuyas moléculas se pueden considerar constituidas por subunidades idénticas de cinco átomos de carbono (isopreno). El nombre de terpenoides agrupa a los terpenos y sus derivados. En la naturaleza existen miles de terpenoides cuyos tamaños y funciones son muy variados, sirvan de ejemplo compuestos tan

diferentes como el mentol, el colesterol, el beta-caroteno, el retinol y el caucho.

## CAROTENOIDES

Los carotenoides constituyen el grupo más extendido de pigmentos en la naturaleza responsables del color de muchos animales y plantas. Se encuentran en todos los organismos fotosintéticos, ciertos hongos y algunas bacterias no fotosintéticas. Los animales son incapaces de sintetizarlos y han de tomarlos en su dieta. Su interés biológico, industrial y estético los ha convertido en objeto de numerosos estudios sobre los que existen varias revisiones (Isler, 1971; Goodwin, 1980; Ruddat y Garber, 1983).

Químicamente son terpenoides generalmente de 40 átomos de carbono y cuya principal característica estructural es la presencia de una larga cadena con un número variable (3-15) de dobles enlaces conjugados. Dentro de los carotenoides se distinguen: los carotenos, compuestos sólo de carbono e hidrógeno, y las xantinas que contienen además oxígeno.

Phycomyces contiene principalmente beta-caroteno (más del 95%) y pequeñas cantidades de otros carotenos pero carece por completo de xantinas.

## Biosíntesis

La información existente sobre la biosíntesis de carotenoides, y en general de todos los terpenoides, es escasa si la comparamos con las demás rutas biosintéticas. Se conoce la secuencia de reacciones pero el estudio de su regulación se encuentra en un estado muy primitivo. El estudio bioquímico de la carotenogénesis ha presentado graves problemas debido a la inestabilidad química y a la naturaleza hidrofóbica de los carotenos. Durante casi treinta años las técnicas cromatográficas y el empleo de inhibidores de la ruta han sido las

herramientas más utilizadas. En los últimos diez años se han desarrollado, además, buenos sistemas "in vitro" con algunos organismos (Aphanocapsa, Neurospora y Phycomyces) (Bramley, 1985) que están aportando una gran cantidad de información. En algunas plantas y sobre todo en hongos filamentosos (Neurospora crassa, Ustilago violacea, Gibberella fujikuroi y Phycomyces blakesleeanus) la obtención de mutantes, y su posterior estudio bioquímico y genético, ha sido y es la otra gran herramienta utilizada. Este enfoque genético ha hecho avanzar enormemente el conocimiento tanto de la estructura como de la regulación de la carotenogénesis.

La ruta de biosíntesis de carotenos generalmente aceptada en Phycomyces y en otros organismos se representa en las Figuras 2 y 3. Para su descripción es conveniente separarla en dos bloques. El primero comprende todas las reacciones que ocurren hasta la formación del fitoeno; en él se producen los intermediarios de los que derivan todos los terpenoides (Fig. 2). Un segundo bloque abarca las reacciones específicas que conducen a la síntesis de beta-caroteno.

#### Síntesis del fitoeno

El punto de partida de la ruta es la 3-hidroximetilglutaril-CoA que se sintetiza por varias rutas a partir de acetato y de otros compuestos. La 3-hidroximetilglutaril-CoA es reducida a ácido mevalónico. Mediante una secuencia de tres reacciones consecutivas (dos fosforilaciones y una descarboxilación) el ácido mevalónico es convertido en isopentenilpirofosfato que por isomerización da lugar a dimetilalilpirofosfato. Por condensación de una molécula de cada uno de estos isómeros se forma geraniol-pirofosfato. Posteriores condensaciones de isopentenilpirofosfato dan lugar al farnesilpirofosfato y al geranilgeraniol-pirofosfato. Estas reacciones de condensación están catalizadas por transferasas de prenilo cuyo número y actividad catalítica varía de un

organismo a otro (Rilling, 1985). En Phycomyces se ha purificado una sola transferasa de prenilo que cataliza las reacciones hasta la formación de farnesil-pirofosfato, pero es incapaz de formar geranilgeraniol-pirofosfato (Rilling, 1985).

La condensación de dos moléculas de geranilgeraniol-pirofosfato da lugar al primer caroteno, el fitoeno, a través de un intermediario muy inestable, el prefitoeno-pirofosfato.

En todos los organismos estudiados, las enzimas necesarias para la síntesis de geranilgeraniol-pirofosfato a partir de ácido mevalónico se encuentran en la fracción soluble. Por el contrario la sintetasa de fitoeno que cataliza la conversión de prefitoeno en fitoeno, puede localizarse en el citoplasma como en el caso de Mycobacterium (Gregonis y Rilling, 1974), Halobacterium (Kushwaha et al., 1976) y Flavobacterium (Britton et al., 1980), o asociada a membranas como ocurre en el caso de Neurospora crassa (Mitzka-Schnabel y Rau, 1981).

#### Interconversiones de los carotenos

El isómero de fitoeno producido no es el mismo en todos los organismos. Phycomyces (Than et al., 1972; De la Concha et al., 1983) y Neurospora (Than et al., 1972) sintetizan fitoeno 15-cis, mientras que Mycobacterium (Gregonis y Rilling, 1974) y Halobacterium (Kushawa et al., 1976) sintetizan fitoeno todo-trans. En Phycomyces el producto final de la ruta es beta-caroteno todo-trans, lo que implica que debe existir una isomerización entre el fitoeno y el beta-caroteno. El paso en el que se produce este proceso no es el mismo en todos los organismos. En Phycomyces (De la Concha et al., 1983) existen indicios de que ocurre a nivel de fitoeno.

Todos los carotenoides se forman a partir del fitoeno mediante diversas reacciones (deshidrogenaciones, ciclaciones, oxigenaciones, etc). En la Fig 3 se esquematiza la secuencia de reacciones que convierten al fitoeno en beta-caroteno

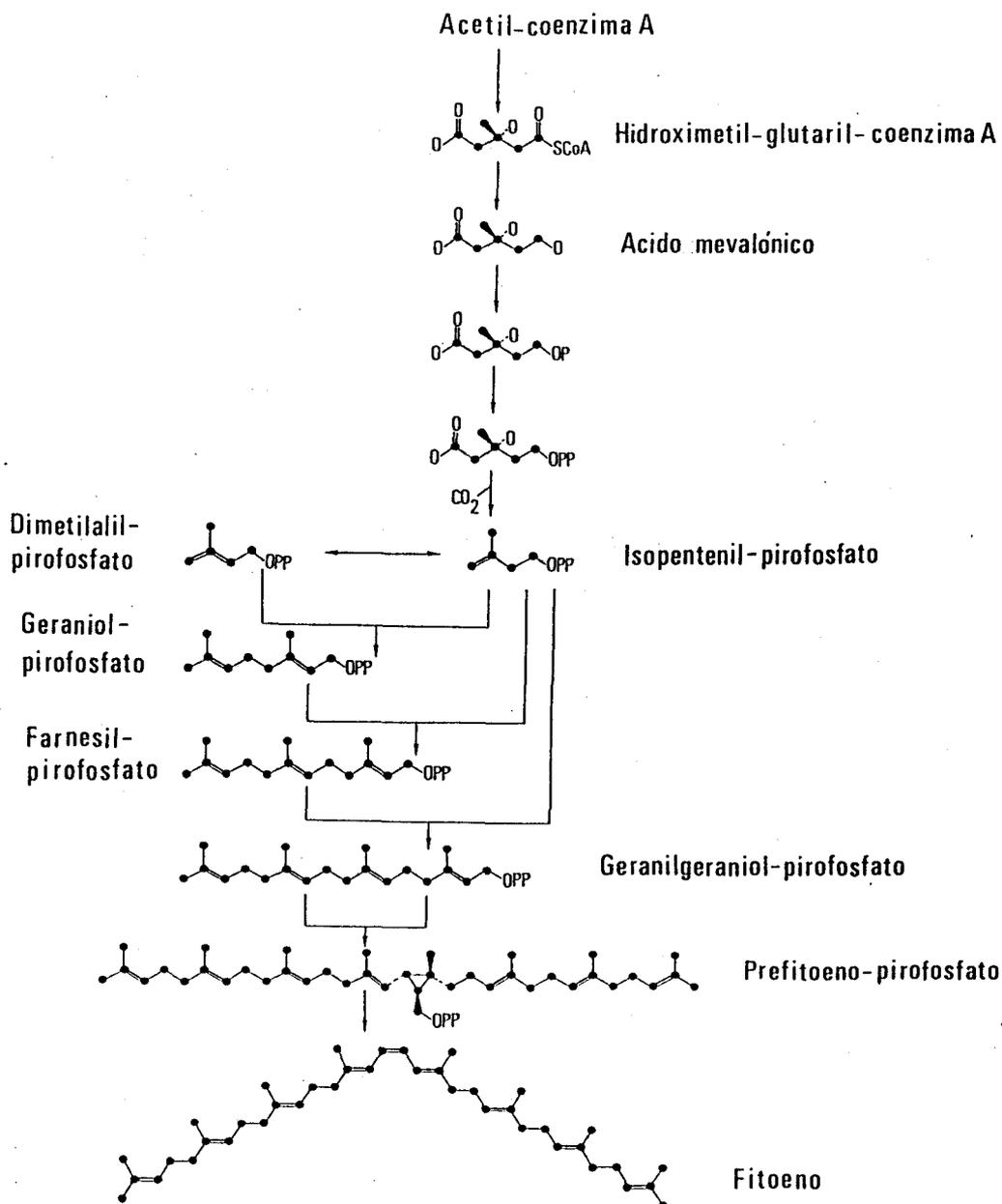


Figura 2. Biosíntesis del fitoeno a partir de la 3-hidroxi-metilglutaril-CoA. En esta figura y las siguientes se han representado los átomos de carbono con círculos negros y se han suprimido los átomos de hidrógeno.

según la propuesta de Porter y Lincoln (1950). Cuatro deshidrogenaciones sucesivas convierten el fitoeno en licopeno, el cual mediante dos ciclaciones consecutivas da lugar a beta-caroteno.

Con excepción de Halobacterium cutirubrum (Kushwaha et al., 1976), en el que estas reacciones se realizan en el citoplasma, la conversión de fitoeno en beta-caroteno tiene lugar en las membranas (Bramley, 1985). Este es el caso de Phycomyces, cuyas enzimas se encuentran en las membranas del retículo endoplásmico y de una serie de gotas lipídicas (Riley y Bramley, 1982), aunque en este último caso podría tratarse de un artefacto experimental.

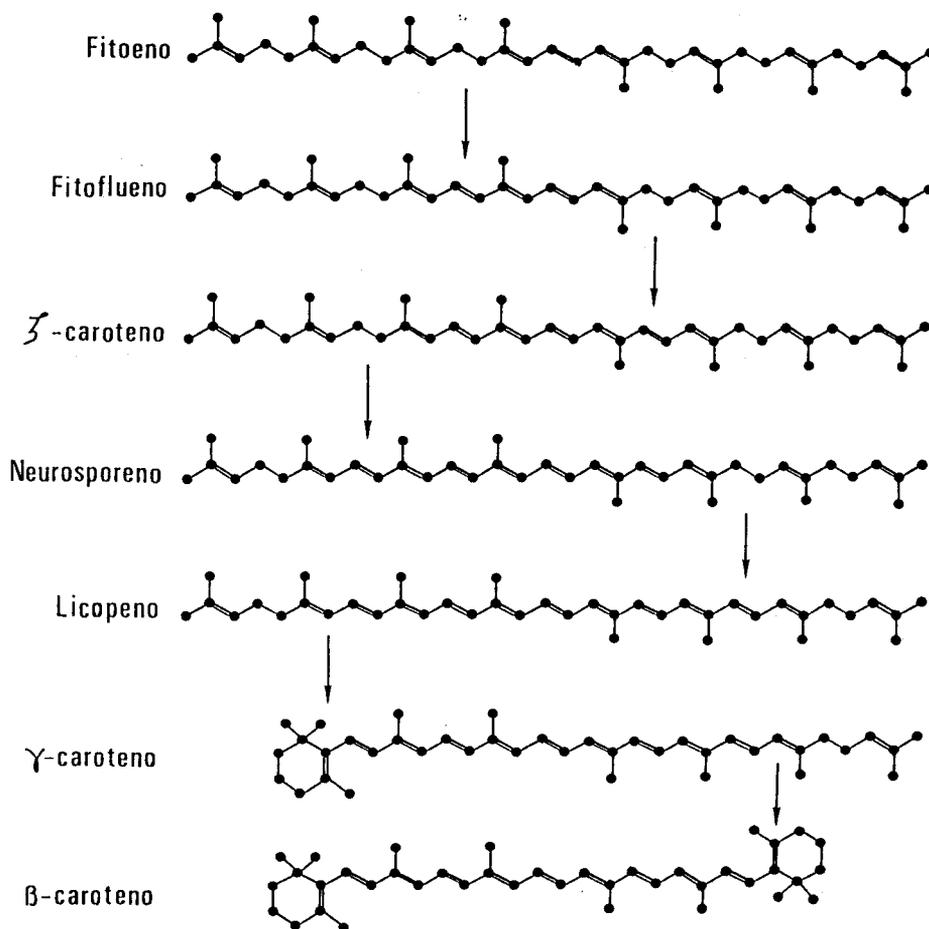


Figura 3. Conversión del fitoeno en beta-caroteno.

## Análisis genético de la ruta

Como ya hemos mencionado anteriormente, el estudio genético de la carotenogénesis ha proporcionado gran cantidad de datos acerca de la ruta biosintética y su regulación. Básicamente este enfoque consiste en la obtención y caracterización de mutantes afectados en los genes responsables de las enzimas carotenogénicas, de su expresión o de su regulación. Phycomyces es el organismo en el que se han utilizado más intensamente estas técnicas (Cerdá-Olmedo, 1987).

Los primeros mutantes de la carotenogénesis en Phycomyces fueron aislados por M. Heisenberg en 1968 (Heisenberg y Cerdá-Olmedo, 1968). Su detección es muy fácil debido al cambio de color que suelen presentar y, básicamente, pueden estar afectados en funciones estructurales y en funciones reguladoras. Estos dos tipos de mutantes pueden distinguirse a veces muy fácilmente, como ocurre en Neurospora crassa (Harding y Shropshire, 1980), pero en general se requiere un estudio bioquímico, genético y fisiológico más profundo.

## Mutantes de genes estructurales

Hasta la fecha se han identificado sólo dos tipos de mutaciones que afectan a funciones estructurales.

Un grupo de estos mutantes son albinos y se caracterizan por acumular grandes cantidades de fitoeno (2-3 mg por g de peso seco) (Meissner y Delbrück, 1968). Todos ellos pertenecen a un mismo grupo de complementación (Ootaki et al., 1973) que define el gen carB. Otro grupo está formado por mutantes rojos debido a que acumulan licopeno (2-3 mg por g de peso seco) (Meissner y Delbrück, 1968). Estos mutantes complementan con los mutantes carB pero no entre ellos por lo que se asignan a otro gen denominado carR (Ootaki et al., 1973). Estudios posteriores (Torres-Martínez et al., 1980) demostraron que carR es una parte del gen bifuncional carRA.

Los extractos celulares de los mutantes carB y carR son incapaces de llevar a cabo, respectivamente, la deshidrogenación del fitoeno y la ciclación del licopeno (Lee y Chichester, 1969; Clarke et al., 1983)

La ausencia de mutantes alterados en los pasos anteriores a la formación del fitoeno puede ser explicada teniendo en cuenta que los esteroides son compuestos esenciales de la membrana celular. Las mutaciones que afectaran a las enzimas previas a la formación de farnesil-pirofosfato serían letales. La adición de un residuo de prenilo al farnesil-pirofosfato para la síntesis de geranylgeraniol-pirofosfato podría llevarse a cabo por la misma transferasa de prenilo responsable de las reacciones anteriores, tal y como ocurre en Saccharomyces cerevisiae (Beytia y Porter, 1976). Sin embargo, no parece ser este el caso de Phycomyces ya que, "in vitro", las enzimas que sintetizan el farnesil-pirofosfato son incapaces de sintetizar geranylgeraniol-pirofosfato (Rilling, 1985).

Especial interés se ha puesto en la búsqueda de mutantes de la hipotética isomerasa del fitoeno. Los mutantes carB acumulan "in vivo" el isómero 15-cis del fitoeno (Than et al., 1972), e "in vitro" el isómero todo-trans (De la Concha, 1983). Los extractos celulares de la estirpe silvestre cultivada en presencia de difenilamina también producen el isómero todo-trans (Clarke et al., 1983). Por tanto, la deshidrogenasa del fitoeno no debe de ser la encargada de tal isomerización, lo que sugiere la existencia de una isomerasa que convierta el fitoeno 15-cis en todo-trans. La búsqueda de mutantes albinos que acumulen principalmente el isómero todo-trans del fitoeno ha sido infructuosa. Es posible que la isomerasa forme parte del complejo multienzimático que transforma el fitoeno en licopeno de manera que "in vivo" la isomerización y deshidrogenación estén estrechamente acoplados. "In vitro" la isomerasa se liberaría del complejo quedando en condiciones de actuar sobre el fitoeno sin que se requiera su posterior deshidrogenación (De la Concha, 1983).

Tampoco se han encontrado mutantes de Phycomyces que

acumulen, como caroteno mayoritario, ningún intermedario de la deshidrogenación del fitoeno o de la ciclación del licopeno. La explicación más simple para la ausencia de estos mutantes es que todas las reacciones están catalizadas por sólo dos enzimas. Una de ellas, producto del gen carB, catalizaría las cuatro deshidrogenaciones que convierten el fitoeno en licopeno. La otra, producto del gen carR, catalizaría las dos ciclaciones que transforman el licopeno en beta-caroteno. Apoyan esta hipótesis el análisis cuantitativo de los carotenos acumulados en mutantes carB rezumantes (Eslava y Cerdá-Olmedo, 1974) y del tipo silvestre cultivado en presencia de difenilamina (Olson y Knizley, 1962) o nicotina (Batra et al., 1973).

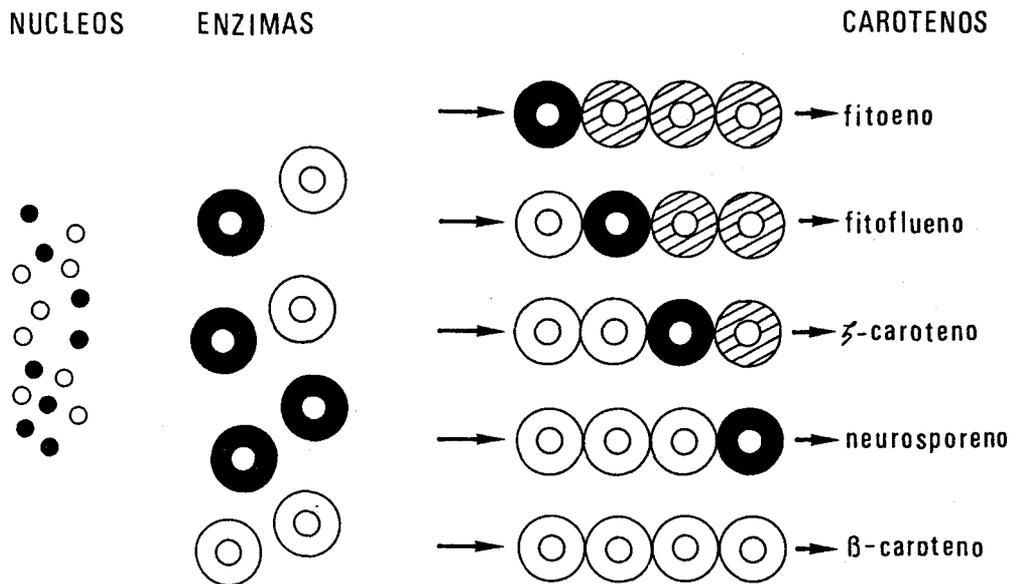


Figura 4. Combinaciones posibles de los complejos multienzimáticos formados en un heterocariote con núcleos de un mutante carB y del tipo silvestre. Los símbolos blancos representan enzimas activas, producto del alelo silvestre del gen carB. Los símbolos negros representan la deshidrogenasa no funcional producto del alelo mutante del gen carB. Los símbolos rayados, indistintamente uno u otro. Si ambos productos son transcritos, traducidos y tienen la misma probabilidad de integrarse en el complejo enzimático, la proporción de enzimas activas en el complejo es la misma que la proporción de los núcleos silvestres en el heterocariote. La cantidad relativa de los carotenos intermedarios acumulados en un heterocariote depende del porcentaje de núcleos, si el caroteno liberado de un complejo no es readmitido por otro complejo (Aragón et al., 1976).

La mejor prueba de esta hipótesis procede de los análisis cuantitativos de heterocariontes que contienen núcleos silvestres y núcleos portadores de la mutación carB (Fig 4). Estos análisis permiten, además, proponer la existencia de un complejo multienzimático formado por cuatro copias del producto del gen carB que catalizaría en forma secuencial la formación de licopeno a partir de fitoeno (Aragón et al., 1976).

Anteriormente, De la Guardia et al. (1971) ya había propuesto la existencia de un agregado carotenogénico formado por dos copias de la ciclase codificada por el gen carR que catalizaría la conversión de licopeno en beta-caroteno (Fig. 5).

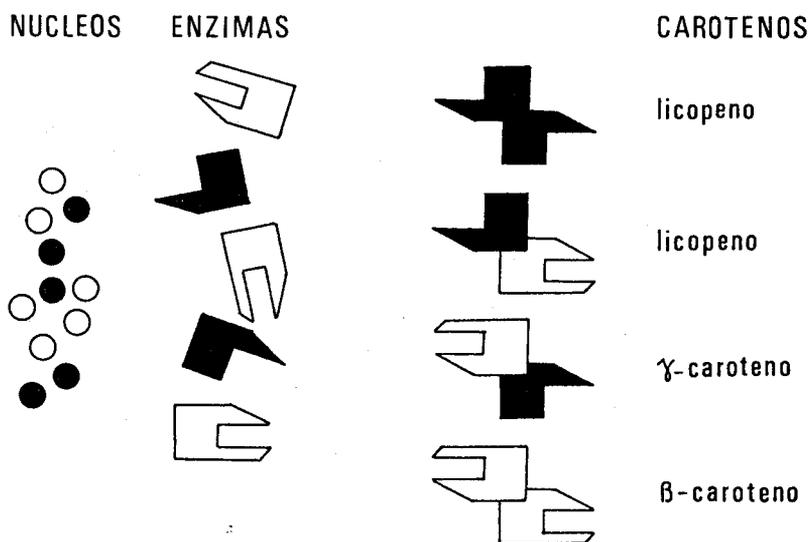


Figura 5. Combinaciones posibles de los complejos multienzimáticos formados en un heterocarionte con núcleos de un mutante carR y del tipo silvestre. Los símbolos blancos representan enzimas activas, producto del alelo silvestre del gen carR. Los símbolos negros representan la ciclase no funcional producto del alelo mutante del gen carR. Si ambos productos son transcritos, traducidos y tienen la misma probabilidad de integrarse en el complejo enzimático, la proporción de enzimas activas en el complejo es la misma que la proporción de los núcleos silvestres en el heterocarionte. La cantidad relativa de los carotenos intermediarios acumulados en un heterocarionte depende del porcentaje de núcleos si el caroteno liberado de un complejo no es readmitido por otro complejo (De la Guardia et al., 1971).

Los complejos multienzimáticos no son infrecuentes en hongos. Tales complejos permiten la compartimentación y la canalización de los sustratos en presencia de varias enzimas con actividades catalíticas semejantes (Fink, 1971). En el caso particular de la síntesis de carotenoides, algunos de cuyos sustratos no son hidrosolubles, la existencia de un complejo multienzimático haría más eficaz la biosíntesis al asegurar el flujo de sustratos, tal y como ocurre en la biosíntesis de ácidos grasos.

### Inhibidores

Basicamente se puede inhibir la ruta a cuatro niveles: 1) formación del ácido mevalónico, 2) conversión del ácido mevalónico en fitoeno, 3) deshidrogenación del fitoeno y 4) ciclación del licopeno.

La mevinolina (Alberts et al., 1980) bloquea la síntesis de ácido mevalónico en Phycomyces actuando como inhibidor competitivo de la reductasa de 3-hidroximetilglutaril-CoA. La adición de este compuesto al medio de cultivo es letal, presumiblemente porque conlleva la ausencia de esteroides. La adición de mevalonato al medio de cultivo restituye el crecimiento (nuestros resultados, no publicados).

Ciertos herbicidas como la norfluorazona y la 4-cloro-5(metilamino)-2-(3-trifluorometilfenil)piradacina-3(2H)ona inhiben la carotenogénesis en Phycomyces sin que se produzca acumulación de carotenos intermediarios (Sandmann et al., 1980a; Sandmann y Boger, 1983). Estudios "in vitro" demostraron que la norfluorazona inhibe a la sintetasa del fitoeno (Sandmann et al., 1980b).

La difenilamina (Goodwin, 1952; Goodwin 1980; Spurgeon y Porter, 1983) es un inhibidor universal de las reacciones de deshidrogenación que convierten el fitoeno en licopeno. En su presencia el micelio de Phycomyces acumula en orden decreciente de concentración, fitoeno, fitoflueno, zeta-caroteno y

neurosporeno (Olson y Knizley, 1962; Lee et al., 1975; Sandmann y Hilgenberg, 1980). Este efecto se mantiene "in vitro" (Clarke et al., 1983) lo que sugiere que la difenilamina actúa directamente o indirectamente sobre la actividad de la deshidrogenasa y no sobre la síntesis de enzimas. Su efecto es reversible, cuando se retira del medio se produce un aumento en la síntesis de los carotenos más insaturados a expensas de los intermediarios acumulados (Clarke et al., 1983).

La delta-2-metilheptanona-6 (Mackinney et al., 1956; Nakayama et al., 1957) tiene en Phycomyces el mismo efecto que la difenilamina. Recientemente se han descrito una serie de compuestos aromáticos (alcohol cinámico, veratrol, 1-2-dimetoxi-4-propenilbeneceno, ftalato de dimetilo, timol, etc) que parecen inhibir también la deshidrogenación del fitoeno en Phycomyces (Cerdá-Olmedo y Hüttermann, 1986).

Otra serie de compuestos provocan la acumulación de gamma-caroteno y principalmente de licopeno al bloquear las ciclaciones que convierten el beta-caroteno en licopeno. Entre los estudiados en Phycomyces destacan el 2-(4-clorofeniltio) trietilamina (CFTA) (Coggins et al. 1970; Elahi et al. 1973, 1975; Murillo et al. 1980a) y la nicotina (Davies, 1973).

### Carotenogénesis "in vitro"

El estudio de la carotenogénesis "in vitro" de Phycomyces resulta problemático debido a la naturaleza hidrofóbica de los carotenos. Esto, ha impedido su utilización como sustrato en preparaciones enzimáticas acuosas, por lo que ha sido necesario emplear, como sustratos radioactivos, precursores muy tempranos. Dado que estos precursores también lo son de los esteroides y otros terpenoides, las muestras han de ser sometidas a purificación posterior y la eficacia global de la síntesis de carotenos "in vitro" es baja. Además, no se ha podido purificar aún la mayoría de las enzimas de la ruta, aunque ya se ha conseguido solubilizar, sin que pierdan su

actividad, las que convierten el fitoeno en beta-caroteno (Bramley y Taylor, 1985).

La presencia de fitoeno, fitoflueno, zeta-caroteno, neurosporeno, licopeno y gamma-caroteno (Lee y Chichester, 1969; Bramley y Davies, 1975); la conversión de intermediarios en beta-caroteno (Davies, 1973; Bramley et al., 1977) y la dilución de la radioactividad del beta-caroteno procedente del mevalonato por adición de intermediarios no marcados (Bramley y Davies, 1975), son algunos de los resultados obtenidos "in vitro" que apoyan la ruta biosintética descrita anteriormente. La aparición de beta-zeacaroteno en estos extractos se ha interpretado como prueba de que existen dos posibles rutas de ciclación: la de la Fig. 3 y otra que implica la ciclación del neurosporeno a beta-zeacaroteno y la de este a beta-caroteno tras una deshidrogenación.

También se ha estudiado el efecto "in vitro" de numerosos inhibidores como la difenilamina (Clarke et al., 1983), varios compuestos bifenólicos, distintos herbicidas y la geranil-acetona (Bramley et al., 1984).

### Regulación

Existen una serie de factores externos (luz, condiciones de cultivo, adición de productos químicos y actividad sexual) que regulan la concentración final de caroteno en el micelio de la estirpe silvestre de Phycomyces a través de varias funciones génicas.

El conocimiento de la regulación de la ruta proviene principalmente del estudio genético y bioquímico de los mutantes regulatorios y del efecto de estimuladores e inhibidores químicos de la ruta.

### Mutantes de genes regulatorios

Se han aislado mutantes que acumulan, en las mismas

condiciones, notablemente más o notablemente menos beta-caroteno que el tipo silvestre.

Existen dos clases de mutantes superproductores de beta-caroteno. Los mutantes del gen carS son recesivos, acumulan de 3 a 5 mg de beta-caroteno por g de peso seco, y no completan el ciclo sexual. Existen otros mutantes que acumulan entre 0.6 y 1 mg por g de peso seco, cruzan normalmente y complementan con los mutantes carS, por lo que se ha asignado a un nuevo gen denominado carD (Salgado et al., en prep.).

La actividad global de la ruta de los carotenos aumenta siempre que la producción de beta-caroteno se bloquea. Las mutaciones carB, carR o la presencia de inhibidores acarrear la acumulación de intermediarios (sobre todo fitoeno y licopeno) en concentraciones muy superiores al beta-caroteno acumulado en la estirpe silvestre sin tratar. Estos resultados sugieren que la ruta está regulada por el nivel de beta-caroteno mediante un mecanismo de retroinhibición. El hecho de que los dobles mutantes carB carS no acumulen más fitoeno que los mutantes carB sugiere que el producto del gen carS participa en esta regulación por producto final, actuando como regulador negativo que requiere la presencia de beta-caroteno. De esta manera la ausencia del regulador o del producto final de la ruta provocaría un incremento en la síntesis de carotenos (Murillo y Cerdá-Olmedo, 1976).

En el otro extremo de la escala carotenogénica están los mutantes albinos que no acumulan cantidades importantes de ningún caroteno, presentando únicamente pequeñas cantidades de beta-caroteno (2-3 ug por g de peso seco). La mayoría de estos mutantes, asignados al gen carA, no complementan entre sí pero sí lo hacen con los mutantes albinos carB (Ootaki et al., 1973).

Estrechamente relacionadas con este tipo de mutantes, se han aislados otras estirpes que, en vez de presentar trazas de beta-caroteno, acumulan pequeñas cantidades de licopeno. En principio, este tipo de mutantes fueron descritos como dobles mutantes carA carR ya que no complementan a los mutantes carA

ni a los mutantes carR (Ootaki et al., 1973). Torres-Martínez et al. (1980) demostraron que ambos tipos de mutantes afectan a un único gen bifuncional denominado carRA. Las funciones génicas A y R estarían determinadas por segmentos contiguos de ADN que son transcritos a una única molécula de ARN mensajero y traducidos a un único polipeptido que posteriormente sería escindido dando lugar a los productos génicos A y R. De acuerdo con esta hipótesis, los mutantes carA estarían afectados en el segmento A, los mutantes carR en el segmento R y los mutantes descritos anteriormente como dobles mutantes carA carR, se deberían a una única mutación, denominada carRA, que afectaría simultáneamente a los segmentos A y R. A pesar de tratarse de un único gen es conveniente mantener las denominaciones de gen carA y gen carR cuando nos estemos refiriendo a fenómenos que se relacionen sólo con la función del segmento correspondiente.

Si bien la función del producto R está bien definida como ciclasa de licopeno, la función precisa del producto A es desconocida. En los mutantes carA no se ha encontrado acumulación de ningún intermediario de la ruta. No puede descartarse, sin embargo, que el producto A desempeñe una actividad enzimática anterior al fitoeno, por ejemplo una transferasa de prenilo específica para el síntesis de geranilgeraniol-pirofosfato a partir de farnesil-pirofosfato. Esta función ha sido atribuida recientemente al gen al-3 de Neurospora crassa (Harding y Turner, comunicación personal).

El retinol (su efecto sobre la estirpe silvestre se describe posteriormente) induce la síntesis de beta-caroteno en los mutantes carA (Eslava et al., 1974). Este efecto hace difícil pensar que el producto A tenga sólo una función estructural. En presencia de CPTA los mutantes carA acumulan cantidades significativas de licopeno y gamma-caroteno, mientras que la concentración de beta-caroteno permanece constante. Estos resultados son explicables si el fenotipo albino de los mutantes carA se debe a la hipersensibilidad del mecanismo de regulación por producto final (Murillo, 1980a).

Por otra parte, se ha demostrado que la alteración genética del producto A impide que tenga lugar el intercambio de

sustratos entre los distintos complejos de la ciclasa del licopeno, y cabría esperar que también lo hiciera con el trasiego de sustratos a través de cada complejo. De esta forma los mutantes carA verían disminuido el nivel de beta-caroteno acumulado sin que aumentase significativamente ningún compuesto intermediario (Murillo et al., 1981).

Existe un tercer grupo de mutantes albinos aislados por mutagénesis de un mutante carS que se atribuyeron inicialmente a mutaciones carA. Sin embargo, estudios genéticos recientes (Salgado et al., en prep.) han demostrado que la mutación responsable del fenotipo albino se encuentra en el gen carS. Trás estudiar un gran número de productos meióticos se han separado, en estos mutantes, dos mutaciones carS (la presente en la estirpe parental y una nueva) que individualmente dan lugar a un fenotipo superproductor de beta-caroteno.

#### Activación química

Cuando se cultivan juntas estirpes de sexo opuesto de Phycomyces, Blakeslea y otros Mucorales se produce un incremento de la síntesis de caroteno (Blakeslee, 1904). De estos cultivos se aislaron unos nuevos compuestos químicos, los ácidos trispóricos, que activan la carotenogénesis de cultivos separados de uno y otro sexo (Sutter, 1977). La estimulación sexual de la carotenogénesis y la que se produce en los heterocariontes intersexuales de Phycomyces (Murillo y Cerdá-Olmedo, 1976) se atribuye a los ácidos trispóricos (Govind y Cerdá-Olmedo, 1986).

Los ácidos trispóricos derivan del beta-caroteno, lo que explica que los mutantes incapaces de sintetizar beta-caroteno no sean capaces de estimular sexualmente a estirpes de sexo opuesto (Sutter, 1975). La estimulación de la carotenogénesis por ácidos trispóricos requiere la presencia de beta-caroteno en el micelio (Govind y Cerdá-Olmedo, 1986), este hecho se ha

explicado como consecuencia de la activación por los ácidos trispóricos de su propia síntesis a partir del beta-caroteno.

Las estimulaciones de la carotenogénesis por el sexo y las mutaciones carS deben ser, al menos, parcialmente independientes, ya que los heterocariontes intersexuales de mutantes superproductores carS acumulan hasta 24 mg de beta-caroteno por g de peso seco frente a los 3-4 mg de estos mutantes (Murillo et al., 1978).

Muchos otros agentes químicos estimulan la carotenogénesis de Phycomyces en diferentes grados. Particularmente interesante es la acción del retinol (Eslava et al., 1974) y la beta-ionona (Reyes et al., 1964; Eslava et al., 1974). Ambos compuestos estimulan fuertemente la carotenogénesis y su efecto desaparece en presencia de cicloheximida, un inhibidor de la síntesis de proteínas. El efecto estimulador del retinol no se debe a que se convierta directamente en beta-caroteno (Eslava et al., 1974). El mecanismo de acción de ambos compuestos es desconocido aunque se ha apuntado la posibilidad de que pueda estar relacionado con su parecido estructural al beta-caroteno. La inhibición química de la síntesis de beta-caroteno por difenilamina o CPTA provoca una estimulación de la ruta en el tipo silvestre, pero no en los mutantes carS (Lee et al., 1975; Murillo et al., 1980). Aunque para algunos autores este efecto estimulador es independiente del efecto inhibidor (Hsu et al., 1972), los resultados obtenidos con los mutantes de la carotenogénesis (Clarke et al., 1983) indican que la activación se debe al mecanismo de retroinhibición que se pone en funcionamiento al disminuir la producción de beta-caroteno (Murillo, 1980).

Muchos compuestos fenólicos activan también la carotenogénesis (Cerdá-Olmedo y Hütermann, 1986).

#### Mutantes quimioinsensibles

Existen mutantes de Phycomyces que acumulan cantidades

casi normales de beta-caroteno y son parcialmente insensibles al efecto estimulador del retinol (F. Parra et al., en prep). Las mutaciones correspondientes se localizan en un nuevo gen denominado carI y en el gen carRA (Roncero et al., 1982). Se ha descrito que estos mutantes son también insensibles al efecto del CPTA y que otros mutantes aislados como insensibles al CPTA lo son también al retinol (Murillo, 1980b).

### Fotocarotenogénesis

Los seres vivos han desarrollado una gran variedad de mecanismos capaces de responder a la presencia de luz con simples respuestas enzimáticas (como la fotorreparación del ADN) o con complejas respuestas nerviosas (como la visión de los vertebrados).

No todos los sistemas regulados por la luz responden de la misma forma ni al mismo tipo de radiación luminosa. Phycomyces muestra varias respuestas a la luz azul: fotomecismo, fototropismo, fotodiferenciación, fotocarotenogénesis e inhibición de la deshidrogenasa de alcohol, que han sido objeto de numerosos estudios (ver las revisiones de Bergman et al., 1969; Russo y Galland, 1980; Cerdá-Olmedo y Lipson, 1987a). En esta introducción nos vamos a centrar en la fotoinducción de la síntesis de carotenos o fotocarotenogénesis por ser uno de los temas de investigación en esta Tesis.

La luz regula la biosíntesis de carotenoides en una gran variedad de organismos (bacterias, algas, hongos y plantas superiores). Existen gran número de revisiones generales sobre este tema (Rau, 1983; Harding y Shropshire, 1980; Senger, 1987).

La fotorregulación de la carotenogénesis ha sido estudiada en varias especies de hongos. En Fusarium aquaeductuum, Neurospora crassa, Verticillium agaricinum (Rau, 1983) y Gibberella fujikuroi (Avalos et al., 1987) el producto final es la neurosporoantina, y la acumulación de los carotenoides

en la oscuridad depende de la especie y de la estirpe (Avalos y Cerdá-Olmedo, 1987). En Phycomyces el producto final es beta-caroteno; la estirpe silvestre en oscuridad acumula una cantidad apreciable de beta-caroteno que el estímulo luminoso incrementa notablemente (Bergman et al., 1973; López-Díaz y Cerdá-Olmedo, 1980; Revuelta y Eslava, 1983).

La fotocarotenogénesis, como todos los procesos regulados por la luz, requiere la recepción de la señal externa (luz) por un pigmento que actúa como fotorreceptor y una serie de procesos que transforman la percepción de ese estímulo en la respuesta final.

#### Fotorreceptor

Desde hace bastantes años existen dos grupos de candidatos para ocupar el papel de fotorreceptor de la luz azul: flavinas y carotenoides (Presti y Delbrück, 1978; Presti y Galland, 1987). Los espectros de absorción de estos compuestos se parecen, en general, a los espectros de acción de la luz azul. Una comparación más fina llevó a Rau (1967) a postular que el fotorreceptor de la fotocarotenogénesis de Fusarium aquaeductuum es una flavoproteína y a De Fabo et al. (1976) a preferir el beta-caroteno como fotorreceptor de Neurospora crassa. Recientemente se ha determinado el espectro de acción de la fotocarotenogénesis de Phycomyces (Bejarano et al., en prep.); los resultados obtenidos sugieren que el fotorreceptor es una flavina como ya se había propuesto para el fototropismo (Delbrück y Shropshire, 1960; Delbrück et al., 1976; Otto et al., 1981; Galland y Lipson, 1987).

#### Mecanismos y niveles de regulación

El incremento de la síntesis de carotenos que se produce como respuesta al estímulo luminoso puede deberse a un

incremento en la actividad de las enzimas carotenogénicas ya preexistentes o a un aumento de la síntesis de estas enzimas (Harding y Shropsire, 1980; Rau, 1983). En Phycomyces, donde se ha sugerido la existencia de dos componentes en la fotocarotenogénesis sensibles a distintos flujos luminosos (Jayaram et al., 1979; Whitaker y Shropshire, 1981), la adición de actinomicina D o cicloheximida inhiben la respuesta del sistema sensible a flujos elevados (Jayaram et al., 1979). Este resultado sugiere que la síntesis de proteínas y de ARN son necesarias para que se produzca esta respuesta, pero no para la de flujos bajos. Sin embargo, la ausencia de respuesta pueden no ser una consecuencia directa de la inhibición de la síntesis de los enzimas de la carotenogénesis. Si consideramos la carotenogénesis como "un lujo", puede ocurrir que se prescindiera de ella ante emergencias como, la inhibición de la síntesis de ARN o proteínas.

Un enfoque genético para determinar si una función génica, estructural o regulatoria es necesaria para una fotorrespuesta consiste en analizar la fotorrespuesta en los mutantes alterados en ella función génica. De este modo, ha sido posible involucrar en el mecanismo de la fotocarotenogénesis de Phycomyces a las funciones génicas madA, madB, picA y picB.

El análisis de la capacidad fotocarotenogénica de mutantes que presentan alteraciones en la carotenogénesis permite establecer que funciones son necesarias para la respuesta y como se integra la señal elaborada por el estímulo luminoso en el mecanismo enzimático o regulador de la carotenogénesis. En este sentido se ha demostrado que un doble mutante carA carS es insensible a la fotoestimulación. Los mutantes simples carA y carS también parecen ser insensibles (López-Díaz y Cerdá-Olmedo, 1980), pero este resultado no es contundente debido a que la acumulación de caroteno en estos mutantes impide obtener datos precisos. En esta Tesis hemos puesto a punto unas condiciones de iluminación y cultivo que nos han permitido realizar un estudio cuantitativo fiable de la capacidad

fotocarotenogénica de estos y otros mutantes de la carotenogénesis de Phycomyces.

#### Mutantes de la fotocarotenogénesis

La transformación del estímulo luminoso en la respuesta final debe estar mediada por los productos génicos primarios (proteínas) o secundarios (metabolitos). La obtención de mutantes y su posterior estudio puede dar mucha información sobre el mecanismo de acción de estos mediadores.

En Phycomyces se han aislado y caracterizado mutantes afectados en el fototropismo (mutantes mad). Algunos de estos mutantes (genes madA, madB y madD) (López-Díaz y Cerdá-Olmedo, 1980; Jayaram et al., 1980; Whitaker y Shropshire, 1981) son también parcialmente defectuosos en la fotoinducción de la carotenogénesis. Este comportamiento indica que deben existir mediadores comunes para estos dos fenómenos incluido posiblemente el fotorreceptor.

También se han aislado varios mutantes defectivos para la fotoinducción de los carotenos pero normales para las otras fotorrespuestas. Un grupo de ellos asignados a un nuevo gen denominado carC (Revuelta y Eslava, 1983, 1984) acumulan menos beta-caroteno que el tipo silvestre en la oscuridad, en luz y en presencia de retinol. Otros dos mutantes asignados a los genes picA y picB (López Díaz y Cerdá-Olmedo, 1980) son parcialmente defectivos para la respuesta a altos flujos luminosos (Jayaram et al., 1980). No obstante, la información disponible no excluye que los genes picB y carC sean alelos de un mismo gen ya que su respuesta frente a la luz y al retinol son similares.

#### Localización cromosómica de los genes de la carotenogénesis

La Figura 6 muestra el mapa genético de Phycomyces obtenido por recombinación (Orejas y Eslava, en prensa; Eslava,

1987). Llama la atención el estrecho ligamiento existente entre los genes que determinan las enzimas que transforman el fitoeno en beta-caroteno (carB, carRA) y la presencia del gen carS en el mismo cromosoma que los anteriores. Esta disposición recuerda el modelo de operón bacteriano no muy frecuente en eucariontes. El gen carI, que no aparece en la figura, es independiente de los genes carB y carRA (Roncero y Cerdá-Olmedo, 1982).

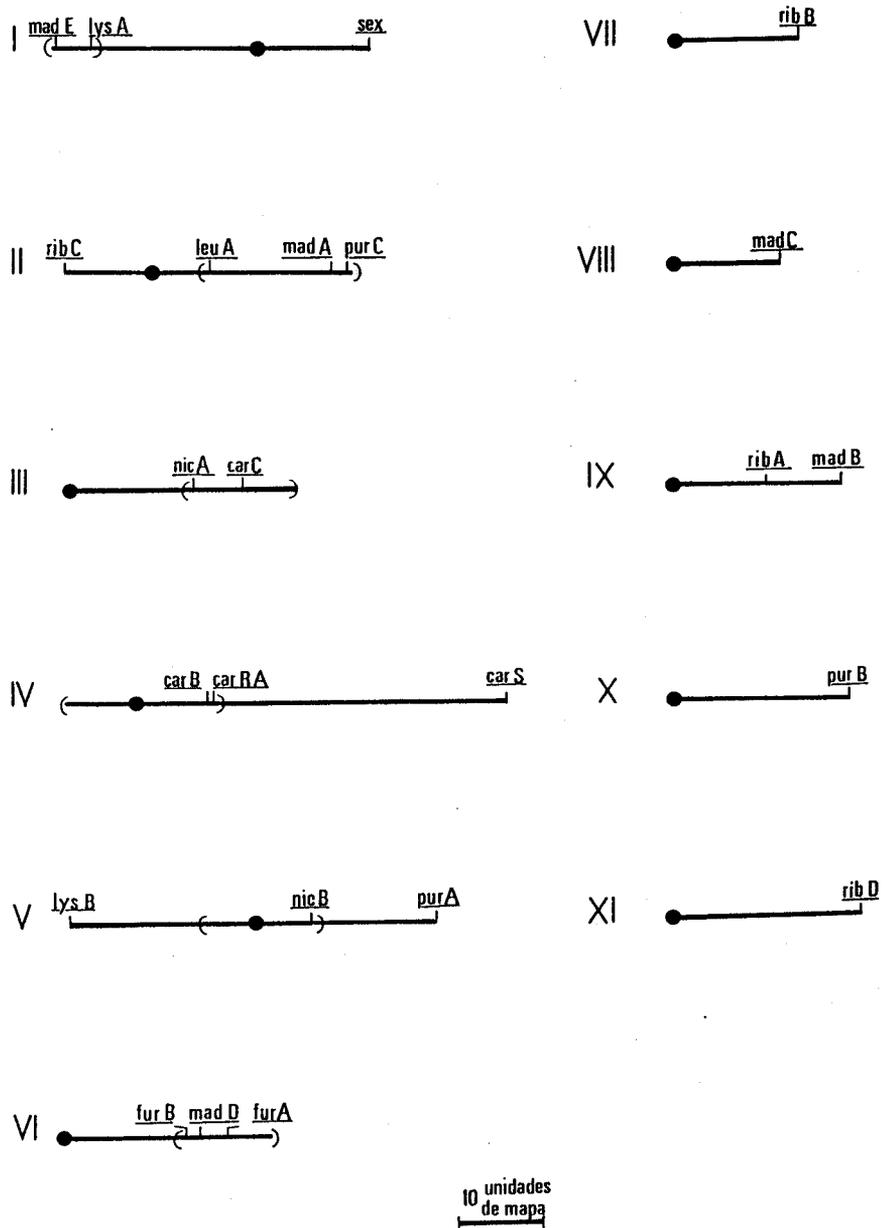


Fig 6. Grupos de ligamiento de *P. blakesleeanus*. No se ha determinado la posición relativa de los genes entre paréntesis.

## ESTEROLES

Los esteroleos son terpenoides de 30 átomos de carbono. En Phycomyces se han detectado además de ergosterol, que es el producto final de la ruta y el esteroles más abundante, alrededor de doce esteroleos, todos ellos intermediarios de la síntesis de ergosterol.

### Biosíntesis

Existen numerosas revisiones sobre la síntesis de esteroleos (Beytia y Porter, 1976; Goodwin, 1980; Mercer 1984). La síntesis de ergosterol coincide con la de carotenos hasta la formación de farnesil-pirofosfato. La condensación de dos moléculas de farnesil-pirofosfato da lugar a pre-escualeno-pirofosfato que es convertido rápidamente en escualeno (Popjak y Cornforth, 1966). Aunque la síntesis de escualeno puede producirse en condiciones anaeróbicas, su posterior conversión en lanosterol requiere la presencia de oxígeno (Bramley and Davies, 1975). El lanosterol es considerado como el primer esteroles sintetizado tanto en hongos como en animales. Posteriores modificaciones de la molécula de lanosterol dan lugar a episterol y a una serie de intermediarios hasta la formación de ergosterol. En Saccharomyces cerevisiae (Bard et al., 1977) los pasos finales de la síntesis de ergosterol forman una matriz de reacciones. En Phycomyces parece ocurrir algo parecido, Goulston et al., (1975) propusieron para la síntesis de ergosterol en Phycomyces el esquema que se muestra en la Figura 7, basado en los análisis de esteroleos de Mercer y Russell (1975).

Una parte importante de los esteroleos de Phycomyces forman ésteres con ácidos grasos. En cultivos líquidos la concentración de ésteres de ergosterol es paralela a la concentración total de lípidos. Esta concentración es relativamente baja durante la fase de crecimiento rápido, pero aumenta cuando cesa el crecimiento (Barlett y Mercer, 1974).

La composición de los esteroides presentes en Phycomyces es relativamente constante a lo largo del crecimiento, mientras que la composición de la fracción esterificada sufre grandes variaciones. Lo mismo ocurre con los ácidos grasos que forman estos ésteres; el porcentaje de ácidos grasos insaturados que están esterificados con esteroides aumenta con la edad del micelio mientras que no sufre variación la composición total de triglicéridos y fosfolípidos (Barlett y Mercer, 1974).

Los mutantes alterados en la biosíntesis de ergosterol son fácilmente aislables por presentar resistencia a antibióticos poliénicos del tipo de la nistatina. P. Burke (en prep.) ha

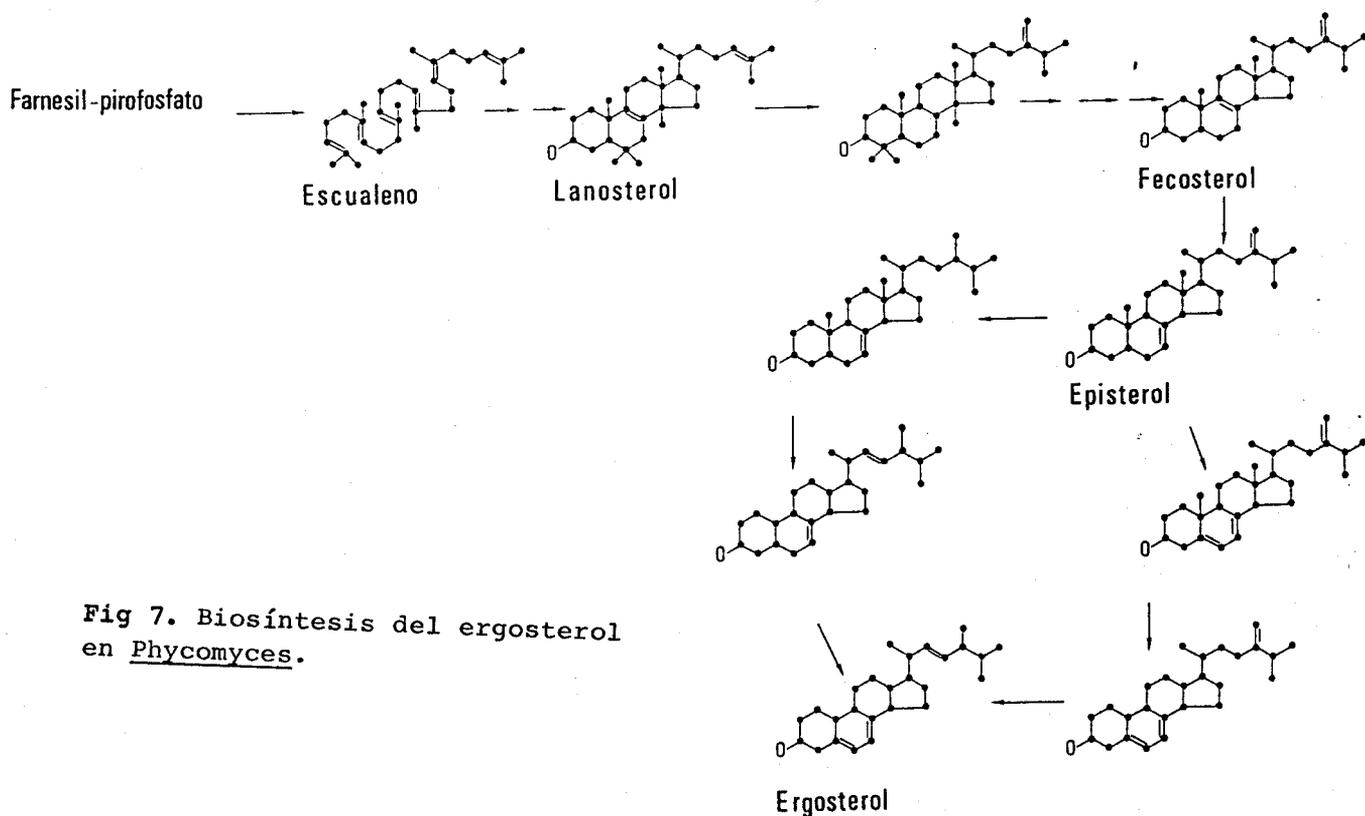


Fig 7. Biosíntesis del ergosterol en Phycomyces.

aislado mutantes resistentes a la nistatina en Phycomyces que, como los de otros hongos, carecen de ergosterol pero tienen grandes cantidades otros esteroides.

## MATERIAL Y METODOS

### ESTIRPES

La Tabla 1 muestra las estirpes de Phycomyces blakeslee-  
anus utilizadas en esta Tesis junto con su genotipo y origen.

Las estirpes se designan con una letra mayúscula según el laboratorio donde se obtuvieron (A, Departamento de Genética, Universidad de Salamanca, Salamanca; B, Max-Plank Institut für Molekulare Genetik, Berlin; C, California Institute of Technology, California; S, Departamento de Genética, Universidad de Sevilla, Sevilla), seguidas de un número de aislamiento. La estirpe silvestre NRRL1555 procede de la colección de Northern Regional Research Laboratories, United States Departement of Agriculture, Peoria, IL, USA; la estirpe UBC21 y UBC24 son estirpes silvestres de fondo genético diferente a NRRL1555 y procedentes de la colección de University of British Columbia, Vancouver, Canada.

Los genotipos se indican mediante tres letras minúsculas que hacen referencia al proceso biológico afectado por la mutación, seguidas de una letra mayúscula que indica el gen a que pertenece y un número para indicar el alelo. Las mutaciones car afectan a la síntesis de carotenos; mad a las respuestas fototrópicas; geo al geotropismo; nic y lys determinan auxotrofia para el ácido nicotínico y lisina respectivamente; dar resistencia a 5-deazarriboflavina. Los signos (+) y (-) indican el sexo de la estirpe.

En el origen de cada estirpe se muestra la estirpe

Tabla 1. Estirpes de Phycomyces utilizadas en esta Tesis

ESTIRPE	GENOTIPO	ORIGEN
NRRL1555	(-)	Silvestre
A87	<u>lys401</u> (-)	NRRL1555 (UV)
A98	<u>carC652</u> (-)	NRRL1555 (NQQ)
B36	<u>nicA101</u> (+)	C296 x S102
C2	<u>carA5</u> (-)	NRRL1555 (NG)
C5	<u>carB10</u> <u>geo-10</u> (-)	NRRL1555 (NG)
C9	<u>carR21</u> (-)	NRRL1555 (NG)
C11	<u>carR23</u> (-)	NRRL1555 (NG)
C12	<u>carR24</u> (-)	NRRL1555 (NG)
C115	<u>carS42</u> <u>mad-107</u> (-)	NRRL1555 (NG)
C144	<u>carRA3</u> <u>mad-98</u> (-)	NRRL1555 (NG)
C173	<u>carB32</u> <u>carR21</u> (-)	C9 (NG)
C181	<u>carB20</u> <u>carR21</u> (-)	C9 (NG)
S13	<u>carR95</u> (-)	UBC24 (NG)
S20	<u>carB59</u> (-)	UBC24 (NG)
S21	<u>carB60</u> (-)	UBC24 (NG)
S22	<u>carB61</u> (-)	UBC24 (NG)
S92	<u>carRA91</u> (-)	NRRL1555 (NG)
S102	<u>nicA101</u> (-)	NRRL1555 (NG)
S115	<u>carS42</u> <u>carS111</u> <u>mad-107</u> (-)	C115 (NG)
S119	<u>carA113</u> (-)	NRRL1555 (NG)
S144	<u>carI131</u> (-)	NRRL1555 (NG)
S194	<u>carA51</u> (-)	UBC21 x S5
S200	<u>carA87</u> (+)	UBC21 x S48
S203	<u>carA55</u> (+)	UBC21 x S16
S208	<u>carA57</u> (-)	UBC21 x S18
S226	<u>carD172</u> <u>nicA101</u> (-)	S102 (NG)
S240	<u>carR21</u> <u>nicA101</u> (-)	C247 x (C9 * C282)
S275	<u>carS42</u> (-)	C242 x (C115 * S102)
S283	<u>carA5</u> <u>carS42</u> <u>nicA101</u> (-)	C242 x (C115 * S102)

Tabla 1. Continuación.

ESTIRPE	GENOTIPO	ORIGEN
S303	<u>carS179</u> <u>carE409</u> <u>dar-52</u> (-)	S213 (NG)
S442	<u>carS42</u> <u>carB401</u> <u>mad-107</u> (-)	C115 (NG)
S470	<u>carA87</u> <u>carS42</u> (-)	C115 x S200

original y el mutágeno utilizado para su obtención (NG= N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina, UV= radiación ultravioleta, NQO= 4-nitro-quinolina-1-óxido o las estirpes parentales de las que procede por cruzamiento.

Los heterocariontes utilizados aparecen en la Tabla 2, donde se indican los genotipos de los núcleos presentes separados por un asterisco. Todos los heterocariontes se obtuvieron durante la realización de esta Tesis por el método de Ootaki (1973). Las proporciones nucleares de los micelios heterocarióticos se determinaron a partir de la frecuencia de las esporas homocarióticas y heterocarióticas producidas por el heterocarionte siguiendo el método de Heisenberg y Cerdá-Olmedo (1968).

Tabla 2. Heterocariontes de Phycomyces utilizados en esta Tesis.

HETEROCARIONTE		
A87 * B36	<u>lysA401</u> (-)	* <u>nicA101</u> (+)
C5 * S442	<u>carB10</u> <u>geo-10</u> (-)	* <u>carB401</u> <u>carS42</u> <u>mad-107</u> (-)
S102 * S442	<u>nicA101</u> (-)	* <u>carB401</u> <u>carS42</u> <u>mad-107</u> (-)

## METODOS DE CULTIVO

### Medios de cultivo

Medio mínimo: descrito por Sutter (1975) contiene 20 g l<sup>-1</sup> de glucosa, 2 g l<sup>-1</sup> de asparragina, 1 mg l<sup>-1</sup> de tiamina HCl y varias sales minerales.

Medio SIVEL: medio mínimo al que se añade extracto de levadura (1 g l<sup>-1</sup>).

Todos los cultivos se realizaron sobre medio sólido obtenido al añadir agar (15 g l<sup>-1</sup>) a los medios anteriores.

Para la obtención de colonias los medios se acidifican a pH 3.3 mediante la adición de HCl 10 N.

Cuando fue necesario, el medio se suplementó con diversos productos químicos que se añadieron antes de verterlo en cajas de Petri:

Acido nicotínico (1 mg l<sup>-1</sup>) o lisina (200 mg l<sup>-1</sup>)

Retinol: se utilizó acetato de retinol (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA) disuelto previamente en etanol y emulsificado con monooleato de polioxietilensorbitol (Tween-80). Las concentraciones finales de etanol y Tween 80 en el medio son de 1.6 ml l<sup>-1</sup> y de 6.4 ml l<sup>-1</sup> respectivamente.

Compuestos fenólicos: alcohol cinámico, ftalato de dimetilo, veratrol, 1,2-dimetoxi-4-propenilbenceno, timol y difenilamina se añadieron al medio previamente disueltos en etanol, cuya concentración final en el medio es de 15 ml l<sup>-1</sup>.

### Condiciones de cultivo

Los medios de cultivo se inocularon con esporas vegetativas previamente activadas a 48°C durante 15 minutos. La única excepción fueron los heterocariontes cuyos cultivos se iniciaron con un pequeño trozo de micelio colocado en el centro de la caja de Petri con una pinzas estériles.

Los cultivos se incubaron a temperatura constante de 22°C

y, a menos que se indique lo contrario, se mantuvieron en completa oscuridad durante cuatro días antes de recolectar el micelio y proceder al análisis cuantitativo y cualitativo de los carotenos o esteroides acumulados.

### Iluminación

En el estudio de la estirpe S442 se utilizó la luz blanca de una batería de cinco tubos fluorescentes (Sylvania F40T121D).

En los estudios de fotocarotenogénesis se utilizó la luz de una lámpara halógena (Sylvania FCS 150W) colocada en un proyector de diapositivas (Hanimex 2100EF). En todos los experimentos se empleó un filtro anticalórico (Schott KG-1, Mainz, R. F. Alemania).

Las intensidades luminosas se midieron con un flujómetro (Hewlett-Packard 8330A, Rockville, MA, USA).

### MUTAGENESIS

Para inducir mutaciones las esporas se expusieron a una dosis de 0.4 M por segundo de N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina obteniéndose una supervivencia en torno al 5% (Roncero et al., 1984). Los mutantes se buscaron directamente entre los supervivientes.

### ANALISIS DE CAROTENOS

#### Extracción

Los micelios se separaron del medio sólido y se limpiaron cuidadosamente de agar, se congelaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  y se liofilizaron. En un mortero con arena de mar lavada se trituró una cantidad determinada de micelio liofilizado (aproximadamente

0.1 g) hasta conseguir un polvo fino. Se añadieron 10 ml de éter de petróleo (punto de ebullición 40-60 °C), se agitó para disolver los carotenos y se recogieron con una pipeta. Esta operación se repitió hasta extraer todo el caroteno. Las fracciones se centrifugaron a 3000 rpm recogándose el sobrenadante. Si el precipitado presentaba color se resuspendía en éter de petróleo y se volvía a centrifugar. Todas estas operaciones se realizaron en ausencia de luz directa y a baja temperatura (próxima a 4°C) para evitar en lo posible la destrucción de los carotenos. Se mezclaron todos los sobrenadantes y se evaporó el éter de petróleo empleando un evaporador rotatorio (Buschler Instruments, Fort Lee, NJ, USA) conectado a una bomba de vacío (Millipore Corporation, Bedford, MA, USA).

### Separación cromatográfica

Para la separación cromatográfica de los carotenos se han utilizado varias condiciones dependiendo del número y naturaleza de los carotenos presentes en el extracto.

En los estudios con inhibidores de la deshidrogenasas (alcohol cinámico, timol y difenilamina) se sigue el protocolo de separación empleado por Murillo (1980). Este tipo de cromatografía permite la separación de todos los carotenos intermedios de la ruta.

Los carotenos presentes en la estirpe S442 se separaron en columnas de óxido de aluminio (CAMAG neutra, grado I) desactivado a grado II según Brockman (Davies, 1965) y se eluyeron con concentraciones crecientes de éter etílico en éter de petróleo (punto de ebullición 50-70°C). En estas condiciones el fitoeno es eluido con éter de petróleo, el fitoflueno con 0.5% éter etílico, el zeta-caroteno con 3% éter etílico, el neurosporeno con 10% éter etílico y un caroteno no identificado (ver resultados, Figura 23) con 100% éter etílico.

Para cuantificar el fitoeno acumulado en los mutantes carB y carB carR es necesario separarlo del ergosterol mediante una

columna de óxido de aluminio (Merck neutra, grado II-III) desactivado a grado III, según Brockman (Davies, 1965). El fitoeno se eluye con éter de petróleo (punto de ebullición 50-70 °C) y el ergosterol permanece en la columna.

### Identificación y cuantificación

Los espectros de absorción se registraron en un espectrofotómetro Bausch & Lomb, modelo Spectronic 2000 (Rochester, NY, USA). Los carotenos se identificaron comparando su espectro de absorción y su comportamiento cromatográfico con los ya publicados (Goodwin, 1980; Davies, 1976), y se cuantificaron por sus coeficientes de extinción en hexano (Davies, 1976). Sus concentraciones se dan en ppm (ug por gramo de peso seco de micelio).

## ANALISIS DEL ERGOSTEROL

### Extracción

Se sigue el mismo método que para la extracción de los carotenos. La adición de 40 ml de éter de petróleo en fracciones de 10 ml es suficiente para extraer todo el ergosterol.

### Separación cromatográfica

Para separar el ergosterol de los carotenos y del escualeno se utilizó una columna de 1.1 cm de diametro interno rellena con óxido de aluminio (CAMAG neutro, grado I) desactivado a grado III según Brockman (Davies, 1965). El escualeno y todos los carotenos presentes en Phycomyces, excepto el licopeno, se eluyeron con éter de petróleo (punto de ebullición 50-70 °C). A continuación se añadieron concentraciones

crecientes de éter etílico en éter de petróleo. El licopeno (si existe) y los ésteres de ergosterol se eluyeron con 0.5% de éter etílico y el ergosterol libre con 12% de éter etílico.

Las distintas fracciones se secan completamente en un evaporador rotatorio y se redisolviéron en un volumen determinado de etanol absoluto (las que contienen ergosterol) o de n-hexano (la correspondiente a caroteno) para obtener su espectro de absorción.

### Identificación y cuantificación

Para identificar el ergosterol se compararon los espectros de absorción con los ya publicados (Woods, 1971) y el obtenido con ergosterol comercial (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA) (Fig. 8). Con este criterio se identificaron dos

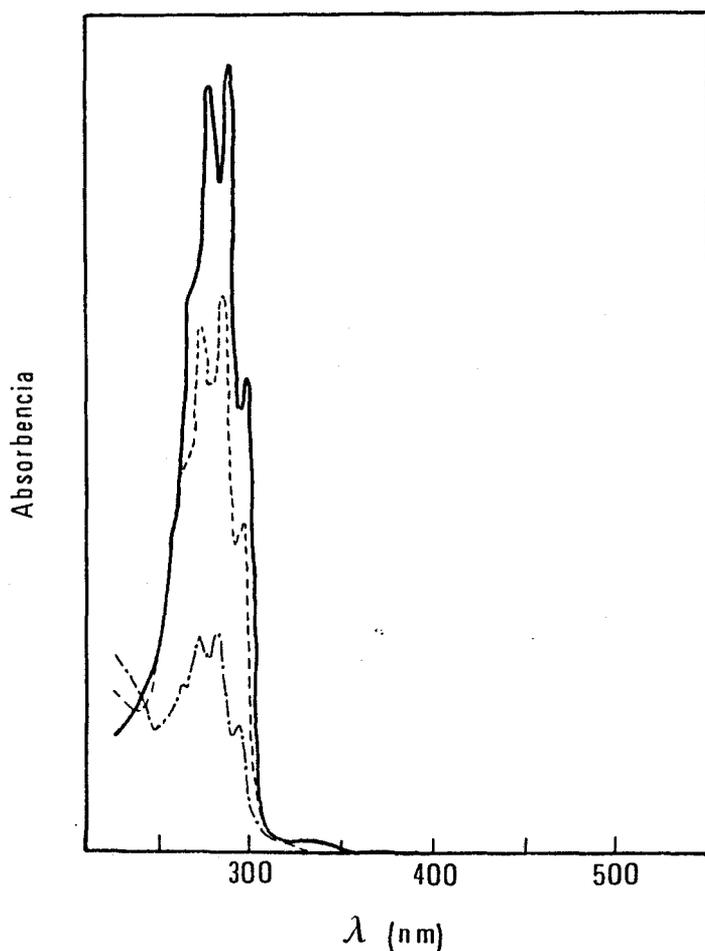


Figura 8. Espectro de absorción en etanol absoluto del ergosterol comercial (—) y las fracciones eluidas con 0.5% (-·-·-) y 12% (- - - -) de éter etílico en éter de petróleo.

fracciones que contenían ergosterol cuyas propiedades cromatográficas correspondían con las ya publicadas (Bartlett et al., 1974) para los ésteres de ergosterol y para el ergosterol libre.

La concentración se calculó a partir de los coeficientes de extinción en etanol  $E = 166$  ( $10 \text{ mg ml}^{-1}$ ,  $1 \text{ cm}$ ) a  $296 \text{ nm}$  y se refiere al peso seco de los micelios de los que fueron extraídos. Más del 96% del ergosterol libre añadido a los extractos iniciales se recuperó e identificó con este método.

#### ANALISIS DE LA GLUCOSA

La congelación y descongelación del medio de cultivo sólido logra la separación parcial de la matriz de agar y la fase líquida del medio que presenta la misma concentración de glucosa que el medio del que proviene (Fig. 9). La concentración de glucosa se determinó inyectando  $25 \text{ ul}$  de este líquido en un

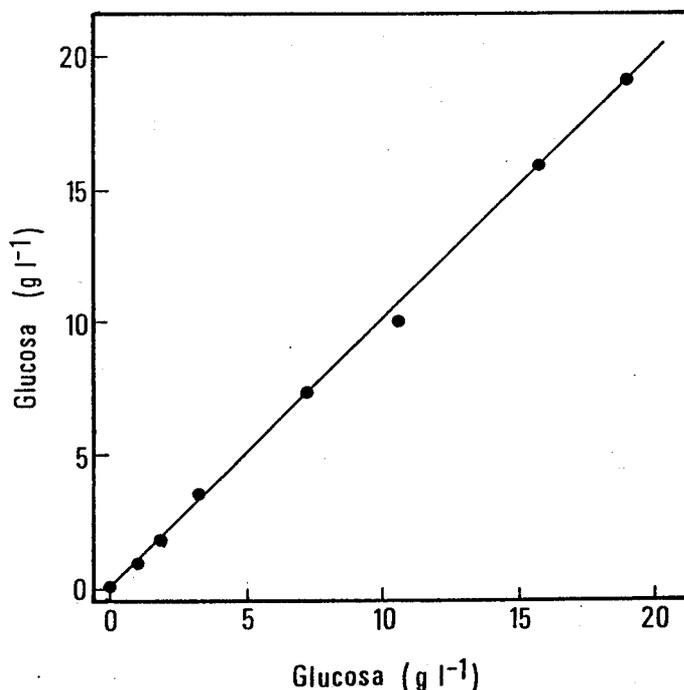


Figura 9. Concentración de glucosa ( $\text{g l}^{-1}$ ) presente en el medio de cultivo antes de autoclavar (eje de ordenadas) y en el líquido obtenido tras su congelación y descongelación (eje de abscisas).

analizador de glucosa YSI modelo 27 (Yellow Spring Instruments, Yellow Springs, OH, USA).

#### ANALISIS DEL RETINOL

Los micelios se cultivaron en membranas de diálisis colocadas sobre medio de cultivo sólido con retinol. A los cuatro días se recogió y se liofilizó el micelio. El retinol se extrajo siguiendo el protocolo utilizado para la extracción de ergosterol (pag. 43) y se determinó el espectro de absorción del extracto lipídico obtenido en éter de petróleo.

La concentración de retinol se calcula a partir de su coeficiente de extinción  $E = 1550 \text{ l} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ , a 325 nm.

#### MARCADO RADIOACTIVO

La lactona del ácido DL(2- $\text{C}^{14}$ )-mevalónico ( $1.85 \text{ MBq ml}^{-1}$ ;  $1.90 \text{ GBq mmol}^{-1}$ ) (Amersham International, Amersham, Inglaterra), se desecó bajo corriente de nitrógeno y se resuspendió en una solución NaOH 25 mM, para obtener la correspondiente sal sódica. Seguidamente se mezcló con la sal sódica de mevalonato frío en las proporciones deseadas y se añadió al medio de cultivo ya autoclavado, justo antes de extenderlo en cajas.

#### Separación de las fracciones radioactivas

Una vez extraídos los carotenos y esteroides por el método habitual el extracto lipídico correspondiente se separó por cromatografía en capa fina (experimento 1) o en columna (experimento 2).

La cromatografía en capa fina de gel de sílice usando éter de petróleo (punto de ebullición 60-80 °C) como eluyente permite separar el beta-caroteno del resto de los carotenos y

esteroles. La fracción correspondiente al beta-caroteno se identificó por el color y por el comportamiento de muestras conocidas sometidas a las mismas manipulaciones.

Las muestras del experimento 2 se separaron por cromatografía en una columna de óxido de aluminio de las mismas características que la empleada en la separación del ergosterol. En primer lugar se añadió éter de petróleo (punto de ebullición 50-70°C) y se recogió la fracción correspondiente a beta-caroteno. A continuación se añadieron concentraciones crecientes de éter etílico en éter de petróleo. Los ésteres de ergosterol se eluyeron con 0.5% de éter etílico y el ergosterol libre con 12% de éter etílico. Se recogió otra fracción con 6% de éter etílico que presenta radiactividad pero cuyo espectro de absorción no corresponde al ergosterol ni a ninguno de los carotenos presentes en Phycomyces. Trás la cromatografía se recuperó al menos el 90% de la radiactividad total inicialmente presente en el extracto lipídico.

#### Cuantificación de la radiactividad

Antes de proceder a la cuantificación de la radiactividad, el beta-caroteno se expone a vapores de yodo (experimento 1) o se disuelve en acetona y se expone a radiación ultravioleta durante 6 horas (experimento 2) para conseguir su decoloración.

Todas las fracciones una vez desecadas se disuelven en 10 ml de tolueno con 5 g l<sup>-1</sup> de 2-5-difeniloxazol (PSPARK Scientific Limited, scintillation grade) y se mide su radioactividad en un contador de centelleo Beckman LS2800 (Beckman Instruments, Inc., Palo Alto, CA, USA).

## RESULTADOS Y DISCUSION

### ESTIMULACION DE LA CAROTENOGENESIS

En la introducción de esta Tesis se han mencionado una serie de factores internos y externos que activan la carotenogénesis de Phycomyces. Hemos tratado de determinar la relación existente entre estos factores, empleando un nuevo criterio genético que nos indica si las estimulaciones producidas por los distintos agentes tienen los mismos mecanismos de acción.

Para realizar este estudio disponemos de una amplia colección de mutantes con distintas alteraciones en la síntesis de caroteno o en su regulación. Los agentes que estimulan la carotenogénesis de la estirpe silvestre pueden activar o no la de cada mutante. Si el número de mutantes empleado es suficientemente representativo y variado dos activadores con distintas listas de mutantes sensibles e insensibles deben tener mecanismos de acción diferentes. Cuando tienen las mismas, sus mecanismos de acción comparten al menos las funciones alteradas en los mutantes disponibles.

#### Activación química

##### Estimulación química en la estirpe silvestre

Se estudió el efecto de los tres compuestos aromáticos más

activos descritos por Cerdá-Olmedo y Hüttermann (1986) (ftalato de dimetilo, veratrol y 1,2-dimetoxi-4-propenilbenceno) y del retinol (Fig. 10) sobre la carotenogénesis y el crecimiento vegetativo de la estirpe silvestre (NRRL1555).

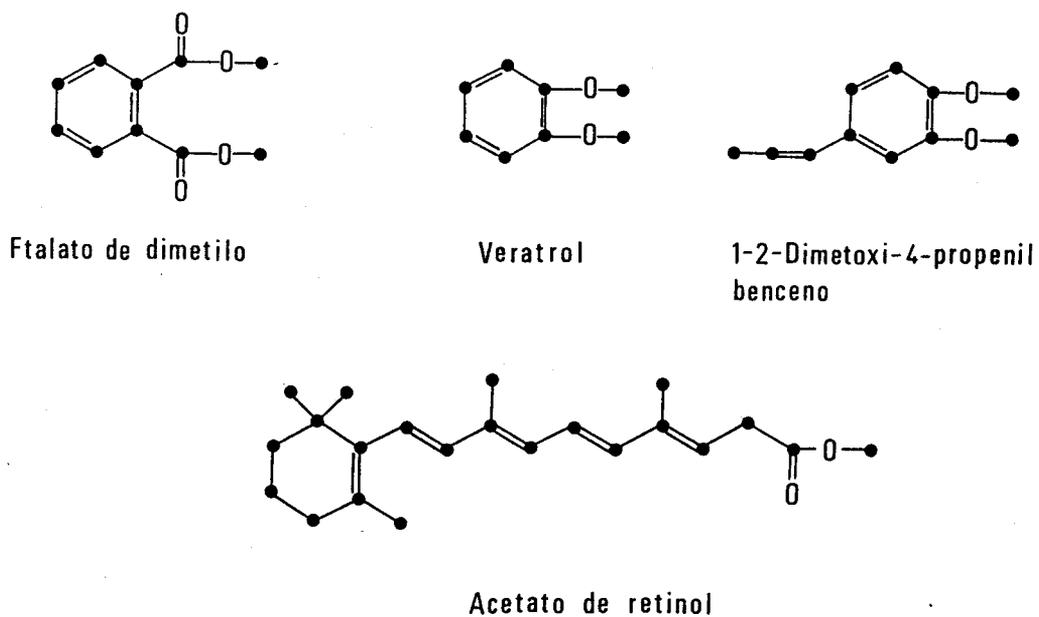


Figura 10. Fórmulas de los activadores de la carotenogénesis utilizados en esta Tesis.

Todos los compuestos producen un aumento en la síntesis de beta-caroteno pero sólo el retinol satura la respuesta. Su efecto es máximo a 0.75 mM y se mantiene a concentraciones superiores (Fig 11). Esta saturación no es una consecuencia indirecta debida a la saturación de la entrada de retinol en la célula, ya que su concentración en el micelio es directamente proporcional a la que existe en el medio incluso por encima de 0.75 mM (Fig. 12).

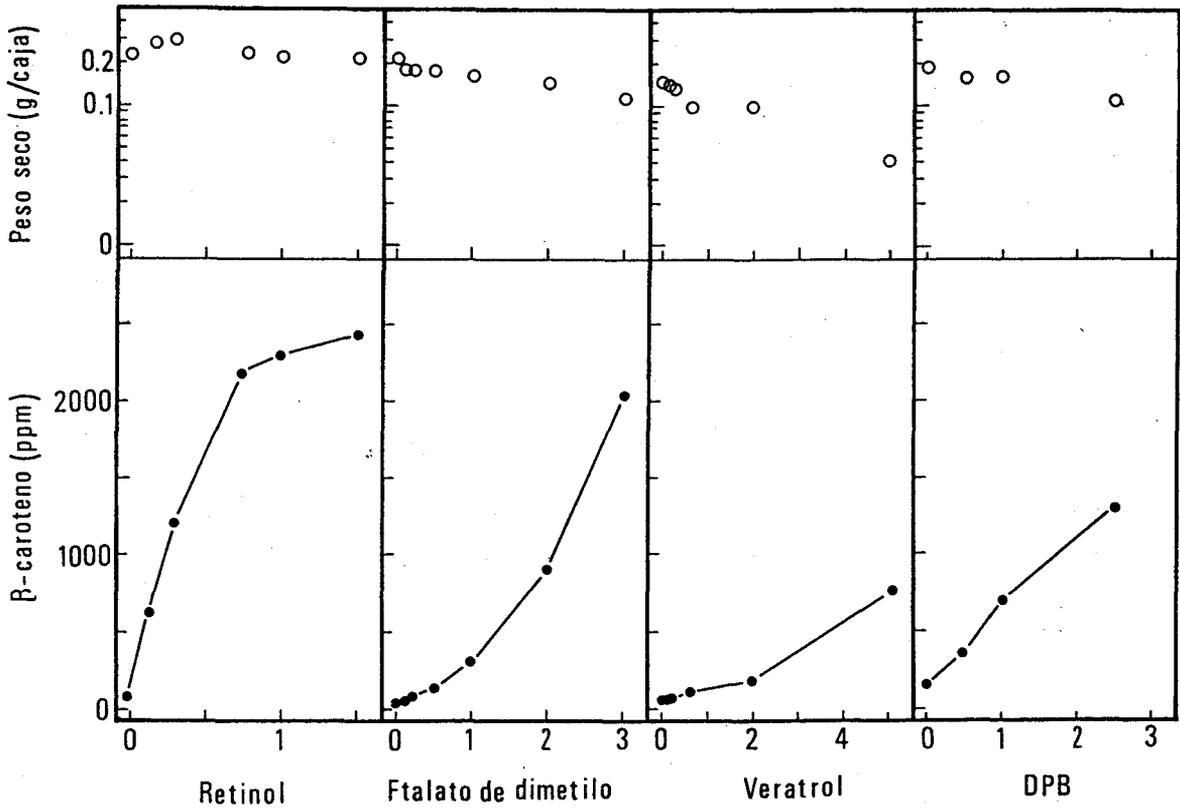


Figura 11. Crecimiento y contenido de beta-caroteno (ppm) de la estirpe silvestre NRRL1555 cultivada en presencia de distintas concentraciones de retinol, ftalato de dimetilo, veratrol y 1,2-dimetoxi-4-propenilbenceno. Los valores son la media de, al menos, tres experimentos independientes.

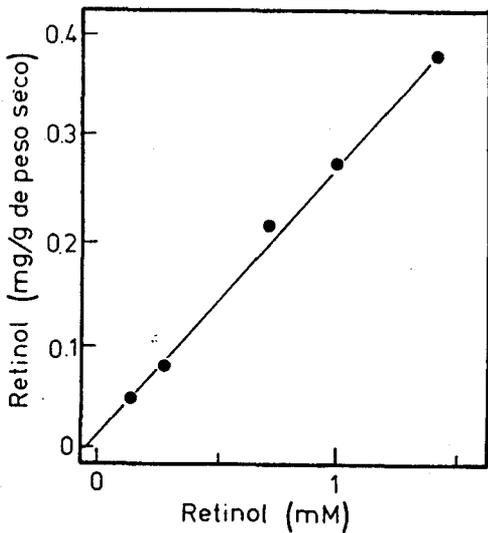


Figura 12. Concentración de retinol presente en el micelio de la estirpe silvestre NRRL1555 (mg por g de peso seco) con respecto a la concentración de retinol presente en el medio de cultivo (mM) donde se incubaron.

Los tres fenoles retrasan el crecimiento vegetativo de la estirpe silvestre de Phycomyces mientras que el retinol no lo afecta ni a concentraciones de 1.5 mM (Fig. 11). El retraso producido por los fenoles no se debe a la inhibición de la germinación ya que se mantiene cuando se incuban germinulas de 12 horas de edad en ftalato de dimetilo (3 mM). Concentraciones de los tres compuestos superiores a las representadas en la Fig. 11 retardan tan considerablemente el crecimiento, que a los cuatro días de incubación cada caja contiene menos de 5 mg (peso seco) de micelio. Este efecto tóxico impide determinar las concentraciones de estos compuestos que saturan la activación.

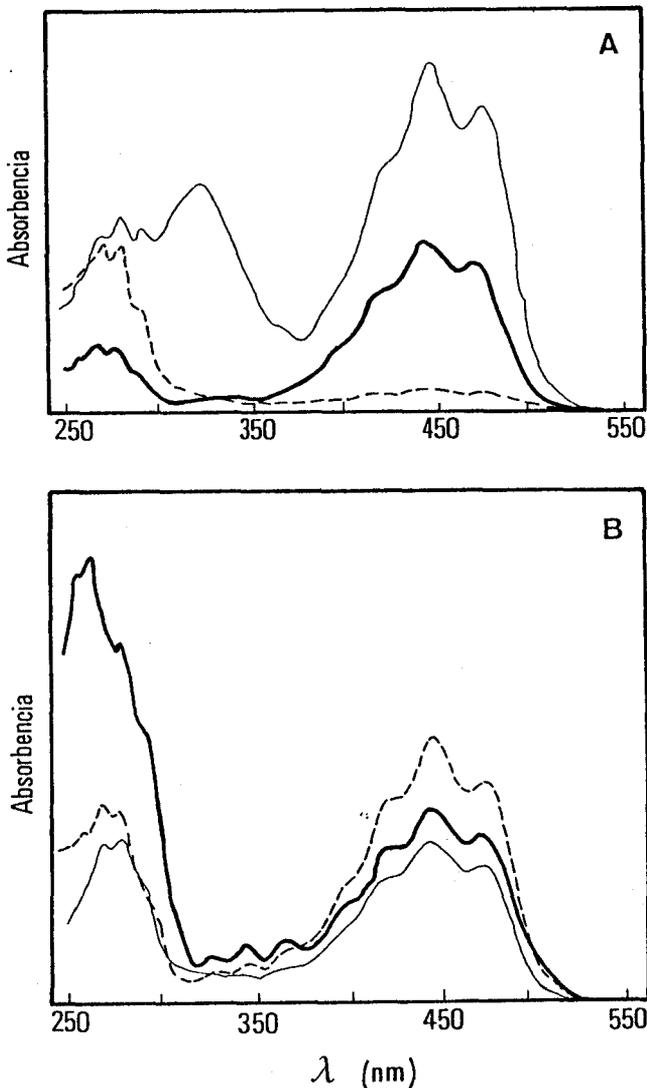


Figura 13. Espectro de absorbancia del extracto en éter de petróleo obtenido a partir del micelio: (A) de un mutante carS (estirpe C115) (—) y de la estirpe silvestre (NRRL1555) cultivada en medio mínimo (----), o en presencia de retinol (1.5 mM) (—); (B) micelio de la estirpe silvestre (NRRL1555) cultivada en presencia de ftalato de dimetilo (3 mM) (—), veratrol (5 mM) (----) y 1,2-dimetoxi-4-propenilbenceno (2.5 mM) (—).

El espectro de absorbencia del extracto obtenido tras extracción con éter de petróleo muestra que en todos los casos el caroteno acumulado es, principalmente, beta-caroteno. Los tres compuestos fenólicos provocan, además, la acumulación de pequeñas cantidades de intermediarios de la carotenogénesis. En los tres espectros aparecen tres picos a 330, 345 y 365 nm (Fig 13) que se corresponden con los descritos para el fitoflueno. La acumulación de fitoflueno es máxima con 1,2-dimetoxi-4-propenilbenceno y mínima con ftalato de dimetilo. El análisis cromatográfico del extracto obtenido de micelios incubados en presencia de retinol permite separarlo y aislar, además, un derivado del retinol (anhidroretinol) e intermediarios de las deshidrogenaciones del fitoeno. Estos intermediarios representan menos del 2% de los carotenos presentes en el micelio.

#### Estimulación química de los mutantes car

Se cultivaron varios mutantes en presencia de distintas concentraciones de retinol y ftalato de dimetilo para determinar si la alteración de los productos génicos correspondientes impide la estimulación (Fig. 14 y 15, Tabla 3).

Las estirpes S119 (portadora de la mutación carA113) y S144 (portadora de la mutación carI131) aisladas como quimio-insensibles al retinol y CPTA respectivamente son parcialmente insensibles al retinol y al ftalato de dimetilo (Fig. 14). La ausencia de respuesta es casi total en S144 y sólo parcial en S119 que en presencia de altas concentraciones de retinol o ftalato de dimetilo multiplica por diez la cantidad de beta-caroteno.

La estirpe albina C2 (mutante del gen carA) experimenta un fuerte incremento en la síntesis de beta-caroteno en presencia de ftalato de dimetilo o de retinol. Lo mismo ocurre con otra estirpe albina S115 (portadora de las mutaciones carS42 y carS111). Ambas estirpes presentan en ausencia de activadores químicos sólo trazas de beta-caroteno (Fig 14).

Por el contrario, las estirpes S92 y C144 (defectivas en las dos funciones del gen carRA) no responden en ninguno de los casos (Fig. 14).

La presencia de ftalato de dimetilo induce la síntesis de los carotenos intermediarios, fitoeno y licopeno, de mutantes carB, carR y carB carR incapaces de efectuar las reacciones de

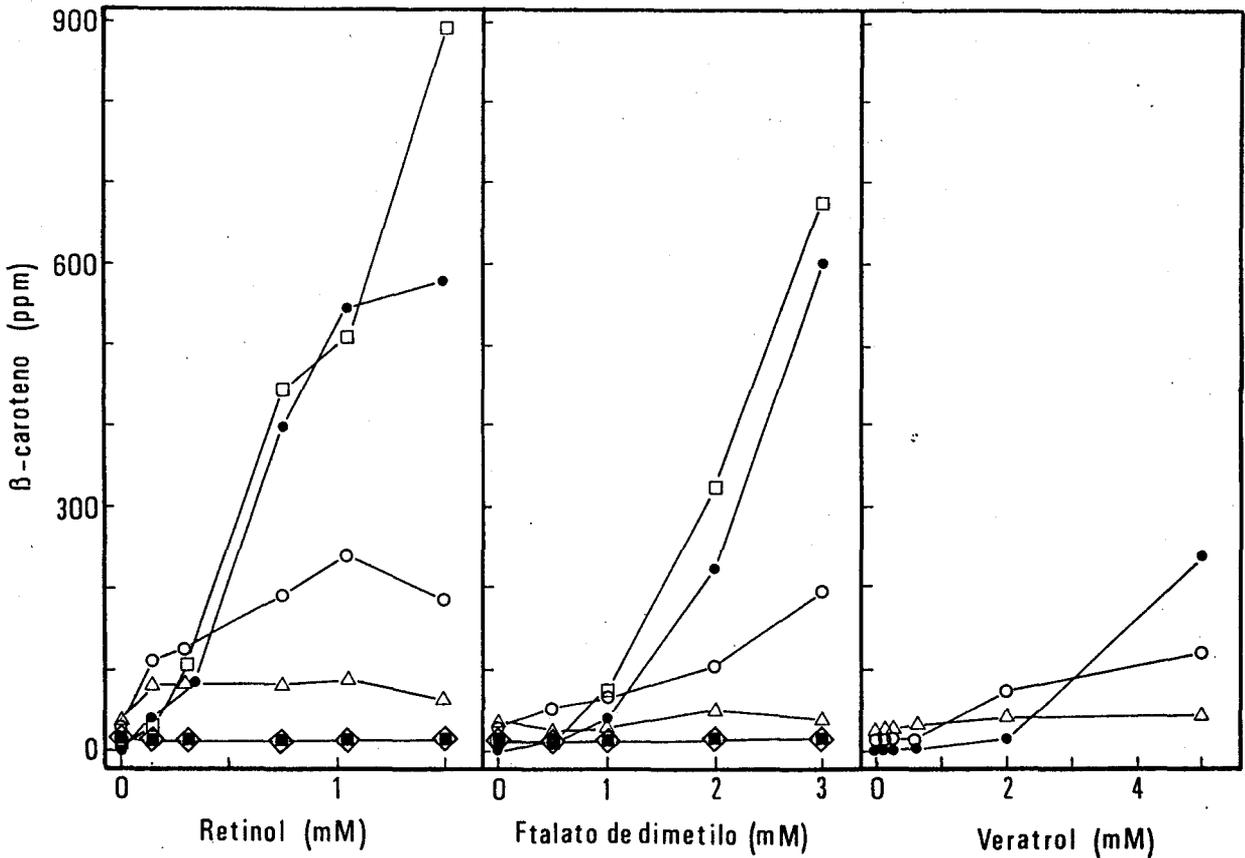


Figura 14. Contenido de caroteno (ppm) presente en el micelio de las estirpes C2 (●), C144 (■), S92 (◇), S115 (□), S119 (○) y S144 (△) cultivadas cuatro días en presencia de retinol, ftalato de dimetilo y veratrol. El caroteno acumulado es licopeno en la estirpe C144 y beta-caroteno en el resto de las estirpes. Los valores son la media de, al menos dos, experimentos independientes

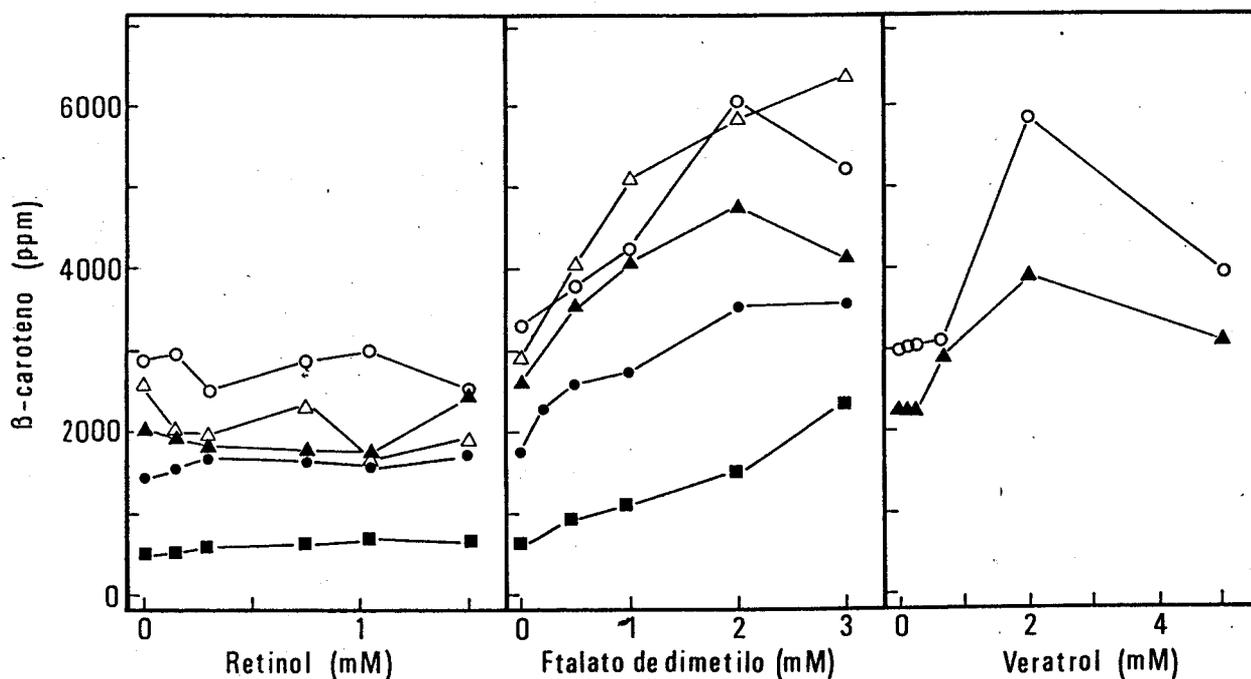


Figura 15. Contenido de caroteno (ppm) presente en el micelio de las estirpes C5 ( $\Delta$ ), C9 ( $\blacktriangle$ ), C115 ( $\circ$ ), C173 ( $\bullet$ ) y S283 ( $\blacksquare$ ) cultivadas cuatro días en presencia de retinol, ftalato de dimetilo y veratrol. El caroteno acumulado es licopeno en la estirpe C9, fitoeno en las estirpes C5 y C173 y beta-caroteno en el resto. Los valores son la media de, al menos dos, experimentos independientes.

deshidrogenación (C5), ciclación (C9) o ambas (C173). El retinol, sin embargo, es incapaz de estimular la carotenogénesis de estos mutantes (Fig. 15).

La ausencia de respuesta frente al ftalato de dimetilo de los dobles mutantes carRA no es debida pues a la ausencia de beta-caroteno, sino a la pérdida total de la función del gen carRA.

La activación de la carotenogénesis por ftalato de dimetilo es también independiente de la función del gen regulatorio carS. Todos los mutantes carS utilizados incrementan su contenido de beta-caroteno al incubarlos en presencia de ftalato de dimetilo. Dicho aumento varía entre 1000 ppm en la estirpe S100 y 5900 ppm en la estirpe S303 (Fig. 15 y Tabla 3).

Por el contrario, el producto del gen carS sí es imprescindible para que se produzca activación por retinol. Se han usado seis mutantes superproductores carS distintos para asegurar esta conclusión, a la vista de la contradicción existente con una observación preliminar del efecto del retinol sobre un mutante superproductor carS (Murillo y Cerdá-Olmedo, 1976). Cinco de los seis mutantes carS estudiados no incrementan la síntesis de beta-caroteno cuando se cultivan en presencia de retinol (Fig. 15 y Tabla 3). El único mutante que incrementa su contenido de caroteno es la estirpe S100, que es precisamente la que menos beta-caroteno produce, lo que indica que probablemente su alelo carS sea rezumante.

ESTIRPE	RETINOL (mM)		FTALATO DE DIMETILO (mM)	
	0	0.75	0	2
NRRL1555	80	1854	75	1042
C115	3110	2869	3654	5748
S100	1738	2724	1829	2805
S177	3421	3497	2489	7241
S178	3728	3498	2675	6167
S276	3672	3712	3581	5005
S303	3589	3265	4295	10209

Tabla 3. Contenido de beta-caroteno (ppm) presente en el micelio de varios mutantes carS cultivados durante cuatro días en presencia o ausencia de retinol y ftalato de dimetilo. Los valores son la media de tres experimentos independientes.

Confirman estas conclusiones el que los dobles mutantes carA carS se comportan como los mutantes simples carS (Fig. 15). Estos dobles mutantes tienen relativamente menos beta-caroteno lo que indica, además, que la falta de respuesta de los mutantes carS al retinol no se debe a su alto contenido de beta-caroteno.

Cuando se realiza el mismo estudio utilizando veratrol, el resultado es similar al obtenido con ftalato de dimetilo. La observación crucial es la activación de la carotenogénesis de las estirpes superproductoras de caroteno: C9, C115 y S303 (Fig. 15).

#### Efecto conjunto del retinol y ftalato de dimetilo

La activación de la carotenogénesis del tipo silvestre por retinol y ftalato de dimetilo es aditiva, como se comprueba usando una concentración saturante de retinol y concentraciones variables de ftalato de dimetilo (Fig. 16 izquierda) o una alta concentración de ftalato de dimetilo y cantidades variables de retinol (Fig 16, derecha).

Los resultados obtenidos con el mutante superproductor del gen carS (estirpe S276) y el doble mutante carA carS (estirpe S283) corroboran los obtenidos anteriormente. La carotenogénesis de las tres estirpes se activa con ftalato de dimetilo y no con retinol. Por el contrario, la de la estirpe S115, mutante del gen carS de fenotipo albino, es activada en ambos casos. El incremento producido es superior al esperado por la simple adición de ambos efectos.

A la vista de los resultados podemos concluir que el ftalato de dimetilo y el retinol no comparten el mismo mecanismo de activación de la carotenogénesis ya que no estimulan a los mismos mutantes. Los resultados cruciales son: los obtenidos con las estirpes que han perdido la función regulatoria del gen carS o de los genes estructurales carB y carR y el efecto aditivo de ambos compuestos sobre el tipo silvestre.

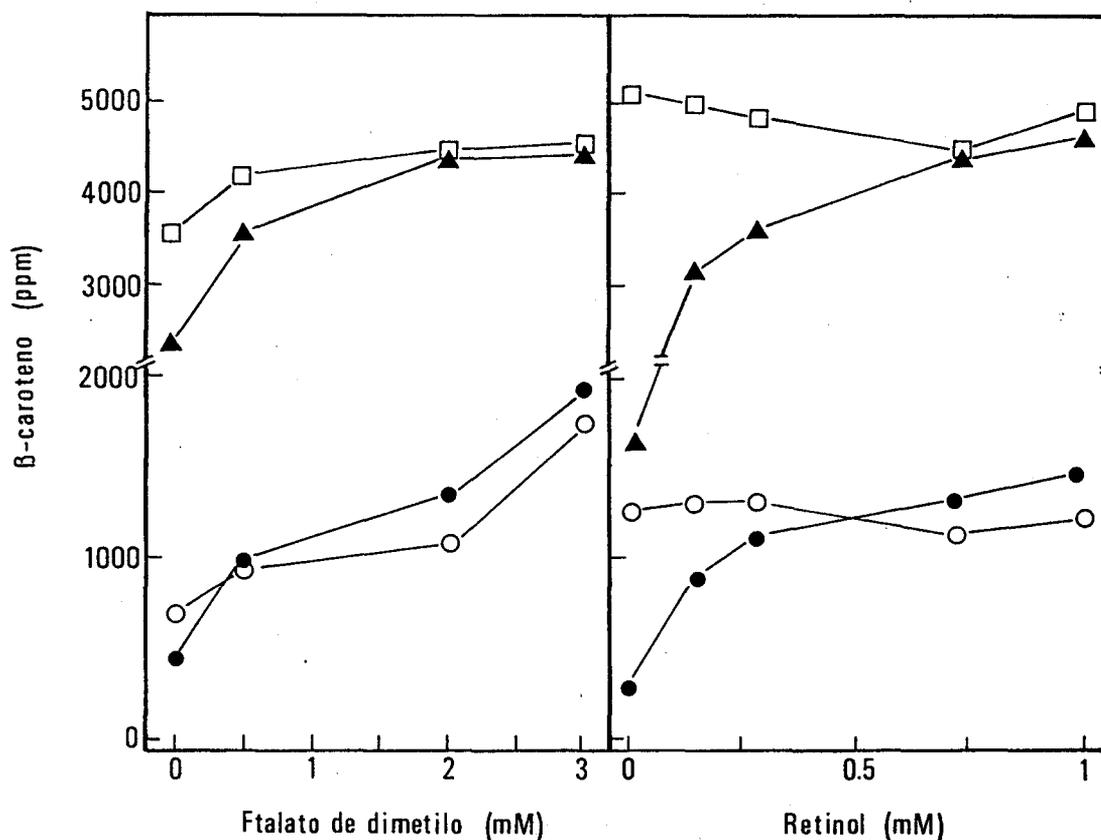


Figura 16. Contenido de beta-caroteno (ppm) presente en el micelio de la estirpe silvestre NRRL1555 (▲) y de los mutantes S115 (●) y S276 (□) y S283 (○) cultivadas cuatro días en presencia de 0.75 mM de retinol y concentraciones variables de ftalato de dimetilo (izquierda) o de 2 mM de ftalato de dimetilo y concentraciones variables de retinol (derecha). Los micelios de la estirpe silvestre NRRL1555 crecidos en las mismas condiciones pero en ausencia de ambos compuestos contienen 135 ppm de beta-caroteno; 4 ppm los de la estirpe S115; 3462 ppm los de la estirpe S276 y 509 ppm los de la estirpe S283.

El ftalato de dimetilo y el veratrol son ejemplos de compuestos que activan la carotenogénesis de los mismo mutantes y por lo tanto comparten el mismo mecanismo de acción. La asignación de otros activadores químicos al grupo del ftalato de dimetilo o del retinol no necesita de un análisis tan extenso como el realizado en este trabajo. Bastaría con un estudio

cualitativo de la activación de los mutantes más importantes carR, carS, carA carS, carI.

### Fotocarotenogénesis

La inducción de la carotenogénesis por la luz requiere, como los demás procesos fotorregulables, un fotorreceptor capaz de captar la señal luminosa y un proceso de transducción sensorial, definido como la secuencia de reacciones que media entre el estímulo y la respuesta final.

¿Qué parámetros definen la fotoinducción de la carotenogénesis en la estirpe silvestre? ¿Puede actuar el beta-caroteno como fotorreceptor de la fotocarotenogénesis? ¿Qué relación existe entre el mecanismo de la fotocarotenogénesis y los de otras activaciones?

Hemos tratado de responder a estas cuestiones estudiando la capacidad fotocarotenogénica de la estirpe silvestre y de diversos mutantes de la síntesis de beta-caroteno.

### Fotocarotenogénesis de la estirpe silvestre

La iluminación continua, empleada en casi todas las investigaciones de la fotocarotenogénesis de Phycomyces, es innecesaria para obtener los resultados óptimos. En el experimento de la Fig. 17, la iluminación del micelio de la estirpe silvestre de Phycomyces durante el tercer y cuarto día de crecimiento produce la misma activación que la iluminación durante los cuatro primeros días.

La ausencia de fotoestimulación adicional durante los dos primeros días de crecimiento del micelio se debe a la existencia de un periodo fotosensible para la carotenogénesis (Fig. 18). La fotosensibilidad del micelio de Phycomyces es máxima durante el cuarto día de crecimiento. La fotodiferenciación de los esporangióforos presenta un fenómeno similar

(Corrochano y Cerdá-Olmedo, 1988), la luz sólo es capaz de regularla durante un determinado periodo del crecimiento. Este periodo no se corresponde con el obtenido para la fotocarotenogénesis pero hay que tener en cuenta que las condiciones de inoculación empleadas en ambos casos son diferentes y que la sensibilidad máxima para ambos procesos coincide con la finalización del crecimiento.

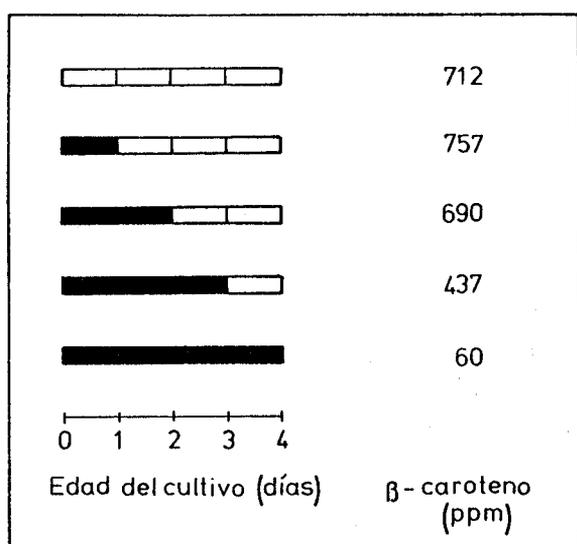


Figura 17. Contenido de beta-caroteno en micelios de la estirpe silvestre (NRRL1555) iluminados ( $15 \text{ W m}^{-2}$  de luz blanca) durante los periodos indicados a la izquierda (barras blancas, iluminación; negras, oscuridad). El caroteno acumulado se extrae a los cuatro días de la inoculación. Los valores son la media de dos experimentos independientes.

En Fusarium aquaeductuum, que presenta una regulación de la carotenogénesis muy diferente a la de Phycomyces, también se ha descrito un periodo de sensibilidad para la fotocarotenogénesis (Rau, comunicación personal).

La ausencia, durante los dos primeros días de crecimiento, del fotorreceptor o de alguno de los elementos que media entre el estímulo y la respuesta final podría ser la causa de la ausencia de respuesta observada en este periodo. El hecho de que la fotodiferenciación de los esporangióforos presente un periodo similar sugiere que el elemento ausente no es específico de la fotocarotenogénesis.

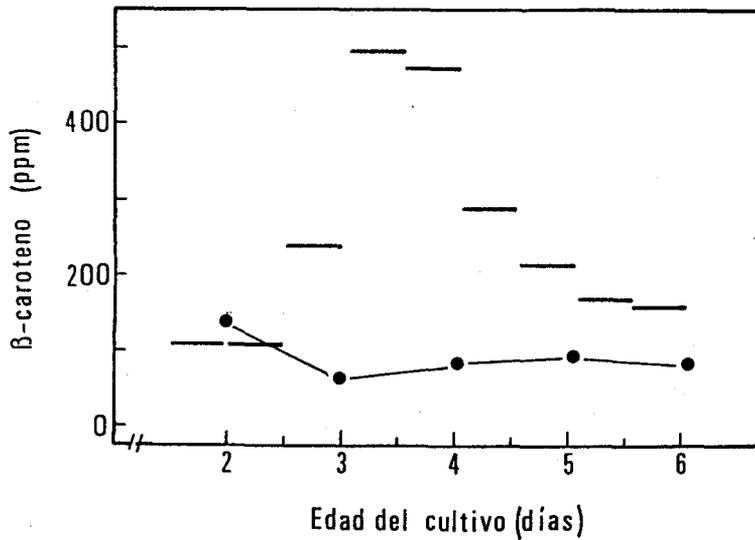


Figura 18. Contenido de beta-caroteno de los micelios de la estirpe silvestre (NRRL 1555) iluminados con luz blanca ( $15 \text{ W m}^{-2}$ ) durante 12 horas en distintos momentos del crecimiento. Las barras horizontales indican el periodo de iluminación y su distancia al eje de abscisas la concentración de beta-caroteno determinada 24 horas después de cesar la iluminación. Los círculos (●) indican la concentración de beta-caroteno en función de la edad de los micelios incubados en oscuridad. Los valores son la media de dos experimentos independientes.

Otra posible explicación vendría dada por la baja cantidad de biomasa existente durante los dos primeros días de crecimiento (Fig. 19). Si asumimos que el efecto de la luz se lleva a cabo mediante la producción de una señal química que actúa como inductor de la carotenogénesis, la ausencia de estimulación durante los dos primeros días es consecuencia de la dilución de esta señal. Todos los elementos necesarios para la estimulación estarían presentes en el micelio desde el principio y la luz induciría la producción de esta señal en cantidad proporcional a la biomasa existente en ese momento. Debido al rápido crecimiento del micelio la señal se diluye, y por lo

tanto, su efecto global es inferior al esperado. Esta hipótesis explicaría porqué no existe respuesta de la carotenogénesis durante el primer día de crecimiento y su aparición es progresiva, alcanzándose el máximo cuando el micelio ha cesado de crecer.

El descenso en la fotoinducción de micelios cultivados más de cuatro días necesita una explicación adicional. Este descenso no se debe a la falta de glucosa en el medio de cultivo (Fig 19) ya que Rauegi et al. (1982) comprobaron que la carotenogénesis de micelios de tres días edad transferidos a un medio sin fuente de carbono es fotoinducible. Tampoco correlaciona con el efecto de sombra que producen los esporangióforos sobre el micelio, ya que su número permanece constante entre el cuarto y noveno día de crecimiento (Corrochano y Cerdá-Olmedo, 1988).

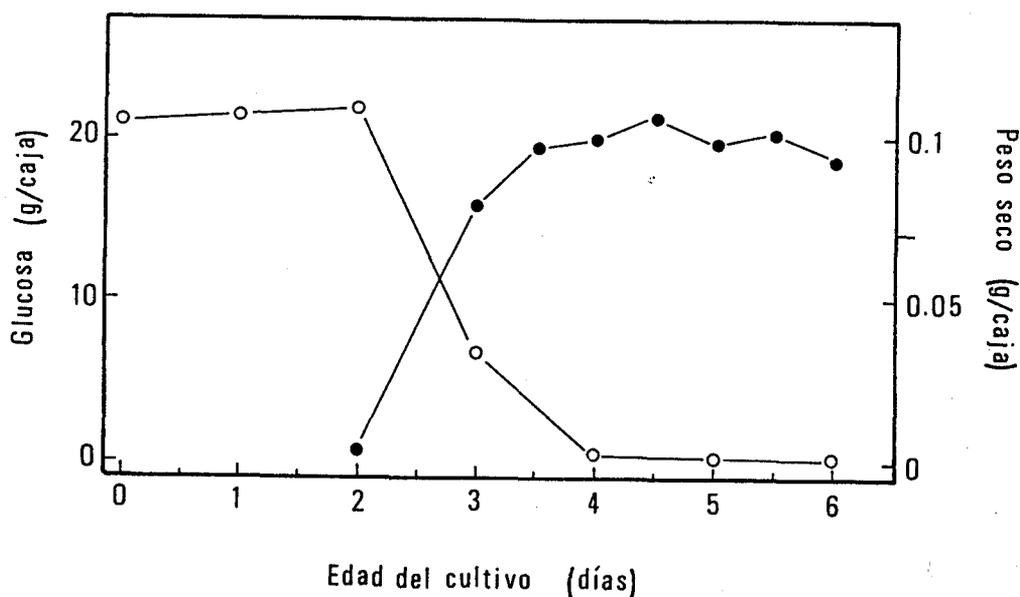


Figura 19. Peso seco del micelio (●) y concentración de glucosa en el medio de cultivo (○) durante el crecimiento de la estirpe silvestre NRRL1555 en la oscuridad.

El nivel de fotoestimulación de la carotenogénesis depende, a una intensidad fija, de la duración de la iluminación. Los resultados, representados en la Fig. 20, indican la existencia de dos componentes en la fotocarotenogénesis como ya sugerían los resultados obtenidos por Jayaram et al. (1979); Whitaker y Shoropshire (1981) y Raugei et al. (1982). El primer componente, que duplica la concentración de beta-caroteno, se satura con menos de un minuto de iluminación. El segundo componente responde a iluminaciones mucho más prolongadas (es decir, flujos luminosos mayores) y llega a multiplicar por diez el contenido en beta-caroteno observado en oscuridad.

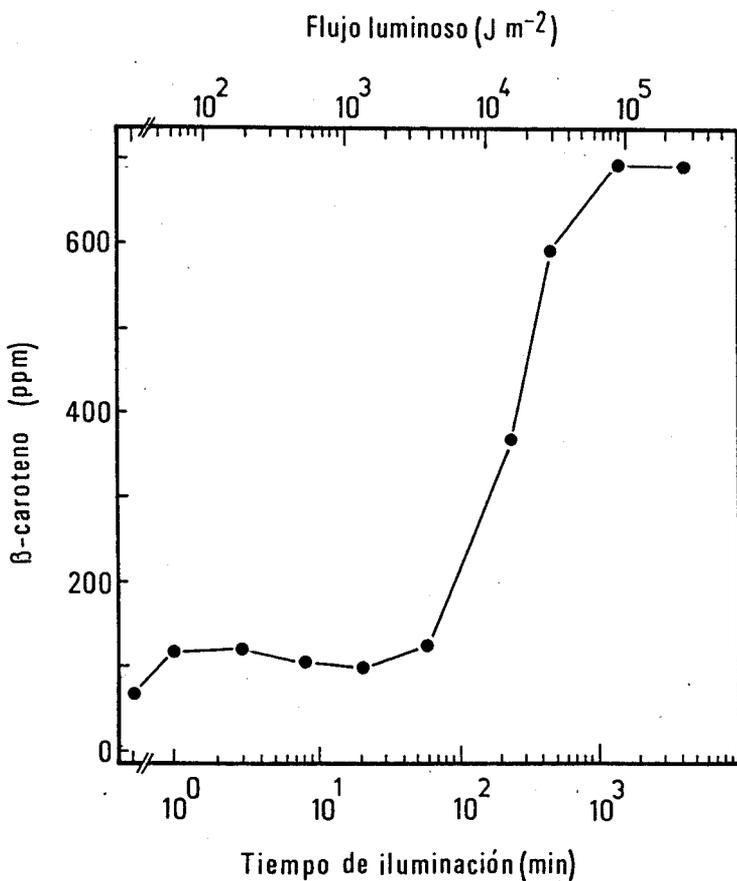


Figura 20. Contenido de beta-caroteno presente en el micelio de la estirpe silvestre NRRL1555 en función del tiempo de iluminación. Los micelios se incuban tres días en oscuridad antes de comenzar la iluminación (luz blanca,  $15 W m^{-2}$ ) y, una vez concluida ésta, se mantienen 24 horas en oscuridad antes de extraer el beta-caroteno. Los valores son la media de dos experimentos independientes

La estimulación de la carotenogénesis por la luz comienza inmediatamente después de empezar la iluminación (Fig. 21). La resolución del experimento no excluye que no exista activación durante la primera hora. Durante la iluminación, el contenido de beta-caroteno aumenta con el tiempo en forma aproximadamente lineal. Cuando cesa, este incremento disminuye inmediatamente pero 36 horas después es aún superior al que existe en oscuridad.

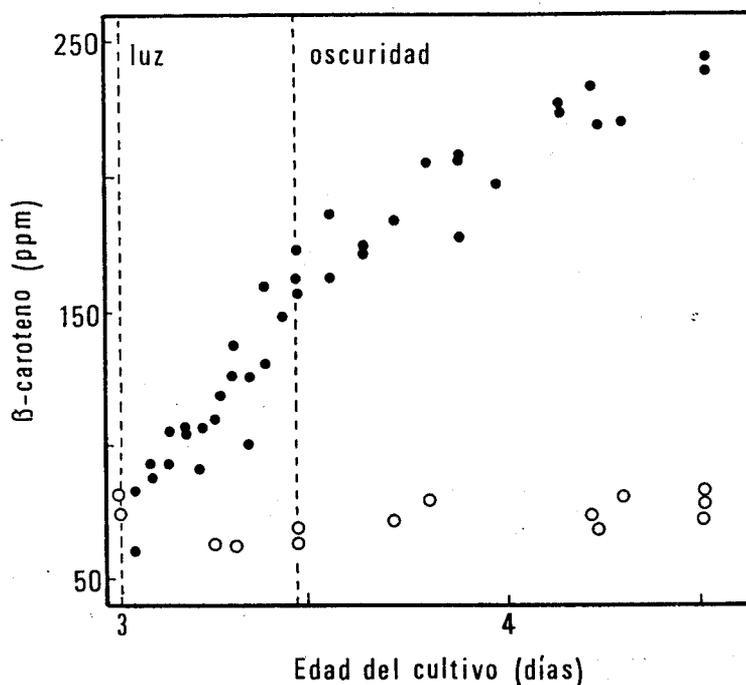


Figura 21. Contenido de beta-caroteno en función de la edad del cultivo. Los círculos blancos representan cultivos mantenidos en oscuridad. Los círculos negros representan cultivos mantenidos tres días en la oscuridad y sometidos al periodo de luz y oscuridad indicado en la figura. Se iluminó con luz blanca ( $2 \text{ W m}^{-2}$ ).

## Fotocarotenogénesis de los mutantes car

La comparación cuantitativa de la fotoinducción en distintos mutantes car requiere que la iluminación se lleve a cabo durante su periodo de sensibilidad. Este periodo podría variar para un mismo mutante con las condiciones de cultivo y para mutantes diferentes con su velocidad de crecimiento. Para resolver este problema se puede determinar el periodo de sensibilidad de cada mutante o utilizar tiempos de iluminación suficientemente largos.

En el caso de los mutantes carB, carR y carS existe el problema adicional de que acumulan en la oscuridad mucho más caroteno que el tipo silvestre en la luz. Para poner de manifiesto la existencia de fotoinducción hemos utilizado las iluminaciones más intensas posibles, ya que el caroteno fotoinducido aumenta con el logaritmo de la intensidad luminosa (López Díaz, 1980; Bergman et al., 1973). A partir de los resultados obtenidos con el silvestre, decidimos estudiar la capacidad fotocarotenogénica de los mutantes car cultivándolos durante 48 horas en oscuridad e iluminándolos durante otras 48 horas con  $15 \text{ W m}^{-2}$  de luz blanca antes de extraer el caroteno.

Los resultados obtenidos en estos estudios aparecen en la Tabla 4. En estas condiciones, la estirpe silvestre NRRL1555 acumula en luz casi diez veces más beta-caroteno que en oscuridad.

Si la presencia de beta-caroteno en el micelio fuera indispensable para la fotoinducción de la carotenogénesis, los mutantes bloqueados en la ruta, y por tanto carentes de beta-caroteno, no deberían ser fotoinducibles. En nuestras condiciones la luz duplica la cantidad de fitoeno acumulado en todos los mutantes carB estudiados. La aparente contradicción existente entre este resultado y los datos preexistentes (Eslava y Cerdá-Olmedo, 1974; Orejas, 1985) se debe a que las condiciones de iluminación utilizadas en estos estudios, sobre todo en lo que se refiere a la intensidad luminosa, son diferentes. Intensidades inferiores a las utilizadas en este

experimento producen una menor estimulación que puede ser interpretada como ausencia de respuesta. Esta sería también la causa de la ausencia de respuesta del mutante S442 (ver página 85 de esta Tesis).

La rezumancia de las mutaciones carB no excluye la síntesis de pequeñas cantidades de beta-caroteno que pudieran bastar para explicar la fotoinducción de dichos mutantes (Russo, 1986). Esta síntesis residual de beta-caroteno es inferior en los dobles mutantes carB carR. La ausencia de fotoestimulación de los dobles mutantes carB carR sugiere que el beta-caroteno es esencial para la fotocarotenogénesis. Sin embargo, la estirpe C9, que acumula en oscuridad pequeñas cantidades de beta-caroteno y que presenta el mismo alelo carR21 que los dos mutantes carB carR estudiados, es casi totalmente insensible a la fotoinducción. La ausencia de fotoestimulación de la estirpe C9 no se debe a otra mutación adicional ya que todos los mutantes carR estudiados presentan el mismo comportamiento. Por lo tanto, la carencia de respuesta de los mutantes carR y de los dobles mutantes carB carR se debe a la mutación carR y no a la carencia de beta-caroteno ni a la presencia de licopeno.

El producto del gen carRA es, al igual que para la estimulación por retinol y ftalato de dimetilo, esencial para la fotocarotenogénesis. Los mutantes carRA (estirpes S92 y C144) no son fotoestimulables (Tabla 4). Sin embargo, al contrario de lo que ocurre con el retinol y el ftalato de dimetilo la alteración de este gen presente en los mutantes carA también impide la respuesta. Este comportamiento permanece aún cuando la concentración de beta-caroteno de los mutantes carA se estimula por la presencia de una mutación adicional en el gen carS (dobles mutantes carA carS). Este resultado es particularmente contundente ya que estos dobles mutantes contienen una concentración ideal de beta-caroteno para que los análisis sean fiables, pero inferior a la que se hubiera esperado de haber fotoinducción. La disminución de la cantidad de beta-caroteno de estos dobles mutantes cultivados en luz puede deberse a fotodestrucción. La posterior incubación de estas

ESTIRPE	GENOTIPO	CAROTENO	OSCURIDAD	LUZ
NRRL1555	Silvestre	Beta-caroteno	64 ± 6.5	540 ± 24.5
C5	<u>carB10</u>	Fitoeno	2330	4098
S20	<u>carB59</u>	" "	2094	4450
S21	<u>carB60</u>	" "	2052	3710
S22	<u>carB61</u>	" "	1989	3991
C173	<u>carB32</u> <u>carR21</u>	Fitoeno	2010	2450
C181	<u>carB40</u> <u>carR21</u>	" "	1335	1151
C9	<u>carR21</u>	Licopeno	2491	2838
C11	<u>carR23</u>	" "	2203	2597
C12	<u>carR42</u>	" "	2448	3175
S13	<u>carR95</u>	" "	2387	2720
S240	<u>carR21</u>	" "	3030	2733
C115	<u>carS42</u> <u>mad-107</u>	Beta-caroteno	1786	4847
S275	<u>carS42</u>	" "	2061	4531
S303	<u>carS179</u>	" "	4621	3959
S115	<u>carS42</u> <u>carS111</u> <u>mad-107</u>	" "	8	11
S226	<u>carD172</u>	Beta-caroteno	591	4370
C2	<u>carA5</u>	Beta-caroteno	5	5
S194	<u>carA51</u>	" "	6	8
S200	<u>carA87</u>	" "	4	2
S203	<u>carA55</u>	" "	9	5
S208	<u>carA57</u>	" "	5	6
S283	<u>carA5</u> <u>carS42</u>	Beta-caroteno	461	303
S470	<u>carA87</u> <u>carS42</u>	" "	533	355
C144	<u>carRA3</u>	Licopeno	8	13
S92	<u>carRA91</u>	Ninguno	nd	nd
S144	<u>carI131</u>	Beta-caroteno	24	184
S119	<u>carA113</u>	" "	22	50

Tabla 4. Contenido (ppm) del caroteno predominante en el tipo silvestre y distintos mutantes car al término de cuatro días de cultivo en la oscuridad o de dos días en la oscuridad y dos en la luz (15 W m<sup>-2</sup>). Concentraciones de caroteno inferiores a 1 ppm no son detectables (nd). Los valores de la tabla son la media de ocho (estirpe NRRL1555, se da el error medio) o dos (el resto de las estirpes) experimentos independientes. En el genotipo sólo se detallan los alelos de interés.

ESTIRPE	LUZ	OSCURIDAD
NRRL1555	58	549
S283	442	253

Tabla 5. Contenido de beta-caroteno (ppm) de la estirpe silvestre NRRL1555 y del doble mutante carA carS (S283) tras cinco días de incubación. Durante los cuatro primeros días los micelios se cultivaron en las mismas condiciones de luz y oscuridad que las descritas en la Tabla 4. Las últimas 24 horas los micelios se cultivaron en oscuridad. Los valores son la media de dos experimentos independientes.

estirpes en oscuridad no modifica el resultado (Tabla 5). Por tanto, se puede concluir que todas las modificaciones del gen carRA, se produzcan en el segmento A, en el R o en ambos, conllevan la insensibilidad al efecto estimulador de la luz sobre la carotenogénesis.

Los mutantes superproductores del gen carS acumulan más beta-caroteno en luz que en oscuridad. La diferencia no es grande en relación con el nivel presente en oscuridad pero es muy importante en términos absolutos. La única excepción es la estirpe S303 que ya acumula en oscuridad una cantidad de beta-caroteno similar a la que tienen en luz el resto de los mutantes superproductores carS. El mutante carS albino (estirpe S115) no es fotoinducible. Este resultado puede prestarse a discusión debido al bajo contenido de beta-caroteno presente en oscuridad y a que sólo se ha estudiado una estirpe. En presencia de luz parece existir un pequeño incremento que puede interpretarse como error experimental y, por lo tanto, como ausencia de estimulación o bien como consecuencia de una estimulación similar, en términos relativos, a la producida en

los mutantes superproductores de este gen. Sin embargo, los resultados obtenidos recientemente por L.M. Salgado con otros dos mutantes carS albinos apoyan la ausencia de estimulación.

La respuesta de la estirpe S226 (mutante carD) es similar a la del tipo silvestre en valor relativo ya que multiplica el contenido de beta-caroteno por diez, pero en términos absolutos es el mayor incremento que se conoce, alcanzando una concentración final de beta-caroteno similar a la de los mutantes carS en luz.

La fotocarotenogénesis de los dos mutantes quimioinsensibles es diferente. El mutante carI (estirpe S144) presenta fotoestimulación similar a la del tipo silvestre, mientras que la estirpe S119 sólo es capaz de duplicar la cantidad de beta-caroteno. El comportamiento de la estirpe S119 no resulta tan extraño si tenemos en cuenta que lleva una mutación en el gen carA.

#### Efecto conjunto de la luz con el ftalato de dimetilo y el sexo

El efecto de la luz sobre la carotenogénesis de un heterocariote intersexual aparece en la Tabla 6.

ESTIRPE	GENOTIPO	CAROTENO	LUZ	OSCURIDAD
A87	lysA401 (-)	Beta-caroteno	592	77
B36	nicA101 (+)	" "	675	43
A87 * B36		" "	1089	186

Tabla 6. Efecto de la luz sobre la acumulación de beta-caroteno del heterocariote intersexual A87 \* B36. Las condiciones experimentales son las de la Tabla 4.

La luz aumenta la concentración de beta-caroteno cualquiera que sea la concentración de ftalato de dimetilo presente en el medio (Fig. 22). La fotoinducción es mayor, en términos absolutos, en presencia de ftalato de dimetilo que en su ausencia.

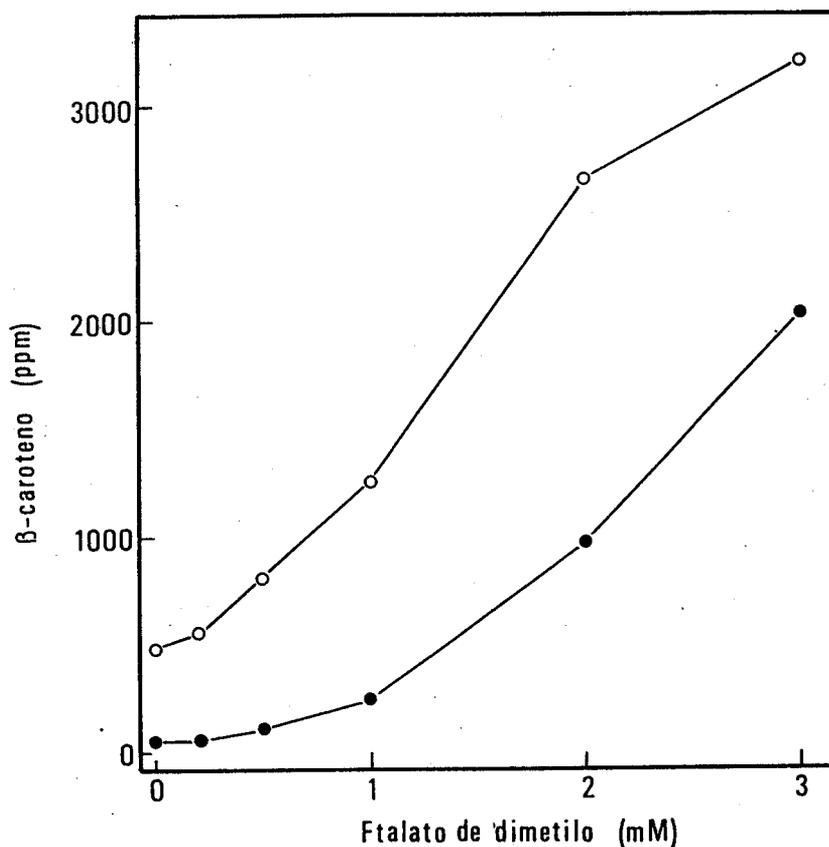


Figura 22. Efecto conjunto del ftalato de dimetilo y la luz sobre el contenido de beta-caroteno de la estirpe silvestre NRRL1555. Los micelios se incuban durante 48 horas en la oscuridad antes de iluminarlos con luz blanca ( $15 \text{ W m}^{-2}$ ) durante otras 48 horas (O) o en oscuridad los cuatro días (●). Los carotenos extraen a continuación.

### Correlación entre las síntesis de carotenos y esteroides

Para decidir si los mecanismos reguladores de la carotenogénesis son comunes a la síntesis de esteroides o son específicos de la rama de los carotenos, determinamos la acumulación de ergosterol en la estirpe silvestre NRRL1555 cultivada en diferentes condiciones que activan la carotenogénesis.

La luz y el ftalato de dimetilo (Tabla 7) estimulan la acumulación de beta-caroteno pero no la de ergosterol. El etanol usado como vehículo para disolver el ftalato de dimetilo no tiene efecto apreciable en ninguna de las dos rutas.

	BETA-CAROTENO	ERGOSTEROL		
		Esterificado	Libre	Total
Oscuridad	80	430	2300	2730
Luz	520	890	2560	3440
Etanol	70	430	2530	2960
Ftalato de dimetilo	2180	540	2280	2820

Tabla 7. Contenido de beta-caroteno y de ergosterol libre y esterificado (ppm) del micelio de la estirpe silvestre NRRL1555 cultivado en medio mínimo durante cuatro días en oscuridad, en luz ( $15 \text{ W m}^{-2}$  de luz blanca), en presencia de etanol (1% V/V) o en presencia de ftalato de dimetilo (3 mM) disuelto en etanol (concentración final en el medio, 1% V/V). Los valores son la media de dos experimentos independientes. Los errores relativos medios fueron de 3% en los análisis de caroteno y de 16% para los ésteres de ergosterol y 5% para el ergosterol libre.

Las diferencias en la concentración total de ergosterol de los diversos mutantes no correlacionan con las existentes para los carotenos (Tabla 8). El porcentaje de ergosterol presente

ESTIRPE	GENOTIPO	CAROTENO	ERGOSTEROL		
			Esterificado	Libre	Total
NRRL1555	silvestre	90	420	2450	4870
S102	silvestre	90	630	2280	2910
C2	<u>carA5</u>	1	510	2070	2570
C5	<u>carB10</u>	2750	850	3570	4420
C115	<u>carS42</u>	2070	700	2470	3160
C9	<u>carR21</u>	2460	N.D.	3110	
S283	<u>carA5</u> <u>carS42</u>	480	230	2510	2730
S119	<u>carA113</u>	20	360	2560	2920
S144	<u>carI131</u>	25	610	2720	3320
C144	<u>carRA3</u>	5	260	2780	3040
A98	<u>carC652</u>	70	660	3020	3690

Tabla 8. Contenido de caroteno y ergosterol libre y esterificado (ppm) de las estirpes NRRL1555, S102 y varios mutantes car incubados durante cuatro días en la oscuridad. Los valores son la media de dos experimentos independientes. (ND) concentración no determinada. Los errores relativos medios fueron de 3% en los análisis de caroteno y de 19% para los ésteres de ergosterol y 10% para el ergosterol libre. En el genotipo se dan sólo los alelos más relevantes.

en forma de ésteres varía fuertemente desde menos del 10% en la estirpe C144 hasta el 25% en la estirpe C115. Esta variación es también independiente de la de caroteno acumulado por los diversos mutantes. La gran variabilidad en la esterificación del ergosterol a lo largo del ciclo vital de Phycomyces (Barlett and Mercer, 1974) y las dificultades de las mediciones precisas del ergosterol esterificado pueden ser las causas de las variaciones descritas.

Ninguno de los factores genéticos y ambientales que regulan la carotenogénesis altera la acumulación de ergosterol. No obstante, no puede excluirse que estas regulaciones afecten a

los primeros pasos de la ruta de los terpenoides si la síntesis de carotenos y esteroides ocurriera en compartimientos subcelulares independientes.

### Papel del anabolismo y el catabolismo en la regulación de la carotenogénesis

La cantidad de beta-caroteno acumulado en el micelio de la estirpe silvestre se mantiene constante al menos del tercer al octavo día de crecimiento. Esta constancia puede reflejar el equilibrio entre una síntesis y una degradación muy activas. También podría haber poca degradación y mantener la síntesis una relación constante con la acumulación de peso seco.

El objeto de este experimento es determinar la relación entre síntesis y degradación. Para ello, se transfieren un micelio silvestre que contenga beta-caroteno radiactivo a un medio no radiactivo. La radiactividad absoluta del beta-caroteno debe mantenerse constante si es cierto que el beta-caroteno se metaboliza poco, o bajar rápidamente, si existe un metabolismo muy activo. Si este experimento se lleva a cabo además con un mutante carS podremos determinar si su aumento en el contenido de beta-caroteno se debe a una menor degradación de éste o a una síntesis más activa. No se conoce un buen método de marcado radiactivo del beta-caroteno. El menos malo consiste en emplear mevalonato radiactivo, aunque compite mal con el mevalonato endógeno. Torres-Martínez (1980) realizó este experimento con mevalonato en su forma lactona y obtuvo un marcado muy escaso del beta-caroteno (Murillo et al. 1981).

En investigaciones previas descubrimos que el mevalonato sódico revertía el efecto de la mevinolina (un inhibidor de la reductasa de 3-hidroximetilglutaril-CoA) (Alberts et al., 1980) a concentraciones inferiores que la lactona. Por ello decidimos repetir el experimento utilizando mevalonato sódico radiactivo.

ESTIRPE	MUESTRA	<u>PESO SECO</u>	<u>BETA-CAROTENO</u>		<u>LIPIDOS TOTALES</u>
		mg	ug	Bq	Bq
Experimento 1					
NRRL1555	A	107	11	21	853
"	B	100	13	23	645
C115	A	107	327	66	901
"	B	98	365	61	861
Experimento 2					
NRRL1555	A	106	11	46	1035
"	B	92	14	36	842
C115	A	104	154	129	1180
"	B	93	177	124	967

Tabla 9. Marcado radiactivo del beta-caroteno. La muestra A corresponde al micelio recogido a los 4 días y cultivado en presencia de DL-(2-<sup>14</sup>C) mevalonato. La muestra B fue incubada dos días más en medio sin mevalonato. El beta-caroteno se purificó por cromatografía en capa fina (experimento 1) o por cromatografía en columna (experimento 2). En cada experimento se da la media de dos repeticiones. Los errores relativos medios fueron de 4% para los análisis de caroteno, 3% para el peso seco, 5% para la radiactividad en beta-caroteno y 5% para la presente en lípidos.

Se cultivó la estirpe NRRL1555 (silvestre) y C115 (mutante carS) en membranas de diálisis colocadas sobre agar mínimo que contenía  $4.6 \times 10^4$  Bq de DL-(2-<sup>14</sup>C)mevalonato sódico a  $2.7 \times 10^5$  Bq mmol<sup>-1</sup>. A los cuatro días se recolectó la mitad del micelio (muestra A). La otra mitad se colocó sobre medio sin mevalonato y se recolectó dos días después (muestra B). Se extrajeron los lípidos de las dos muestras y se purificó

	NRRL1555		C115	
	A	B	A	B
Beta-caroteno	287	182	54	47
Ergosterol esterificado	116	159	150	154
Ergosterol libre	159	138	148	138
Ergosterol total	148	142	149	142

Tabla 10. Radioactividad específica (Bq por umol de unidad de isopreno) del beta-caroteno, del ergosterol esterificado y del ergosterol libre correspondientes al experimento 2 de la tabla 9 (hay ocho unidades de isopreno en cada molécula de beta-caroteno y seis en la de ergosterol). La muestra A corresponde al micelio cultivado a los 4 días en presencia de DL-(2-14C)mevalonato. La muestra B fue incubada dos días más en medio sin mevalonato. Los errores relativos medios fueron del 15% para la determinación de radiactividad presente en ésteres de ergosterol y del 3% para el ergosterol libre.

por cromatografía el beta-caroteno, determinandose su concentración y radiactividad.

La neutralización del mevalonato con hidróxido sódico mejora la incorporación de radiactividad en beta-caroteno y, en el caso del mutante carS, es unas siete veces superior a la descrita por Torres-Martínez (1980) para el mutante carS (Murillo et al. (1981)). Entre los días 4 y 6 no varían apreciablemente ni el peso seco del micelio, ni la cantidad y ni la radiactividad del beta-caroteno (Tabla 9). Por lo tanto, la degradación del beta-caroteno, si existe, es muy escasa. El aumento en la acumulación de caroteno producida por la mutación carS no se debe a la pérdida de un hipotético catabolismo del beta-caroteno, sino al aumento de su síntesis.

En el experimento 2 de la Tabla 9 se separaron mediante cromatografía en columna cuatro fracciones radioactivas. Por el espectro de absorción se comprobó que una de ellas contenía beta-caroteno y otras dos ergosterol (esterificado o libre).

Suponiendo que la radiactividad detectada en ambas fracciones se deba al ergosterol hemos calculado la radiactividad específica del beta-caroteno y el ergosterol.

La radiactividad específica de los terpenoides sintetizados (Tabla 10) es similar a la del mevalonato añadido al cultivo ( $2.7 \times 10^2 \text{ Bq } \mu\text{mol}^{-1}$ ), lo que indica que la incorporación de mevalonato exógeno es muy eficaz. La radiactividad específica del ergosterol es aproximadamente la misma en todos los casos; el 54% del ergosterol acumulado procede del mevalonato exógeno y el resto del endógeno. En la estirpe silvestre todo el beta-caroteno procede del mevalonato exógeno, mientras que en el mutante carS, sólo el 19% tiene esta procedencia.

La distinta radiactividad específica del ergosterol y del beta-caroteno puede explicarse como consecuencia de la compartimentación de las síntesis respectivas. El mevalonato que penetra en la célula sería transformado en ergosterol o beta-caroteno dependiendo de su accesibilidad a las enzimas de la carotenogénesis o de la esterogénesis.

El producto del gen carS no afecta a la regulación de la síntesis de ergosterol puesto que en presencia de esta mutación no varía ni la concentración ni la radiactividad específica del ergosterol.

Por el contrario, la mutación carS produce un aumento de la síntesis endógena de mevalonato que diluye al mevalonato exógeno. El mevalonato adicional, debido a la compartimentación de la ruta, produce beta-caroteno, pero no ergosterol. Una posible interpretación de este resultado es que en el tipo silvestre, el producto del gen carS inhibiría la producción de mevalonato dedicada especialmente a la síntesis de caroteno.

La reductasa de 3-hidroximetilglutaril-CoA juega un papel central en la regulación de la síntesis de colesterol en ratas Rodwell et al. (1976). Posiblemente la regulación mediada por el producto del gen carS tenga lugar a este nivel.

Es posible que las enzimas que transforman el 3-hidroximetilglutaril-CoA en farnesil-pirofosfato sean distintas para



ambas rutas. Estas enzimas podrían tener una regulación independiente, de manera que el producto del gen carS sólo pudiera regular la síntesis de la enzima específica de la carotenogénesis. Si es cierto, deben de existir mutantes albinos de Phycomyces que en presencia de mevalonato serían capaces de sintetizar caroteno. Esta hipótesis sería comprobable mediante la obtención de estos mutantes o la estimación del número de copias del gen que determina la reductasa de 3-hidroximetilglutaril CoA presente en el genomio de P. blakesleeanus.

Esta explicación no excluye la posibilidad de que la disminución de la radiactividad específica del beta-caroteno del mutante carS se deba, al menos en parte, al aumento de actividad de las enzimas posteriores a la síntesis del mevalonato.

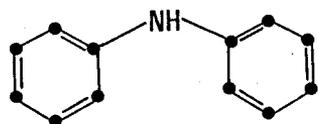
#### INHIBICION DE LA CAROTENOGENESIS

La inhibición de las enzimas que transforman el fitoeno en beta-caroteno conlleva un incremento en la actividad global de la ruta. Hemos utilizado el mismo criterio que con el retinol, ftalato de dimetilo y la luz para determinar la relación existente entre esta activación y las demás estimulaciones conocidas.

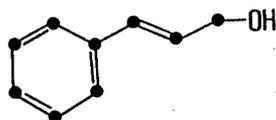
#### Inhibición química de la deshidrogenasa del fitoeno

Hemos estudiado los efectos de dos compuestos químicos (alcohol cinámico y timol) en cuya presencia el micelio del tipo silvestre es de color amarillo verdoso y los hemos comparado a los que produce la difenilamina (un inhibidor universal de la síntesis de carotenos)(Fig. 22). Los tres compuestos inhiben el crecimiento vegetativo, lo que establece un límite superior a las concentraciones de estos compuestos que se pueden utilizar en la práctica.

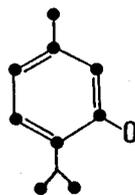
El cambio de color del micelio en presencia de los tres



Difenilamina



Alcohol cinámico



Timol

Figura 22. Fórmulas de los inhibidores utilizados en este trabajo.

CAROTENO	ALCOHOL CINAMICO		TIMOL		DIFENILAMINA	
	ppm	%	ppm	%	ppm	%
Fitoeno	2806	84.4	2051	82.8	2325	90.9
Fitoflueno	231	6.9	215	8.7	164	6.4
Zeta-caroteno	127	3.8	106	4.3	44	1.7
Neurosporeno	48	1.4	43	1.7	18	0.7
Beta-caroteno	111	3.3	61	2.5	6	0.2
TOTAL	3323		2476		2557	

Tabla 11. Contenido y porcentaje de los carotenos presentes en el micelio de la estirpe silvestre NRRL1555 cultivada durante 4 días en oscuridad en presencia de alcohol cinámico (2 mM), timol (2 mM) o difenilamina (100  $\mu$ M). En ausencia de los compuestos químicos, la estirpe NRRL 1555 acumula en las mismas condiciones de cultivo 60 ppm de beta-caroteno. Los valores son la media de tres experimentos independientes.

compuestos se debe a la acumulación de carotenos intermedios de la deshidrogenación del fitoeno (Tabla 11). En los tres casos se produce un aumento de la cantidad total de carotenos acumulados y de la proporción relativa de los carotenos más insaturados. Sin embargo, los efectos del alcohol cinámico y el timol no son completamente idénticos al de la difenilamina. La principal diferencia es que mientras la difenilamina disminuye la concentración de beta-caroteno, los otros dos, al menos a ciertas concentraciones, la aumentan ligeramente. La estimulación es mayor con alcohol cinámico que con timol.

La activación global que se produce al bloquear la ruta se ha atribuido a la disminución de la concentración de beta-caroteno. Este no parece ser el caso del alcohol cinámico ni del timol, para los que la inhibición de la deshidrogenación y la estimulación global parecen ser efectos independientes.

#### Inhibición química de las deshidrogenasas de los mutantes car

La Tabla 12 muestra los resultados obtenidos al cultivar distintos mutantes de la carotenogénesis en presencia de alcohol cinámico o difenilamina.

La deshidrogenasa del fitoeno de todos los mutantes car es inhibida por ambos compuestos de manera similar. La única excepción es el mutante carB (estirpe C5), que carece de una deshidrogenasa funcional.

En las estirpes C5, C9 y C115, que han perdido la regulación por producto final, la difenilamina no modifica la concentración total de caroteno, mientras que el alcohol cinámico la duplica.

Ambos compuestos activan la síntesis de caroteno del mutante carA (estirpe C2), aunque en forma cualitativa y cuantitativamente diferente.

Las estirpes S119 y S144 son insensibles al efecto estimulador de ambos compuestos, pero no a su efecto inhibitorio.

CAROTENO	C2		C5		C9	
	DFA	AC	DFA	AC	DFA	AC
Fitoeno	280	1057	2584	3989	1850	2133
Fitoflueno	4	103	nd	nd	120	252
Zeta-caroteno	nd	39	nd	nd	18	123
Neurosporeno	nd	24	nd	nd	10	114
Licopeno	nd	nd	nd	nd	28	2043
Beta-caroteno	nd	36	nd	nd	nd	24
TOTAL	284	1259	2584	3989	2026	4689

CAROTENO	C115		S119		S144	
	DFA	AC	DFA	AC	DFA	AC
Fitoeno	2315	2422	120	338	104	149
Fitoflueno	190	275	17	11	5	12
Zeta-caroteno	28	130	5	12	nd	4
Neurosporeno	10	99	nd	4	nd	nd
Licopeno	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Beta-caroteno	48	1886	nd	6	nd	5
TOTAL	2591	4812	142	371	109	170

Tabla 12. Contenido en caroteno (ppm) de varios mutantes car cultivados durante 4 días en oscuridad y en presencia de 100 uM de difenilamina (DFA) o 2 mM de alcohol cinámico (AC). En ausencia de éstos, las estirpes C2 (4 ppm), C115 (3200 ppm), S119 (24 ppm) y S144 (43 ppm) acumulan predominantemente beta-caroteno; licopeno la estirpe C9 (2578 ppm) y fitoeno la estirpe C5 (2856 ppm). Concentraciones de caroteno inferiores a 1 ppm no son detectables (nd). Los valores de la tabla son la media de dos experimentos independientes.

## Efecto conjunto de la luz y los inhibidores químicos

La luz modifica la cantidad y la concentración relativa de los carotenos acumulados en presencia de alcohol cinámico y difenilamina (Tabla 13). Las modificaciones no son idénticas en ambos casos. Cuando se ilumina un micelio crecido en presencia de alcohol cinámico, la concentración total de caroteno se triplica y el fitoeno es prácticamente el único caroteno acumulado. Si el micelio crece en presencia de difenilamina, la luz sólo incrementa en un 40% la concentración de fitoeno y la proporción y cantidad del resto de los carotenos se mantiene con excepción de la del beta-caroteno.

CAROTENO	ALCOHOL CINAMICO		DIFENILAMINA	
	Luz	Oscuridad	Luz	Oscuridad
Fitoeno	6885	1815	3656	2767
Fitoflueno	1	105	147	211
Zeta-caroteno	7	46	92	74
Neurosporeno	nd	10	15	5
Beta-caroteno	nd	43	67	2
<b>TOTAL</b>	<b>6893</b>	<b>2019</b>	<b>3977</b>	<b>3059</b>

Tabla 13. Efecto conjunto de la luz blanca ( $15 \text{ W m}^{-2}$ ) y el alcohol cinámico (2 mM) o difenilamina (100  $\mu\text{M}$ ) sobre el contenido en caroteno (ppm) de la estirpe silvestre NRRL1555 en medio mínimo. Concentraciones de caroteno inferiores a 1 ppm no son detectables (nd). Los micelios se cultivan durante dos días en oscuridad antes de proceder a su iluminación durante dos días más. En ausencia de los productos químicos la estirpe NRRL1555 acumula 56 ppm de beta-caroteno en oscuridad y 546 ppm en luz. Los valores de la tabla son la media de dos experimentos independientes

La disminución, en ambos casos, de la proporción de fitoflueno a de zeta-caroteno es debida, seguramente, a la mayor fotosensibilidad del fitoflueno (ver Figura 24).

### Un mutante verde

Ciertas mutaciones del gen carB tienen un efecto parecido al de los inhibidores descritos en la sección anterior. Los mutantes con un leve tono amarillo verdoso no son raros; almacenan grandes cantidades de fitoeno y cantidades muy inferiores de los demás intermediarios de las reacciones de deshidrogenación (Eslava y Cerdá Olmedo, 1973).

Hemos encontrado un nuevo mutante, la estirpe S442, con un fenotipo muy llamativo: sus micelios y esporangióforos jóvenes son verdosos y presentan una intensa fluorescencia verde cuando se irradian con luz ultravioleta cercana. Los mutantes de este fenotipo son raros: sólo se encontró uno tras el reconocimiento visual de unas quinientas mil colonias producidas por esporas de la estirpe Cl15 expuestas a N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina. S442, como su estirpe parental, crece normalmente en medio mínimo y sus esporangióforos presentan un fototropismo muy escaso.

### Análisis de carotenos

En S442 (Tabla 14) predomina el fitoeno, pero llama sobre todo la atención la desusada abundancia de zeta-caroteno, causa principal del color verde, y también de fitoflueno, responsable de la fluorescencia. En ningún caso se detectaron licopeno, gamma-caroteno o beta-caroteno. La composición se mantiene constante durante muchos días en micelios cultivados en oscuridad (Fig 24).

En todos los análisis aparece otro compuesto cuyas propiedades cromatográficas y espectrofotométricas recuerdan las

de los carotenos. Se parece al zeta-caroteno por su espectro de absorción (Fig. 23), pero es más polar que éste, puesto que para eluirlo de columnas de óxido de aluminio hace falta mucho más éter etílico. Si atribuimos al nuevo compuesto el coeficiente de extinción del zeta-caroteno, la estirpe S442 contiene unos 10 ug del nuevo compuesto por g de peso seco si se cultiva en la oscuridad, y unos 30 si se cultiva en la luz. Esta diferencia excluye que el nuevo compuesto sea un artefacto analítico. El aumento de polaridad sugiere que se trata de un producto de oxidación del zeta-caroteno. La luz favorecería este proceso mediante la producción de radicales oxigenados.

CAROTENO	CONCENTRACION (ppm)
Fitoeno	2667 ± 213
Fitoflueno	69 ± 20
Zeta-caroteno	454 ± 62
Neurosporeno	3 ± 1
Total	3193

Tabla 14. Contenido de caroteno de la estirpe S442 cultivada cuatro días en oscuridad. En la tabla se da el error medio.

### Efecto de la luz y reguladores químicos

La iluminación continua de S442 con luz blanca ( $0.4 \text{ W m}^{-2}$ ) no estimula la carotenogénesis. Por el contrario, a partir del quinto día disminuyen los carotenos que absorben a mayores longitudes de onda (Fig. 24), debido posiblemente a fotodestrucción.

El retinol no afecta a la carotenogénesis de S442, pero el

ftalato de dimetilo duplica la cantidad de fitoeno acumulado sin afectar al resto de los carotenos (Fig. 25). Este comportamiento coincide con el de los demás mutantes que carecen de inhibición de la carotenogénesis por producto final, entre los que se encuentra C115, origen de S442.

La reducida actividad deshidrogenasa de carotenos de la estirpe S442, como todas las conocidas, es sensible a la difenilamina (Fig. 25).

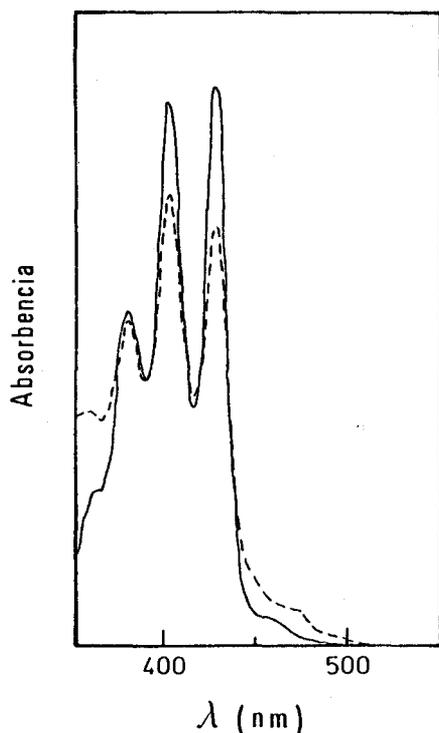


Figura 23. Espectro de absorción en hexano del zeta-caroteno (—) y del caroteno no identificado (----) presentes en el micelio de la estirpe S442.

### Análisis por complementación

La mutación responsable del color verde de S442 es recesiva porque los heterocariontes que contienen núcleos S102 y S442 son amarillos y producen beta-caroteno. Por el contrario, los heterocariontes de S442 y C5 (el más estudiado de los mutantes carB) no fabrican beta-caroteno ni tienen mayor actividad deshidrogenasa que los homocariontes que los componen (Fig. 26). Podemos concluir que la mutación carB10 de C5 no complementa a la mutación responsable del fenotipo de la

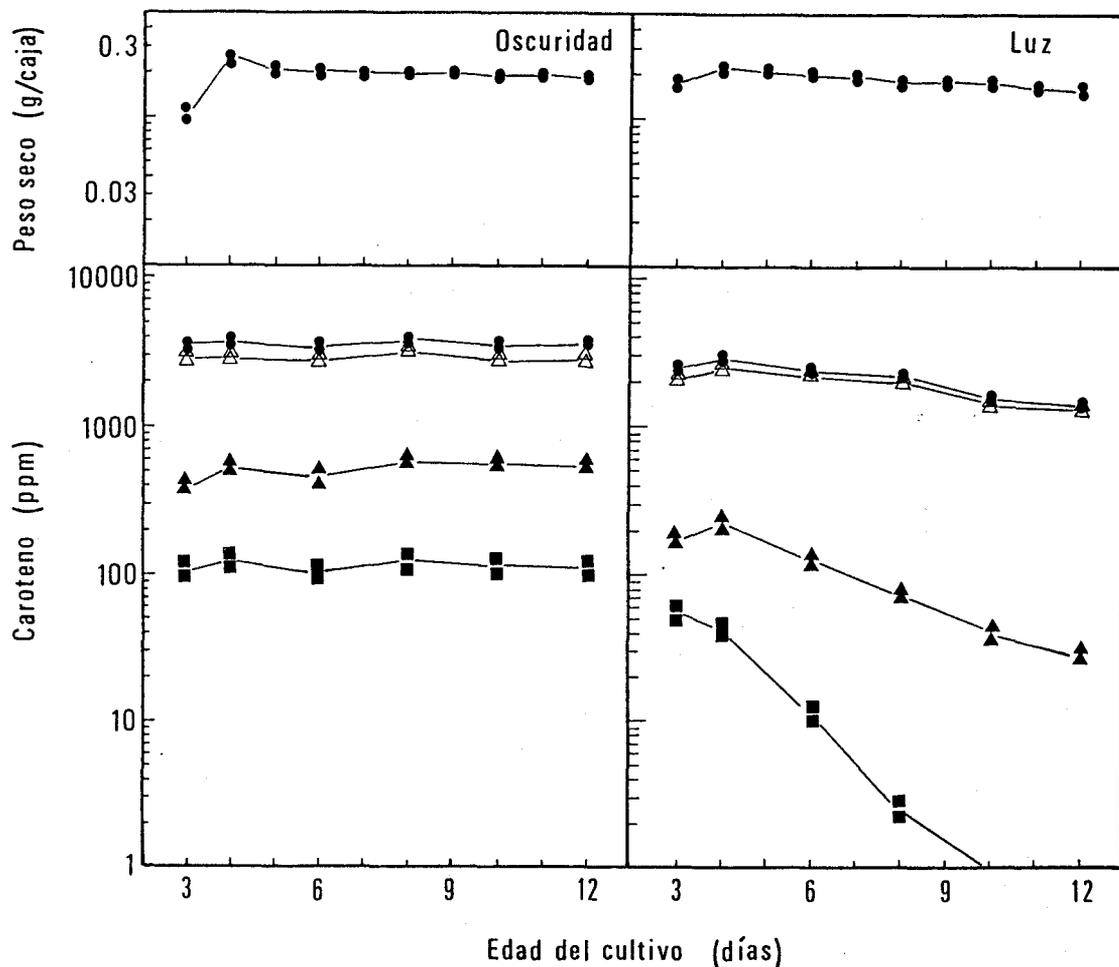
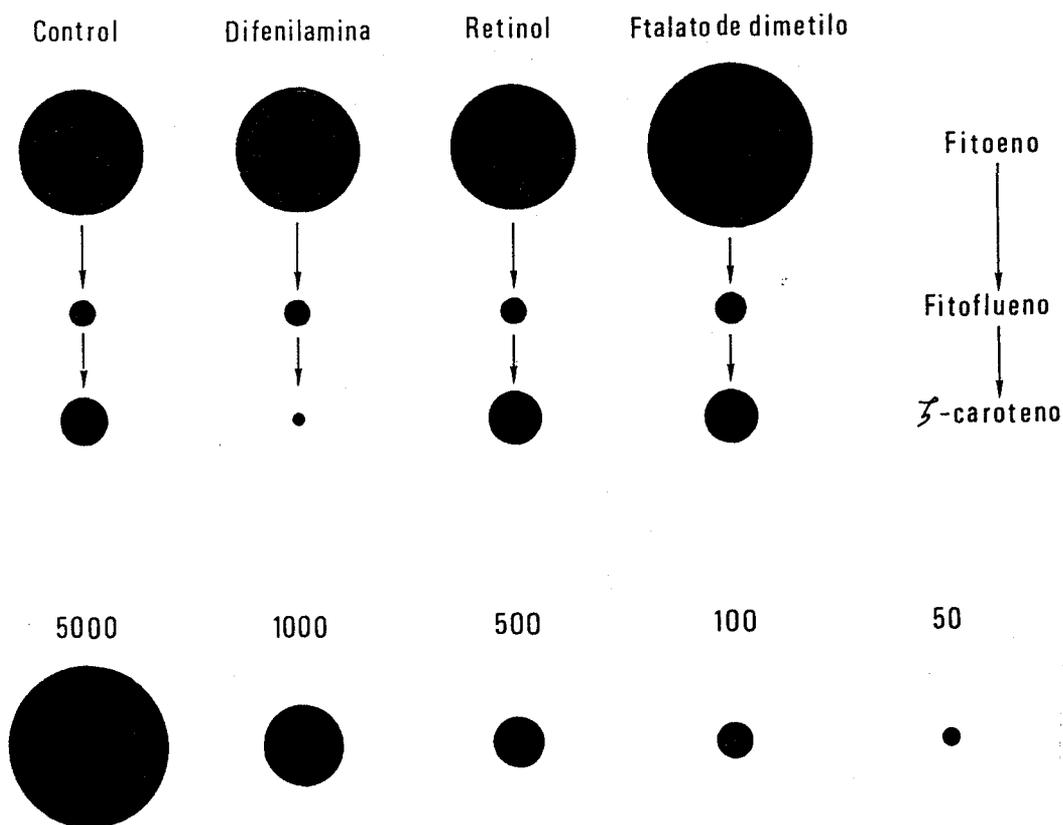


Figura 24. Crecimiento y contenido de caroteno de la estirpe S442 cultivada en oscuridad (izquierda) o en luz (derecha). Fitoeno ( ), fitofluena ( ), zeta-caroteno ( ) y caroteno total ( ).

estirpe S442. A esta nueva mutación la denominamos carB401. La conclusión de que ambas mutaciones están en el mismo gen implica que S442 tiene una alteración en la deshidrogenasa de los carotenos, que disminuye drásticamente la actividad global y es completamente incapaz de realizar la tercera deshidrogenación.



**Figura 25.** Contenido de fitoeno, fitoflueno y zeta-caroteno (ppm) de la estirpe S442 cultivada cuatro días en presencia de difenilamina (100  $\mu$ M), ftalato de dimetilo (2 mM) o retinol (1 mM). La superficie de los círculos es proporcional a la concentración en ppm (escala inferior). Las flechas indican las reacciones de deshidrogenación.

### Búsqueda de nuevos mutantes verdes

El color verde de S442 destaca mucho sobre el fondo intensamente anaranjado de las colonias de C115, pero poco sobre un fondo silvestre. La extremada rareza de las mutaciones de este tipo y el uso habitual del tipo silvestre como punto de partida en la búsqueda de mutantes explican el que no se hubieran aislado antes.

En efecto, mezclando esporas de las estirpes S102, de color amarillo normal, y S442 se comprobó que con luz natural no es posible distinguir una colonia verdosa que comparta con más

de 50 colonias amarillas los 50 cm<sup>2</sup> de la superficie de una caja usual. Sin embargo, bajo una lámpara que emite radiación ultravioleta cercana, se puede distinguir una entre mil.

Conocidos estos resultados, se buscaron nuevos mutantes a partir de esporas de la estirpe S102 expuestas a N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina. Tras el reconocimiento visual de unas doscientas mil colonias seleccionamos cinco que presentaban fluorescencia verdosa. Su análisis de carotenos se parece al de los mutantes descritos por Eslava y Cerdá Olmedo (1974) y no al de la estirpe S442.

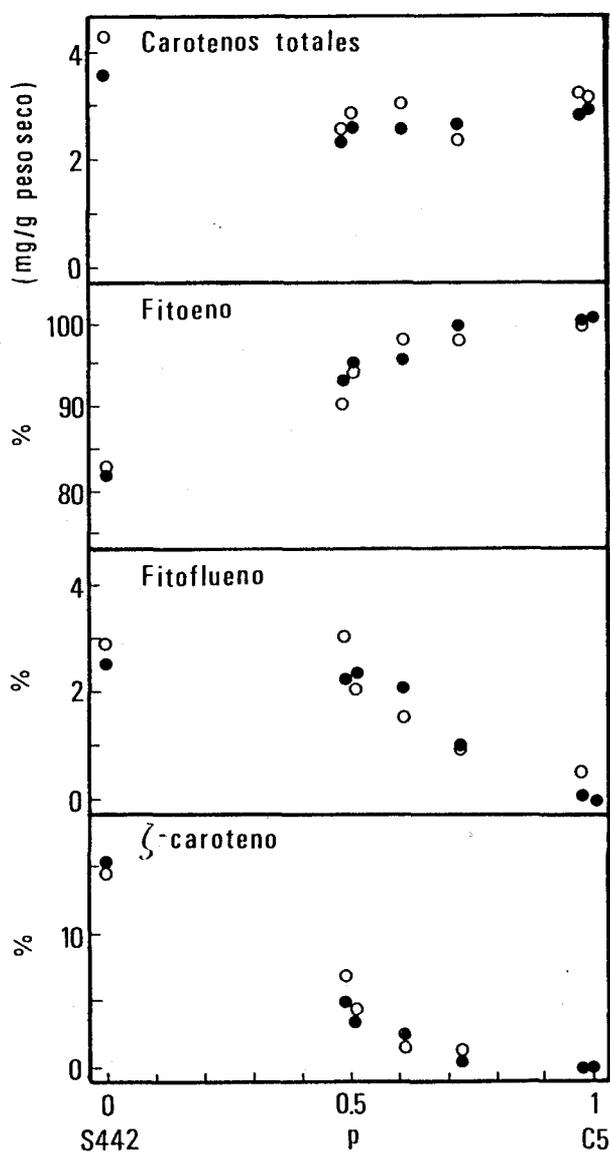


Figura 26. Contenido de los carotenos presentes en cinco heterocariotes que contienen diferentes proporciones de núcleos (p) de la estirpe C5 y S442. Los símbolos (●) representan la suma de los carotenos y el porcentaje de fitoeno, fitoflueno y zeta-caroteno de cultivos crecidos en medio mínimo y los símbolos (○) de cultivos crecidos en SIVEL. El neurosporeno y el caroteno no identificado, que no están representados en la figura, representan menos del 1% del caroteno total. En ningún caso se detectó beta-caroteno, licopeno ni gamma-caroteno.

## Naturaleza del mutante verde

Los resultados, sobre todo los de complementación, excluyen que la abundancia de zeta-caroteno en la estirpe S442 se deba a la alteración de una deshidrogenasa específica para este caroteno. El fenotipo de S442 es consecuencia de una mutación poco común del gen carB, responsable de las cuatro deshidrogenaciones de la ruta.

Sin embargo, la mutación no afecta por igual a las cuatro deshidrogenaciones, lo que llevaría a la acumulación de los carotenos parcialmente saturados en cantidades decrecientes como en otros mutantes del gen carB (Eslava y Cerdá Olmedo, 1973). El 84% de las moléculas de fitoeno sintetizadas en S442 permanecen como tal; sólo el 16% sufre la primera deshidrogenación y se convierten en fitoflueno. El 17% de las moléculas de fitoflueno se acumulan en el micelio; el 83% restante se transforman en zeta-caroteno y se quedan como tal; en S442 el neurosporeno es rarísimo y los carotenos menos saturados, indetectables.

El comportamiento diferente en las cuatro deshidrogenaciones no es incompatible con la modificación de una sola deshidrogenasa, producto de un mismo gen carB. Ciertos cambios en la estructura de la proteína pueden dificultar el ensamblaje de las cuatro copias por modificación de las interacciones entre las distintas subunidades del complejo o de éste con su entorno específico de la membrana celular en la que se encuentra embebido.

El fenotipo de la estirpe S442 es diferente del de los mutantes de la carotenogénesis de Phycomyces estudiados hasta ahora. Los más parecidos son los de Eslava y Cerdá Olmedo (1973) que acumulan los mismos carotenos que S442, pero con cantidades mucho menores de zeta-caroteno y fitoflueno.

Los llamados mutantes verdes de Chlorella (Claes, 1959, 1966) y Scenedesmus obliquus (Powls y Britton, 1977) también acumulan cantidades importantes de zeta-caroteno, entre otros compuestos. Se desconoce la naturaleza exacta de su fenotipo.

## DISCUSION GENERAL

Mecanismos de regulación de la carotenogénesis

Los agentes activadores de la carotenogénesis estudiados en esta Tesis se pueden agrupar en tres grupos que representan mecanismos activadores total o parcialmente independientes. Esta clasificación se basa en el criterio genético expuesto en la pag 48, según el cual dos agentes que tengan la misma lista de mutantes sensibles e insensibles deben tener mecanismos de acción diferentes. En la Tabla 15 se muestran los resultados cualitativos de la activación de los mutantes con agentes de los tres grupos (retinol, ftalato y luz). La ausencia de beta-caroteno y ciertas mutaciones del gen carS pertenecen al mismo grupo de activadores que el retinol. El grupo representado por el ftalato de dimetilo reúne a otros compuestos caracterizados por la presencia en su molécula de un anillo fenólico.

	RETINOL	FTALATO	LUZ
Silvestre	+	+	+
<u>carB</u>	-	+	+
<u>carR</u>	-	+	-
<u>carB carR</u>	-	+	-
<u>carA</u>	+	+	-
<u>carRA</u>	-	-	-
<u>carA carS</u>	-	+	-
<u>carS</u> (1)	-	+	+
<u>carS</u> (2)	+	+	-
<u>carI</u>	-	-	+

Tabla 15. Activación de la carotenogénesis de diversos mutantes por retinol, ftalato de dimetilo y luz. (+) estimulación normal no afectada por la mutación, (-) ausencia de estimulación o estimulación parcial. (1) Mutación carS que produce superproducción, (2) mutación carS que produce fenotipo albino.

La activación sexual de la carotenogénesis que se observa en cultivos mixtos, en heterocariontes intersexuales o por adición de ácidos trispóricos representa un cuarto mecanismo de activación independiente de los tres anteriores: requiere la presencia de beta-caroteno, es independiente de las mutaciones carS (Murillo y Cerdá-Olmedo, 1976), y es aditiva respecto a la estimulación por retinol, ftalato de dimetilo y luz (Govind y Cerdá-Olmedo, 1986). Algunos resultados de esta Tesis confirman estas conclusiones.

Nuestros resultados y los datos preexistentes permiten elaborar una nueva teoría general sobre la regulación de la carotenogénesis que desarrolla la expuesta por Murillo y Cerdá-Olmedo (1976). La regulación de la carotenogénesis por su producto final juega el papel central en esta teoría.

#### Regulación por producto final

La carotenogénesis está regulada por su producto final, el beta-caroteno, que reprime su propia síntesis cuando alcanza una determinada concentración. Cuando se bloquea parcialmente la ruta mediante inhibidores químicos o por mutaciones rezumantes de los genes carB o carR, la concentración final de beta-caroteno se mantiene aumentando el flujo de moléculas en la ruta, lo que provoca un incremento en la acumulación de intermediarios. El bloqueo total produce la acumulación de 2-3 mg de fitoeno o licopeno por gramo de peso seco del micelio, según se inhiba la ciclasa o la deshidrogenasa.

Para que funcione la retroinhibición es necesaria la presencia del producto del gen carS (pS). La ausencia de pS funcional (mutaciones recesivas del gen carS) provoca la activación de la ruta (mutantes superproductores). El bloqueo químico o genético de la síntesis de beta-caroteno de estos mutantes no produce una estimulación adicional, lo que indica que la ausencia de beta-caroteno o de pS comparten el mismo mecanismo activador.

Por otro lado, el producto A (pA) del gen carRA es esencial para la carotenogénesis. Su pérdida total (mutantes carRA) conlleva el bloqueo total de la ruta que ninguna de las estimulaciones conocidas es capaz de romper.

Murillo (1980a) propuso que el fenotipo albino de los mutantes carA representa un aumento en la sensibilidad a la regulación por producto final: en estos mutantes bastaría una menor cantidad de beta-caroteno para inhibir la ruta. Si esta hipótesis es totalmente cierta la ausencia de beta-caroteno o de pS en los mutantes carA activaría la ruta hasta el mismo nivel que el silvestre. Sin embargo, la respuesta de los mutantes carA es inferior en ambos casos. Nuestra propuesta es que el fenotipo de los mutantes carA se debe a que su pA es parcialmente inactivo lo que impide que la activación de su carotenogénesis en ausencia de regulación por producto final (carencia de beta-caroteno, de pS o presencia de retinol) alcance los mismos niveles de acumulación de beta-caroteno que el tipo silvestre.

La concentración del beta-caroteno acumulado en los dobles mutantes carA carS es el resultado de las acciones contrarias de ambas mutaciones. Una posible explicación para este comportamiento es que la regulación de la ruta por producto final consista en la inactivación del pA por el beta-caroteno y el pS. No se puede precisar la naturaleza exacta de la interrelación entre los tres elementos, una posibilidad, basada en la importancia de los anillos beta en el efecto del retinol (Parra y Murillo, 1982) y en el mecanismo de acción de este compuesto (ver pag. 92), es que el beta-caroteno se uniera a pA y pS mediante el reconocimiento de los extremos de su molécula formando un complejo pA:beta-caroteno:pS que bloquearía la ruta. En ausencia de beta-caroteno no se podría formar el complejo que inhibe a pA.

Según esta hipótesis, el pS de los mutantes carS albinos tendría más afinidad por pA y se necesitaría por tanto menos beta-caroteno para inhibir la ruta. La dominancia de estas mutaciones apoya esta hipótesis.

## Mecanismos de activación química

El retinol y el ftalato de dimetilo no comparten el mismo mecanismo de estimulación de la carotenogénesis, ya que sus listas de mutantes sensibles e insensibles son muy diferentes.

Para la estimulación por retinol son necesarios la función génica carS y la presencia de beta-caroteno, o sea, los mismos requisitos de la regulación por producto final.

Como ya se ha mencionado, el anillo beta de la molécula de retinol es esencial para que se produzca la estimulación mientras que su cadena lateral no tiene mucha importancia (Parra y Murillo, 1982). El anillo beta del retinol, idéntico al del beta-caroteno, le permite competir por los sitios de unión a pA y pS. Un exceso de retinol impediría la formación del complejo pA:beta-caroteno:pS, lo que provoca la misma estimulación que la pérdida de pS o a la ausencia de beta-caroteno. Este mecanismo explica que el retinol no active a los mutantes superproductores carS ni a los mutantes carentes de beta-caroteno (carB, carR y carB carR) y que el nivel de saturación en el silvestre sea similar al provocado por la ausencia de beta-caroteno. También explica que los mutantes carA acumulen en presencia de retinol la misma cantidad de beta-caroteno que los dobles mutantes carA carS con o sin retinol. El comportamiento en ambos casos se debe a que pA no se inhibe porque no se forma el complejo pA:beta-caroteno:pS.

Los mutantes carRA al perder la función de pA son totalmente insensibles al efecto estimulador del retinol y deben también de serlo a la activación que produce la ausencia de pS.

En los mutantes carS albinos el retinol compete con el beta-caroteno e impide la inhibición de pA. En estos mutantes la mayor afinidad de su pS por el beta-caroteno y pA hace que la respuesta al retinol sea menos eficaz y que no se alcance la máxima respuesta con las concentraciones de retinol que se pueden ensayar en la práctica. Pero al contrario de lo que ocurre con los mutantes carA, su respuesta no se satura obteniéndose en las mejores condiciones niveles muy superiores de estimulación.

La existencia de proteínas que reconozcan específicamente el retinol no resulta sorprendente. En células de mamífero se han aislado varias de estas proteínas y recientemente se ha secuenciado una de ellas (Petkovich et al., 1987) que resulta ser homóloga de los receptores de esteroides.

El efecto del ftalato de dimetilo y el veratrol no requiere ni beta-caroteno ni pS. Su mecanismo de activación es por tanto independiente de la regulación por producto final. No obstante, existen algunos puntos en común para las dos estimulaciones químicas: las funciones génicas carI carRA son necesarias para la activación por retinol y por ftalato de dimetilo.

Los ésteres de ftalato se emplean usualmente en la industria de los plásticos. Aunque algunas bacterias como Pseudomonas cepacia son capaces de emplearlos como fuente de carbono (Batie et al., 1987), normalmente no se metabolizan y se acumulan en el medio ambiente y en los tejidos animales. Muchos de estos compuestos son tóxicos y han sido objeto de estudios para determinar sus efectos sobre los animales. Así, se ha descrito que producen proliferación de peroxisomas y tumores hepáticos en ratas (Moody y Roddy, 1978; Kluwe et al., 1983), alteraciones del metabolismo de lípidos (Yanagita et al., 1986 1979; Bell et al., 1978; Osumi y Hashimoto, 1978) como la inhibición de algunas enzimas (Lagente et al., 1979; Srivastava et al., 1977), cambios en la composición de fosfolípidos (Yanagita et al., 1987), etc. Por otro lado, Grob et al. (1951) describieron que en Phycomyces existe una relación inversa entre la acumulación de caroteno y de ácidos grasos. La adición de ftalato de dimetilo o veratrol podría alterar en Phycomyces el metabolismo lipídico y su efecto sobre la carotenogénesis sería una consecuencia indirecta de esta alteración.

## Mecanismo de activación de los inhibidores

Los dos inhibidores de la deshidrogenación del fitoeno, el alcohol cinámico y la difenilamina, estimulan la ruta y conducen sobre todo a grandes acumulaciones de fitoeno. Las estimulaciones por ambos compuestos emplean mecanismos diferentes, ya que requieren distintas funciones génicas.

La estimulación por difenilamina es consecuencia de la inhibición de la ruta. Al provocar la ausencia de beta-caroteno, estimula la carotenogénesis mediante el mecanismo de regulación por producto final. Basamos esta conclusión en la ausencia de estimulación en la carotenogénesis de los mutantes carB, carR y carS. Por el contrario, el alcohol cinámico estimula a estos mutantes e incrementa la concentración de beta-caroteno en la estirpe silvestre. Por consiguiente, el efecto estimulador del alcohol cinámico es independiente de su efecto inhibidor. La lista de mutantes sensibles e insensibles a la estimulación por alcohol cinámico coincide con la de los otros fenoles (ftalato de dimetilo y el veratrol), que además de activar la ruta producen la acumulación de intermediarios. Los efectos activador e inhibidor no guardan una relación fija en los distintos fenoles: en el ftalato de dimetilo predomina la activación y en el alcohol cinámico la inhibición, pero existen muchos otros fenoles con distintas mezclas de ambos efectos (Cerdá-Olmedo y Hüttermann, 1986). Probablemente todos estos fenoles comparten el mismo mecanismo de acción.

No existen mutantes insensibles a los efectos inhibidores del difenilamina ni del alcohol cinámico. La insensibilidad del mutante carI se refiere sólo a la activación y su aparente insensibilidad al efecto de los inhibidores es una consecuencia indirecta de la ausencia de estimulación. El fenotipo de este mutante no puede definirse, por tanto, como quimioinsensible, sino como quimioinactivable.



## Mecanismo de activación por la luz

La estimulación de la carotenogénesis por luz es la suma de dos componentes sensibles a flujos luminosos diferentes. La existencia de dos componentes aditivos se observa también en la relación entre el flujo luminoso y la respuesta en el fototropismo (Galland y Russo, 1984; Galland y Lipson, 1987) y en la fotodiferenciación de los esporangióforos (Corrochano et al., en prensa) y en el LIAC (cambios de absorbencia inducidos por la luz) (Trad y Lipson, 1987).

Esta y otras observaciones (Jayaram et al, 1980) junto con la cinética de acumulación del beta-caroteno sugieren que la fotocarotenogénesis es la suma de dos activaciones, la estimulación de las enzimas preexistentes y la inducción de otras nuevas. Desgraciadamente aún no se han realizado las investigaciones que podrían confirmar o rechazar estas propuestas.

El mecanismo de activación por luz tiene características que lo separan de las demás estimulaciones de la carotenogénesis, pero está íntimamente relacionada con la regulación por producto final.

La capacidad de estimular la carotenogénesis de los mutantes carB pero no la de los mutantes carR es exclusiva de la luz. Las razones de este comportamiento son desconocidas, pero indican que el beta-caroteno no es absolutamente indispensable para la fotoinducción de la ruta y que la luz regula la actividad de las enzimas que sintetizan el fitoeno.

La insensibilidad de los mutantes carA y carRA indica que pa es esencial para la estimulación de la carotenogénesis por la luz. La ausencia de respuesta de los mutantes carA no se debe a la falta de beta-caroteno ya que los dobles mutantes carA carS, cuyo contenido de beta-caroteno en oscuridad es muy superior, son también insensibles al estímulo luminoso. Este comportamiento no se debe a la mutación carS, pues el mutante simple carS (del mismo alelo) es fotoinducible. Por otro lado, la insensibilidad de los mutantes carS albinos sugiere que ps

también juega un papel importante en la fotoestimulación. La luz es incapaz de romper la inhibición del pS superrepresor de estos mutantes sobre pA.

Los mutantes superproductores carS se pueden clasificar en dos grupos según la concentración de beta-caroteno que presenten. Los mutantes carS que acumulan de 2-3 mg de beta-caroteno por g de peso seco son fotoinducibles a altas intensidades y tanto estos mutantes como los mutantes carB alcanzan la misma concentración (5 mg por g de peso seco) presente en los mutantes carS no fotoinducibles. Estos resultados junto al obtenido al iluminar el micelio de la estirpe silvestre cultivado en presencia de difenilamina indica que la ausencia de regulación por producto final (que conlleva la acumulación de 2-3 mg de caroteno por g de peso seco) no impide la fotoestimulación. Estos resultados sugieren que el pS silvestre tiene dos niveles de inhibición sobre pA, uno propio y otro mediado por el beta-caroteno. Según esta hipótesis la ausencia pS conlleva la acumulación de, aproximadamente 5 mg de caroteno por g de peso seco. Los mutantes carS de nivel inferior tendrían un pS incapaz de llevar a cabo la inhibición de pA mediada por el beta-caroteno, pero sí de inhibir pA por sí mismo. La luz rompería la inhibición de pA tanto por el pS silvestre como por el pS de los mutantes carS. Los mutantes superproductores carS no fotoinducibles, carecerían totalmente de pS y representarían el efecto conjunto de la luz y la ausencia de retroinhibición.

Es decir, al igual que la regulación por producto final, la luz actúa a través de pA y pS seguramente impidiendo la inhibición de pA por pS. El mecanismo mediante el cual la luz rompe la inhibición es desconocido. La señal procedente de la luz podría actuar tanto sobre pS como sobre pA. El hecho de que cualquier alteración del gen carRA impida la fotoestimulación de la carotenogénesis sugiere que la luz actúa sobre pA y no sobre pS.

Esta hipótesis no excluye la posibilidad de que la luz también active la carotenogénesis mediante la isomerización del beta-caroteno (Cerdá-Olmedo, 1987) lo que impediría la

formación del complejo pA:beta-caroteno:pS impidiendo la inhibición de la ruta. Esta sugerencia esta basada en el aumento de la proporción de isómero 15-cis que se detecta en micelios cultivados bajo la luz y sugiere la idea de que el fotorreceptor de la fotocarotenogénesis sea el beta-caroteno y no la flavina propuesta para el fototropismo. Sin embargo, los espectros de acción obtenidos recientemente (Bejarano et al., en preparación), la presencia de dos componentes en todos los procesos fotorregulables y, sobre todo, la ausencia de fotoestimulación de la carotenogénesis en los mutantes madA y madB (López-Díaz, 1980; Jayaram, 1980; Raugei, 1982) indican que algunos componentes celulares normalmente usados para el fototropismo y la fotodiferenciación, incluido quizás el fotorreceptor, participan en la fotorregulación de la carotenogénesis. No parece por tanto que la luz regule la carotenogénesis por isomerización directa del beta-caroteno. Sin embargo, no es posible excluir la posibilidad de que, la luz produzca una señal, que una vez elaborada por una serie de componentes celulares provoque la interconversión de beta-caroteno trans a cis, con destrucción del complejo inhibidor pS:beta-caroteno:pA.

Otro dato que sugiere la existencia de una relación entre la estimulación por luz y por producto final es el hecho de que todos los mutantes picB y carC aislados por presentar alteraciones específicas de la fotocarotenogénesis, son menos estimulables por retinol. Estas mutaciones, aunque no se ha realizado un estudio genético completo, no parecen afectar a los genes madA y madB. Las estimulaciones por retinol y luz son, sin embargo, parcialmente diferentes, como lo demuestran sus efectos en los mutantes carS, carA y carI.

En este esquema de funcionamiento de la fotocarotenogénesis no es necesario modificar la función génica carC propuesta por Revuelta et al. (1984). Según ésta, carC regula negativamente la inhibición de la carotenogénesis mediada por pS.

### Comentarios finales

Aunque los experimentos realizados en este trabajo no desechan, a menos que aporten evidencias negativas, otros modelos más complejos sobre los mecanismos de regulación de la carotenogénesis, la complicación del sistema parece innecesaria, toda vez que el modelo propuesto explica todos los datos existentes. Por otra parte, aunque un modelo es siempre un reflejo de la realidad y como tal puede distorsionarla, su realización tiene justificación en la medida en que facilita la comprensión y discusión del problema.

La puesta a punto, recientemente, de las técnicas de producción de protoplastos, transformación y clonación de Phycomyces (Suarez, 1985; Suarez y Eslava, 1987; Arnau et al., 1988) abre nuevas vías para el conocimiento de la carotenogénesis y deben permitir la determinación de los mecanismos moleculares de las distintas regulaciones.

Desde un punto de vista aplicado, las cuatro activaciones, definidas en esta discusión como las debidas al retinol, ftalato de dimetilo, luz y sexo, pueden combinarse para la producción de grandes cantidades de carotenos. Sirva de ejemplo, el contenido de fitoeno de micelio silvestre cultivado en presencia de alcohol cinámico y luz que es la producción más alta que se conoce de este caroteno. Esta activación, reúne las estimulaciones por luz, por ausencia de producto final (grupo del retinol) y por fenol (grupo del ftalato). Además, en esta Tesis se ha obtenido también la mayor concentración conocida zeta-caroteno. Tanto el fitoeno como el zeta-caroteno no tienen aplicación comercial pero son muy útiles para los estudios bioquímicos de la carotenogénesis.

## BIBLIOGRAFIA

ALBERTS, A.W.; J. CHEN; G. KURON; V. HUNT; J. HUFF; C. HOFFMAN; J. ROTHROCK; M. LOPEZ; H. JOSHUA; E. HARRIS; A. PATCHETT; R. MONAGHAN; S. CURIE; E. STAPLEY; G. ALBERS-SCHONBERG; O. HENSENS; J. HIRSHFIELD; K. HOOGSTEEN; J. LIESCH y J. SPRINGER (1980) *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 77: 3957.

ARAGON, C.M.G.; F.J. MURILLO; M.D. DE LA GUARDIA y E. CERDA-OLMEDO (1976) *Eur. J. Biochem.*, 63: 71.

ARNAU, J.; S. TORRES-MARTINEZ y F.J. MURILLO (1988) *Mol. Gen. Genet.*, en prensa.

AVALOS, J. y E. CERDA-OLMEDO (1987) *Curr. Genet.*, 11: 505.

BARD, M.; R.A. WOODS; D.H.R. BARTON; J.E.T. CORRIE y D.A. WIDDOWSON (1977) *Lipids*, 12: 645.

BARTLETT, K. y E.I. MERCER (1974) *Phytochemistry* 13: 1115.

BARTLETT, K.; M.J. KEAT y E.I. MERCER (1974) *Phytochemistry* 13: 1107.

BATIE, C.J.; E. LAHAIE y D.P. BALLOU (1987) *J. Biological. Chemistry*, 262: 1510.

BATRA, P.P.; R.M.J. GLASON y J.W. LOUDN (1973) *Phytochemistry*, 12: 1309.

BELL, F.P.; C.S. PATT y P.J. GILLIES (1978) *Lipids*, 13: 673.

BERGMAN, K.; P.V. BURKE; E. CERDA-OLMEDO; C.N. DAVID; M. DELBRUCK; K.W. FOSTER; E.W. GOODELL; M. HEISENBERG; G. MEISSNER; M. ZALOKAR; D.S. DENNISON y W. SHROPSHIRE (1969) *Bacteriol. Rev.*, 33: 99.

BERGMAN, K.; A.P. ESLAVA y E. CERDA-OLMEDO (1973) *Mol. Gen. Genet.*, 123: 1.

BEYTIA, E.D. y J.W. PORTER (1976) *Annu. Rev. Biochem.*, 45: 113.

BLAKESLEE, A.F. (1904) *Proc. Am. Acad. Arts Sci.*, 40: 205.

BLAKESLEE, A.F. (1906) *Ann. Mycol.*, 4: 1.

BRAMLEY, P.M.; B.H. DAVIES y A.F. REES (1972) *Phytochemistry*, 11: 3187.

BRAMLEY, P.M. y B.H. DAVIES (1975) *Phytochemistry*, 14: 463.

- BRAMLEY, P.M.; A. THAN y B.H. DAVIES (1977) *Phytochemistry*, 16: 235.
- BRAMLEY, P.M.; I.E. CLARKE; G. SANDMANN y P. BOGER (1984) *Z. Naturforsch.*, 39c: 460.
- BRAMLEY, P.M. (1985) *Adv. Lip. Res.*, 21: 243.
- BRAMLEY, P.M. y R.F. TAYLOR (1985) *Biochem. Biophys. Acta*, 839: 155.
- BRITTON, G.; T.W. GOODWIN; D.J. BROWN y N.J. PATEL (1980) *Methods Enzymol.*, 67:264.
- CERDA-OLMEDO, E. (1975) *Genet. Res.*, 25: 285.
- CERDA-OLMEDO, E. y A. HUTTERMANN (1986) *Angew. Bot.*, 60: 59.
- CERDA-OLMEDO, E. (1987) en "Phycomyces", pp. 199-222 (E. Cerdá-Olmedo y E.D. Lipson, eds.) Cold Spring Harbor, New York.
- CERDA-OLMEDO, E. y E. LIPSON (1987a) "Phycomyces", (E. Cerdá-Olmedo y E.D. Lipson, eds.), Cold Spring Harbor, New York.
- CERDA-OLMEDO, E. y E. LIPSON (1987b) en "Phycomyces", pp. 7-26 (E. Cerdá-Olmedo y E.D. Lipson, eds.) Cold Spring Harbor, New York.
- CLARKE, I.E.; A. DE LA CONCHA; F.J. MURILLO; G. SANDMANN; E.J. SKONE y P.M. BRAMLEY (1983) *Phytochemistry*, 22: 435.
- COGGINS, C.W.; G.L HENNING y H. YOKOYAMA (1970) *Science*, 168: 1589.
- CORROCHANO, L.M.; P. GALLAND; E.D. LIPSON y E. CERDA-OLMEDO (1988) *Planta*, en prensa.
- CORROCHANO, L.M. y E. CERDA-OLMEDO (1988) *Planta*, en prensa.
- DAVIES, B.H. (1965) en "Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments", pp. 489 (Goodwin, T.W., ed.) Academic Press, London.
- DAVIES, B.H. (1973) *Pure Appl. Chem.*, 35: 1.
- DAVIES, B.H. (1976) en "Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments", pp. 38-165 (Goodwin, T.W. ed.) Academic Press, London.
- DAVIES, B.H. y R.F. TAYLOR (1976) *Pure Appl. Chem.*, 47: 211.
- DE FABO, E.C.; R.W. HARDING y W. SHROPSHIRE (1976) *Planta Physiol.*, 57: 440.
- DE LA CONCHA, A. (1983) Tesis Doctoral. Universidad de Sevilla.
- DE LA CONCHA, A.; F.J. MURILLO; E.J. SKONE y P.M. BRAMLEY (1983) *Phytochemistry*, 22: 441.
- DE LA GUARDIA, M.D.; C.M.G. ARAGON; F.J. MURILLO y E. CERDA-OLMEDO (1971) *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 68: 2012.

- DELBRUCK, M. y W. SHROPSHIRE (1960) *Plant Physiol.*, 35: 194.
- DELBRUCK, M.; A. KATZIR y D. PRESTI (1976) *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 73: 1969.
- ELAHI, M.; T.H. LEE, K.L. SIMPSON y C.O. CHICHESTER (1973) *Phytochemistry*, 12: 1633.
- ELAHI, M.; R.W. GLASS; T.C. LEE; C.O. CHICHESTER y K.L. SIMPSON (1975) *Phytochemistry*, 14: 133.
- ESLAVA, A.P. y E. CERDA-OLMEDO (1974) *Plant Sci. Lett.*, 2: 9.
- ESLAVA, A.P.; M.I. ALVAREZ y E. CERDA-OLMEDO (1974) *Eur. J. Biochem.*, 48: 617.
- ESLAVA, A.P.; M.I. ALVAREZ; P.V. BURKE y M. DELBRUCK (1975a) *Genetics*, 80: 445.
- ESLAVA, A.P.; M.I. ALVAREZ y M. DELBRUCK (1975b) *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 72: 4076.
- ESLAVA, A.P. (1987) en "Phycomyces", pp. 27-48 (E. Cerdá-Olmedo y E. D. Lipson, eds.) Cold Spring Harbor, New York.
- FINK, G.R. (1971) en "Metabolic Pathways", Vol. V, (H.J. Vogel, ed.) Academic Press, New York and London.
- GALLAND, P. y V.E.A. RUSSO (1984) *J. Chem. Physiol.*, 84: 101.
- GALLAND, P. y E.D. LIPSON (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 84: 104.
- GOODWIN, T.W. (1952) *Biochem. J.*, 80: 550.
- GOODWIN, T.W. (1980) "The Biochemistry of the Carotenoids", Vol I, (Goodwin, T.W., ed.), Chapman and Hall, London.
- GOULSTON, G.; E.I. MERCER y L.J. GOAD (1975) *Phytochemistry*, 14: 457.
- GOVIND, N.S. y E. CERDA-OLMEDO (1986) *J. Gen. Microbiol.*, 132: 2775.
- GREGONIS, D.E. y H.C. RILLING (1973) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 54: 449.
- GREGONIS, D.E. y H.C. RILLING (1974) *Biochemistry*, 13: 1538.
- GROB, E.C.; M. BEIN y W.H. SCHOPFER (1951) *Bull. Soc. Chim. Biol. Paris*, 32: 1236.
- GUTIERREZ-CORONA, F. y E. CERDA-OLMEDO (1985) *Exp. Mycol.*, 9: 56.
- HARDING, R.W. y W. SHROPSHIRE (1980) *Annu. Rev. Plant Physiol.*, 31: 217.
- HARDING, R.W. y R.V. TURNER (1981) *Plant Physiol.*, 68: 745.

- HEISENBERG, M. y E. CERDA-OLMEDO (1968) *Mol. Gen. Genet.*, 102: 187.
- HSU, W.J.; H. YOKOYAMA y C.W. COGGINS (1972) *Phytochemistry*, 11: 2895.
- ISLER, O. (1971) "Carotenoids", (Isler, O., ed.), Birkhauser Verlag, Basel.
- JAYARAM, M.; D. PRESTI y M. DELBRUCK (1979) *Exp. Mycol.*, 3: 42.
- JAYARAM, M.; L. LEUTWILER y M. DELBRUCK (1980) *Photochem. Photobiol.*, 32: 241.
- JUNGALWALA, F.B. y J.W. PORTER (1965) *Arch. Biochem. Biophys.*, 110: 291.
- KLUWE, W.H.; J.K. HASEMAN y J.E. HUTT (1983) *J. Toxicol. Environ. Health*, 12: 159.
- KUSHWAHA, S.C; M. KATES y J.W. PORTER (1976) *Can. J. Biochem.*, 54: 816.
- LAGENTE, M.; F. DE LA FARGE y P. VALDIGVIE (1979) *Lipids*, 14: 533.
- LEE, T.C. y C.O. CHICHESTER (1969) *Phytochemistry*, 8: 603.
- LEE, T.C.; D.B. RODRIGUEZ; I. KARASAWA; T.H. LEE; K.L. SIMPSON y C.O. CHICHESTER (1975) *Appl. Microbiol.*, 30: 988.
- LOPEZ-DIAZ, I. y E. CERDA-OLMEDO (1980) *Planta*, 150: 134.
- MACKINNEY, G; T. NAKAYAMA y C.O. CHICHESTER (1956) *J. Biol. Chem.*, 220: 759.
- MEISSNER, G. y M. DELBRUCK (1968) *Plant Physiol.*, 43: 1279.
- MERCER, E.I. (1984) *Pestic. Sci.*, 15: 133.
- MERCER, E.I. y S.M. RUSSELL (1975) *Phytochemistry*, 14: 445.
- MITZKA-SCHNABEL, U. y W. RAU (1981) *Phytochemistry*, 20: 63.
- MOODY, D.E. y J.K. REDDY (1978) *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 45: 497.
- MURILLO, F.J. y E. CERDA-OLMEDO (1976) *Mol. Gen. Genet.*, 148: 19.
- MURILLO, F.J.; I.L. CALDERON; I. LOPEZ-DIAZ y E. CERDA-OLMEDO (1978) *Appl. Environ. Microbiol.*, 36: 639.
- MURILLO, F.J. (1980a) *Plant Sci. Lett.*, 17: 201.
- MURILLO, F.J. (1980b) Tesis Doctoral, Universidad de Sevilla.
- MURILLO, F.J.; S. TORRES MARTINEZ; C.M.G. ARAGON y E. CERDA-OLMEDO (1981) *Eur. J. Biochem.*, 119: 511.

- NAKAYAMA, T.; C.O. CHICHESTER; A. LUKTON y G. MACKINNEY (1957) Arch. Biochem. Biophys., 66: 310.
- NELKI, D.S. (1987) Tesis Doctoral. Universidad de Londres.
- NINET, L.; J. RENAUT y R. TISSIER (1969) Biotechnol. Bioeng., 11: 1195.
- OLSON, J.A. y H. KNIZLEY (1962) Arch. Biochem. Biophys., 97: 138.
- OREJAS, M. (1985) Tesis Doctoral. Universidad de Salamanca. Salamanca.
- OREJAS, M. y A. PEREZ-ESLAVA (1987) Mol. Gen. Genet. En prensa.
- OOTAKI, T. (1973) Molec. Gen. Genet., 121: 49.
- OOTAKI, T.; A.C. LIGHTY y M. DELBRUCK (1973) Mol. Gen. Genet., 121: 57.
- OSUMI, T. y T. HASHIMOTO (1978) J. Biochem., 83: 1361.
- OTTO, M.K.; M. JAYARAM; R.M. HAMILTON y M. DELBRUCK (1981) Proc. Natl. Acad. Sci., 78: 266.
- PARRA, F. y F.J. MURILLO (1982) Phycomyces, 5: 68.
- PETOKVICH, M.; N.J. BRAND; K. ANDREE y P. CHAMBON (1987) Nature, 330: 444.
- POPJAK, G. y J.W. CORNFORTH (1966) Biochem. J., 101: 553.
- PORTER, J.W. y R.E. LINCOLN (1950) Arch. Biochem. Biophys., 27: 390.
- PORTER, J.W. y S.L. SPURGEON (1979) Pure Appl. Chem., 51: 609.
- POULTER, C.D. y H.C. RILLING (1983) en "Biosynthesis of Isoprenoid Compounds", Vol. 1, pp. 161-224 (J.W. Porter and S.L. Spurgeon, eds.), Wiley and Sons, New York.
- POWLS, R. y G. BRITTON (1977) Arch. Microbiol., 115: 175
- PRESTI, D. y M. DELBRUCK (1978) Planta. Cell and Environment, 1: 81.
- PRESTI, E. y P. GALLAND (1987) en "Phycomyces", pp. 93-126, (E. Cerdá-Olmedo y E.D. Lipson, eds.), Cold Spring Harbor, New York.
- RAU, W. (1967) Planta, 72: 14.
- RAU, W. (1983) en "Biosynthesis of Isoprenoid Compounds", pp. 123-157 (J.W. Porter y S.L. Spurgeon, eds.), John Wiley & Sons, Inc. New York.
- RAUGEI, G.; U. DOHRMANN; U. POHL y V.E.A. RUSSO (1982) Planta, 155: 296.
- REVUELTA, J.L. (1983) Tesis Doctoral. Universidad de León, León.
- REVUELTA, J.L. y A.P. ESLAVA (1983) Mol. Gen. Genet., 192: 225.

- REVUELTA, J.L y A.P. ESLAVA (1984) *Current Genetics*, 8: 261.
- REYES, P.; C.O. CHICHESTER y T. NAKAYAMA (1964) *Biochem. Biophys. Acta*, 90: 578.
- RILEY, G.J.P. y P.M. BRAMLEY (1982) *Cytobios.*, 34: 97.
- RILLING, H.C. (1985) *Methods Enzymol.*, 110: 145.
- RODWELL, V.W; J.L. NORDSTROM y J.J. MITSHELLEN (1976) *Adv. Lipid. Res.*, 14: 1.
- RONCERO, M.I.G y E. CERDA-OLMEDO (1982) *Curr Genet.*, 5: 5.
- RONCERO, M.I.G.; C. ZABALA y E. CERDA-OLMEDO (1984) *Mutat. Res.*, 125: 195.
- RUDDAT, M. y E. D. GARBER (1983) en "Secondary Metabolism and Differentiation in Fungi", pp. 95-151 (J.W. Bennet y A. Ciegler, eds.), Marcel Dekker Inc., New York.
- RUSSO, V.E.A. (1986) *Planta*, 168: 56.
- RUSSO, V.E.A. y P. GALLAND (1980) en "Structure and Bonding", pp. 71-110 (J.D. Dunitz et al., eds), Springer-Verlag, Berlin.
- SANDMANN, G. y W. HILGENBERG (1980) *Biochem. Phydiol. Pflanz.*, 175: 237.
- SANDMANN, G.; W. HILGENBERG y P. BOGER (1980) *Z. Naturforsch.*, 35c: 927.
- SANDMANN, G. y P. BOGER (1983) *Weed. Sci.*, 31: 338.
- SENGER, H. (1987) en "Blue Light Effects in Biological Systems", pp. 375-383 (H. Senger, ed.), Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- SPURGEON, S.L. y J.W. PORTER (1983) en "Biosynthesis of Isoprenoid Compounds", pp. 1-112 (J.W. Porter and S.L. Spurgeon, eds.), Vol. 2, Wiley and Sons, New York.
- SRIVASTAVA, S.P.; D.K. AGARWAL y P.K. SEHT (1977) *Toxicology*, 7: 163.
- SUAREZ, T. y A.P. ESLAVA (1988) *Mol. Gen. Genet.*, en prensa.
- SUTTER, R.P. (1975) *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 72: 127.
- SUTTER, R.P. (1977) en "Eucaryotic Microbes as Model Developmental Systems", pp. 251-272, (D.H. O'Day and P.A. Horgeon, eds.), Marcel Dekker, New York.
- SUTTER, R.P. (1987) en "Phycomyces", pp. 317-336 (E. Cerdá-Olmedo y E.D. Lipson, eds.), Cold Spring Harbor, New York.
- THAN, A.; P.M. BRAMLEY; B.H. DAVIES y A.F. REES (1972) *Phytochemistry*, 11: 3187.

TORRES-MARTINEZ, S.; F. J. MURILLO y E. CERDA-OLMEDO (1980) Genet. Res., 36: 299.

TRAD, C.H. y E.D. LIPSON (1987) J. Photochem. Photobiol, en prensa.

VAN LAERE, A.J.; J.A. VAN ASSCHE y A.R. CARLIER (1980) Arch. Microbiol., 124: 289.

VAN LAERE, A.J.; J.A. VAN ASSCHE y B. FURCH (1987) en "Phycomyces", pp. 247-279 (E. Cerdá-Olmedo y E.D. Lipson, eds.), Cold Spring Harbor, New York.

WOODS, R.A. (1971) J. Bacteriol., 108: 69.

WHITAKER, B.D. y W. SHROPSHIRE (1981) Exp. Mycol., 5: 243.

YANAGITA, T.; S. KUZUHARA; N. ENOMOTO; T. SHIMADA y M. SUGANO (1979) Biochem. Pharmacol., 28: 3115.

YANAGITA, T.; N. ENOMOTO y S. KUZUHARA (1986) Agr. Biol. Chem., 50: 1653.

YANAGITA, T.; M. SATOH; H. NOMURA; N. ENOMOTO y M. SUGANO (1987) Lipids, 22: 572.

## AGRADECIMIENTOS

Sería interminable la lista de personas que de una u otra forma me han ayudado a realizar este trabajo. Gracias a todos, y especialmente:

A Enrique Cerdá Olmedo, por su apoyo y confianza, por esos paseos interminables en los que he aprendido un poco de todo y por darme la oportunidad de realizar este Tesis.

A Javier, Luis Miguel, Curro y Juan por su ayuda no sólo científica sino sobre todo humana, a todos ellos, se debe que el Departamento fuera para mí, mucho más que un lugar de trabajo.

A Enca, Cayo y Pépe, nada menos que por su amistad. A Reyes por su eterna alegría. A Corro por escuchar estoicamente todas mis locas hipótesis. A Isa (la López) por su ayuda y sus consejos. A Pépe Córdoba y especialmente a Asun por hacer bien su trabajo. A Choni, Edu, Paco L., Paco R., Andrés, Beatriz, Juan Ramón, María, Tahía, Amador, Rafi, Govind, Norman e Isa (Yebra) por sus sugerencias y apoyo constante.

A Jose por ser único. A Beluca y a todos mis amigos extradepartamentales.

A la Isa por soportarme, ayudarme, animarme y dar sentido, en muchas ocasiones, a mi vida.

# UNIVERSIDAD DE SEVILLA

Reunido el Tribunal integrado por los abajo firmantes  
en el día de la fecha, para juzgar la Tesis Doctoral de

D. Eduardo Roehriges Bejarano  
titulada "Regulación de la Biogénesis de carotenois  
de Phycomyces Blakesleeanus"

acordó otorgarle la calificación de APTO "Cum Laude"

Sevilla, 20 de Febrero 1988

El Vocál,

El Vocál,

El Vocál,

El Presidente

El Secretario,

El Doctorado,



UNIVERSIDAD DE SEVILLA



600672367