

TD
31

Expresión de los genes de la carotenogénesis en hongos Mucorales

Eduardo Rocha Amazonas de Almeida

Tesis Doctoral

Universidad de Sevilla

2005

TD
31
21



Facultad de Biología
Biblioteca

Doy mi autorización a la Biblioteca de esta Facultad para que mi Tesis Doctoral titulada "**Expresión de los genes de la carotenogénesis en hongos Mucorales**"

Sea consultada, según la modalidad/es indicadas:

- Consulta en depósito.
- Préstamo interbibliotecario.
- Reproducción parcial.
- Reproducción total.
- Tipo de usuarios.
- Otros términos.

Firmado:

Eduardo Alameda

Sevilla, a 22 de febrero de 2006

TA
611

Queda registrada esta Tesis Doctoral
al folio 160 número 276 del libro
correspondiente.

Sevilla, 17-10-05

El Jefe del Neoclado de Tesis





Expresión de los genes de la carotenogénesis en hongos Mucorales

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 Rocha Amazonas de Almeida

Sevilla, Octubre de 2005

El doctorando



Fdo: Eduardo Rocha
Amazonas de Almeida

El director de la Tesis



Fdo: Enrique Cerdá-Olmedo
Catedrático de Genética

“Páreceme, Sancho, que no hay refrán que no sea verdadero, porque todos son sentencias sacadas de la misma experiencia, madre de las ciencias todas.”

**Miguel de Cervantes Saavedra
“El ingenioso hidalgo Don Quijote de la Mancha”**

Quisiera agradecer sinceramente el apoyo y la colaboración de todos los que me habéis ayudado a realizar esta Tesis. Para fortuna mia son muchos tanto a este como al otro lado del Atlántico. Me gustaría citar a todos pero resultaría interminable por lo que me limitaré a los que recuerde mientras rellene esta página.

Ante todo agradezco a Enrique Cerdá-Olmedo por admitirme en su grupo y por la formación casi “universal” que me ha proporcionado. Con él aprendí mucho más de lo que él pueda imaginar. A Javier Ávalos le agradezco por la confianza, apoyo y motivación que literalmente me permitieron llegar al final de esta Tesis.

A los miembros del grupo que más me han ayudado como Rafa Fer y Bina, al compañerismo de las colegas Vera, Silvia, Lola y Carmela y al de los colegas del “grupo anexo”, Loubna, Ale, Alfonso, Carmen, Roberto y Lorena.

A los miembros del departamento con los que he tenido alguna relación, en particular a Ralf e Iván que me facilitaron mucho el trabajo. A Felipón, Ana Rincón y More (Morera) por citar algunos de los más cercanos. Al apoyo de Luis Romanco, Pepe Córdoba y Rocío.

A mis amigos biólogos, Esther, Boni, Santi y Pek entre muchos otros. A los de la calle Feria: Fran, Carlota y María. A los Gañafotes. A Javi, a Ako, al Antigua Sevilla y su Flamenco. Muchas gracias a todos los que me ayudaron a superar y olvidar el periodo infernal.

Ahora paso a la otra “dimensión” de estos agradecimientos dirigidos a las personas que apenas vi durante estos últimos años pero que nunca me abandonaron. Si estoy terminando esta Tesis es gracias a las visitas estratégicas de Maria, mi madre y de mi hermano Marcos. Gracias a Vó Cida que, a través de sus pinturas, me mantuvo confortablemente cerca de los bosques de Paraná. Al apoyo incondicional de Tío Zé y Tío Beto. A Fernando, mi padre, a mis hermanos Ricardo y Daniela. A toda mi familia, a los que quisieron entender qué hacía y a los que nunca quisieron.

A la admirable lealtad de mis amigos de Brasil: Andréa, Artur, Quaquer, Marcélus, Cassiano, Muga, André y Álvaro. De alguna manera inexplicable vosotros siempre habéis estado muy cerca.

Finalmente a Andalucía, por acogerme y enseñarme a vivir, a veces de la manera más ardua. Aunque no me haya resultado nada fácil escribir esta Tesis sospecho que la tarea mas difícil todavía está por llegar. Porque algún día tendré que marcharme y dejar aquí, además de siete *Araucarias*, muchos amigos que fueron y continuarán siendo muy importantes en mi vida.

INDICE

INTRODUCCIÓN	8
1. <i>Phycomyces</i> .	9
1.1. Ciclo vegetativo.	10
1.2. Ciclo sexual.	11
2. <i>Blakeslea</i> .	12
3. Terpenoides.	13
3.1. Terpenoides mayoritarios.	13
4. Carotenos.	15
5. Biosíntesis de carotenos.	17
5.1. Síntesis del mevalonato.	17
5.2. Síntesis del pirofosfato de geranylgeraniol.	18
5.3. Síntesis de carotenos.	19
6. Mutantes de la síntesis de carotenos.	21
7. Regulación de la síntesis de carotenos.	23
7.1. Regulación química de la carotenogénesis.	24
7.2. Estimulación sexual de la carotenogénesis.	25
7.3. Fotoestimulación de la carotenogénesis.	26
7.4. Retroinhibición de la carotenogénesis.	28
8. Carotenogénesis <i>in vitro</i> .	29
RESULTADOS: CAPÍTULO 1	
Optimización de las condiciones experimentales.	33
1.1. Sondas e hibridación.	33
1.1.1. Multiplicidad de transcritos.	34
1.2. Edad de los cultivos y densidad de siembra.	37
1.3. Iluminación.	39
1.4. Condiciones adoptadas para los demás experimentos.	41
RESULTADOS: CAPÍTULO 2	
Cinética de la carotenogénesis.	42
2.1. Cinética del crecimiento micelial.	42
2.2. Cinética de la acumulación de carotenos.	42
2.3. Cinética de la transcripción de los genes de la carotenogénesis.	43

RESULTADOS: CAPÍTULO 3

Estimulación química de la carotenogénesis.	46
3.1. Efecto del retinol y del ftalato de dimetilo sobre el crecimiento micelial.	46
3.2. Efecto del retinol y del ftalato de dimetilo sobre la concentración de carotenos.	46
3.3. Efecto del retinol y del ftalato de dimetilo sobre la transcripción de los genes.	48

RESULTADOS: CAPÍTULO 4

Estimulación sexual de la carotenogénesis.	49
4.1. Efecto de la estimulación sexual sobre el crecimiento micelial.	49
4.2. Efecto de la estimulación sexual sobre la concentración de carotenos.	49
4.3. Efecto de la estimulación sexual sobre la transcripción de los genes.	51
4.4. Inhibición de la estimulación sexual de la carotenogénesis por acetato.	54
4.4.1. Efecto del acetato sobre el crecimiento micelial.	54
4.4.2. Efecto del acetato sobre la concentración de carotenos.	55
4.4.3. Efecto del acetato sobre la transcripción de los genes.	57

RESULTADOS: CAPÍTULO 5

Efecto de las mutaciones <i>car</i> sobre la carotenogénesis.	60
5.1. Efecto de las mutaciones <i>car</i> sobre el crecimiento micelial.	60
5.2. Efecto de las mutaciones <i>car</i> sobre la concentración de carotenos.	60
5.3. Efecto de las mutaciones <i>car</i> sobre la transcripción de los genes.	62

RESULTADOS: CAPÍTULO 6	
Fotocarotenogénesis.	67
6.1. Fototranscripción de los genes <i>car</i> en la estirpe silvestre y en mutantes de la carotenogénesis.	67
6.2. Efecto combinado de la estimulación luminosa y sexual sobre la transcripción de los genes en la estirpe silvestre.	68
RESULTADOS: CAPÍTULO 7	
Inmunodetección de proteínas de la carotenogénesis.	71
DISCUSIÓN	73
1. Expresión de los genes <i>hmgS</i> y <i>hmgR</i> .	74
2. Cinética de la expresión de los genes <i>carRA</i> y <i>carB</i> .	75
3. Efecto de los activadores químicos de la carotenogénesis sobre la expresión génica.	76
4. Efecto de las mutaciones <i>car</i> sobre la expresión génica.	76
5. El efecto de la luz sobre la expresión de los genes de la carotenogénesis.	77
6. El efecto del sexo sobre la expresión de los genes de la carotenogénesis.	79
7. Integración de las regulaciones.	80
7.1 La regulación de la transcripción.	80
7.2 Regulación posttranscripcional.	81
CONCLUSIONES	85
MATERIALES Y MÉTODOS	87
1. Estirpes y plasmidos.	88
1.1. Estirpes.	88
1.2. Plásmidos.	90
2. Medios y condiciones de cultivo.	90
2.1. Medios de cultivo.	90
2.2. Condiciones de cultivo.	91
2.3. Condiciones de iluminación.	91
3. Extracción y análisis de carotenos.	92
3.1. Extracción de carotenos.	92
3.2. Análisis de carotenos por HPLC.	92

4. Extracción y manipulación de ácidos nucleicos.	93
4.1. Extracción de ADN de <i>Phycomyces</i> .	93
4.2. Extracción de ARN total de <i>Phycomyces</i> .	94
4.3. Cuantificación de ácidos nucleicos.	94
4.4. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).	95
4.5. Digestión de ADN con restrictasas.	95
4.6. Electroforesis de ADN.	95
4.7. Electroforesis de ARN.	96
5. Detección de secuencias de ARN por hibridación.	97
5.1. Transferencia de ARN de geles de agarosa a membrana.	97
5.2. Sondas para ARN mensajeros.	97
5.3. Marcaje radioactivo de sondas.	97
5.4. Hibridación y cuantificación.	98
6. Análisis de proteínas.	100
6.1. Extracción de proteínas de <i>Phycomyces</i> .	100
6.2. Fraccionamiento de proteínas en geles desnaturalizantes.	100
6.3. Tinción con azul de Coomassie.	100
6.4. Inmunodetección con anticuerpos conjugados con peroxidasa y quimioluminiscencia.	101

BIBLIOGRAFÍA	103
---------------------	------------

INTRODUCCIÓN

1. *Phycomyces*

Phycomyces blakesleeanus es un hongo saprofito terrestre que ha sido encontrado en ambientes húmedos de diversas regiones del mundo, lo que sugiere una distribución cosmopolita. Pertenece a la clase Zigomicetos, al orden Mucorales y a la familia Phycomycetaceae.

Phycomyces fue descrito por primera vez por Agardh (1817), quien lo confundió con un alga y lo denominó *Ulva nitens*. Kunze (1817) volvió a encontrarlo, percibió el error y lo clasificó como hongo, llamándolo *Phycomyces nitens*, que significa "hongo-alga con brillo metálico". Burgeff (1925) dividió la especie en dos al distinguir *P. blakesleeanus*. Esta especie ha sido usada en esta Tesis para conocer mejor el mecanismo de la carotenogénesis.

La principal razón de la presencia de *Phycomyces* en los laboratorios es su sensibilidad a la luz, investigada desde antiguo (Hoffmeister, 1867; Carnoy 1870; Mássart 1888). Blakeslee (1904) descubrió su ciclo sexual y Burgeff inició el estudio de su genética y descubrió la heterocariosis (Burgeff, 1912) y la recombinación durante el ciclo de vida sexual (Burgeff, 1914). Además, contribuyó al conocimiento de la bioquímica al demostrar el intercambio de "hormonas sexuales" entre micelios de sexos opuestos (Burgeff, 1928) y al descubrir, a la vez que Schopfer (1934), que *Phycomyces* necesita tiamina para crecer. Este fue el primer caso conocido de requerimiento de una vitamina por parte de un organismo distinto del hombre. Fue a partir de 1956 que las investigaciones con *Phycomyces* recibieron un gran impulso, gracias a la incansable dedicación de Max Delbrück y sus colaboradores. En 1987, Cerdá-Olmedo y Lipson publicaron el libro "*Phycomyces*" que reúne los conocimientos acumulados hasta entonces acerca de este organismo.

Las motivaciones para el estudio de *Phycomyces* han cambiado con el paso del tiempo y las particularidades de este organismo han despertado el interés de un variado grupo de científicos. Durante la primera mitad del siglo veinte, muchos investigadores buscaron organismos de crecimiento rápido que soporten condiciones experimentales variadas y sean fáciles de manejar en el laboratorio. *Phycomyces* no solo reúne estas características, sino que presenta singularidades que le convirtieron en un eucarionte modelo para investigaciones de fotobiología,

fisiología, bioquímica y genética, como sus respuestas a la luz, la acumulación de ciertos productos químicos y una sucesión elaborada de estructuras complejas empleadas para propagarse.

Desafortunadamente no se ha conseguido transformar este hongo más que de forma inestable y transitoria (Obraztsova *et al.*, 2004). Mientras que varios métodos han sido desarrollados y empleados con éxito para obtener transformantes estables de otros hongos filamentosos (Ruiz-Díez, 2002), ningún gen exógeno ha sido expresado establemente en *Phycomyces*.

1.1 Ciclo vegetativo

Habitualmente *Phycomyces* crece como un micelio de filamentos ramificados que se reproduce de forma vegetativa por esporulación (Figura1). La disponibilidad de un medio apropiado para el crecimiento no basta para inducir la germinación de las esporas. En el laboratorio se consigue su germinación masiva por un choque térmico de 48° C durante 15 minutos o por la adición al medio de ciertos compuestos químicos, como el acetato o el propionato (Robbins *et al.*, 1942; Borchert, 1963; Van Mulders *et al.*, 1986). Cuando las condiciones son propicias, las esporas se hinchan y de ellas emergen uno, dos, o raramente tres tubos germinales que van a formar hifas cilíndricas y no tabicadas (cenocíticas). Estas hifas contienen muchos núcleos haploides resultantes de la proliferación mitótica de los núcleos de las esporas. Al crecer las hifas se ramifican abundantemente dando lugar al micelio vegetativo. El micelio crece rápidamente (expansión radial, 2 cm diarios) mientras haya nutrientes y las condiciones ambientales lo permitan.

Al crecimiento trófico sucede un proceso de diferenciación que consiste en la emisión de hifas aéreas especializadas no ramificadas (esporangióforos) que eventualmente desarrollan en su extremo distal una pequeña esfera (esporangio) donde se acumulan núcleos que son empaquetados formando las esporas. Existen dos tipos de esporangióforos, los micróforos, de hasta 3 mm de longitud, y los macróforos, que alcanzan más de 15 cm de largo, que se forman según señales ambientales relacionadas con las posibilidades de dispersar las esporas.

1.2. Ciclo sexual

Como otros Zigomicetos, *Phycomyces* es heterotálico, es decir, los micelios pueden ser de dos sexos diferentes, (+) y (-), indistinguibles salvo por la iniciación del ciclo sexual cuando encuentran un micelio de sexo contrario en condiciones apropiadas.

Los mecanismos básicos del desarrollo sexual, incluidas las señales químicas iniciales, son compartidos por muchos Mucorales (Sutter, 1987). Cuando están próximos, pero aún antes del contacto físico, los micelios de sexos opuestos intercambian feromonas que son convertidas en ácidos trispóricos exclusivamente por el micelio receptor (Caglioti *et al.*, 1966; Sutter, 1977; Sutter y Whitaker, 1981). Los ácidos trispóricos inducen la diferenciación de las hifas características del ciclo sexual (Figura 1). El ciclo sexual conduce a la formación de germosporas, productos de la recombinación genética entre los padres, que se comportan igual que las esporas vegetativas.

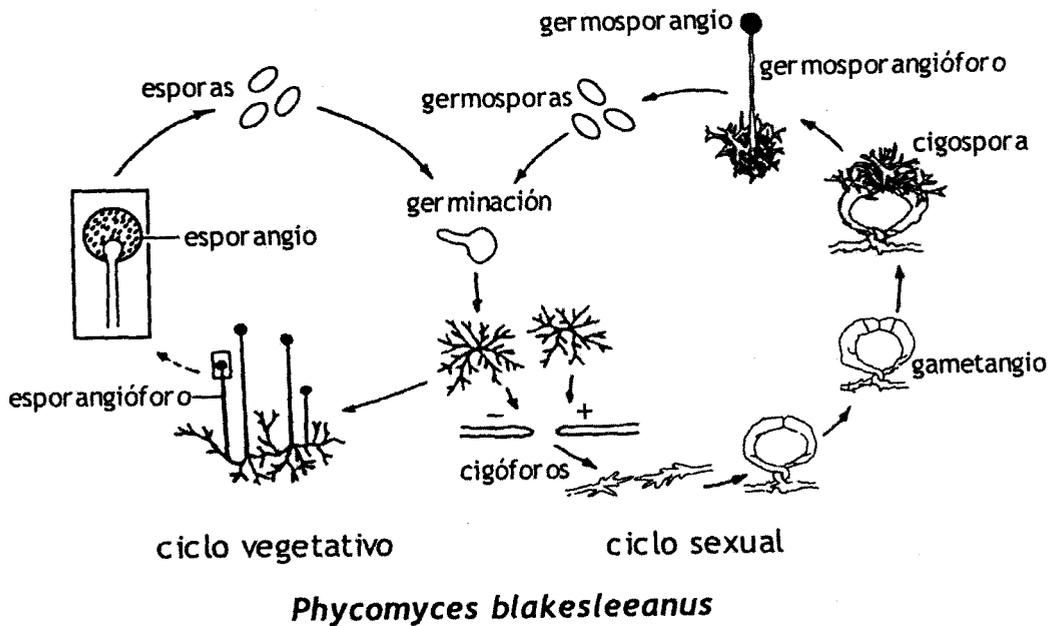


Figura 1: Representación esquemática de los ciclos de vida de *Phycomyces*.

2. *Blakeslea*

Todos los experimentos de esta Tesis fueron hechos con *Phycomyces* y algunos, los que tratan de los efectos de la interacción sexual sobre la carotenogénesis, se repitieron con *Blakeslea*. La especie que se estudió fue *Blakeslea trispora* (Thaxter, 1914), un Mucoral de la familia Choanephoraceae. Se discute si se deben distinguir *Blakeslea* y *Choanephora* como géneros diferentes (Zycha *et al.*, 1969).

Blakeslea se aísla sobre todo de hojas de plantas en regiones tropicales, pero no es un patógeno sino un oportunista (Zycha *et al.*, 1969; Webster, 1970). Como *Phycomyces*, es un hongo heterotálico (Weber y Wolf, 1927; Kishore, 1940, Barnett *et al.*, 1956). El ciclo vegetativo se caracteriza por presentar dos modelos de estructuras para la dispersión de esporas, los esporangios y los esporangiolos (Figura 2). En el ciclo sexual las cigosporas, después de un periodo de latencia, germinan formando un tubo germinal aéreo con un germosporangio terminal o germoesporangio (Yu y Ko, 1997).

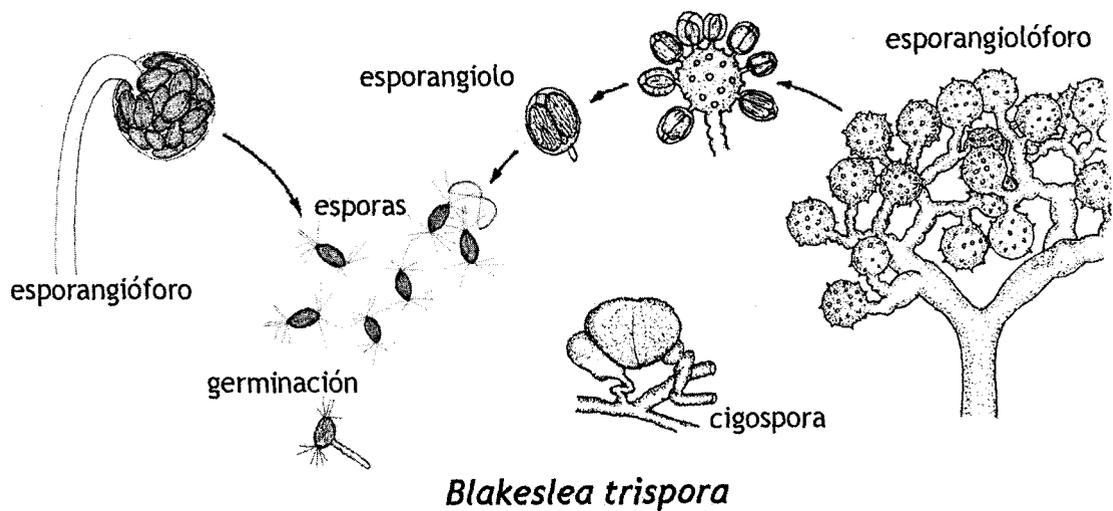


Figura 2: Representación esquemática de la propagación vegetativa y del cigoto de *Blakeslea* (modificado de Zycha *et al.*, 1969; Webster, 1970).

3. Terpenoides

Los terpenoides, o isoprenoides, forman una de las más diversas familias de compuestos presentes en la naturaleza. Sus funciones y tamaños son muy variados. Participan en multitud de procesos biológicos, tan indispensables como la respiración (ubiquinona), la fotosíntesis (carotenoides, fitol, cadenas preniladas de clorofila y plastoquinona), la regulación del crecimiento y del desarrollo (retinoides, esteroides, hormonas juveniles en insectos, giberelinas, ácido abscísico, citoquininas) y la composición de las membranas (esteroles) (Law, 1985; Goldstein y Brown, 1990; Chappell, 1995; Bach, 1995). Comprenden desde molécula volátiles (mentol) a moléculas gigantes (caucho).

Más de 23.000 terpenoides han sido caracterizados y centenas de nuevas estructuras son identificadas cada año. A pesar de su diversidad, todos los terpenoides derivan de subunidades de isopentenil pirofosfato (IPP), un compuesto de cinco carbonos (C5) que es considerado la unidad de isopreno. El descubrimiento de que la molécula de caucho está formada por muchas repeticiones unidas covalentemente de una subunidad de cinco carbonos (Staudinger y Fritschi, 1922) fue la confirmación experimental de los conceptos de macromoléculas y polimerización (Staudinger, 1920) e introdujo un gran cambio conceptual en la Química. Los terpenoides se clasifican según el número de de unidades de isopreno que los forman. Los carotenoides son terpenoides formados por ocho unidades de isopreno (C40). Cuando están constituidos no más que por carbono e hidrógeno los carotenoides son conocidos como carotenos y los derivados oxigenados de estos se denominan xantofilas.

3.1. Terpenoides mayoritarios

Los principales terpenoides producidos por *Phycomyces* están en su fracción lipídica. Dependiendo de las condiciones y edad del cultivo y de la estirpe los lípidos pueden llegar a constituir hasta un 41% de la masa seca de *Phycomyces* (Cerdá-Olmedo y Ávalos, 1994). Las mayores concentraciones ocurren en medios ricos en azúcar y con el pH neutro, pero en agar mínimo (pH 4,5) estas concentraciones son menores.

Otros constituyentes de la fracción lipídica comparten con los terpenoides los

pasos iniciales de sus rutas de síntesis, como es el caso de los triglicéridos y los ácidos grasos. Estos últimos constituyen el 80% de la fracción lipídica siendo el oleico y el palmítico los más abundantes (Cerdá-Olmedo y Ávalos, 1994). La concentración de ácidos grasos en las esporas es particularmente elevada y su composición difiere de la del micelio (Marouf y Malhotra, 1976).

Los principales lípidos terpenoides son los esteroides y los carotenos. Los esteroides constituyen el 0,5% de la masa seca siendo los más abundantes el ergosterol y el episterol (Barrero, 2002). El caroteno mayoritario de la estirpe silvestre es el β -caroteno todo-trans (50-200 $\mu\text{g/g}$ de masa seca) ($\mu\text{g/g m.s.}$), las concentraciones de sus precursores son muy bajas. Mientras que los carotenos no son necesarios para el ciclo vegetativo de *Phycomyces*, los esteroides son esenciales.

El contenido de ergosterol no varía en la estirpe silvestre por exposición a la luz, ni al añadir ftalato de dimetilo al medio, pero sí se incrementa el contenido de β -caroteno. Tampoco hay diferencias en el contenido de ergosterol entre la estirpe silvestre y varios mutantes afectados en la carotenogénesis. Estos datos indican que las biosíntesis de esteroides y carotenos están reguladas de forma independiente (Bejarano y Cerdá-Olmedo, 1992). La ruta de síntesis de estos terpenoides coincide hasta el precursor común pirofosfato de farnesilo (C15) pero se ha demostrado que están físicamente separadas en compartimentos subcelulares independientes (Bejarano y Cerdá-Olmedo, 1992).

La ubiquinona de *Phycomyces* tiene 45 átomos de carbono en su parte terpenoide y comparte el precursor directo con los carotenos (Spiller *et al.*, 1968). Está involucrada en la respiración mitocondrial y en otras funciones y su concentración aproximada en condiciones experimentales normales es de 300 $\mu\text{g/g m.s.}$ Recientemente se ha demostrado que las biosíntesis de ubiquinona y ergosterol ocurren en el mismo compartimento subcelular o intercambian precursores entre sus compartimentos. Como consecuencia las biosíntesis de ubiquinona y carotenos están físicamente separadas. Los cambios importantes en la producción de caroteno causados por mutaciones en varios genes o interacción sexual no afectan a la de ubiquinona. Estos resultados indican que la síntesis de carotenos y ubiquinona están reguladas independientemente (V. Kuzina, Tesis doctoral en preparación).

La esporopolenina es un polímero de carotenoides muy resistente que se encuentra en las paredes de esporas y sobre todo de cigosporas. Es un terpenoide con evidente función protectora (Furch y Gooday, 1978).

4. Carotenos

El color amarillo típico de *Phycomyces* atrajo la atención de los científicos incluso antes de la existencia de la cromatografía o de la espectrofotometría. El color se debe a un pigmento carotenoide, el β -caroteno (Schopfer, 1935; Schopfer y Jung, 1935). En 1930 la estructura del β -caroteno fue determinada por Karrer, que recibió por ello el Premio Nobel en 1937, y su síntesis química es todavía la base de una gran industria. El estudio sistemático de los carotenos en *Phycomyces* fue iniciado por Garton (1951) y sigue avanzando gracias al desarrollo de nuevas técnicas analíticas. Las contribuciones de Goodwin (1980) a la bioquímica de los carotenos y de Ciegler (1965) a la producción industrial de carotenos en *Blakeslea* fueron fundamentales para llegar al conocimiento que disponemos hoy sobre estos pigmentos. Más recientemente, Eslava y sus colaboradores (Iturriaga *et al.*, 2001) vienen aportando avances importantes al investigar la carotenogénesis no solo en *Phycomyces* pero también en *Mucor circinelloides*, organismo que permite la obtención de transformantes estables.

Los carotenoides son de los pigmentos más frecuentes en la naturaleza. Todos los organismos fotosintéticos, al igual que ciertos hongos y bacterias no fotosintéticas son capaces de sintetizarlos. También se encuentran en los animales que, incapaces de sintetizarlos, incorporan y modifican carotenoides ingeridos. Tienen en común un esqueleto de 40 átomos de carbono de estructura lineal, a veces con anillos cerrados en uno o ambos extremos de la molécula (Figura 3). Debido a su naturaleza apolar, los carotenos se acumulan en regiones hidrófobas de la célula, como glóbulos lipídicos o membranas. Son sensibles a la luz y al calor (que causa isomerización *cis-trans*) y susceptibles de oxidación por el oxígeno del aire.

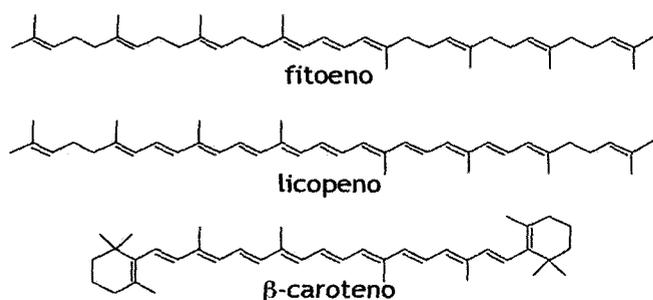


Figura 3: Estructura de dos intermediarios fitoeno y licopeno y del producto final de la biosíntesis de carotenos en *Phycomyces*, el β -caroteno.

Los carotenos se diferencian entre sí por sus características espectrofotométricas y cromatográficas. La mayoría de ellos absorben luz en la región visible del espectro electromagnético, y sobre todo longitudes de onda entre 350 y 550 nm, debido a sus enlaces dobles conjugados.

Sus funciones en la naturaleza son muy diversas y algunas todavía poco claras. Son esenciales para la vida de los organismos fotosintéticos, en los cuales actúan como colectores de luz (pigmentos antena) y protectores contra daños fotooxidativos. Pueden servir de precursor para otras moléculas con distintas funciones fisiológicas como los ácidos trispóricos (Austin *et al.*, 1970), implicados en la sexualidad de los hongos Mucorales y el retinal, implicado en el sistema visual de los vertebrados. Algunos derivados de los carotenos son responsables de muchos aromas (rosas) y sabores (pimiento, azafrán, achiote o urucú) encontrados en la naturaleza. Al ser responsables de las tonalidades llamativas de muchas flores y frutos, atraen agentes polinizadores y dispersores de semillas. Por influir en la coloración de diversas aves, reptiles, peces, crustáceos e insectos (Britton, 1983) los carotenoides desempeñan funciones importantes en la conducta de estos animales.

La función más estudiada de los carotenoides es la de servir como precursor de la vitamina A o retinol cuya principal fuente es el β -caroteno, abundante en la naturaleza, pero muchas veces insuficiente en la dieta de animales. La carencia de esta vitamina tiene consecuencias graves incluyendo ceguera y muertes prematuras, principalmente en poblaciones infantiles desfavorecidas. Se estima que la escasez de vitamina A causa la muerte de 2 millones de niños a cada año por infecciones como el sarampión y que varios millones de personas sufren ceguera permanente por la misma causa.

Para los seres humanos los carotenoides, además de proveer vitamina A, tienen otros papeles importantes como protectores contra rayos solares nocivos (Bartley y Scolnik, 1995; Sies y Stahl, 2004) y como antioxidantes biológicos que protegen células y tejidos contra daños causados por radicales libres (Edge *et al.*, 1997). El licopeno, precursor rojo del β -caroteno, es particularmente eficiente como antioxidante (Böhm *et al.*, 2001;). Otros efectos benéficos de los carotenos incluyen la inhibición de la proliferación de determinados tipos de cáncer (Mayne, 1996; Campbell *et al.*, 2004; Taylor y Greenwald, 2005; Palozza *et al.*, 2004) y la prevención de enfermedades crónicas y cardiovasculares (Chew *et al.*, 2004).

Como consecuencia de sus efectos benéficos para la salud y de sus colores llamativos, los carotenoides purificados tienen numerosas aplicaciones en las industrias alimentaria (humana y animal), cosmética y farmacéutica, donde son empleados como suplementos alimentarios, antioxidantes, nutracéuticos o colorantes naturales (Lee y Schmidt-Dennert, 2002; Fraser *et al.*, 2004).

5. Biosíntesis de carotenos

El IPP, precursor universal de los terpenoides, es sintetizado a través de la ruta metabólica del mevalonato. En eubacterias, algas verdes y plantas, pero no en hongos, existe una ruta adicional de formación de IPP que es independiente del mevalonato (Rohmer *et al.*, 1993). Para una mejor descripción separamos la ruta de síntesis de los carotenos en tres partes consecutivas representadas en las Figuras 4, 5 y 6.

5.1. Síntesis del mevalonato

La síntesis de carotenos empieza a partir de acetil-coenzima A (acetil-CoA). Tres moléculas de este compuesto son convertidas, vía acetoacetil-CoA, en 3-hidroximetil-3-metilglutaril-coenzima A (HMG-CoA). Estas reacciones están catalizadas por la transferasa de acetilo del acetil-CoA, que condensa dos unidades de acetil-CoA para formar acetoacetil-CoA y por la sintasa de HMG-CoA que llamaremos HmgS, por ser producto del gen *hmgS* de *Phycomyces*, que cataliza la condensación de una molécula de acetoacetil-CoA con una de acetil-CoA para producir HMG-CoA. La HMG-CoA sirve de sustrato para que la reductasa de

HMG-CoA o HmgR, producto del gen *hmgR*, convierte este compuesto en mevalonato (Figura 4). El HMG-CoA puede, alternativamente, servir de sustrato para la síntesis de cuerpos cetónicos (acetato y β-hidroxibutirato). Los genes *hmgS* y *hmgR* de *Phycomyces* se han caracterizado a nivel molecular (Ruiz-Albert *et al.*, 2001).

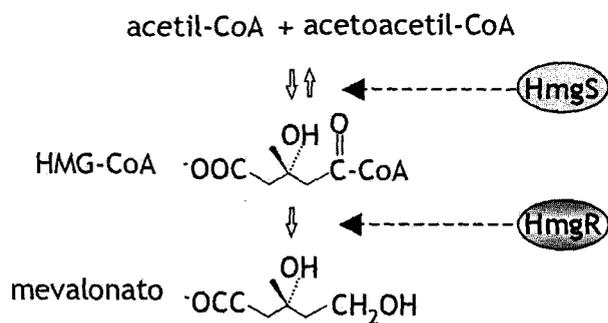


Figura 4: Biosíntesis del mevalonato a partir del acetil-CoA. En este trabajo se analizó la expresión de los genes que codifican para las enzimas que se indican a la derecha.

5.2. Síntesis del pirofosfato de geranylgeraniol

El mevalonato es convertido en la unidad de isopreno, el IPP (C5) por medio de dos fosforilaciones y una descarboxilación (Figura 5). Estas reacciones son catalizadas respectivamente por la cinasa del mevalonato, la cinasa del fosfomevalonato y la decarboxilasa del difosfomevalonato.

Tras la isomerización reversible de IPP en pirofosfato de dimetilalilo (también C5), catalizada por la isomerasa de IPP, ambos compuestos se condensan por mediación de las transferasas del prenilo y originan una molécula de pirofosfato de geranilo (GPP) (C10). La adición sucesiva de nuevas moléculas de IPP dan lugar a pirofosfato de farnesilo (FPP) (C15) y pirofosfato de geranylgeraniol (GGPP) (C20). El FPP es también el precursor directo del escualeno (C30), que es la primera molécula de la síntesis de los esteroides.

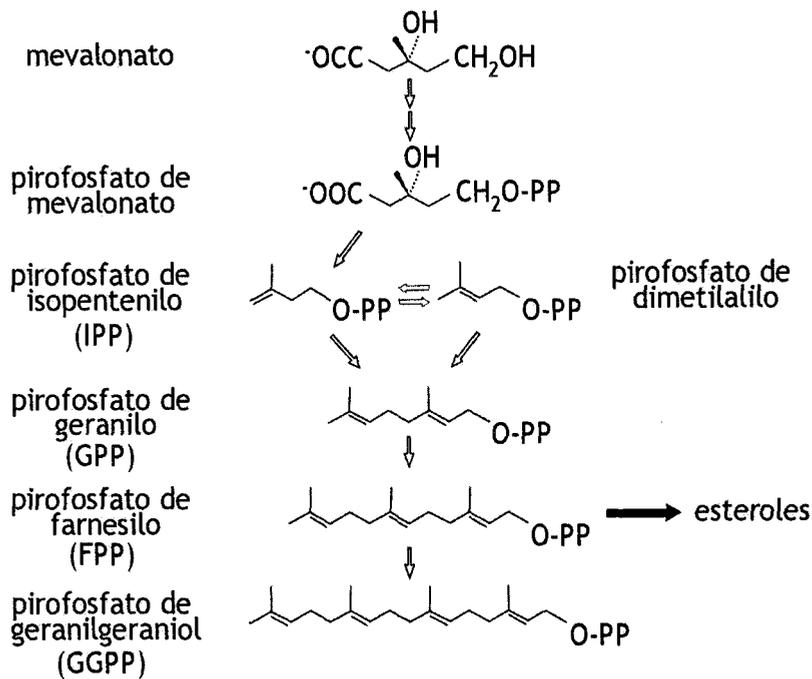


Figura 5: Biosíntesis del pirofosfato de geranilgeraniol a partir del mevalonato.

5.3. Síntesis de carotenos

De acuerdo con la nomenclatura genética adoptada para *Phycomyces* (Demerec *et al.*, 1966), los genes implicados en la producción de carotenos se denominan con las letras minúsculas *car* y una letra mayúscula, todas cursivas, la proteína producto de un gen se denomina como este, pero sin cursivas y empezando con mayúscula. Los mutantes se denominan como el gen afectado y un número de aislamiento. Cuando se ignora el gen afectado su letra mayúscula se sustituye por un guión. Hay un gen *carRA*, con dos letras mayúsculas, que da lugar a dos proteínas, CarR y CarA.

El GGPP es el precursor directo de todos los carotenoides (Figura 6). La condensación de dos moléculas de GGPP da lugar a fitoeno (C₄₀), un caroteno incoloro, a través de un intermediario muy inestable, el pirofosfato de prefitoeno (Altman *et al.*, 1972). En *Phycomyces* esta reacción doble mediada por la sintasa del fitoeno, se atribuye al producto CarA, del dominio A del gen *carRA* (Torres-Martínez *et al.*, 1980; Arrach *et al.*, 2001) dado su parecido con sintasas de fitoeno de otros hongos (*Mucor circinelloides*, *Neurospora crassa*, *Xanthophyllomyces*

dendrorhous), bacterias, algas y plantas superiores.

La formación de carotenos coloreados implica una serie de deshidrogenaciones sucesivas, cada una de las cuales introduce una nueva doble ligación en la molécula. En *Phycomyces* cuatro reacciones, llevadas a cabo por cuatro ejemplares de la deshidrogenasa del fitoeno, producto del gen *carB*, conducen a la formación del licopeno, de color rojo, pasando por los intermediarios fitoflueno, ζ -caroteno y neurosporeno (Eslava y Cerdá-Olmedo, 1974; Aragón et al., 1976).

En otros hongos filamentosos, como *Neurospora* y *Fusarium*, ocurre una quinta deshidrogenación que conduce a la formación de 3,4-didehidrolicopeno o toruleno (Ávalos y Cerdá-Olmedo, 1987; Hausmann y Sandmann, 2000). Según el organismo, el neurosporeno, el licopeno o el toruleno sirven de precursores para originar, a través de distintas ramificaciones de la ruta biosintética, la enorme variedad de carotenoides encontrados en la naturaleza.

En *Phycomyces* el licopeno sirve de sustrato para dos reacciones de ciclación. La primera cierra en un anillo un extremo de la molécula y origina el γ -caroteno. La ciclación de la otra extremidad produce el β -caroteno de color amarillo, que es el producto final de la ruta. Estas reacciones son catalizadas por dos ejemplares de la ciclasa del licopeno. Esta enzima es el producto del dominio R del gen *carRA* (De la Guardia et al., 1971; Torres-Martínez et al., 1980). Los genes *carRA* y *carB* de *Phycomyces* están caracterizados molecularmente (Ruiz-Hidalgo et al., 1997; Arrach et al., 2000). Las secuencias de los genes de *Blakeslea* (Rodríguez-Sáiz, 2004) son muy parecidas a las de *Phycomyces* y se les atribuyen las mismas funciones.

Los estudios genéticos citados (De la Guardia et al., 1971; Aragón et al., 1976) sugieren la existencia de un agregado multienzimático formado por cuatro copias de CarB y dos de CarR. Los estudios cuantitativos de la inhibición de la ruta por productos químicos han añadido detalles sobre la dinámica de este agregado enzimático (Candau et al., 1991).

Algunos organismos poseen enzimas capaces de promover modificaciones finales en carotenos hidrocarbonados. La oxidación de carotenos origina las xantofilas muy abundantes en las plantas, pero también en microorganismos, como la zeaxantina de *Erwinia* (Armstrong, 1997), la luteína de *Chlorella*, la

astaxantina de *Xanthophyllomyces* (An *et al.*, 1989; Johnson y Lewis, 1979) y la neurosporaxantina de *Neurospora* (Aasen y Jensen, 1965) y de *Fusarium* (Ávalos y Cerdá-Olmedo, 1987).

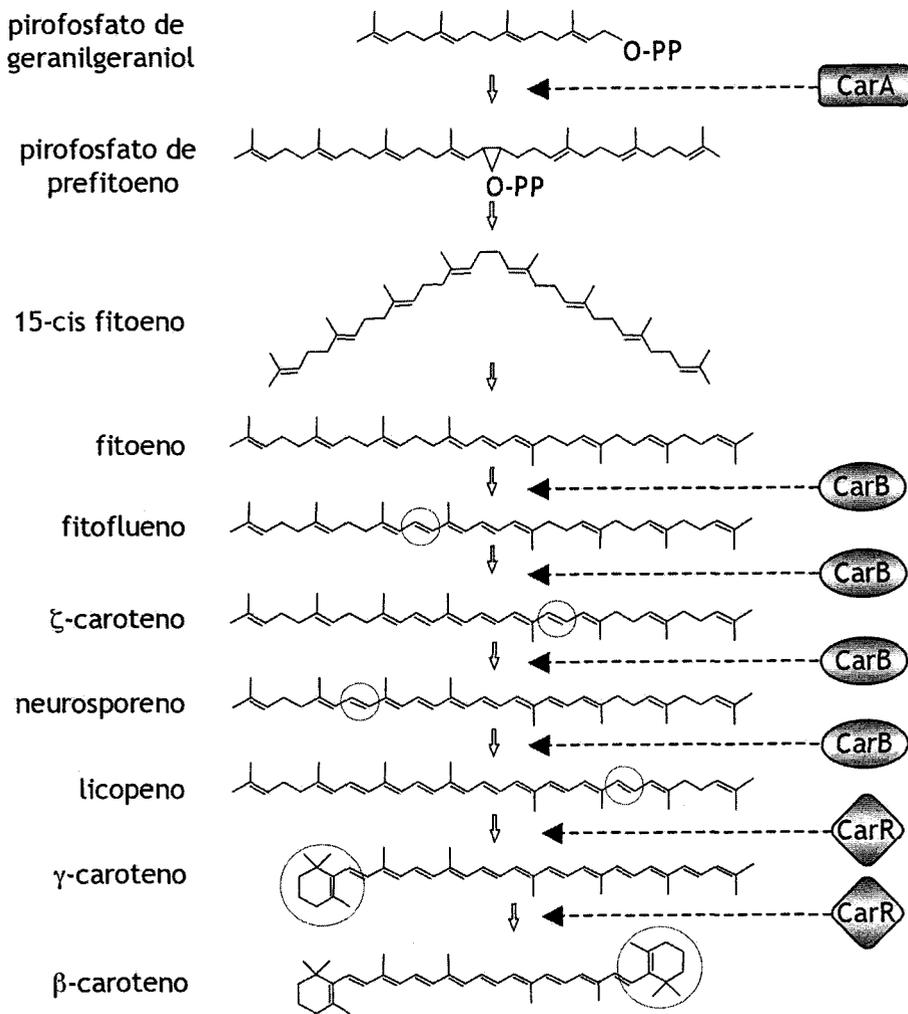


Figura 6: Biosíntesis del β-caroteno a partir del pirofosfato de geranilgeraniol. En este trabajo se analizó la expresión de los genes que codifican para las enzimas que se indican a la derecha. Los círculos destacan el lugar de las deshidrogenaciones y las ciclaciones.

6. Mutantes de la síntesis de carotenos

Phycomyces fue uno de los primeros organismos en que se encontraron mutantes, espontáneos (Burgeff, 1912) e inducidos (Dickson, 1932). El desarrollo

de métodos eficaces para aislar mutantes recesivos a partir de las esporas multinucleadas de este organismo (Heisenberg y Cerdá-Olmedo, 1968; Roncero *et al.*, 1984) dio lugar a una amplia colección de mutantes que facilita el estudio de la carotenogénesis. Los mutantes de la carotenogénesis son fáciles de identificar por el color de sus micelios.

La obtención de mutantes permitió la identificación y caracterización genética de dos genes estructurales, *carRA* y *carB* y cinco genes reguladores, *carC*, *carD*, *carE*, *carF* y *carS*. El gen *carRA*, además de ser responsable por la síntesis de dos proteínas estructurales tiene también función reguladora (Torres-Martínez *et al.*, 1980; Murillo *et al.*, 1981).

Según el color del micelio los mutantes *car* de *Phycomyces* pueden ser separados en tres fenotipos principales. Los mutantes superamarillos acumulan grandes cantidades de β -caroteno y están afectados en los genes reguladores *carS* (Murillo y Cerdá-Olmedo, 1976), *carD* (Salgado *et al.*, 1989) o *carF* (Mehta *et al.*, 1997). La estirpe que acumula la mayor cantidad de β -caroteno es la S566, mutada simultáneamente en los genes *carF* y *carS* (Mehta *et al.*, 1997). Existe también mutantes reguladores *carC*; con poco menos caroteno que la estirpe silvestre, estos mutantes son parcialmente insensibles a la fotocarotenogénesis (Revuelta y Eslava, 1983).

Los mutantes blancos pueden estar alterados en el gen estructural *carB* y acumular grandes cantidades de fitoeno o en todo el gen bifuncional *carRA* y ser albinos por una total ausencia de carotenos. Mutantes del dominio A del gen *carRA* también son blancos y producen apenas trazas de β -caroteno. Hay mutantes verdes del gen *carB* que acumula ζ -caroteno y fitoflueno además de grandes cantidades de fitoeno; su color se debe a la desusada abundancia de ζ -caroteno (Bejarano *et al.*, 1987; Sanz *et al.*, 2002). Los mutantes rojos están afectados en el dominio R del gen *carRA* y acumulan grandes cantidades de licopeno (Meissner y Delbrück, 1968; De la Guardia *et al.*, 1971; Ootaki *et al.*, 1973; Torres-Martínez *et al.*, 1980). Cuando la mutación *carA* viene acompañada de otra en el gen *carS*, la estirpe recupera el color amarillo y produce cantidades algo mayores de caroteno que de la estirpe silvestre, según sea el alelo *carA* implicado (Salgado y Cerdá-Olmedo, 1992). De la exposición de mutantes *carS* a

una segunda ronda del agente mutagénico se aislaron mutantes albinos que combinan dos mutaciones *carS*. Los análisis de recombinación y complementación confirmaron que se trata de doble mutantes del gen *carS* cuyas mutaciones separadamente resultan en fenotipo superamarillo (Salgado y Cerdá-Olmedo, 1992).

Se han aislado mutantes llamados "quimioinsensibles", de color similar al de la estirpe silvestre, que responden poco o nada a la estimulación por productos químicos (retinol y ftalato de dimetilo). Se han caracterizado dos de ellos: uno define el gen *carI* y el otro ha sido asignado al dominio A del gen *carRA* (Roncero y Cerdá-Olmedo, 1982). De resultados se deduce que, para ser efectivos, los estimuladores químicos de la carotenogénesis necesitan al menos los productos CarI y CarA.

Se aislaron también otros tipos de mutantes de *Phycomyces*, como los varios mutantes *mad*, *pic* y *pin* que entre otras alteraciones no incrementan su carotenogénesis en la luz o la incrementan menos que el silvestre (Bergman *et al.*, 1973; Lopez-Días y Cerdá-Olmedo, 1980).

7. Regulación de la síntesis de carotenos

Como suele ocurrir en la evolución de las rutas metabólicas, la biosíntesis de carotenos está significativamente más conservada que su regulación y no es de esperar que los procesos reguladores sean los mismos en distintos organismos carotenogénicos. El caso mejor conocido es el de *Phycomyces*, en el que estos procesos son complejos y se caracterizan por la interacción de estímulos ambientales y funciones celulares.

El conocimiento de la regulación de la carotenogénesis proviene principalmente del estudio sistemático de los mutantes y del efecto de inhibidores y estimuladores de la ruta. Algunos factores que estimulan la carotenogénesis de *Phycomyces* son la iluminación por luz azul (Bejarano *et al.*, 1991), la interacción sexual (Barnett *et al.*, 1956; Govind y Cerdá-Olmedo, 1986) y la adición al agar de productos químicos, como el ácido trispórico C (Caglioti *et al.*, 1966), el retinol (Eslava *et al.*, 1974) y el ftalato de dimetilo (Cerdá-Olmedo y Hüttermann, 1986). Cada uno de estos factores responde a un mecanismo diferente de activación,

como se reconoce por sus sinergias y por depender de diferentes productos génicos para actuar (Bejarano *et al.*, 1988).

7.1. Regulación química de la carotenogénesis

Se han descrito muchos compuestos químicos que alteran la carotenogénesis en diferentes grados y en distintos organismos. Sus acciones no son universales y así la mayoría de los activadores de la carotenogénesis de *Phycomyces* son poco o nada activos en *Blakeslea*, y viceversa. Algunos ejemplos se muestran en la Figura 7.

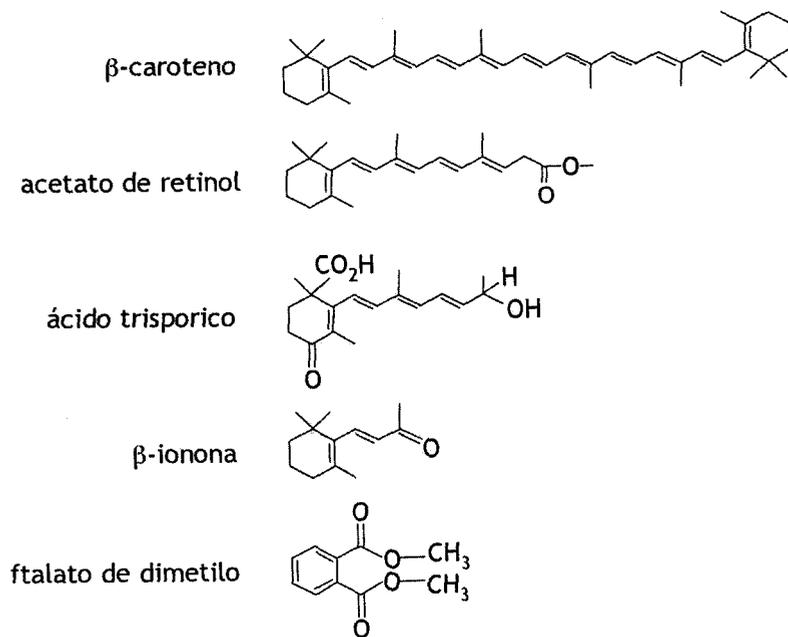


Figura 7: Estructura del β-caroteno y de algunos compuestos que estimulan la carotenogénesis en *Phycomyces*.

El retinol, cuya estructura química se parece a una sección de la molécula del β-caroteno, estimula la síntesis de caroteno en la estirpe silvestre y en varios mutantes, pero no en los mutantes *carR*, *carRA*, *carB* y *carS*. La respuesta de los mutantes blancos *carA* al retinol varia según el alelo afectado. Algunos son casi insensibles; otros se tornan amarillos por acumular cantidades apreciables de β-caroteno (Bejarano *et al.*, 1988). La β-ionona actúa de forma análoga al retinol (Eslava *et al.*, 1974); el retinal y la α-ionona son menos eficaces (Bejarano *et al.*,

1988). Este grupo de compuestos químicos necesita la presencia de β -caroteno y de CarA para activar.

Entre los compuestos fenólicos que estimulan la carotenogénesis (Cerdá-Olmedo y Hüttermann, 1986) el ftalato de dimetilo y el veratrol son los más activos. Su actividad no depende de la presencia de β -caroteno o del producto CarS pues estimulan la carotenogénesis de los mutantes *carB*, *carR* y *carS*. La sinergia de los fenoles indica también mecanismos de acción diferentes (Bejarano *et al.*, 1988).

Se han descrito varios inhibidores químicos de la ruta de síntesis de los carotenos que actúan a distintos niveles. La lovastatina (mevinolina, monacolina K) y otras estatinas son inhibidores competitivos de la HmgR (Endo, 1992). El herbicida norflurazona bloquea la síntesis de fitoeno (Sandmann *et al.*, 1980). La difenilamina es un inhibidor casi universal de las deshidrogenaciones (Kharasch *et al.*, 1936; Goodwin, 1952; Goodwin *et al.*, 1953); el micelio de *Phycomyces* cultivado en su presencia es blanco por acumular fitoeno. La nicotina y la 2-(4-clorofeniltio)-trietilamina CPTA bloquean la ciclación del licopeno; su presencia en el agar origina micelio de color rojo (Howes y Batra, 1970; Coggins *et al.*, 1970; Candau *et al.*, 1991).

7.2. Estimulación sexual de la carotenogénesis

La intensificación del color que ocurre cuando se encuentran micelios de sexos opuestos se debe a un incremento en la síntesis de β -caroteno (Barnett *et al.*, 1956).

Durante el ciclo sexual, los Mucorales convierten β -caroteno en ácidos trispóricos (Figura 7) (Austin *et al.*, 1969). Esta conversión se da a través de una compleja ruta de síntesis todavía insuficientemente conocida. Se propone una cooperación entre los dos sexos. Uno de los productos intermediarios no sería metabolizable por el sexo (+) y otro por el sexo (-); ambos serían difusibles y ambos sexos completarían la producción de ácidos trispóricos, que serían los verdaderos estimuladores, tanto de la morfología sexual como de la carotenogénesis (Sutter, 1970a; van den Ende *et al.*, 1972; Sutter y Whitaker, 1981). Los ácidos trispóricos activan la carotenogénesis en cultivos de una sola estirpe de

cualquier sexo; el más activo es el ácido trispórico C (Caglioti *et al.*, 1966; Govind y Cerdá-Olmedo, 1986; Sutter, 1987).

Un micelio cenocítico es homocariote cuando sus núcleos son iguales genéticamente y heterocariote cuando posee núcleos de varios genotipos (Burgeff, 1914). Los heterocariotes intersexuales albergan núcleos de ambos sexos y poseen un color más intenso porque están bajo una constante estimulación sexual (Murillo *et al.*, 1978). Esta observación se ha extendido a *Blakeslea* (Mehta *et al.*, 2003). A través de cruzamientos se obtuvieron diploides parciales de *Phycomyces* heterocigotos para marcadores sexuales y por lo tanto en sus cultivos simples la carotenogénesis está estimulada sexualmente (Mehta y Cerdá-Olmedo, 2001).

Algunos elementos del desarrollo sexual, como los ácidos trispóricos, son comunes entre los Mucorales y dan lugar a que estirpes de distintos sexos y distintas especies sean capaces de iniciar, pero no de completar, el ciclo sexual (Sutter, 1987).

La estimulación sexual actúa de forma independiente y sinérgica con las demás estimulaciones de la carotenogénesis. El retinol, el ftalato de dimetilo, la luz y las mutaciones en el gen *carS* son independientes de la estimulación sexual dado que sus efectos se suman (Murillo *et al.*, 1978; Govind y Cerdá-Olmedo, 1986; Bejarano y Cerdá-Olmedo, 1989).

7.3. Fotoestimulación de la carotenogénesis

Entre los varios estímulos externos que modifican el crecimiento o el metabolismo de *Phycomyces* la luz azul es uno de los más llamativos. El desarrollo del esporangióforo está influenciado por la luz (fotoforogénesis), así como la dirección y la velocidad de su crecimiento (fototropismo y fotomecismo, respectivamente). La luz estimula la carotenogénesis (fotocarotenogénesis), no solo de *Phycomyces*, sino de la mayoría de los organismos en los que se ha estudiado. Existen, sin embargo, algunos organismos, como *Blakeslea*, en los que la cantidad de caroteno acumulado disminuye tras la iluminación (Sutter, 1970b). Este descenso puede deberse a una inhibición de la síntesis mediada por la luz o a fotodestrucción del caroteno.

La síntesis de caroteno en *Phycomyces* varía con el flujo luminoso de la luz (“intensidad”). La medida de la acumulación de carotenos a distintas intensidades de luz muestra que *Phycomyces* posee dos respuestas separadas para dos intervalos distintos de flujo luminoso (dos componentes). La iluminación con bajas intensidades, del orden de $10 \mu\text{J m}^{-2}$, produce un pequeño incremento en la síntesis de β -caroteno que se satura con intensidades inmediatamente superiores. Una respuesta adicional ocurre a fuertes intensidades, a partir de 10^2 J m^{-2} , y consiste en un aumento progresivo de la acumulación de β -caroteno en función de la intensidad hasta por lo menos 2 MJ m^{-2} (Bejarano *et al.*, 1991). Notese el amplio intervalo dinámico de la respuesta.

La fotoforogénesis y el fototropismo actúan de forma análoga a la fotocarotenogénesis una vez que también pueden ser separados en dos componentes con espectros de acción similares pero no idénticos (Corrochano *et al.*, 1988; Galland y Lipson, 1987). Estos datos sugieren que los fotoprocesos de *Phycomyces* comparten elementos de sus mecanismos.

Durante los últimos años surgieron varios trabajos que tratan del efecto de la luz sobre la transcripción de genes involucrados en la carotenogénesis. En *Phycomyces* la transcripción del gen *carB* es fuertemente estimulada por la luz (Ruiz-Hidalgo *et al.*, 1997; Blasco *et al.*, 2001). También en otros hongos la fotoinducción actúa a nivel de transcripción, como es el caso de los genes *carRP* y *carB* de *Mucor circinelloides* (Velayos *et al.*, 2000a; 2000b) y de los genes *al* de *Neurospora crassa* (Nelson *et al.*, 1989; Schmidhauser *et al.*, 1990; 1994). Además, la fototranscripción de genes involucrados en la carotenogénesis fue estudiada exhaustivamente en organismos fotosintéticos desde el alga verde *Chlamydomonas reinhardtii* (Bohne y Linden, 2002) hasta las plantas superiores (Von Lintig *et al.*, 1997; Welsch *et al.*, 2002).

La fotocarotenogénesis en *Phycomyces* resulta de una respuesta a la luz azul, como demostró la comparación de los efectos de diferentes longitudes de onda (Bejarano *et al.*, 1991). La iluminación con luz roja no varía el contenido celular de ARNm del gen *carB* de *Phycomyces* y de *Mucor* (Ruiz-Hidalgo *et al.*, 1997; Velayos *et al.*, 2000a). En esta Tesis se utilizó la luz blanca que contiene luz azul.

7.4. Retroinhibición de la carotenogénesis

Phycomyces posee un mecanismo que controla la concentración intracelular de β -caroteno y le permite reprimir la síntesis cuando se alcanza una cierta concentración de carotenos. La hipótesis de esta regulación por producto final, o retroinhibición, fue fundamental para interpretar varios aspectos de la carotenogénesis de este hongo.

La inhibición de la síntesis por mutaciones o por productos químicos conlleva un incremento en la actividad global de la ruta y una consecuente acumulación de intermediarios, que puede llegar a superar a la de β -caroteno en la estirpe silvestre. Cuando la inhibición es total, como en muchos mutantes estructurales *carR* y *carB*, se alcanzan concentraciones muy elevadas de licopeno y fitoeno, respectivamente, que se atribuyen a que la ausencia del producto final da lugar a un intento vano de alcanzar el nivel normal de β -caroteno. El mismo efecto se consigue mediante el bloqueo químico de la ruta con inhibidores de la ciclación (Candau *et al.*, 1991) y la deshidrogenación (Clarke *et al.*, 1983).

El hecho de que la concentración de β -caroteno en mutantes *carS* sea similar a las de los respectivos intermediarios encontradas en mutantes *carR* y *carB* levantó la sospecha de que la superproducción en los mutantes *carS* se debe a ausencia de retroinhibición. Se propuso que CarS actúa como mediador de la regulación por producto final, que no ocurre en los mutantes *carR* y *carB* por la falta de β -caroteno y en los mutantes *carS* por defecto de CarS (Murillo y Cerdá-Olmedo, 1976).

El dominio A del gen *carRA*, además de su función estructural de codificar la sintasa de fitoeno, posee también alguna función reguladora. Se le atribuyó un papel en la transferencia de sustratos a través de las enzimas carotenogénicas (Murillo *et al.*, 1981). La regulación por producto final consiste en la formación de un complejo de CarA, CarS y β -caroteno que inhibiría la síntesis. Se propuso que CarA y CarS se unen cada uno a uno de los extremos cíclicos del β -caroteno e interrumpen la ruta por una deficiente transferencia de sustratos intermedios (Bejarano *et al.*, 1988).

El modelo de regulación propuesto explica la estimulación de la carotenogénesis por retinol. Por su estructura química ser parecida a una sección

de la molécula de β -caroteno, el retinol y sus análogos anularían la retroinhibición porque competirían con el β -caroteno por la unión a CarA o CarS, pero no serían capaces de servir de puente entre ellos. Como sería de esperar, el retinol no estimula la carotenogénesis en los mutantes *carS*, *carRA*, *carB* y *carR* porque en estos mutantes la ruta ya se encuentra estimulada por ausencia de retroinhibición. Los mutantes *carA* producen β -caroteno en cantidades similares en presencia de retinol o combinados en doble mutantes *carA carS* (Salgado y Cerdá-Olmedo, 1992), situaciones en que se pierde la retroinhibición. Para eso los mutantes *carA* tienen que ser rezumantes y no completamente desprovistos de sintasa del fitoeno.

El hecho de que los mutantes *carS* presentan activación sexual de la carotenogénesis indica que el mecanismo de activación por el sexo es independiente de la retroinhibición por producto final. La estimulación por fitalato de dimetilo y por la luz también son independientes de la retroinhibición dado que sus efectos se suman (Murillo y Cerdá-Olmedo, 1976; Govind y Cerdá-Olmedo, 1986; Bejarano *et al.*, 1988; Bejarano y Cerdá-Olmedo, 1989).

8. Carotenogénesis *in vitro*

En condiciones adecuadas, los extractos libres de células obtenidos a partir de algunos organismos carotenogénicos son capaces de sintetizar caroteno *in vitro*. En *Phycomyces* esta técnica sirvió para demostrar la conversión de leucina (Chichester *et al.*, 1955), glutarato, acetato y mevalonato (Yokoyama *et al.*, 1960; 1962) en carotenos, para comprobar los pasos que convierten fitoeno en β -caroteno (Davies, 1973; Bramley, 1985), para comprobar mutantes (Schmidt y Sandmann, 1990; Salgado *et al.*, 1991) y para ensayar el efecto de productos químicos que *in vivo* serían incapaces de entrar en las células o serían letales al organismo (Clarke *et al.*, 1983)

El empleo de mutantes *car* y de agentes estimulantes de la carotenogénesis en análisis *in vitro* sirvieron para analizar la regulación de la carotenogénesis en *Phycomyces* (Bramley y Davies, 1975; De la Concha *et al.*, 1983; Salgado *et al.*, 1991). En estos experimentos la actividad carotenogénica de los extractos se estimó por la incorporación de radioactividad a partir de mevalonato a carotenos.

En extractos de micelios cultivados en agar (Salgado *et al.*, 1991) se encontró que la estimulación de la carotenogénesis durante el cultivo (retinol, ftalato de dimetilo, luz o sexo) resulta en una actividad carotenogénica *in vitro* mayor que la encontrada en micelios no estimulados. Los estímulos químicos y la luz no son efectivos si se aplican directamente al el extracto. Los extractos de mutantes superproductores (*carS* y *carD*) y estructurales (*carB* y *carR*) se parecen entre sí e incorporan más radioactividad que el silvestre. Las estirpes albinas (*carA*, *carRA*) y los dobles mutantes *carA carS* tienen una actividad carotenogénica *in vitro* similar a la de la estirpe silvestre. El mutante quimioinsensible *carI*, que *in vivo* acumula poco menos caroteno que la estirpe silvestre, tiene *in vitro* una actividad carotenogénica mayor que la él.

Teniendo en cuenta todos los datos relacionados con la biosíntesis de carotenos en *Phycomyces* y su regulación se ha propuesto un esquema que se representa en la Figura 8 que es una modificación de la Figura 4 de Ávalos y Cerdá-Olmedo (2004).

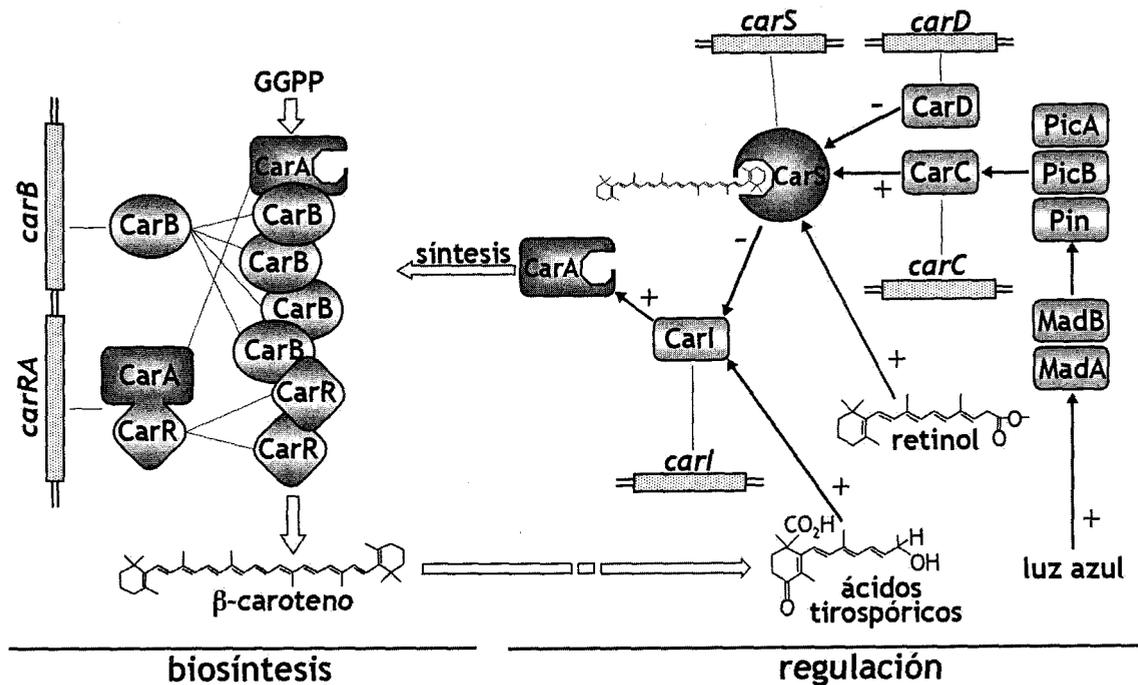


Figura 8: Hipótesis general de la biosíntesis de β -caroteno y su regulación en *Phycomyces*. Se representan los genes y sus productos. En la biosíntesis se representa las reacciones químicas y en la regulación las posibles interacciones entre los agentes que modifican la carotenogénesis. Los símbolos + y - representan efectos estimuladores e inhibidores, respectivamente. Los genes *carRA* y *carB* son responsables de las enzimas que convierten el GGPP en caroteno. Los otros genes *car* son reguladores. Los genes *mad*, *pic* y *pim* fueron identificados por mutaciones que afectan al fototropismo, la fotocarotenogénesis y la fotomorfogénesis, respectivamente. Flechas gruesas indican conversiones metabólicas; flechas sencillas acciones reguladoras.

RESULTADOS

CAPÍTULO 1

Optimización de las condiciones experimentales

Ante todo fue preciso determinar las condiciones experimentales óptimas para estudiar la expresión de los genes de la carotenogénesis. La síntesis de carotenos depende de varios factores genéticos y ambientales. Se ensayaron muchas variaciones y se representan aquí las más importantes para justificar las decisiones tomadas para el resto del trabajo.

1.1. Sondas e hibridación

Con el fin de comparar la acumulación de ARNm con la de carotenos, cada cultivo se hizo de forma duplicada. El micelio obtenido de una caja de Petri se destinó al estudio de la expresión de los genes y el de otra al análisis cromatográfico de los carotenos.

Las sondas radioactivas empleadas son fragmentos de ADN de cuatro genes involucrados en la síntesis de carotenos: *hmgS* y *hmgR* (Ruiz-Albert *et al.*, 2002), *carB* (Ruiz-Hidalgo *et al.*, 1997) y *carRA* (Arrach *et al.*, 2001). En el caso de *hmgS* se usó primero una sonda de 130 pb y luego otra de mayor afinidad, con 1731 pb, que contiene todo el gen. Para *hmgR* se probaron primero sondas de 315 y de 3700 pb que contienen respectivamente un fragmento del gen y todo el gen y luego otra de mayor afinidad con 1428 pb que contiene solamente el dominio catalítico del gen. Para *carRA* y *carB* se usaron sondas que contienen todo el gen en sus 2230 y 1100 pb, respectivamente. Los resultados se normalizaron por la expresión de un gen de la actina, el *actA* (Voigt y Wöstemeyer, 2001). La sonda que se usó es un fragmento de 870 pb y contiene parte del gen *actA*.

Se constató que, bajo nuestras condiciones de experimentación, las membranas de nailon con el ARN fijado se pueden hibridar y lavar hasta 4 veces. A partir de la cuarta hibridación las señales no presentan calidad suficiente para ser analizadas. Como consecuencia, nos vimos obligados a fraccionar por electroforesis dos veces cada preparación de ARN y obtener, por tanto, dos ejemplares de cada membrana. Uno de ellos se hibridó sucesivamente con las sondas *hmgR*, *carRA* y *actA* mientras que la otra se hibridó sucesivamente con las

sondas *hmgS*, *carB* y *actA*. Este orden fue decidido tras unos ensayos previos y corresponde al orden creciente de afinidad de las sondas.

1.1.1. Multiplicidad de transcritos

Las cinco sondas de *Phycomyces* empleadas hibridan con moléculas de ARN de distinta movilidad electroforética detectando cada una varias bandas (Figura 9). Esta multiplicidad de bandas se observó en fraccionamientos del ARN de las tres estirpes silvestres y de todos los mutantes analizados.

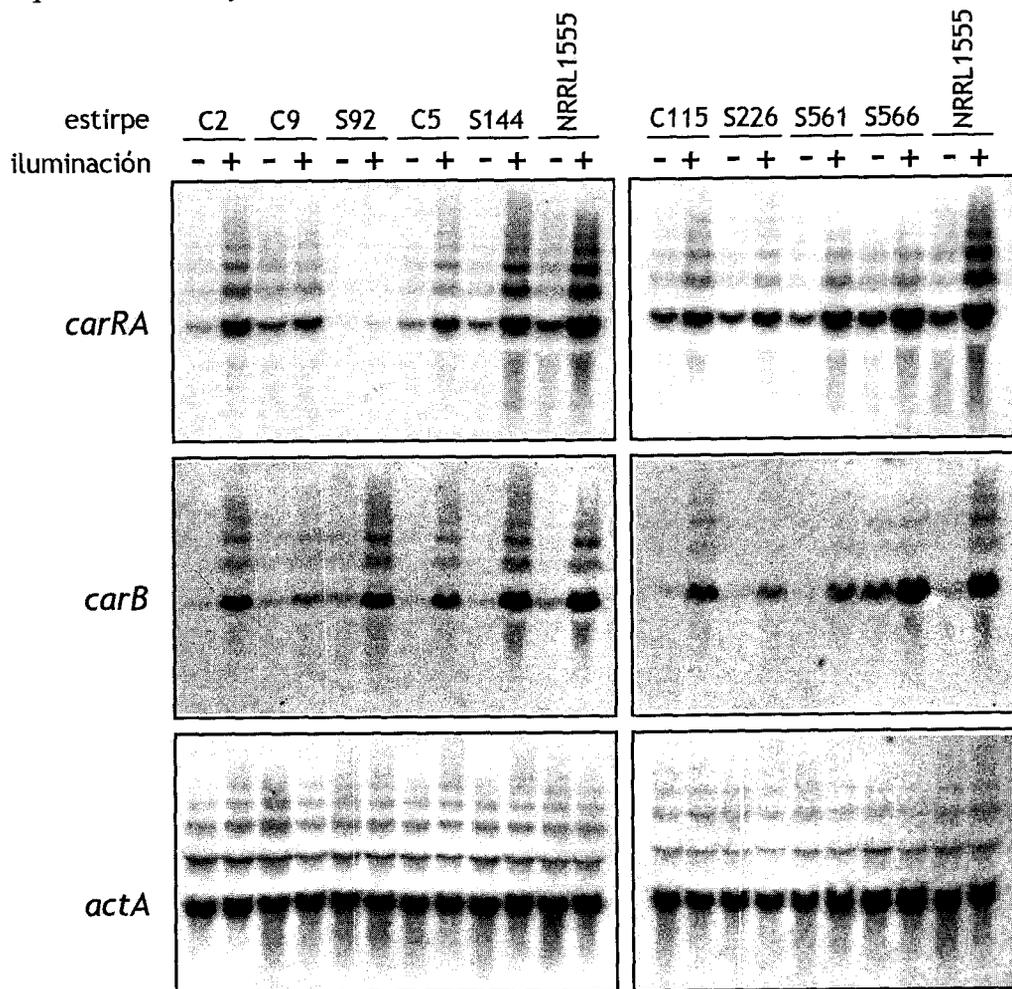


Figura 9: Fraccionamiento electroforético del ARN total e hibridación con sondas radioactivas de los genes *carRA*, *carB* y *actA*. Se representan todos los resultados de un experimento con dos fraccionamientos separados, en lo que se compararon extractos de la estirpe silvestre y de los nueve mutantes que se indican. El signo - señala cultivos inoculados en la oscuridad y el signo +, cultivos expuestos durante 30 min a 16 kJm^{-2} de luz blanca inmediatamente antes de la extracción.

A primera vista queda evidente que tanto la distribución de las bandas de una muestra como la relación entre sus intensidades no son aleatorias. Las distancias entre bandas presentan un patrón similar en los cinco genes investigados. Las bandas son más intensas cuanto más alejadas del origen. Estas pautas no son compatibles con el reconocimiento por cada sonda de varios ARNm producidos por genes diferentes.

Llamaremos "banda principal" a la más intensa, que es también la más alejada del origen, y "bandas secundarias" a las demás. Las distancias al origen se explican fácilmente si la masa de la banda n (empezando a contar por la principal) es n veces la masa de la banda principal, es decir si las bandas secundarias contienen múltiplos de las moléculas de la banda principal.

Existe una relación lineal inversa entre el logaritmo de la masa molecular y la migración en el gel (Spohr *et al.*, 1976). Es decir, $\log M = a - b D$, donde M es la masa de la molécula, D la distancia al origen y a y b dos parámetros que dependen del ARN y de las condiciones de la migración. Para el caso de múltiplos, $M = n M_1$, donde M_1 es la masa de las moléculas sencillas. De estas dos expresiones se deduce

$$D = \frac{a - \log M_1 - \log n}{b}$$

y se predice una relación lineal entre la distancia migrada y el logaritmo del número n de repeticiones. Esta relación queda confirmada en la Figura 10 para los genes estudiados y también para resultados publicados de múltiplos de ARN del virus de la inmunodeficiencia humana (HIV).

Aunque se detecta siempre como más intensa la banda más rápida, la de moléculas más pequeñas, las bandas secundarias no son despreciables cuantitativamente. A veces aportan conjuntamente una densitometría mayor que la banda principal. En la mayoría de los casos aportan entre todas menos que la banda principal; el valor mediano es 60 % de la banda principal para el gen *carRA* y 70 % para el gen *carB*. El análisis comparativo de la densitometría de las bandas principal y secundarias de un mismo carril resulta en una correlación negativa entre la intensidad de la banda principal y de la suma de las secundarias (Figura 10B). La menor cantidad de secundarias en muestras con mayor concentración de

moléculas indica que aquellas no proceden de reacciones entre moléculas sencillas. Las condiciones del fraccionamiento que son desnaturalizantes, implican que las bandas secundarias no contienen estructuras secundarias o terciarias mantenidas por enlaces no covalentes, sino moléculas unidas enteramente por enlaces covalentes.

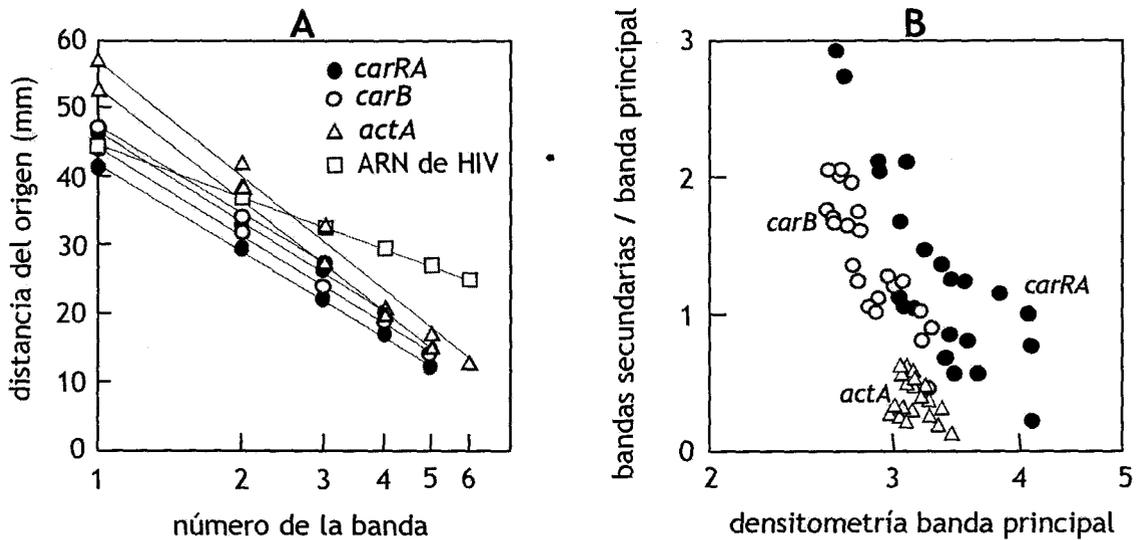


Figura 10: A. Relación entre la distancia de cada banda al origen y el número de orden de la bandas, tomando la banda principal como número 1. Se consideran todos los carriles de la Figura 9 y además los de la Figura 1 del trabajo de *Mariaux et al.* (1996) sobre multímeros del ARN del virus de la inmunodeficiencia humana (HIV). B. Relación entre las densitometrías de las bandas principal y secundarias de la Figura 9.

La formación de multímeros de ARN de virus está bien documentada (*Darlux et al.*, 1990; *Muriaux et al.*, 1996; *Greatorex y Lever*, 1998; *Ren et al.*, 2003). No conocemos precedentes para nuestras observaciones sobre ARNm; su estudio no es objetivo de esta Tesis.

En todos los casos las conclusiones de nuestro trabajo no varían si se considera solo la banda principal o la suma de todas las bandas. Las siguientes figuras de este trabajo solo muestran la banda principal, que es la única tenida en cuenta en los análisis cuantitativos.

1.2. Edad de los cultivos y densidad de siembra

La edad fisiológica de un micelio depende de las condiciones de cultivo. La adición de extracto de levadura al medio mínimo favorece el crecimiento de las hifas y acelera la maduración del micelio. Estos hechos repercuten en la expresión de genes de la carotenogénesis (Figura 11). La expresión de los genes *hmgS* y *hmgR* también varía con la edad del cultivo. En todo caso, no podemos consolidar resultados obtenidos con micelios de distintas edades y tenemos que atender a la variación temporal del contenido de ARNm y de carotenos.

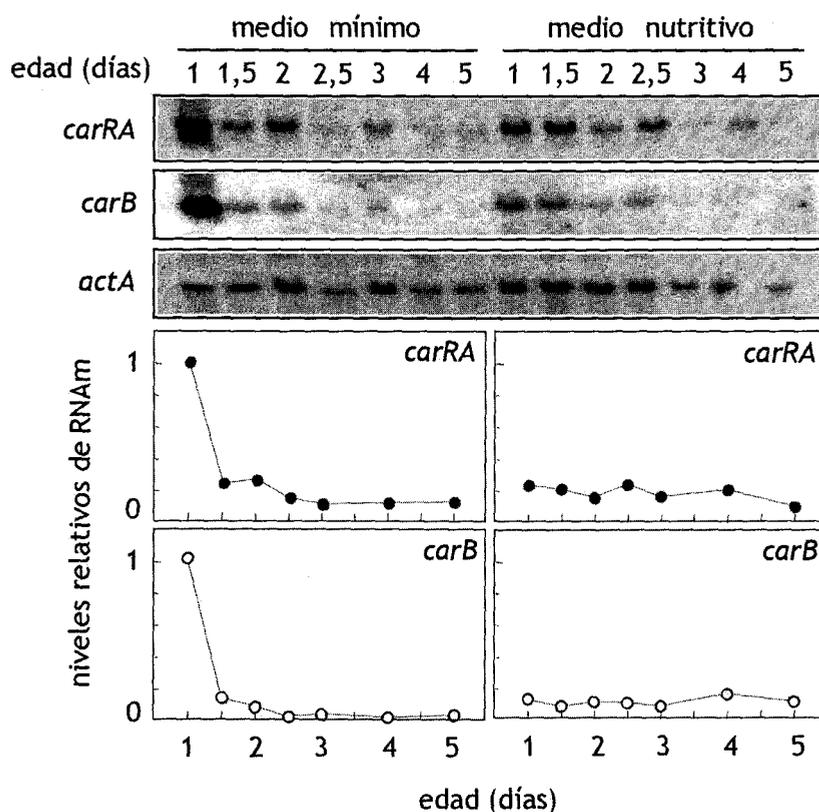


Figura 11: Efecto del medio y de la edad del cultivo sobre la expresión de los genes *carRA*, *carB* y *actA*. Inóculos de 10^7 esporas por caja. Arriba, fraccionamiento electroforético y reconocimiento con sondas radioactivas específicas. Abajo, cuantificación de la radioactividad hibridada. Las densitometrías de bandas se dividieron por la de *actA* en el mismo carril y estos valores por los obtenidos en cultivos de 1 día en medio mínimo, que se toman como unidad.

La separación del micelio y del medio por una capa de celofán no interfiere en el crecimiento, una situación que facilita la recolección del micelio y su separación del agar. Tampoco lo hace la adición de acetato de retinol (0,75 mM) al medio, pero el ftalato de dimetilo (2 mM) retrasa el crecimiento, aunque no lo suficiente para justificar un ajuste en los tiempos de cultivo en los experimentos para investigar su efecto.

La densidad de inoculación influye mucho en la formación de los esporangióforos de un cultivo (forogénesis). Las densidades de hasta 10^4 esporas por caja no afectan a la forogénesis mientras que las densidades más altas inhiben la macroforogénesis y estimulan la microforogénesis (Corrochano y Cerdá-Olmedo, 1988). También la expresión de los genes de la carotenogénesis y la interacción sexual se ven afectados por la densidad de siembra (Figura 12). Cuando la densidad es alta, el hongo se limita al crecimiento vegetativo y la esporulación inmediata y no permite observar el efecto de la interacción sexual sobre la carotenogénesis.

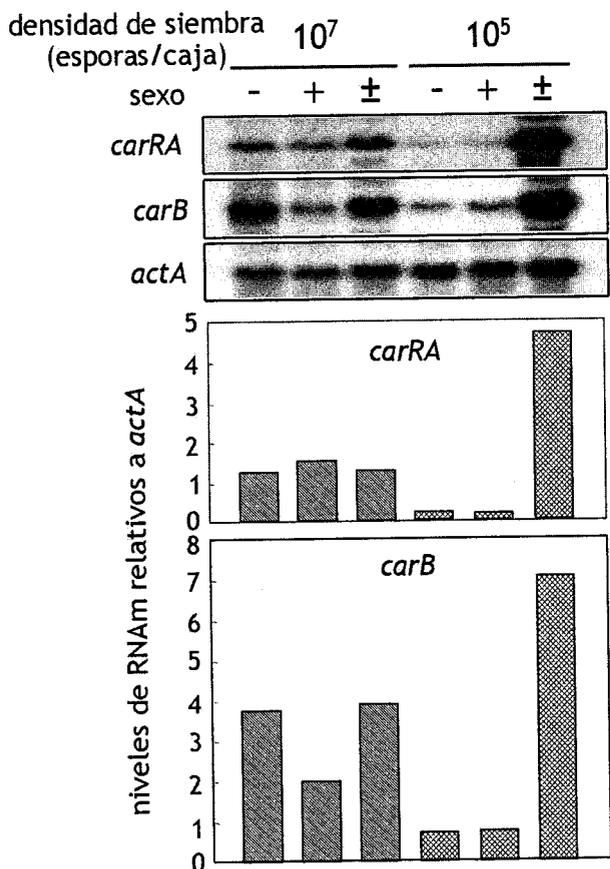


Figura 12: Efecto de la densidad de siembra sobre la expresión de los genes *carRA*, *carB* y *actA* en cultivos de las estirpes silvestre de *Phycomyces* NRRL1555 (-) y NRRL1554 (+) y en el cultivo mixto de estas estirpes (±). Inóculos de 10^5 esporas por caja; los cultivos se incubaron por 1,5 días a 22 °C en oscuridad. Arriba, fraccionamiento electroforético y reconocimiento con sondas radioactivas específicas. Abajo, cuantificación de la radioactividad hibridada. Las densitometrías de bandas se dividieron por la de *actA* en el mismo carril.

1.3. Iluminación

A fin de determinar las condiciones de iluminación para el estudio de la fotocarotenogénesis se analizaron los efectos de varios programas de iluminación (Figura 13). Los micelios son sensibles a la luz durante los tres días investigados (paneles centrales), pero los niveles de ARNm están sometidos a adaptación, al igual que ocurre con las concentraciones de carotenos y muchas otras respuestas del hongo. De esta manera los cultivos de tres días iluminados todo el tiempo tuvieron los mismos niveles de ARNm que los mantenidos en la oscuridad (paneles de la izquierda). La mayores respuestas se observaron con una iluminación breve (30 min), pero intensa, inmediatamente antes de la extracción (paneles de la derecha) y estas fueron las condiciones adoptadas para el resto de la Tesis.

A excepción de los experimentos diseñados para estudiar los efectos de la luz, todos los cultivos fueron incubados en oscuridad.

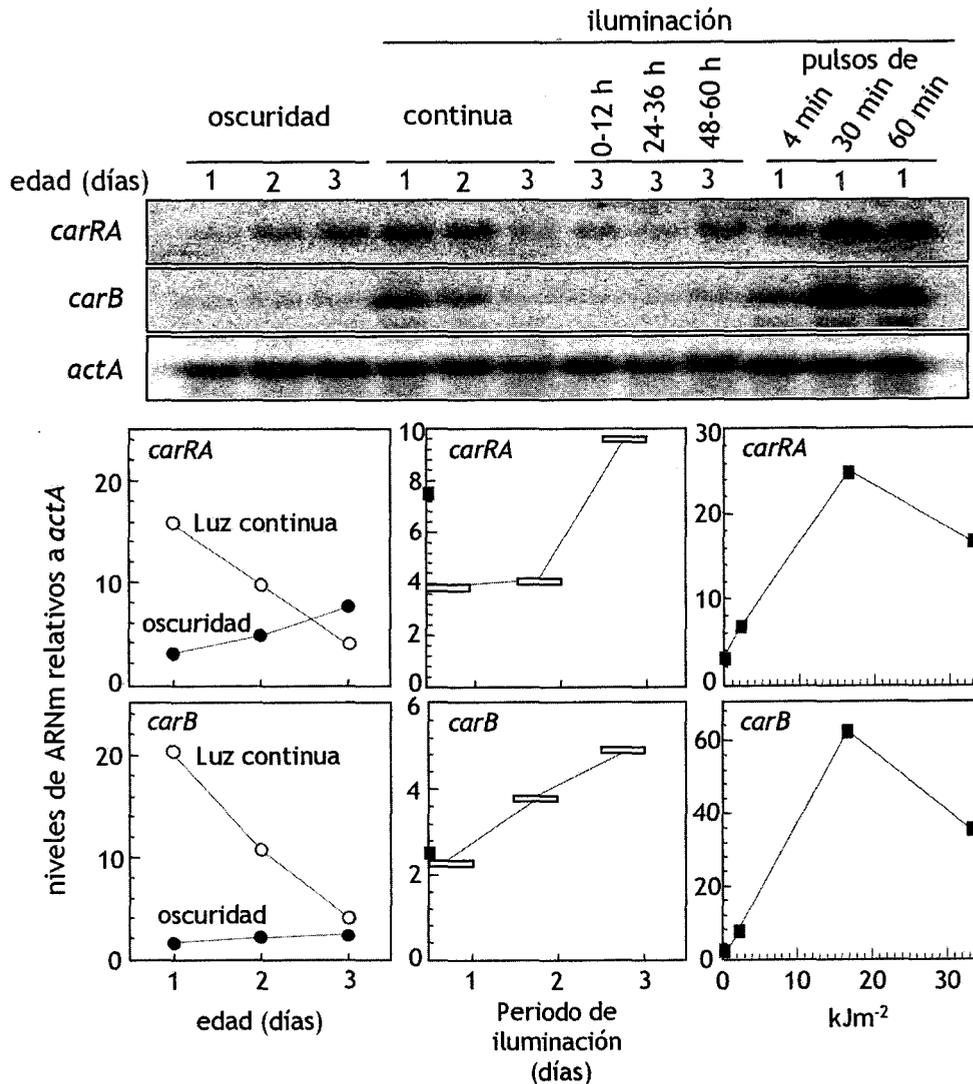


Figura 13: Efecto de la iluminación sobre la expresión de los genes *carRA*, *carB* y *actA*. Inóculos de 10^6 esporas por caja. Arriba, fraccionamiento electroforético y reconocimiento con sondas radioactivas específicas. A la izquierda, cultivos de la edad indicada en abscisas iluminados continuamente (1 Wm^{-2} de luz blanca) o mantenidos en la oscuridad. En el centro, cultivos de tres días de edad iluminados (1 Wm^{-2} de luz blanca) durante 12 h indicadas por las barras horizontales. A la derecha, cultivos de un día en la oscuridad, iluminados ($9,24 \text{ Wm}^{-2}$ de luz blanca) durante 0, 4, 30 y 60 min inmediatamente antes de la extracción. Las densitometrías de bandas se dividieron por la de *actA* en el mismo carril.

1.4. Condiciones adoptadas para los demás experimentos

Estos ensayos iniciales demostraron que son muchas las variables que influyen en los resultados y que deben ser fijadas en los protocolos experimentales. Dado que las condiciones específicas del marcado radioactivo de las sondas varían para cada hibridación, los resultados numéricos provenientes de la cuantificación de distintas membranas no son homogéneos. Para superar esta limitación se cargó en cada membrana el mismo control, representado siempre que fue posible, por el ARN de la estirpe silvestre de *Phycomyces* NRRL1555 de 2, 3, 4 y 5 días de edad. A fin de volver los resultados de diferentes membranas comparables entre sí, se normalizaron los valores densitométricos por la media de la densitometría del control.

Incluso con estas precauciones, los resultados tienen una variabilidad que debe ser definida con suficientes repeticiones y sometida a análisis estadísticos.

Como consecuencia de estos resultados previos y para validar la comparación entre la expresión de los genes estudiados, decidimos adoptar para los demás experimentos de esta tesis el agar mínimo, cubierto con un disco de celofán e inoculado con 10^5 esporas por caja. La densidad media resultante es de 20 esporas por mm^2 . En los casos indicados se suplementó el medio mínimo con 0,75 mM de acetato de retinol o con 2 mM de ftalato de dimetilo. Considerando la gran influencia de la edad del cultivo y la escasez de biomasa cuando los micelios son muy jóvenes, se optó por estimar los niveles de ARNm y de carotenos a los 2, 3, 4 y 5 días de edad.

CAPÍTULO 2

Cinética de la carotenogénesis

Llamaremos cinética de la carotenogénesis al análisis de las variaciones de los niveles de ARNm de los genes estudiados, del contenido de carotenos y de la masa micelial seca en función de la edad del cultivo.

Las variaciones temporales encontradas para los niveles de ARNm eran modestas y su análisis solamente ha sido posible gracias a la acumulación de muchos experimentos. La decisión de cargar en cada membrana el ARNm de la estirpe silvestre de varias edades como control para comparar experimentos distintos (ver página.MM....) nos proporcionó muchas repeticiones independientes. La necesidad de ensayar estirpes silvestres del sexo opuesto durante el estudio de la estimulación sexual de la carotenogénesis extendió estas informaciones.

2.1. Cinética del crecimiento micelial

Los cultivos silvestres de *Phycomyces* de dos días de edad tenían 4/5 de la masa seca máxima que se alcanzó a los tres días y se mantuvo en los días siguientes (Figura 14). Los resultados obtenidos con las estirpes NRRL1555, NRRL1554 y A56 (respectivamente siete, dos y dos experimentos independientes) no eran significativamente diferentes y se representan conjuntamente en la Figura 14.

2.2. Cinética de la acumulación de carotenos

La cromatografía líquida de alta presión (HPLC) encontró en todas las muestras concentraciones considerables de β -caroteno y fitoeno; en 14 de las 48 muestras analizadas se detectaron también pequeñas cantidades de ζ -caroteno (Figura 14).

Durante el intervalo considerado (entre dos y cinco días) y bajo las condiciones de cultivo empleadas, la concentración de β -caroteno prácticamente se duplicó. El incremento se dio entre el segundo y el cuarto día, período en que la concentración pasó de 104 a 186 μg por g de masa seca ($\mu\text{g}/\text{g m.s.}$). A partir de

entonces la concentración de β -caroteno se estabilizó, como ya se sabía que ocurre en *Phycomyces* (Mehta *et al.*, 1997).

Se encontró para el fitoeno una cinética de acumulación algo parecida a la del β -caroteno, pero con un día de antelación. Del segundo al tercer día de cultivo la concentración de fitoeno se duplicó al pasar de 26 a 50 $\mu\text{g/g}$ m.s., y luego se mantuvo aproximadamente constante.

Dentro de su escasez, el ζ -caroteno sigue aproximadamente la cinética del fitoeno con concentraciones máximas de 4 $\mu\text{g/g}$ masa seca.

2.3. Cinética de la transcripción de los genes de la carotenogénesis

Todos los genes analizados se expresan durante todo el intervalo de tiempo analizado, con variaciones modestas (Figuras 14 y 15).

Los resultados primarios sobre ARNm son siempre mediciones relativas a la cantidad de ARN total (esencialmente ARN ribosómico), que se usa para igualar las muestras sometidas a fraccionamiento. Los resultados primarios para el ARNm de la actina se mantienen aproximadamente constantes durante todo el tiempo. Al referir a ellos en adelante todos los resultados mostrados se consigue compensar más finalmente las variaciones experimentales y disminuir la dispersión de los resultados.

El ARNm del gen *hmgS* es relativamente abundante en cultivos muy jóvenes y luego se mantiene prácticamente constante a lo largo del ciclo de vida de *Phycomyces*. El nivel de ARNm del gen *hmgR* sube gradualmente durante el cultivo; es el único gen estudiado cuyo ARNm es más abundante en cultivos viejos que en jóvenes.

Los niveles de ARNm de los genes *carRA* y *carB* se portan de manera parecida entre ellos y decrecen a lo largo del periodo de tiempo analizado, especialmente el de *carB*.

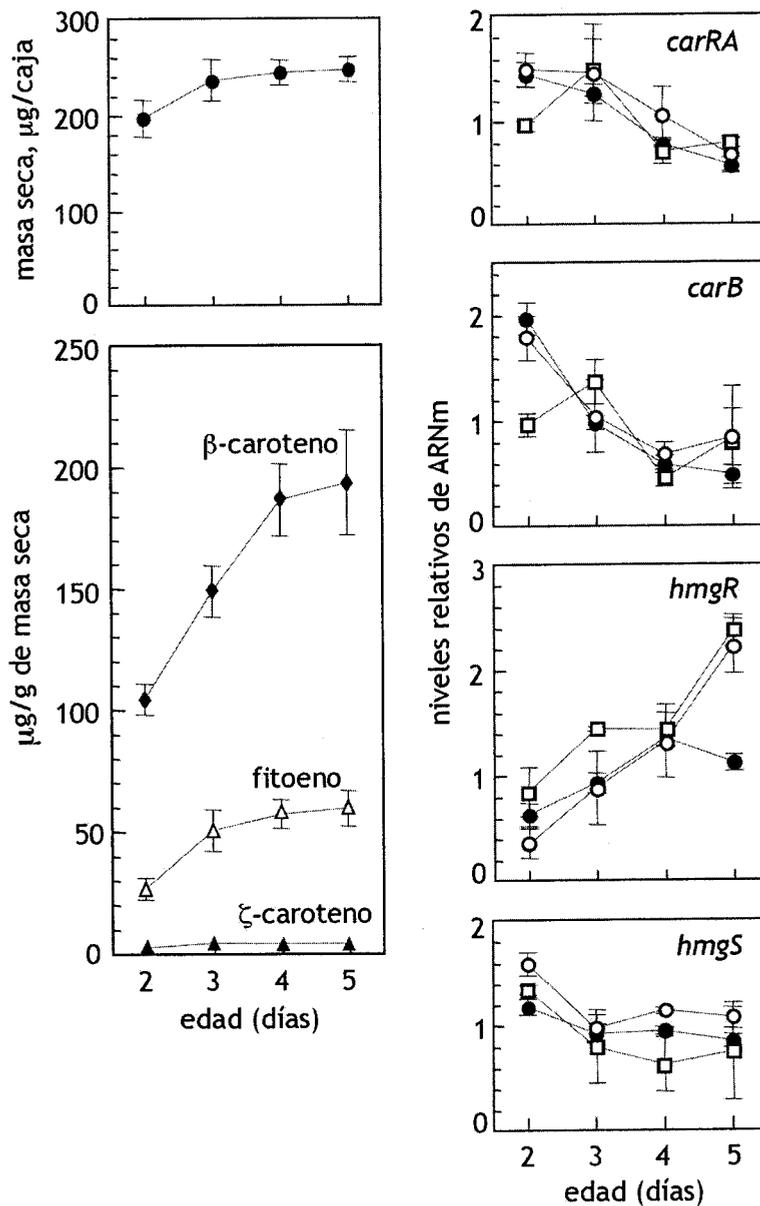


Figura 14: A la izquierda, crecimiento y contenido de carotenos. A la derecha, expresión de los genes indicados. Los datos se representan en función de la edad del cultivo de las estirpes silvestres de *Phycomyces* NRRL1555 (●), NRRL1554 (○) y A56 (□). Para las masas secas y el contenido de carotenos se representa la media de estas tres estirpes. Los experimentos independientes analizados para calcular las medias y sus desviaciones típicas fueron de 10 a 11 en el caso de la masa seca, 10 a 15 en el caso de los carotenos y para la expresión génica fueron de 12 a 14 para NRRL1555, de 3 a 4 para NRRL1554 y 3 para A56.

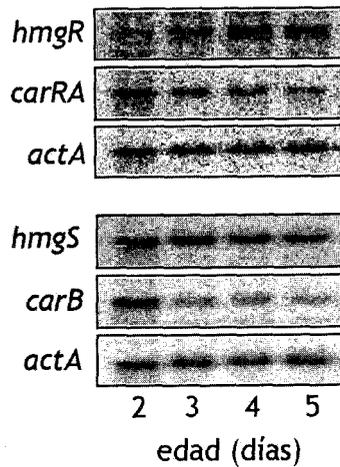


Figura 15: Aspecto habitual de los fraccionamientos electroforéticos del ARN total de la estirpe silvestre de *Phycomyces* (NRRL1555) hibridados con el ADN marcado que se indica.

La radioactividad incorporada al β -caroteno durante los primeros días de cultivo se mantiene inalterada durante los dos días siguientes en medio no radioactivo (Murillo *et al.*, 1981; Bejarano *et al.*, 1992). Por tanto el β -caroteno acumulado por *Phycomyces* no se degrada ni se metaboliza. Bajo nuestras condiciones experimentales la masa micelial es constante a partir de los tres días de cultivo y a partir del día cuatro no hay más síntesis de carotenos. Entretanto los niveles de ARNm de los genes estudiados se mantienen altos. Por tanto tenemos que distinguir entre la transcripción de los genes *carRA* y *carB* y el uso de sus ARNm para producir carotenos y postular la existencia de un mecanismo de regulación que impide el uso de los ARNm presentes en micelios maduros.

CAPÍTULO 3

Estimulación química de la carotenogénesis

Se estudió el efecto de dos compuestos químicos que estimulan la carotenogénesis a través de mecanismos independientes (Bejarano *et al.*, 1988) y representan los dos principales grupos de activadores químicos. Uno es el retinol (Eslava *et al.*, 1974) parecido a casi la mitad de una molécula de β -caroteno. El otro es el ftalato de dimetilo, uno de los compuestos aromáticos más activos entre los varios descritos (Cerdá-Olmedo y Hüttermann, 1986). Ambos compuestos son poco solubles en agua, por lo que se usaron etanol y el detergente "Tween 80" para facilitar su acceso a las células.

3.1. Efecto del retinol y del ftalato de dimetilo sobre el crecimiento micelial

El retinol, a 0,75 mM, apenas afectó al crecimiento vegetativo de *Phycomyces*, salvo por un ligero retraso que se refleja en la masa de los micelios de dos días, algo inferior a la de los testigos. El ftalato de dimetilo retrasó algo más al crecimiento vegetativo (Figura 16). Parte de este retraso se deberá al efecto del etanol (4 ml/l) usado para solubilizarlo. Para solubilizar el retinol se usó menos etanol (1,6 ml/l).

3.2. Efecto del retinol y del ftalato de dimetilo sobre la concentración de carotenos

Se analizó, mediante HPLC, el contenido de carotenos de micelios cultivados en presencia de los activadores químicos. Tanto el retinol cuanto el ftalato de dimetilo produjeron un aumento en las concentraciones de carotenos; en ambos casos el principal caroteno acumulado fue el β -caroteno. En presencia de ftalato de dimetilo se detectaron concentraciones notables de algunos intermediarios particularmente el ζ -caroteno y el fitoeno (Figura 16).

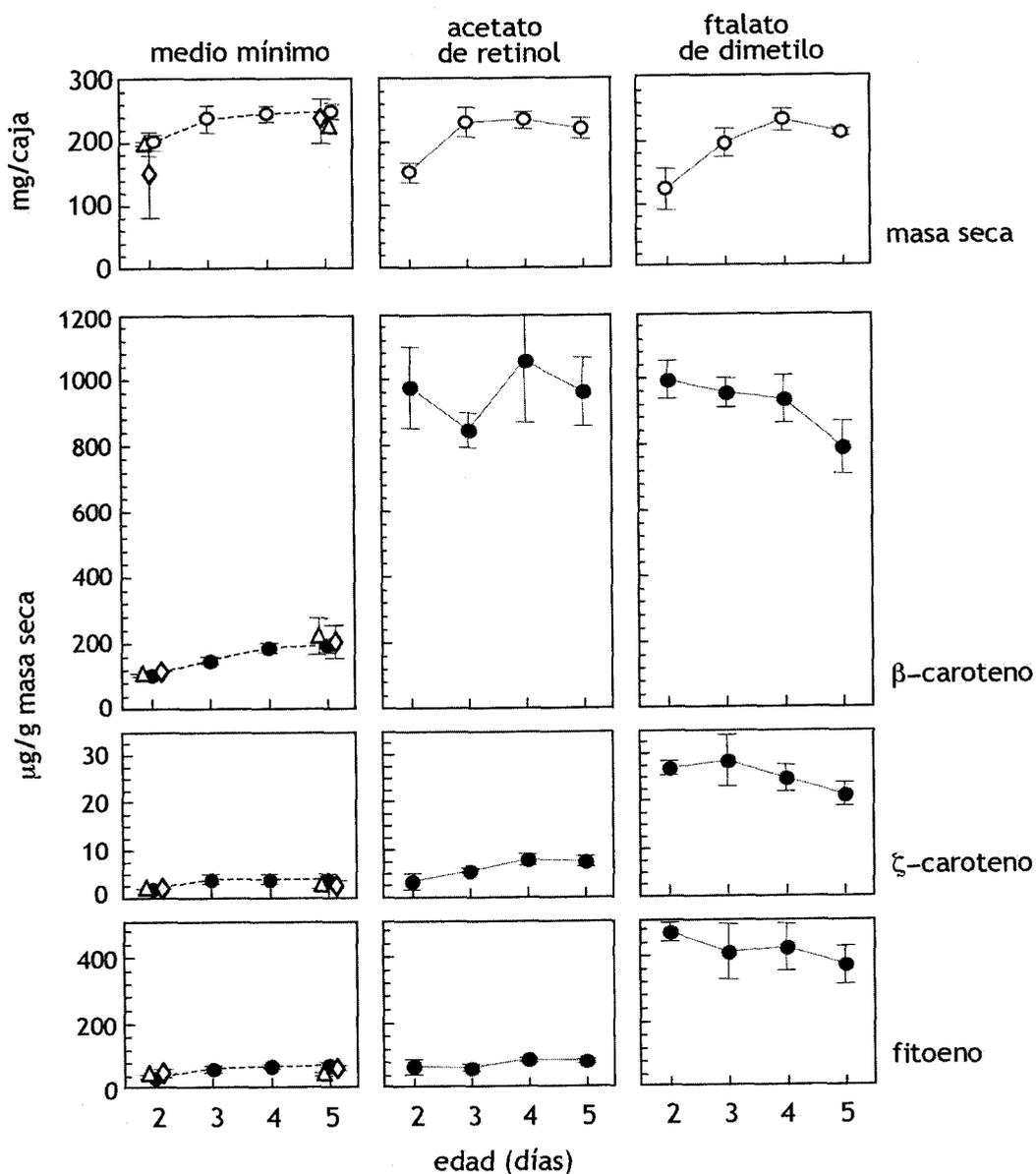


Figura 16: Efecto del retinol (0,75 mM) y del ftalato de dimetilo (2 mM) sobre el crecimiento micelial y el contenido de carotenos. Se representan las medias y las desviaciones típicas de tres experimentos independientes. Los triángulos son testigos con Tween 80 (5 ml/l) y los rombos, los testigos con etanol (4 ml/l), empleados en los tratamientos. Los resultados en medio mínimo que se dan para comparación proceden de la Figura 14.

3.3. Efecto del retinol y del ftalato de dimetilo sobre la transcripción de los genes

Se analizó en duplicados de los micelios usados para los análisis químicos la expresión de los genes involucrados en la biosíntesis de carotenos (Figura 17). Tanto con retinol como con ftalato de dimetilo, los niveles de ARNm de los genes *carRA*, *carB*, *hmgR* y *hmgS* eran similares a los encontrados en los testigos. No se observó por tanto ningún efecto sobre la transcripción.

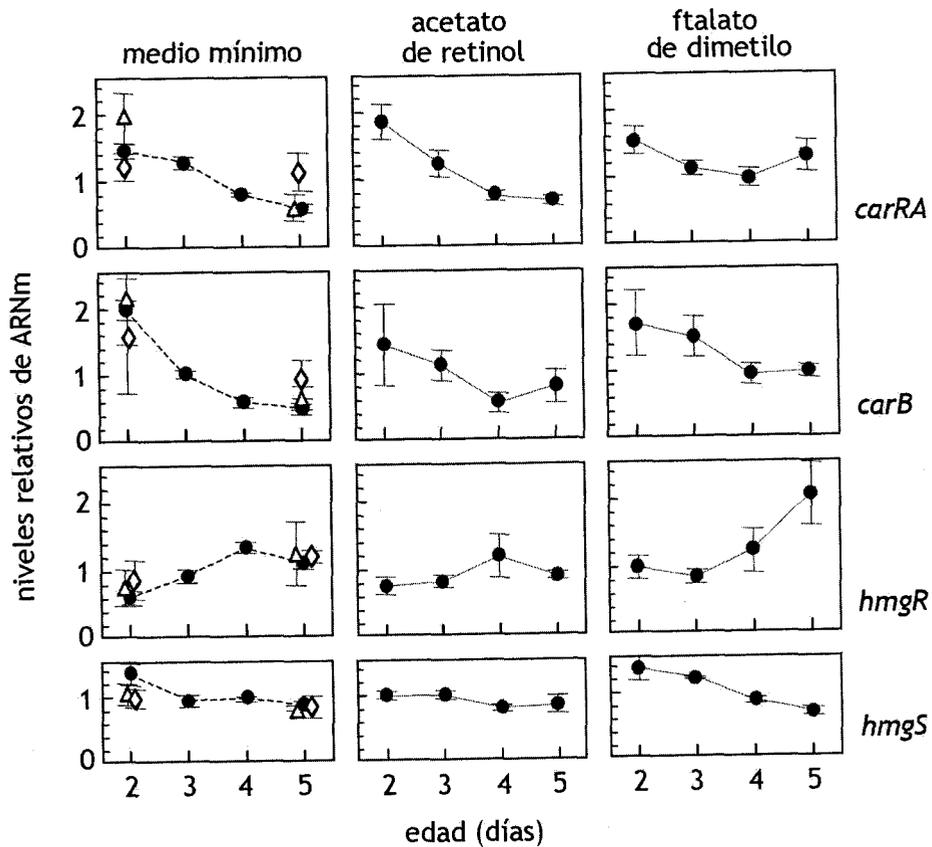


Figura 17: Efecto del retinol (0,75 mM) y del ftalato de dimetilo (2 mM) sobre la expresión de los genes indicados. Se representan las medias y las desviaciones típicas de tres experimentos independientes. Los triángulos son testigos con Tween 80 (5 ml/l) y los rombos, los testigos con etanol (4 ml/l), empleados en los tratamientos. Los resultados en medio mínimo que se dan para comparación proceden de la Figura 14.

CAPÍTULO 4

Estimulación sexual de la carotenogénesis

Para analizar la estimulación sexual de la carotenogénesis nos servimos de cultivos mixtos resultantes de la siembra de una mezcla equitativa de esporas de ambos sexos. A los cultivos resultantes de la siembra de esporas de una sola estirpe llamaremos cultivos simples.

Se optó por extender este estudio a *Blakeslea* debido a la gran respuesta que presenta frente al estímulo sexual y por la importancia industrial de los cultivos mixtos de este organismo.

Se analizó el contenido de carotenos y la expresión de genes involucrados en su biosíntesis. Como sexo (-) de *Phycomyces* se utilizó la estirpe NRRL1555 y como sexo (+) las estirpes NRRL1554 y A56. Las dos primeras proceden de aislamientos naturales independientes. La estirpe A56 debe ser isogénica a la NRRL1555, pues procede de una serie de retrocruzamientos con esta. Las estirpes de *Blakeslea* F921, de sexo (-), y F986, de sexo (+), proceden de aislamientos naturales independientes.

4.1. Efecto de la estimulación sexual sobre el crecimiento micelial

Los cultivos mixtos de *Phycomyces* y *Blakeslea* crecieron poco menos que los cultivos simples (Figuras 18 y 19). *Blakeslea*, cultivada a 30° C, creció más deprisa que *Phycomyces*, cultivado a 22° C. El micelio de *Blakeslea* alcanzó su masa máxima en menos de dos días y durante el intervalo de tiempo analizado su masa seca se mantuvo aproximadamente constante.

4.2. Efecto de la estimulación sexual sobre la concentración de carotenos

Se comprobó, a través de análisis en HPLC, que el contenido de carotenos en cultivos mixtos era mayor que en cultivos simples. La estimulación fue mucho mayor en *Blakeslea* que en *Phycomyces*.

Los cultivos mixtos de *Phycomyces* contenían tres veces más carotenos que los cultivos simples. Se encontraron contenidos de carotenos bastante similares tanto entre los cultivos simples de las tres estirpes silvestres ensayadas como entre

los cultivos mixtos resultantes de las dos combinaciones de esporas de sexos opuestos. Nuestros cultivos mixtos de *Blakeslea* contenían unas 24 veces más carotenos que cultivos simples.

La estimulación sexual de la carotenogénesis varió con la edad del cultivo. Los dos hongos analizados resultaron considerablemente diferentes en cuanto a dichas variaciones. En *Phycomyces* la estimulación sexual apenas se notó en micelios jóvenes, alcanzó su máximo al final del periodo de crecimiento, al los tres días, y se mantuvo constante durante el resto del tiempo del experimento (Figura 18).

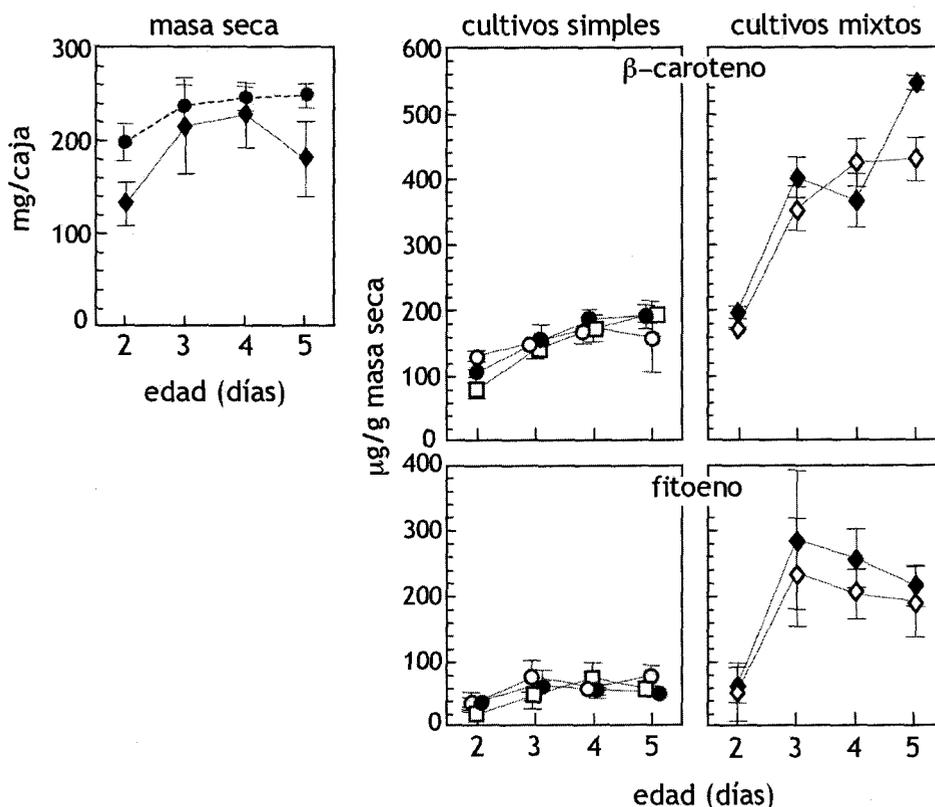


Figura 18: Efecto de la estimulación sexual en el contenido de carotenos de *Phycomyces*. A la izquierda, crecimiento de cultivos simples (●) y mixtos (◆). Al centro, concentraciones de carotenos en cultivos simples de NRRL1555 (●), NRRL1554 (○) y A56 (□). A la derecha, concentraciones de carotenos en cultivos mixtos de NRRL1555 y NRRL1554 (◆) y de NRRL1555 y A56 (◇). Los experimentos independientes analizados para calcular las medias y sus desviaciones típicas fueron de 4 para la masa seca de cultivos mixtos, de 10 a 15 para el contenido de carotenos de NRRL1555 y 2 para las demás determinaciones. La masa seca de cultivos simples que se da para comparación procede de la Figura 14.

En *Blakeslea* el contenido de carotenos fue máximo en cultivos mixtos de micelios jóvenes y disminuyó con el paso del tiempo. En este organismo, los cultivos mixtos de dos días contenían unas 65 veces más carotenos que la media de los cultivos simples. El fitoeno representaba una parte significativa del caroteno total, pero su concentración disminuyó abruptamente durante el tercer día, posiblemente por conversión en β -caroteno. Se detectaron también carotenos minoritarios, principalmente γ -caroteno y licopeno, que sumados representaban menos de 10% del total de carotenos de los cultivos mixtos (Figura 19).

4.3. Efecto de la estimulación sexual sobre la transcripción de los genes

Los análisis de expresión génica demuestran que el incremento en el contenido de carotenos por estimulación sexual viene acompañado de incrementos en los niveles de ARNm y más notablemente en *Phycomyces* que en *Blakeslea*.

Los cultivos mixtos contenían más ARNm de los genes *carRA* y *carB* de *Phycomyces* que los cultivos simples y los micelios jóvenes más que los maduros (Figura 20). Los niveles de ARNm de los genes *hmgS* y *hmgR* variaron mucho menos. En los cultivos mixtos de *Blakeslea* el ARNm del gen *carRA* no aumentó tanto como el contenido de carotenos (Figura 21).

En conclusión, la estimulación sexual de la transcripción de los genes *car* de *Phycomyces* parece suficiente para explicar el aumento del contenido de carotenos, sin tener que recurrir a otras formas de regulación. En *Blakeslea* el aumento de la transcripción está tan lejos del aumento del contenido de carotenos que es preciso postular un mecanismo de regulación adicional posterior a la transcripción.

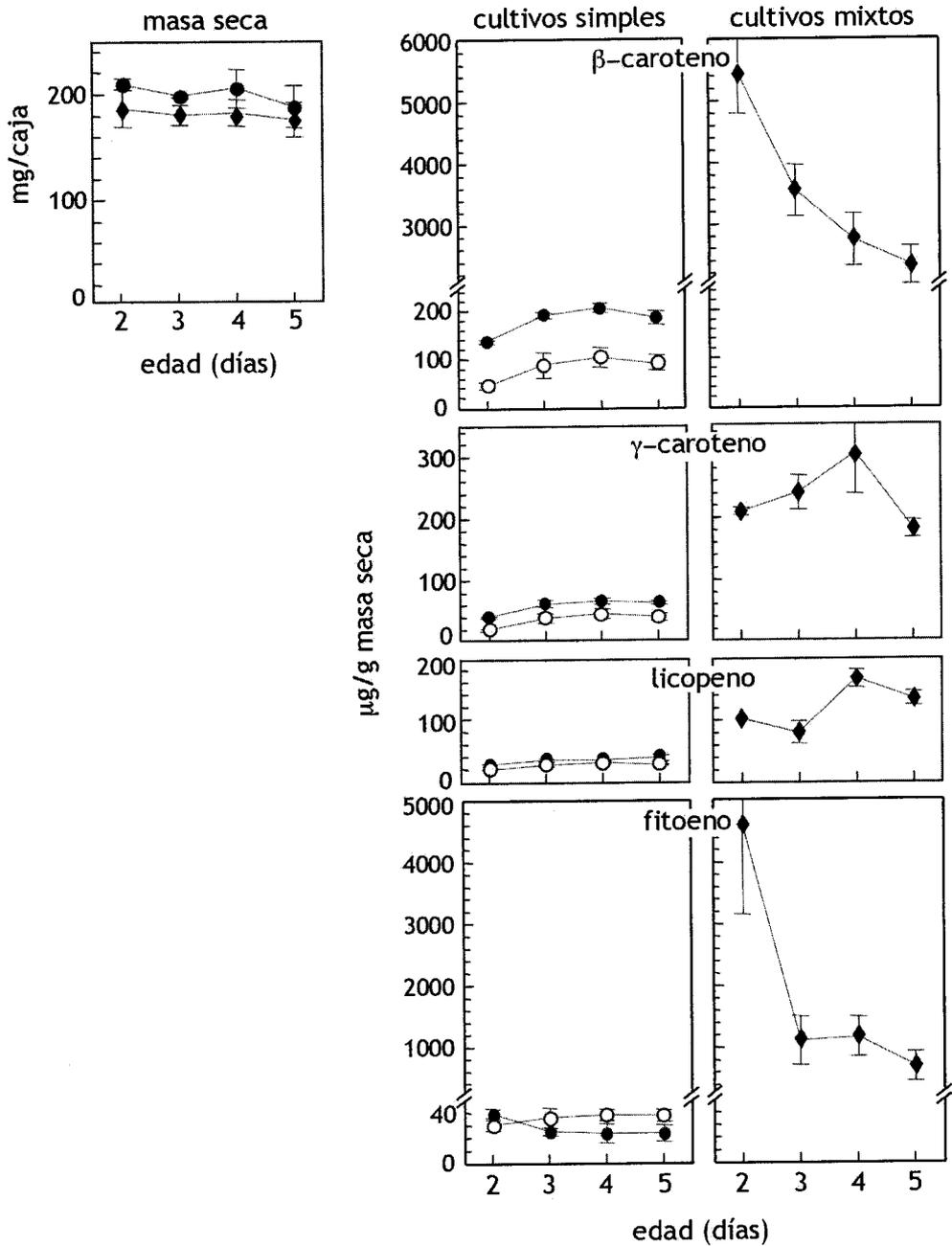


Figura 19: Efecto de la estimulación sexual en el contenido de carotenos de *Blakeslea*. A la izquierda, crecimiento de los cultivos simples (●) y mixtos (◆). Al centro, niveles de carotenos en cultivos simples de F921 (●) y F986 (○). A la derecha, niveles de carotenos en cultivos mixtos de estas estirpes. Se representan las medias y las desviaciones típicas de dos experimentos independientes, excepto para la masa de los cultivos simples, que se representan cuatro experimentos.

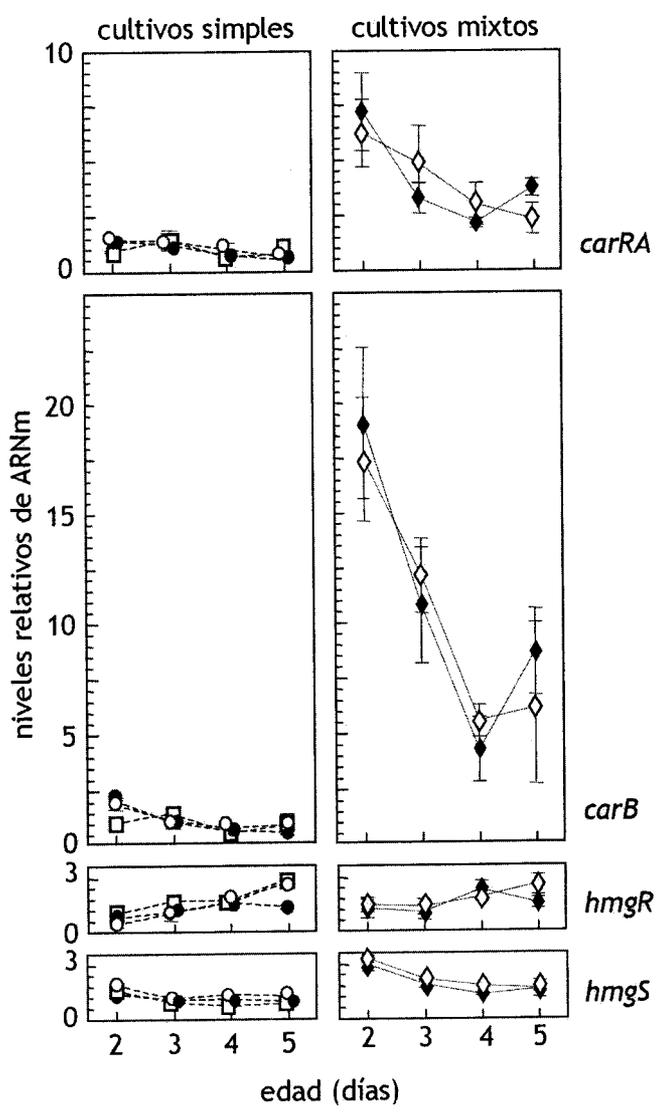
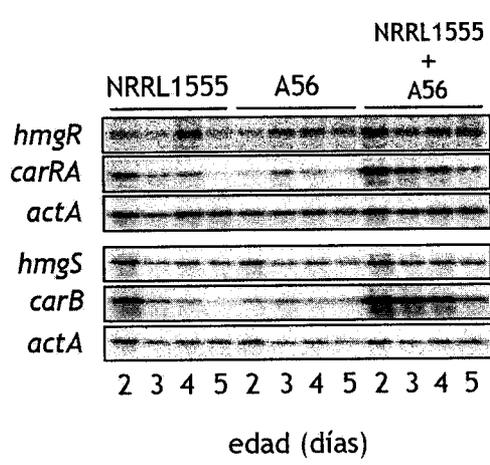
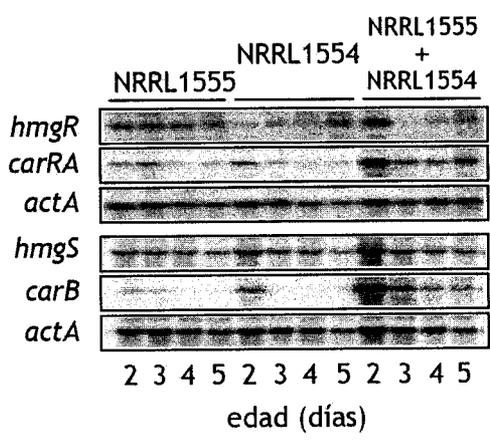


Figura 20: Efecto de la estimulación sexual sobre la expresión de los genes de *Phycomyces* que se indican. A la izquierda, aspecto habitual de los fraccionamientos electroforéticos del ARN total hibridados con ADN marcado. A la derecha, niveles relativos de ARNm en cultivos simples de las estirpes NRRL1555(●), NRRL1554 (o) y A56 (□) y en cultivos mixtos de NRRL1555 con NRRL1554 (◆) y de NRRL1555 con A56 (◇). Se representan las medias y las desviaciones típicas de cuatro experimentos independientes para los cultivos mixtos de NRRL1555 con NRRL1554 y tres para los cultivos mixtos de NRRL1555 con A56. Los datos de los cultivos simples que se dan para comparación proceden de la Figura 14.

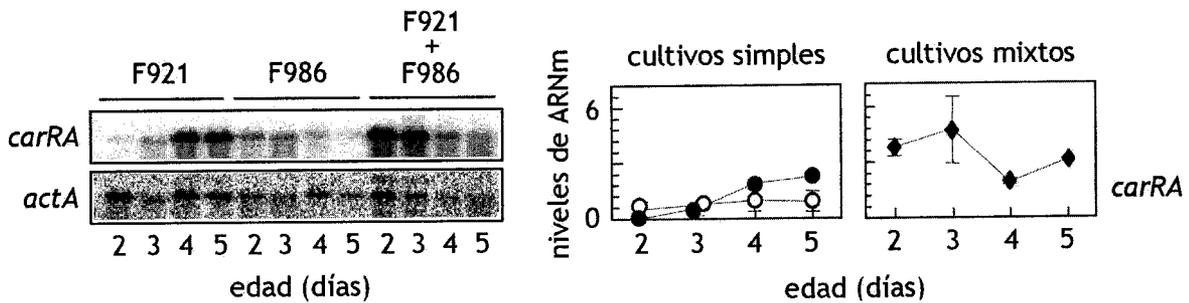


Figura 21: Efecto de la estimulación sexual sobre la expresión de los genes de *Blakeslea* que se indican. A la izquierda, aspecto habitual de los fraccionamientos electroforéticos del ARN total hibridados con ADN marcado. A la derecha, niveles relativos de ARNm del gen *carRA* en las estirpes silvestres de *Blakeslea* F921 (●) y F986 (○) y en el cultivos mixtos de estas estirpes. Se representan las medias y las desviaciones típicas de dos experimentos independientes.

4.4. Inhibición de la estimulación sexual de la carotenogénesis por acetato

La adición de pequeñas cantidades de acetato sódico (de 1 a 10 mM) al medio provoca grandes alteraciones en la interacción sexual de *Phycomyces* y de *Blakeslea*. Además de incrementar considerablemente la formación de zigosporas, el acetato inhibe fuertemente la estimulación sexual de la carotenogénesis. Se obtuvo un efecto similar al reemplazar el acetato sódico por acetato potásico, L-leucina y otros compuestos (resultados de V. Kuzina en este laboratorio no publicados).

4.4.1. Efecto del acetato sobre el crecimiento micelial

Los cultivos suplementados con acetato crecieron en la mayoría de los casos algo menos que los testigos, aunque disponían de unas fuentes de carbono algo más abundantes (Figura 22).

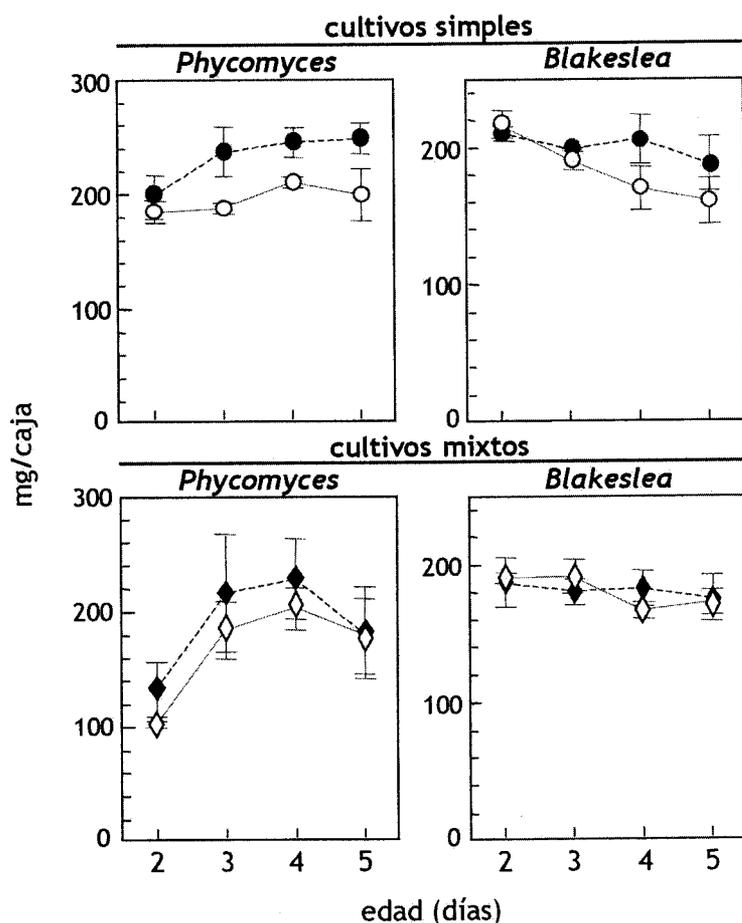


Figura 22: Crecimiento micelial en medio mínimo (símbolos negros) y en medio mínimo suplementado con 10 mM de acetato sódico (símbolos blancos). Medias y las desviaciones típicas de cinco determinaciones independientes. Los resultados en medio mínimo que se dan para comparación proceden de las Figuras 14, 18 y 19.

4.4.2. Efecto del acetato sobre la concentración de carotenos

Los contenidos de β -caroteno y fitoeno de los cultivos simples de *Phycomyces* eran ligeramente menores cuando los micelios se cultivaban en medios con acetato sódico. Las concentraciones de carotenos de cultivos simples de *Blakeslea* apenas eran afectadas por la presencia del acetato sódico (Figuras 23 y 24).

Al comparar el contenido de carotenos de cultivos mixtos incubados en ausencia y presencia de acetato sódico quedó patente el efecto inhibitorio de este compuesto sobre la estimulación sexual de la carotenogénesis. Los cultivos mixtos de *Phycomyces* suplementados con acetato contenían unas tres veces menos

β -caroteno que los cultivados en ausencia de acetato aproximadamente lo mismo que los cultivos simples (Figura 23).

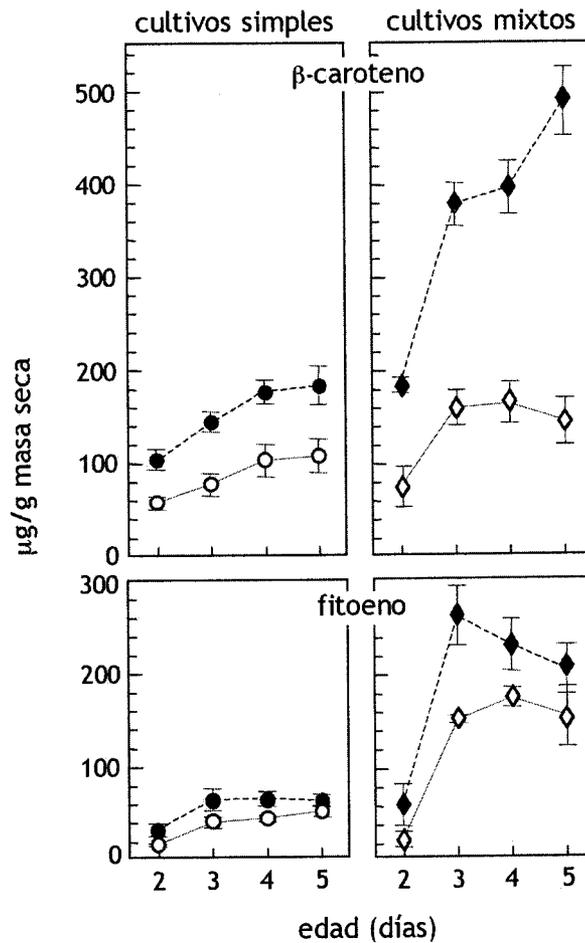


Figura 23: Efecto del acetato sobre la carotenogénesis de *Phycomyces*. Contenido de carotenos en cultivos con (símbolos blancos) o sin (símbolos negros) acetato sódico (10 mM). Se representan las medias y sus desviaciones típicas de cuatro experimentos independientes para cultivos mixtos y seis para cultivos simples. Los datos de los cultivos sin acetato que se dan para comparación resultan de la consolidación de los valores de la Figura 18.

En *Blakeslea* el efecto del acetato sódico era aún más evidente dada la magnitud de la respuesta sexual. Además de no afectar prácticamente a los cultivos simples abolía casi por completo la estimulación sexual de la carotenogénesis (Figura 24).

Se concluye que el acetato sódico es un antagonista potente de la estimulación sexual de la carotenogénesis en estos organismos.

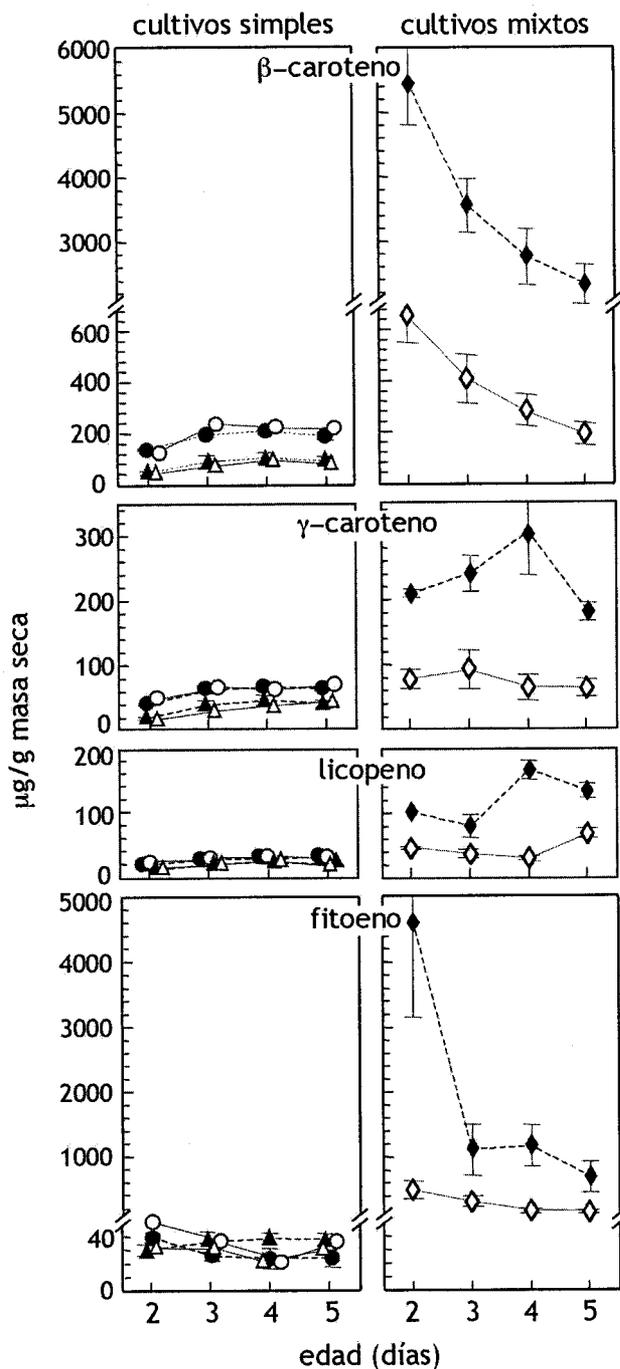


Figura 24: Efecto del acetato sobre la carotenogénesis de *Blakeslea*. Contenido de carotenos en cultivos simples de F921 (círculos) y F986 (triángulos) y mixtos en presencia (símbolos blancos) o ausencia (símbolos negros) de acetato sódico (10 mM). Se representan las medias y las desviaciones típicas de tres experimentos independientes. Los datos de los cultivos sin acetato que se dan para comparación proceden de la Figura 18.

3.4.3. Efecto del acetato sobre la transcripción de los genes

La presencia del acetato no alteró los niveles de los ARNm de los genes *car* y *hmg* de cultivos simples de *Phycomyces*, como se ve en el ejemplo de la Figura 25.

En los cultivos mixtos con acetato, los niveles de ARNm de los genes *car* siguieron muy altos (Figura 26). Las únicas diferencias significativas se encuentran en micelios de dos días, y pueden deberse al ligero retraso en el crecimiento. Por consiguiente, el acetato no impide en *Phycomyces* el aumento de la

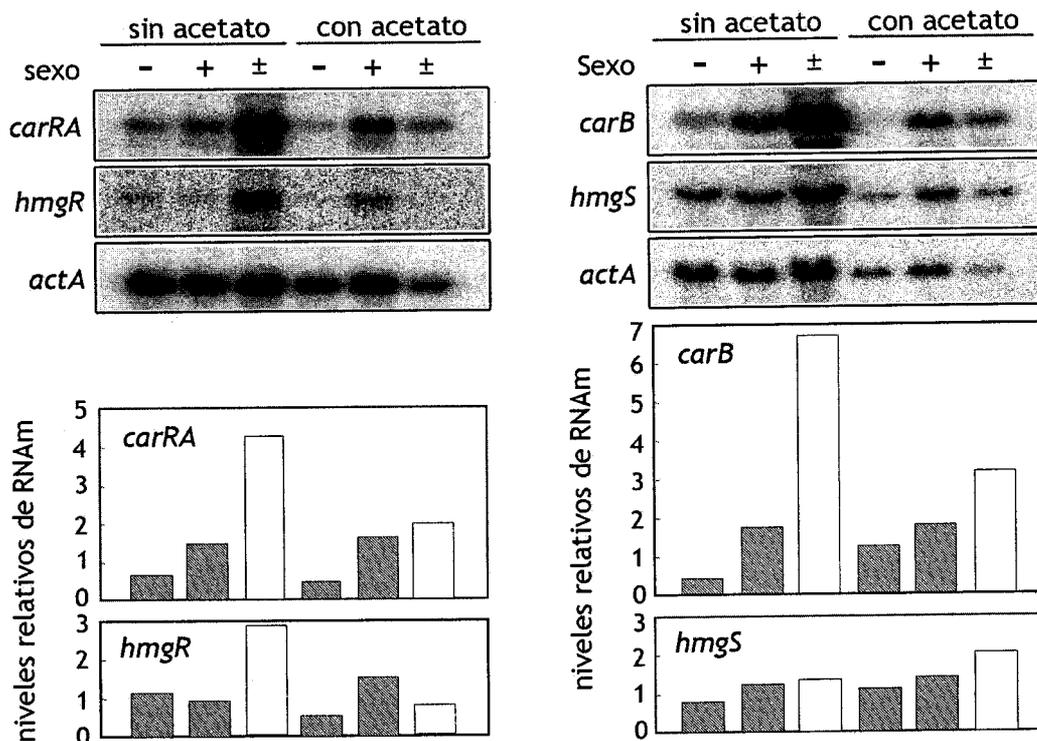


Figura 25: Expresión de los genes indicados en las estirpes silvestres de *Phycomyces* NRRL1555 (-) y NRRL1554 (+) en cultivos simples o mixtos (\pm), en medio mínimo suplementado o no con 10 mM de acetato sódico. Micelios de 2 días de edad. Arriba, fraccionamiento electroforético y reconocimiento con sondas radioactivas específicas. Abajo, densitometría de la radioactividad hibridada. Los valores son relativos a la *actA* del mismo carril y a la media de los cultivos simples en medio mínimo de la misma membrana.

transcripción de los genes *car* por interacción sexual, sino que actúa en algún punto intermedio entre la transcripción y la acumulación de carotenos.

Al comparar los niveles de ARNm del gen *carRA* en cultivos mixtos de *Blakeslea* cultivados en presencia y ausencia de acetato se notó que este compuesto inhibió fuertemente la transcripción del gen *carRA* durante todo el intervalo analizado. De hecho, mantuvo los niveles de ARNm iguales a los encontrados en cultivos simples (Figura 27). Esto implica que desaparecieron los dos efectos estimulantes de la interacción sexual: el modesto incremento de la transcripción y la estimulación post-transcripcional.

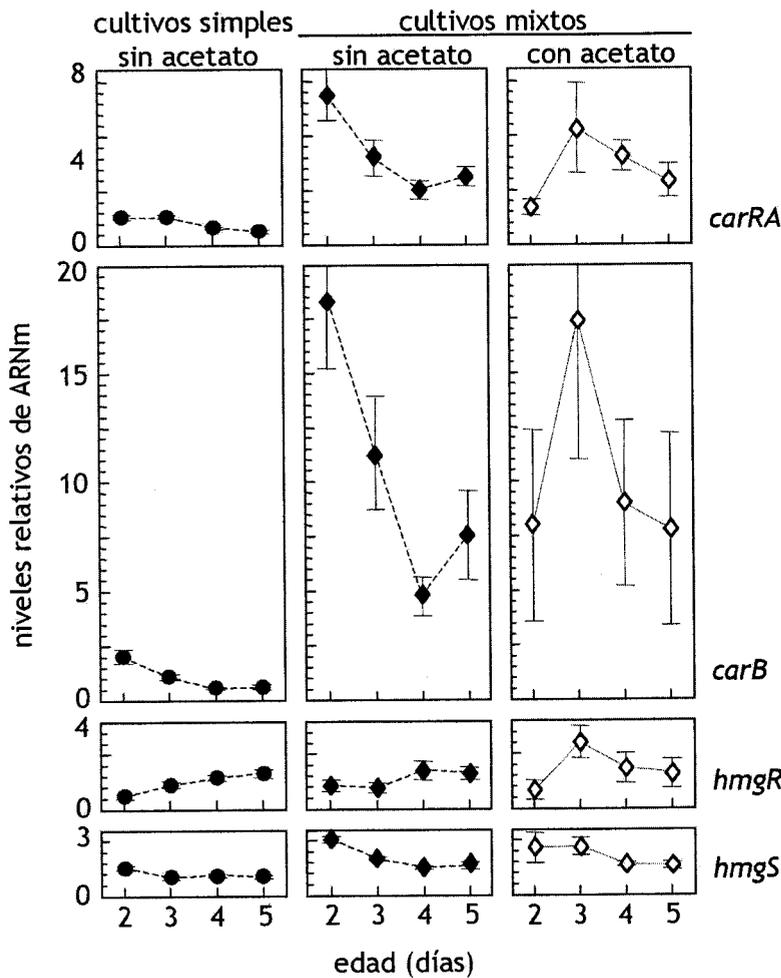


Figura 26: Expresión en *Phycomyces* de los genes indicados en cultivos simples, en cultivos mixtos y en cultivos mixtos con 10 mM de acetato sódico. En los tres casos se representan la media y la desviación típica del conjunto de resultados disponibles, que no difieren significativamente entre sí. En el caso de los cultivos con acetato se representa la media y la desviación típica de tres experimentos independientes, siendo dos de NRRL1555 con NRRL1554 y uno de NRRL1555 con A56. Los demás datos proceden de la consolidación de los valores de la Figura 20.

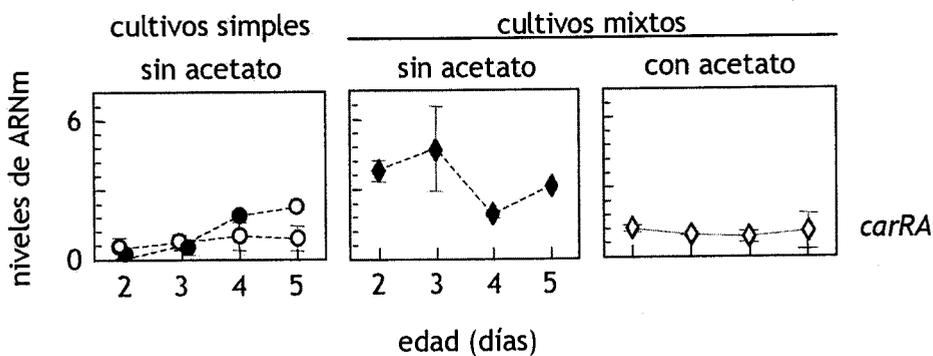


Figura 27: Expresión del gen *carRA* de *Blakeslea* en cultivos simples, en cultivos mixtos y en cultivos mixtos suplementados con 10 mM de acetato sódico. Se representan las medias y las desviaciones típicas de dos experimentos independientes. Los datos de los cultivos sin acetato que se dan para comparación proceden de la Figura 21.

CAPÍTULO 5

Efecto de las mutaciones *car* sobre la carotenogénesis

Las investigaciones realizadas en *Phycomyces* son facilitadas por la disponibilidad de una extensa y variada colección de mutantes. En este trabajo nos restringimos a estudiar mutantes *car*, alterados en la biosíntesis de carotenos. Se seleccionaron 12 estirpes que representan los principales grupos de mutantes estructurales y reguladores de la carotenogénesis.

Como representantes de los mutantes estructurales se analizaron las estirpes C5, C2, C9 y S92, mutadas respectivamente el gen *carB*, en el dominio A del gen *carRA*, en el dominio R del gen *carRA* y en todo el gen *carRA*; es decir, en los genes estructurales exclusivos de la vía de síntesis de los carotenos. Como mutantes reguladores se analizaron las estirpes C115, S561, S226 y S566 mutadas respectivamente en los genes *carS*, *carF*, *carD* y en ambos genes *carF* y *carS*; todos los cuales, al ser mutados, originan el fenotipo superamarillo (superproductores de β -caroteno). Además se analizaron las estirpes A98 mutada en el gen regulador *carC*, las estirpes quimioinsensibles S144 y S119 mutadas respectivamente en los genes *carI* y *carA* y el doble mutante S470 mutado simultáneamente en los genes *carA* y *carS*.

5.1. Efecto de las mutaciones *car* sobre el crecimiento micelial

Se comparó el crecimiento vegetativo de las estirpes mutantes con el de la estirpe silvestre y se encontraron ligeras variaciones. Las estirpes C9 y S566 crecieron más despacio que la silvestre, pero alcanzaron su misma masa adulta; las estirpes C2 y S226 alcanzaron una masa adulta algo mayor que la silvestre (Figura 28). Estas variaciones no tienen que estar relacionadas con las mutaciones señaladas en los genotipos, porque pueden deberse a otros cambios inducidos simultáneamente a ellas durante la exposición al mutágeno.

5.2. Efecto de las mutaciones *car* sobre la concentración de carotenos

Para cada una de las estirpes mutantes se determinó, a través de análisis en HPLC, el contenido de carotenos en función de la edad del cultivo y se comparó

con el de la estirpe silvestre (Figura 28).

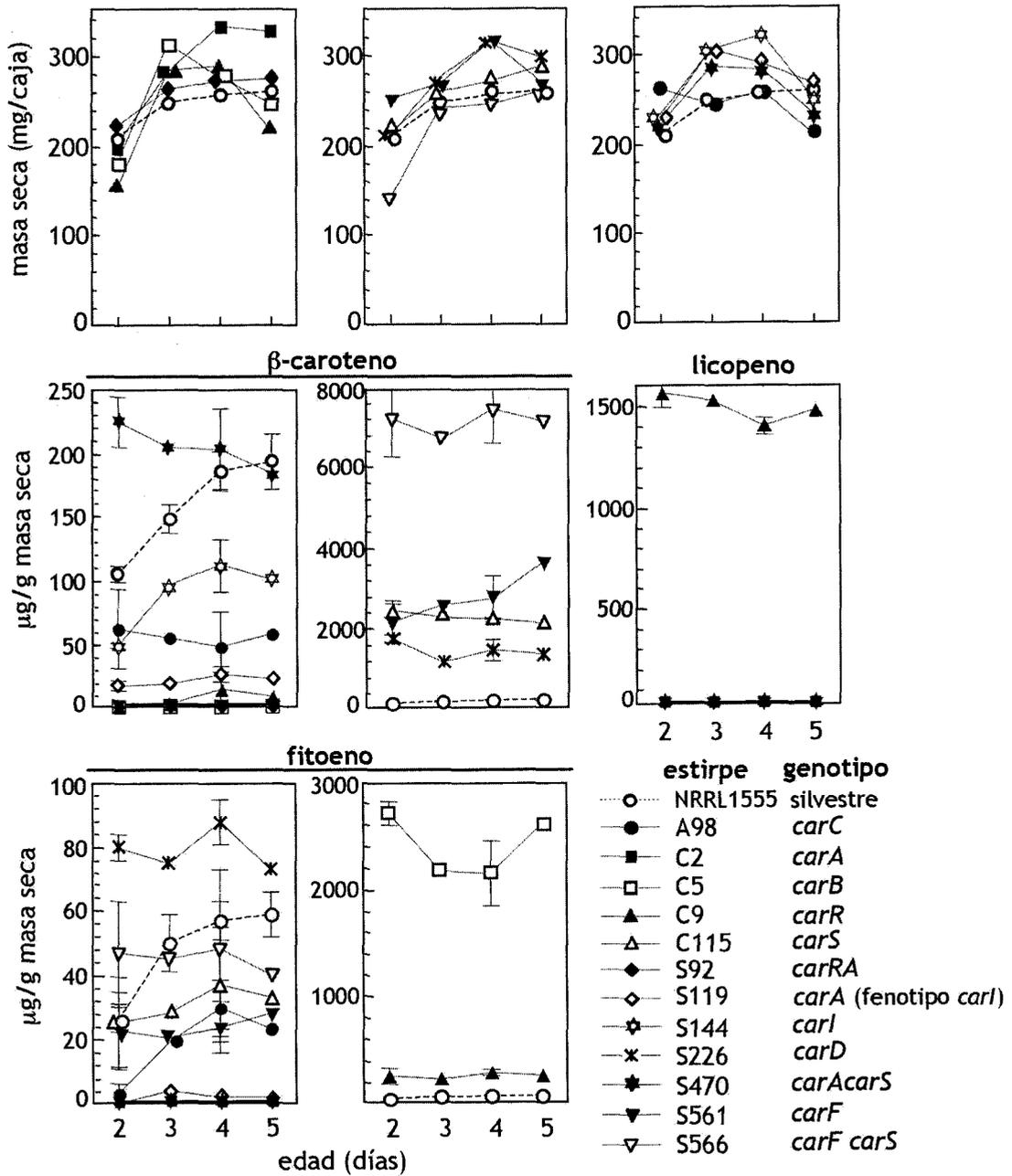


Figura 28: Crecimiento micelial y contenido de carotenos en la estirpe silvestre y en 12 mutantes *car*. Los contenidos de β -caroteno y fitoeno están representados en dos gráficas con escalas distintas. Los datos de los mutantes resultan de una única medición para muestras de 3 y 5 días de crecimiento y de la media de dos mediciones con sus desviaciones típicas para muestras de 2 y 4 días de crecimiento. Los valores para la estirpe silvestre que se dan para comparación proceden de la Figura 14.

Como era de esperar, la cantidad y calidad de carotenos acumulados variaron notablemente entre las estirpes analizadas. Así, en la estirpe S92 no se detectó ningún caroteno y en la estirpe C2 no más que trazas de β -caroteno ($1 \mu\text{g/g m. s.}$). Ya en a la estirpe S566 se encontró $7182 \mu\text{g}$ de β -caroteno/g masa seca. A pesar de la gran cantidad de β -caroteno acumulada, la estirpe S566 tenía cantidades parecidas a las encontradas en la estirpe silvestre para los demás carotenos. En la estirpe C5 se encontró $2420 \mu\text{g/g m. s.}$ de fitoeno, es decir, 50 veces más que en la estirpe silvestre.

La estirpe C9 fue la única en que se encontraron todos los carotenos ensayados. Además de una grande cantidad de licopeno ($1500 \mu\text{g/g m. s.}$) se encontraron también una apreciable cantidad de fitoeno ($245 \mu\text{g/g m. s.}$) y pequeñas cantidades de β -caroteno (hasta $13 \mu\text{g/g m. s.}$), γ -caroteno (hasta $20 \mu\text{g/g m. s.}$) y ζ -caroteno (entre 15 y $30 \mu\text{g/g m. s.}$). Esta situación indica que la estirpe C5 es portadora de una mutación rezumante.

Cuanto a las cinéticas de acumulación de carotenos fue posible dividir las estirpes en dos grupos. En uno la concentración del caroteno mayoritario aumentó significativamente durante el intervalo considerado. Este grupo estaba formado por las estirpes silvestre, S144 y S226. En el otro grupo, formado por las demás estirpes, las concentraciones eran más estables y las oscilaciones no eran significativas.

5.3. Efecto de las mutaciones *car* sobre la transcripción de los genes

Las diferencias entre los mutantes ensayados no se limitan a las grandes variaciones en las concentraciones de carotenos; las investigaciones publicadas indican grandes diferencias en los mecanismos moleculares responsables de esas variaciones. Sin embargo, los niveles de ARNm de los genes analizados no eran diferentes a los de la estirpes silvestre (Figuras 29, 30, 31 y 32). En esas figuras se incluye un recuadro con todos los resultados, en el que se observa que los mutantes no se pueden clasificar en grupos discretos.

Las pequeñas diferencias encontradas entre los niveles de ARNm se deben atribuir a variaciones experimentales y no deben tener un significado funcional. En todo caso esas pequeñas variaciones no corresponden con las grandes variaciones

en el contenido de carotenos.

En resumen, los mutantes no se diferenciaron del tipo silvestre en la transcripción de los genes relacionados con la carotenogénesis.

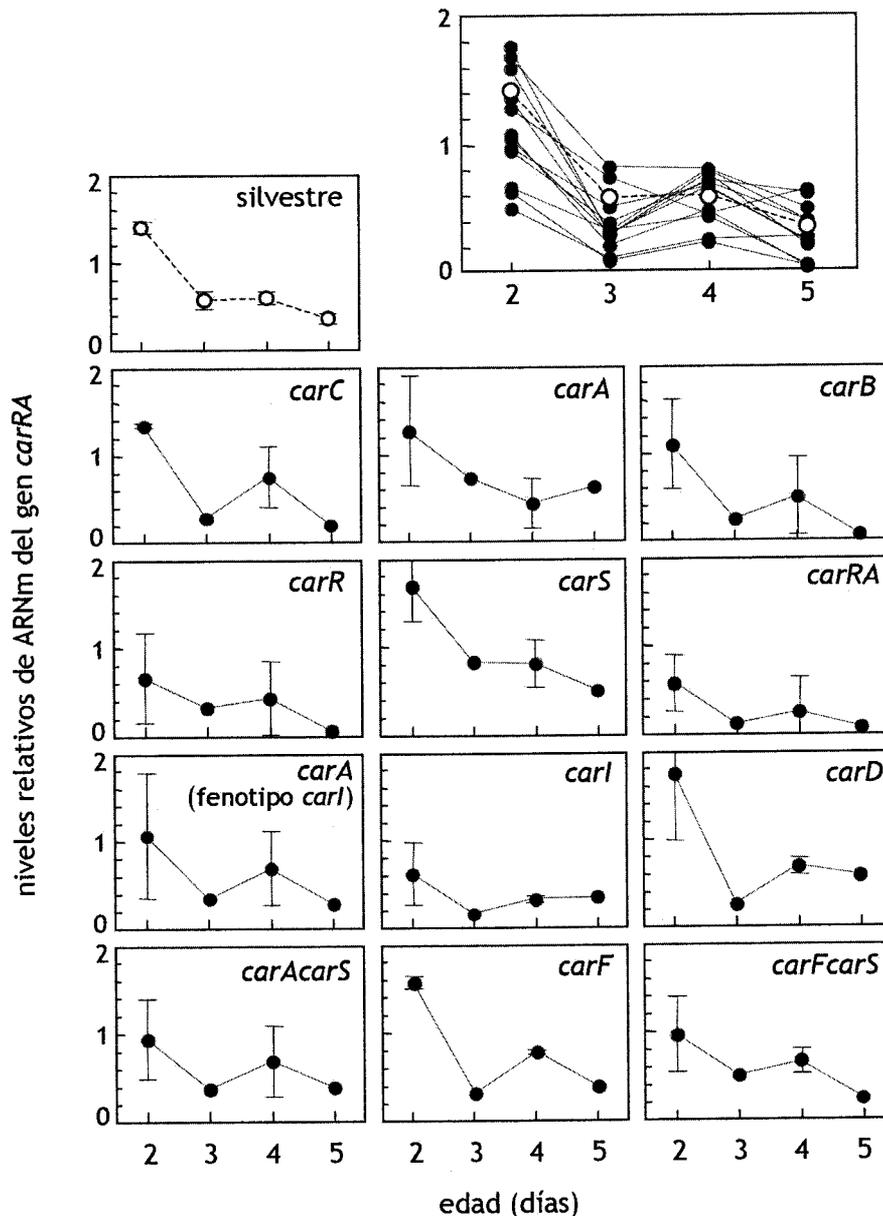


Figura 29: Niveles de ARNm del gen *carRA* en la estirpe silvestre (○) y en 12 mutantes *car*. Arriba a la derecha se representan todos los resultados y abajo se representan separadamente los de cada estirpe, identificada por el gen afectado. Los datos de los mutantes resultan de una única medición para muestras de 3 y 5 días de crecimiento y de la media de dos mediciones con su desviación típica para muestras de 2 y 4 días de crecimiento. Los valores para la estirpe silvestre resultan de la media y su desviación típica de 10 a 12 experimentos independientes.

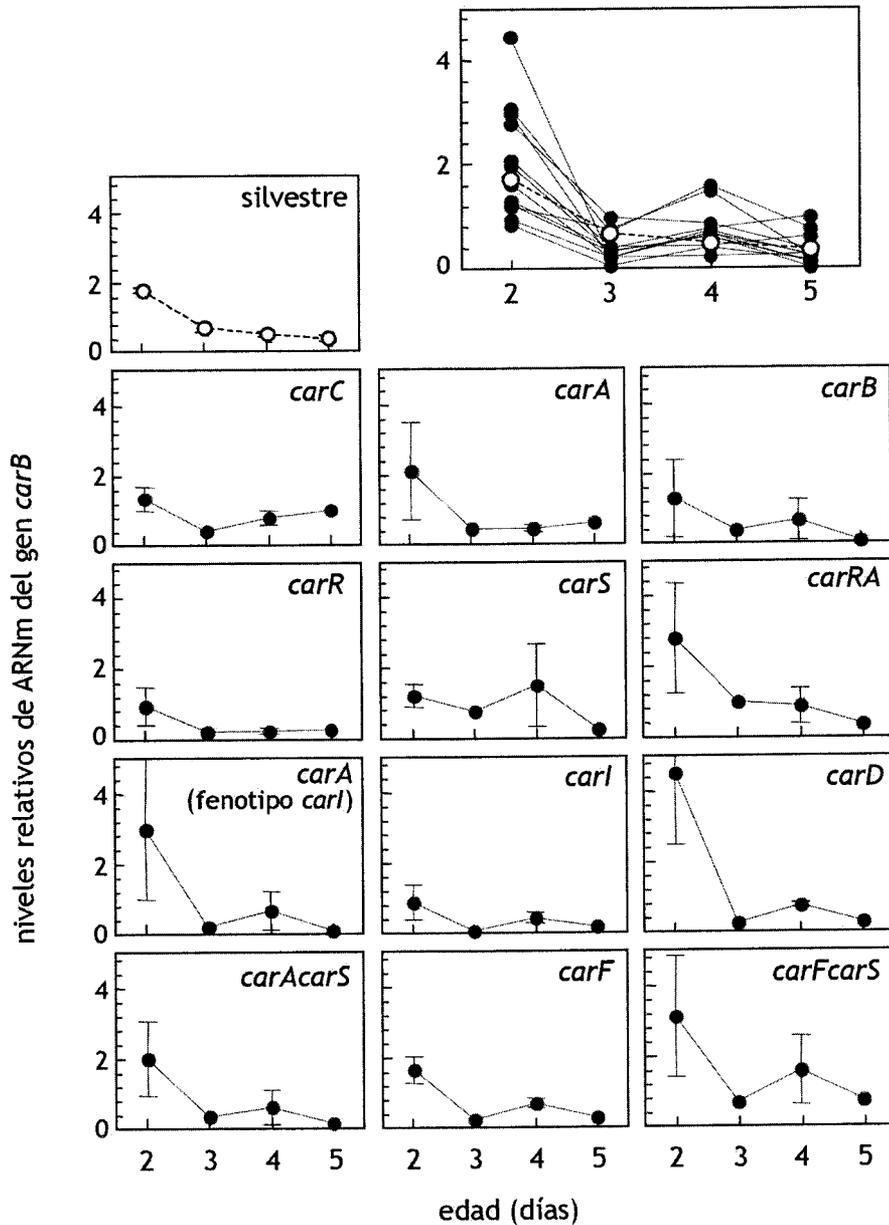


Figura 30: Niveles de ARNm del gen *carB* en la estirpe silvestre (○) y en 12 mutantes *car*. Arriba a la derecha se representan todos los resultados y abajo se representan separadamente los de cada estirpe, identificada por el gen afectado. Los datos de los mutantes resultan de una única medición para muestras de 3 y 5 días de crecimiento y de la media de dos mediciones con su desviación típicas para muestras de 2 y 4 días de crecimiento. Los valores para la estirpe silvestre resultan de la media y su desviación típica de 10 a 12 experimentos independientes.

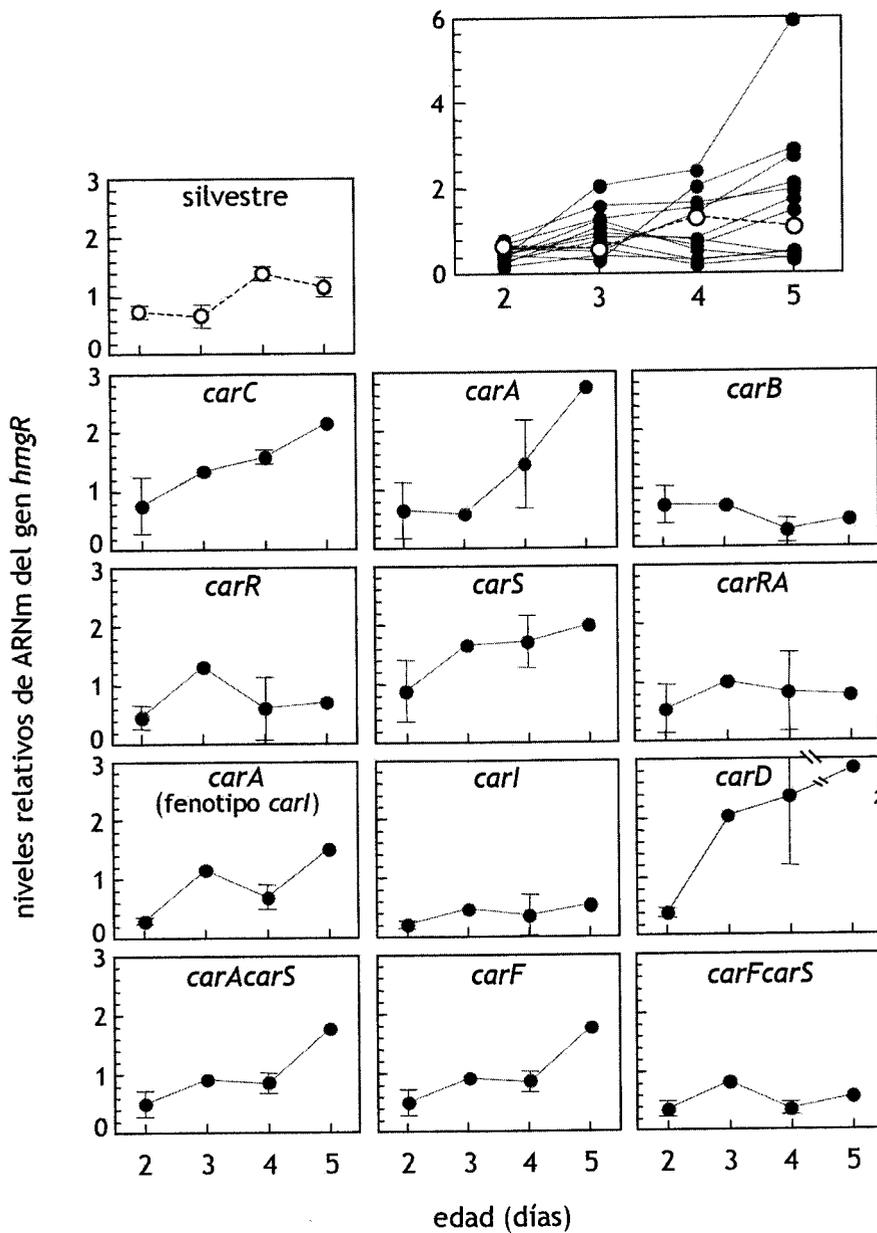


Figura 31: Niveles de ARNm del gen *hmgR* en la estirpe silvestre (○) y en 12 mutantes *car*. Arriba a la derecha se representan todos los resultados y abajo se representan separadamente los de cada estirpe, identificada por el gen afectado. Los datos de los mutantes resultan de una única medición para muestras de 3 y 5 días de crecimiento y de la media de dos mediciones con su desviación típicas para muestras de 2 y 4 días de crecimiento. Los valores para la estirpe silvestre resultan de la media y su desviación típica de 10 a 12 experimentos independientes.

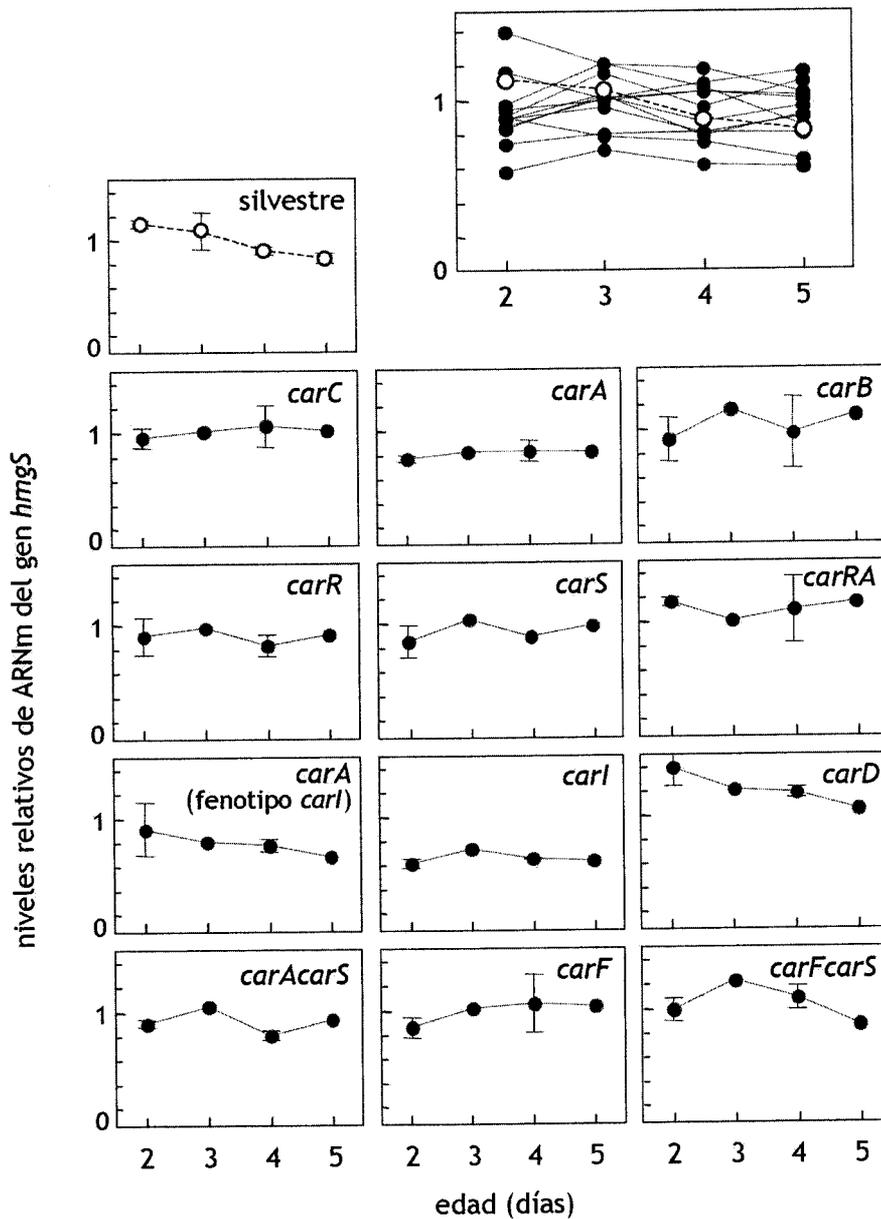


Figura 32: Niveles de ARNm del gen *hmgS* en la estirpe silvestre (○) y en 12 mutantes *car*. Arriba a la derecha se representan todos los resultados y abajo se representan separadamente los de cada estirpe, identificada por el gen afectado. Los datos de los mutantes resultan de una única medición para muestras de 3 y 5 días de crecimiento y de la media de dos mediciones con su desviación típicas para muestras de 2 y 4 días de crecimiento. Los valores para la estirpe silvestre resultan de la media y su desviación típica de 10 a 12 experimentos independientes.

CAPÍTULO 6

Fotocarotenogénesis

Como quedó patente en la Introducción, la luz azul estimula la síntesis de carotenos (Bejarano *et al.*, 1991; Ávalos *et al.*, 1993) y aumenta la transcripción del gen *carB* (Ruiz-Hidalgo *et al.*, 1997; Blasco *et al.*, 2001). En esta Tesis se confirmó este efecto sobre el gen *carB* y se complementó con el análisis de la expresión de los genes *carRA*, *hmgR* y *hmgS*. También se investigó el efecto de la luz en la expresión génica de mutantes *car* y la relación entre la fotoestimulación y la estimulación sexual.

6.1. Fototranscripción de los genes *car* en la estirpe silvestre y en mutantes de la carotenogénesis

Se compararon los niveles de ARNm de micelios iluminados y no iluminados (Figuras 33). Se confirmó la fototranscripción del gen *carB* en la estirpe silvestre y se encontró un efecto muy parecido en el gen *carRA*.

Se detectó un aumento en los niveles de ARNm tanto del gen *carB* como del gen *carRA* en micelios iluminados de todos los mutantes analizados. La única excepción fue la estirpe S92 y solo para el gen *carRA*, cuyo ARNm era casi indetectable. Es posible que en este caso los bajos niveles encontrados tanto en micelios iluminados como no iluminados se debieron a la mutación *carRA91*, que sustituye un triptófano (TGG) por un codón de terminación (TGA) en el codón 59. Se sabe que terminaciones prematuras pueden desestabilizar el ARNm (Baker y Parker, 2004).

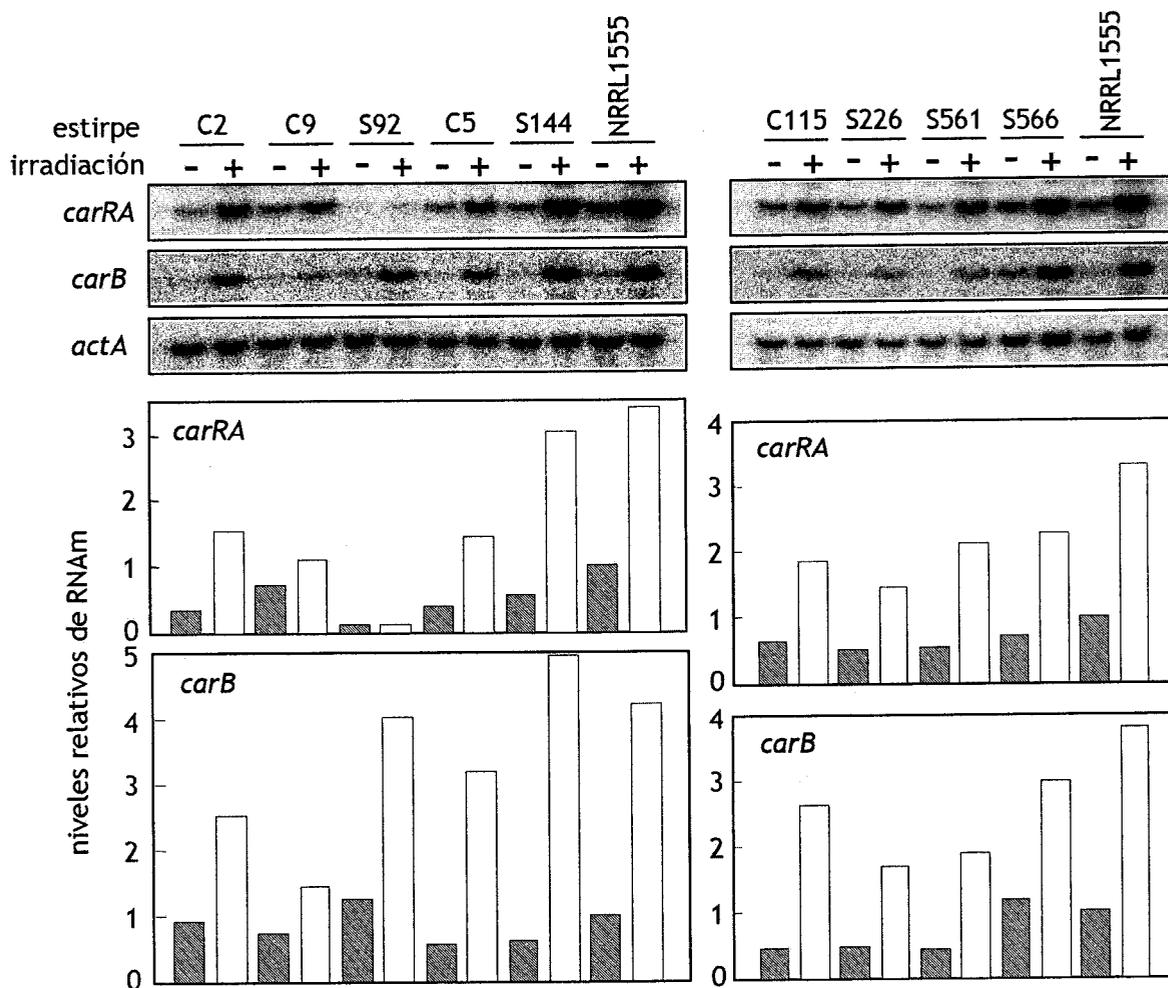


Figura 33: Efecto de la luz sobre los niveles de ARNm de los genes *carRA* y *carB* en la estirpe silvestre NRRL1555 y en mutantes *car*. Arriba, fraccionamientos electroforéticos y reconocimiento con sondas radioactivas específicas. Abajo, cuantificación de la radioactividad hibridada. Las densitometrías de bandas se dividieron por la de *actA* en el mismo carril y estos valores por el obtenido para la estirpe silvestre cultivada en oscuridad, que se toman como unidad. Tras haber sido cultivados en oscuridad durante dos días, los micelios se expusieron o no durante 30 min a 17 kJm⁻².

6.2. Efecto combinado de la estimulación luminosa y sexual sobre la transcripción de los genes en la estirpe silvestre

En *Phycomyces* los efectos de la luz y del sexo sobre la acumulación de carotenos son sinérgicos y por lo tanto actúan a través de distintos mecanismos de

acción (Govind y Cerdá-Olmedo, 1986). Deseamos conocer el efecto combinado de estos agentes estimulantes sobre la transcripción de los genes de la carotenogénesis. Para ello se comparamos los niveles de ARNm de micelios no estimulados con los de micelios estimulados por la luz, el sexo o ambos(Figura 34).

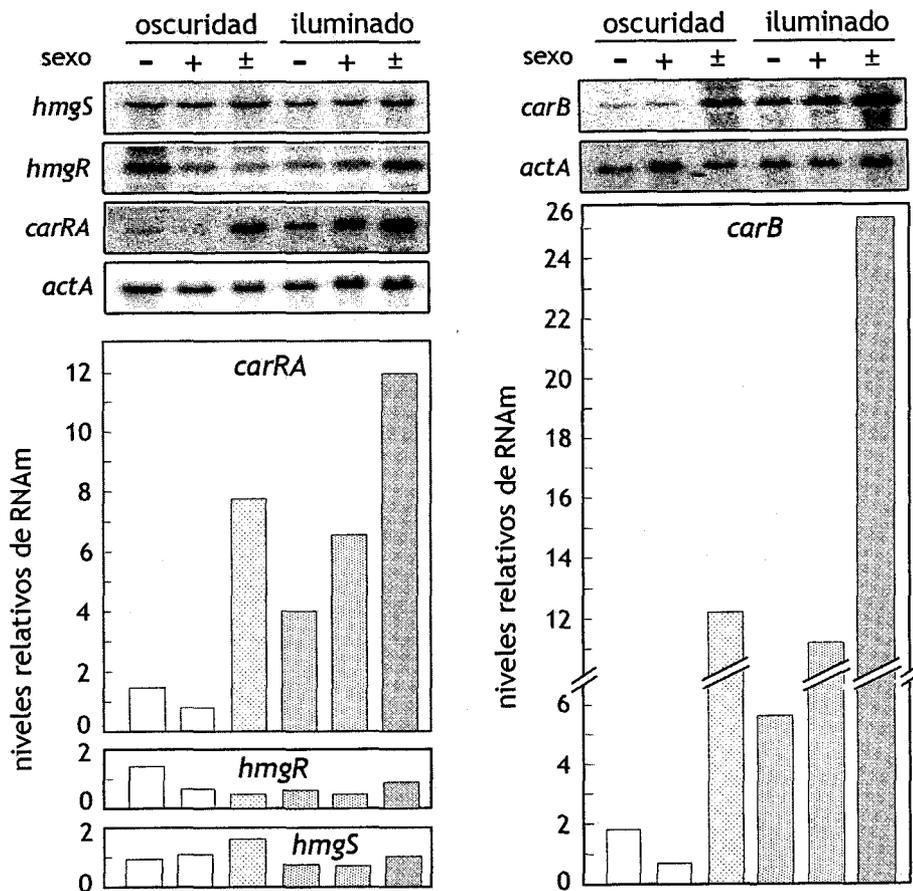


Figura 34: Efecto combinado de los estímulos sexual y luminoso sobre los niveles de ARNm de los genes indicados en estirpes silvestres NRRL1555 (-) y NRRL1554 (+) cultivadas separadas o juntas (\pm) durante dos días. Arriba, fraccionamiento electroforético y reconocimiento con sondas radioactivas que se indican. Abajo, cuantificación de la radioactividad hibridada. Los valores se dividieron por lo de *actA* del mismo carril y luego por la media de los obtenidos para los cultivos simples de las estirpes silvestres en oscuridad. Tras haber sido cultivados en oscuridad durante dos días, los micelios se expusieron o no durante 30 min a 17 kJ m^{-2} .

Los resultados representados en la Figura 34 corroboran y complementan aquellos obtenidos con el análisis del contenido de carotenos. Se encontró que la estimulación simultánea por la luz y por el sexo son sinérgicas sobre la transcripción de los genes de la carotenogénesis.

Los resultados numéricos apoyan una sinergia aditiva, y no multiplicativa. Así, por ejemplo, la media del ARNm de *carRA* en micelios no estimulados fue de 1,0 unidades, a las que la estimulación sexual en la oscuridad añadió 6,4 unidades y la estimulación lumínica una media de 3,8 unidades. La suma de estos valores, 11,2 unidades, coincide con el valor experimental de micelios mezclados e iluminados, que fue 10,8 unidades. La hipótesis multiplicativa predeciría $1,0 \times 7,4 \times 4,8 = 35,4$ unidades. En el caso de *carB* la hipótesis aditiva predice 19,4 unidades y la multiplicativa 99,8, mientras que el resultado experimental fue 25,8.

Ni la iluminación ni la interacción sexual modificaron apreciablemente la expresión de los genes *hmgR* y *hmgS*.

CAPÍTULO 7

Inmunodetección de proteínas de la carotenogénesis

La luz y la interacción sexual provocan un incremento en los niveles de ARNm de los genes de la carotenogénesis, pero el análisis de la expresión génica no explica la acumulación de carotenos encontrada en cultivos con retinol o ftalato de dimetilo, ni las variaciones entre los mutantes *car*. Por esta razón se proyectó extender el trabajo al análisis de los niveles de proteínas carotenogénicas.

Tras el fraccionamiento electroforético de extractos proteicos, se trató de identificar la reductasa de HMG-CoA (HmgR), la sintasa del fitoeno (CarA) y la ciclasa del licopeno (CarR), producidas respectivamente por el gen *hmgR* y por los dominios *A* y *R* del gen *carRA* en varias estirpes en diversas condiciones (Figura 35). Para ello se emplearon anticuerpos policlonales de conejo obtenidos por el Dr. Jürgen Breitenbach en el laboratorio dirigido por el Prof. Gerhard Sandmann (Botanisches Institut, Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt am Main, Alemania).

El ARNm del gen *carRA* es traducido a un único polipéptido CarRA, que se rompe luego en dos, la ciclasa del licopeno y la sintasa del fitoeno. La estirpe S92 tiene el gen *carRA* interrumpido por una terminación prematura en el codón 59 y por lo tanto es incapaz de sintetizar las proteínas CarA y CarR (Torres-Martínez *et al.*, 1980; Arrach *et al.*, 2000).

Los anticuerpos reconocieron varias proteínas de *Phycomyces*, que se detectaron de forma parecida en todas las muestras ensayadas, incluso en las del control negativo representado por la estirpe S92. Estos resultados indican que los reconocimientos eran inespecíficos y que las bandas no correspondían a las proteínas CarA o CarR. Además, la movilidad de las proteínas detectadas no correspondía a la esperada según sus pesos moleculares estimados. Presumiblemente los conejos utilizados tenían anticuerpos contra antígenos de *Phycomyces*, organismo al que probablemente nunca estuvieron expuestos, tal vez por tratarse de proteínas muy conservadas en distintos hongos.

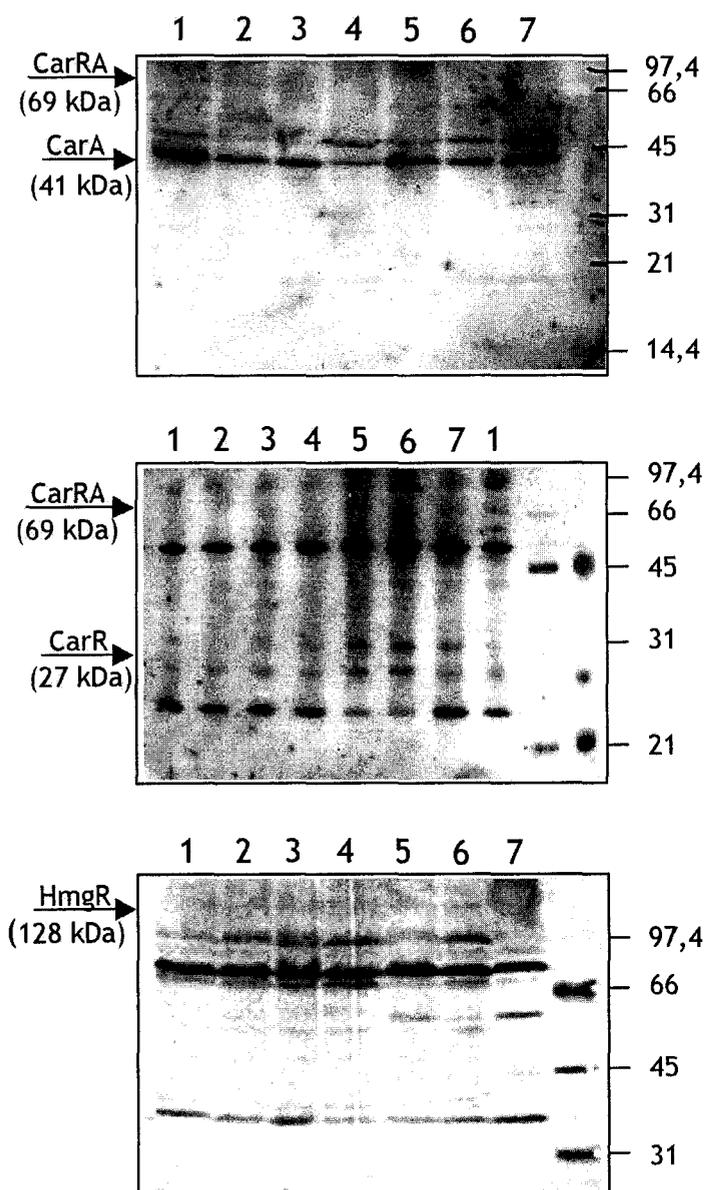


Figura 35: Inmunodetección de las proteínas CarA (arriba), CarR (en medio) y HmgR (abajo), tras fraccionamientos electroforéticos de proteínas totales extraídas de micelios cultivados por dos días. Las flechas señalan el punto de migración esperado según el peso molecular estimado (entre paréntesis).

1. S92 (mutante *carRA*).
2. NRRL1555 con acetato de retinol (0,75 mM).
3. NRRL1555 con ftalato de dimetilo (2 mM).
4. S566 (mutante *carFcarS*).
5. NRRL1555 17 kJ m⁻² de luz blanca en los 30 min finales de cultivo.
6. Cultivo mixto de NRRL1555 con NRRL1554.
7. NRRL1555.

Este resultado resalta la utilidad de la Genética para evitar conclusiones erróneas en experimentos bioquímicos. Confiamos en disponer pronto de anticuerpos específicos para poder estimar las existencias de proteínas carotenogénicas en varias situaciones reguladoras diferentes.

DISCUSIÓN

1. Expresión de los genes *hmgS* y *hmgR*.

Estos genes (Ruiz-Albert *et al.*, 2002) son necesarios para la síntesis de todos los terpenoides de *Phycomyces*, de los cuales los carotenoides constituyen una parte muy pequeña, excepto en los mutantes más coloreados. Varios motivos de la secuencia del promotor del gen *hmgS* de *Phycomyces* sugiere que su transcripción está regulada por esteroides. El promotor de *hmgR* de *Phycomyces* carece de esos motivos, pero los autores citados sugieren una modulación de la actividad de la proteína por la concentración de esteroides en la membrana donde se inserta la proteína mediante sus ocho segmentos transmembranales. Sus indicios fueron la presencia de dominios sensibles a esteroides (*sterol sensin domains*) en la parte lipofílica predicha de la proteína HmgR (Brown y Goldstein, 1999; Davis e Ioannou, 2000).

Mientras el ARNm del gen *hmgS* se mantiene casi constante, en relación con el de actina, el gen *hmgR* es el único, entre los cuatro analizados, cuyo ARNm se vuelve relativamente más abundante con el paso del tiempo. No hemos medido la síntesis global de terpenoides durante la fase estacionaria, aunque sería factible hacerlo con mevalonato marcado. Por tanto no sabemos si la presencia de ARNm de *hmgS* y *hmgR* en esa fase responde a una necesidad metabólica, pero la mayor abundancia relativa del ARNm de *hmgR* sugiere que este gen está regulado a nivel posttranscripcional. Una manera de interpretar las diferencias entre el acumulo de ARNm de los genes *hmgS* y *hmgR* de *Phycomyces* es que las concentraciones de esteroides regulan la transcripción del gen *hmgS* y la actividad de la proteína HmgR.

La regulación del gen *hmgR* ha sido estudiada de manera particularmente minuciosa en mamíferos. La transcripción del gen y la actividad, la estabilidad y la degradación de la proteína están reguladas por varios metabolitos de la ruta de los terpenoides (Goldstein y Brown, 1990). Podemos imaginar que los genes *hmgS* y *hmgR* de *Phycomyces* están sujetos a una regulación compleja. La generación y uso de anticuerpos específicos contra el dominio catalítico de HmgR podría aportar información sobre la estabilidad de esta enzima y ayudar a comprender la regulación de la conversión de HMG-CoA a mevalonato.

Los niveles de los ARNm de los genes *hmgS* y *hmgR* de *Phycomyces* no

cambian apreciablemente en ninguna de las circunstancias investigadas: estimulación química, interacción sexual, varios mutantes e iluminación. Ni siquiera se notaron variaciones bajo el efecto conjunto de la luz y el sexo, que fue la situación en que encontramos los mayores incrementos en los niveles de ARNm de los genes *carRA* y *carB*, específicos para la carotenogénesis. Se propone que las posibles variaciones en la transcripción de los genes *hmgS* y *hmgR* demandadas por el incremento en la síntesis de carotenos serían indetectables en comparación con la transcripción necesaria para producir todos los terpenoides.

La síntesis de carotenos, esteroides (Bejarano y Cerdá-Olmedo, 1992) y ubiquinona (Kuzina, Tesis doctoral en redacción) ocurren en compartimentos subcelulares creados y regulados independientemente. Por tanto se debe pensar que la luz y el sexo, que aumentan la transcripción de los genes *carRA* y *carB* deben afectar a todos los pasos de la ruta y activar también la transcripción de los genes *hmgS* y *hmgR*.

2. Cinética de la expresión de los genes *carRA* y *carB*.

Las esporas de la estirpe silvestre contienen más caroteno, en relación a su masa, que cualquier otra fase de la vida del hongo (Rauguei *et al.*, 1982). Durante la germinación, la masa crece rápidamente, pero no la acompaña la concentración de carotenos, que decrece hasta alcanzar niveles mínimos en micelios jóvenes, de alrededor de un día de edad (Mehta *et al.*, 1997). La concentración de carotenos creció durante la expansión de los micelios y se estabilizó durante la fase estacionaria (Capítulo 2 de Resultados), para mantenerse aproximadamente constante durante semanas y decrecer lentamente (Garton *et al.*, 1951). La estabilidad podría reflejar un equilibrio aproximado entre síntesis y degradación, pero se ha demostrado que el β -caroteno de *Phycomyces* no se degrada ni se metaboliza apreciablemente en el período de tiempo y las condiciones de nuestros experimentos (Murillo *et al.*, 1981; Bejarano *et al.*, 1992) y por tanto deja de sintetizarse al llegar a la fase estacionaria. La concentración de ARNm de los genes estructurales *carRA* y *carB*, en relación con la del gen para la actina, decrece durante la fase de expansión, pero no se anula. Como cesa la síntesis de carotenos, concluimos que el ARNm de esos genes no se expresa. No sabemos qué lo impide,

pero debemos suponer la existencia de un mecanismo de regulación posttranscripcional de la expresión génica.

3. Efecto de los activadores químicos de la carotenogénesis sobre la expresión génica.

El retinol y el ftalato de dimetilo inducen aumentos grandes y de magnitud comparable del contenido de caroteno a través de mecanismos diferentes; el retinol impide la regulación por retroinhibición y el ftalato es independiente de ella. Tienen en común que ambos necesitan a CarI para ejercer su acción estimuladora, como indica el poco efecto que tienen en el mutante S144 (Bejarano *et al.*, 1988).

Los resultados de esta Tesis demuestran que la presencia de retinol o ftalato de dimetilo en el medio no altera los niveles de los ARNm de los genes estudiados. Concluimos por tanto que ambos productos químicos estimulan la carotenogénesis a nivel posttranscripcional por distintos mecanismos.

4. Efecto de las mutaciones *car* sobre la expresión génica.

El Capítulo 5 de Resultados presenta análisis nuevos y detallados de los carotenos presentes en la estirpe silvestre y en doce mutantes y los compara con los niveles de ARNm de los genes *carRA*, *carB*, *hmgR* y *hmgS*. Aunque los mutantes fueron elegidos entre los más interesantes y mejor estudiados en trabajos anteriores, los análisis de carotenos precedentes no eran tan completos, se habían limitado al producto mayoritario en la mayoría de los casos y se habían hecho con técnicas menos fiables que la cromatografía HPLC.

Las cinéticas de acumulación del caroteno mayoritario permitió separar las estirpes en dos grupos. En uno de ellos la concentración aumentó durante la fase de expansión micelial; en él se encuentran las estirpes silvestres, el mutante S144, insensible a activación química, y el mutante S561, superproductor de caroteno por mutación *carF*. En todos los demás mutantes la concentración se mantuvo aproximadamente constante durante el período de observación. Tienen en común contener mutaciones en los genes *carS*, *carC*, *carD*, *carRA* y *carB*, que están implicados en el mecanismo de regulación por producto final.

No se encontraron diferencias significativas en los ARNm de los genes *carRA*, *carB*, *hmgR* y *hmgS* de la estirpe silvestre y de los mutantes investigados. Estos no solo difieren enormemente en la calidad y concentración de carotenos, sino también en los mecanismos moleculares empleados para alterar el contenido de carotenos o su respuesta a estímulos, mecanismos que son poco o nada conocidos. Nuestros resultados indican que tales mecanismos no actúan a través de la transcripción de los genes de la carotenogénesis y por tanto que las variaciones de contenido de caroteno en los mutantes se deben a regulación posttranscripcional de la expresión génica.

Los resultados llevan a la conclusión inesperada de que los niveles de ARNm de la estirpe silvestre son suficientes para producir concentraciones de caroteno cincuenta veces mayores que las encontradas en esa estirpe.

5. El efecto de la luz sobre la expresión de los genes de la carotenogénesis.

La luz estimula la transcripción de los genes *carRA* y *carB* de la estirpe silvestre de *Phycomyces*, como indica el aumento de las señales obtenidas de micelios iluminados con respecto a sus controles en oscuridad. Este aumento es similar a los de las concentraciones de caroteno, por lo que basta para explicarlos, sin necesidad de invocar otros mecanismos de regulación, pero sin excluirlos. Ya se había demostrado que la luz aumenta la transcripción de los genes *carB* de *Phycomyces* (Ruiz-Hidalgo *et al.*, 1997; Blasco *et al.*, 2001) y *Mucor* (Velayos *et al.*, 2000a) y *carRP* de *Mucor* (Velayos *et al.*, 2000b), homólogo de *carRA* de *Phycomyces*.

Phycomyces posee dos sistemas sensoriales para la fotocarotenogénesis (Bejarano *et al.*, 1991), que se diferencian en muchos rasgos, entre ellos sus espectros de acción y sus intervalos dinámicos. El sistema sensible a flujos luminosos elevados estimula la carotenogénesis mucho más que el que solo detecta flujos bajos. La actinomicina D y la ciclohexamida (inhibidores de la transcripción y traducción, respectivamente) inhiben la respuesta a flujos luminosos elevados, pero no a flujos bajos (Jayaram *et al.*, 1979). Este resultado es congruente con nuestras observaciones, que se hicieron con flujos elevados, y sugiere además que la respuesta a luz implica mecanismos reguladores diferentes,

como podría ser, por ejemplo, el incremento en la actividad de las enzimas carotenogénicas preexistentes.

Los efectos de la iluminación sobre el acúmulo de ARNm en los mutantes ensayados son muy parecidos al de la estirpe silvestre. La única excepción es la estirpe S92, que tiene poquísimo ARNm del gen *carRA*. Se trata de un mutante con una terminación prematura en el gen *carRA* (Arrach *et al.*, 2001), que puede acelerar la degradación del ARNm (Baker y Parker, 2004). Nuestros resultados confirman la conclusión de que las mutaciones no modifican los niveles de transcripción y la extienden a que el aumento de la transcripción en cultivos iluminados no depende de los productos de los genes alterados en esos mutantes.

El contenido de caroteno en los mutantes *carA*, como la estirpe C2, la más utilizada, es tan bajo que es difícil distinguir si aumenta con la luz, pero varios trabajos con seis estirpes, incluyendo C2, concuerdan en que no varía (Eslava *et al.*, 1974; López-Díaz y Cerdá-Olmedo, 1980; Revuelta y Eslava, 1984; Bejarano *et al.*, 1991). Nuestros resultados indican que la luz aumenta la transcripción de los genes *carRA* y *carB* en la estirpe C2, y por tanto llevan a la conclusión de que además de la regulación transcripcional de la fotocarotenogénesis hay una regulación posttranscripcional mediada por la proteína CarA. Así, la transcripción de los genes es insuficiente para modificar la concentración de caroteno y necesita estar complementada por una activación posttranscripcional.

Como todas las respuestas de *Phycomyces* a la luz, la fotocarotenogénesis necesita la función de los genes *madA* y *madB* (Bergman *et al.*, 1973; López-Díaz y Cerdá-Olmedo, 1980), entre otros. El gen *madA* ha resultado ser homólogo del gen *wc-1* de *Neurospora* (trabajos inéditos de A. Idnurm, L. M. Corrochano, E. A. Iturriaga y otros), un fotorreceptor regulado por fosforilación (Talora *et al.*, 1999; Franchi *et al.*, 2005). Ya se había indicado que la fosforilación de proteínas participa en la regulación de la fotocarotenogénesis de *Phycomyces* (Tsolakis *et al.*, 1999). No se excluye que la actividad de las enzimas carotenogénicas dependa de su fosforilación.

6. El efecto del sexo sobre la expresión de los genes de la carotenogénesis.

Ampliamos nuestro trabajo a *Blakeslea trispora* porque muestra una gran estimulación sexual de la carotenogénesis que facilita la interpretación de los resultados; en *Phycomyces* la respuesta es menor, pero se conoce mejor la Bioquímica y la Genética. La regulación de la biosíntesis de carotenos por la luz y por productos químicos difiere mucho entre estos dos organismos (Ávalos y Cerdá-Olmedo, 2004), así como la producción de ácidos trispóricos, mucho mayor en *Blakeslea* que en *Phycomyces* (Gooday, 1978). Teniendo en cuenta estas diferencias no resulta sorprendente el hecho de que la regulación de la estimulación sexual de la carotenogénesis sea distinta para los dos hongos.

Tanto *Phycomyces* como *Blakeslea* presentan estimulación sexual de la carotenogénesis y su inhibición por acetato. En *Phycomyces*, el incremento de la transcripción de los genes de la carotenogénesis por la estimulación sexual basta para justificar el incremento de la acumulación de caroteno. En *Blakeslea*, el nivel de ARNm del gen *carRA* aumenta mucho menos que la acumulación de carotenos en cultivos mixtos.

A pesar de que el acetato inhibe la estimulación sexual de la carotenogénesis en ambos organismos, su efecto sobre la transcripción de los genes *carRA* y *carB* de *Phycomyces* es inexistente o muy pequeño. Los menores niveles de ARNm encontrados en cultivos de dos días pueden ser explicados por el retraso que el acetato causa en el crecimiento de este organismo. Por tanto el acetato tiene que impedir la expresión de los ARNm producidos en su presencia.

El incremento de los niveles de ARNm del gen *carRA* de *Blakeslea* en presencia de acetato, aunque modesto, indica la existencia de una activación transcripcional. La disparidad entre el gran aumento de la carotenogénesis y el pequeño incremento de los niveles de ARNm del gen *carRA* indica la existencia de una activación posterior a la transcripción. Como la presencia de acetato hace que la concentración de caroteno en cultivos mixtos de *Blakeslea* se mantenga al nivel de los cultivos simples, concluimos que el acetato contrarresta ambas activaciones.

Sorprende que el acetato inhiba la estimulación sexual de la carotenogénesis e induzca la formación de cigosporas porque ambos procesos son activados por ácidos trispóricos y se consideraban inseparables. Otro efecto del acetato, la

activación de la germinación de las esporas de *Phycomyces* (Robbins *et al.*, 1942; Borchert, 1963; Van Mulders *et al.*, 1986) parece ventajoso en la vida saprofítica de este organismo. *Phycomyces* crece mucho más despacio que las bacterias en materiales orgánicos. El acetato es un producto de la fermentación bacteriana y, por consiguiente, una excelente señal para un organismo que puede alimentarse de bacterias. La ventaja adaptativa del efecto del acetato sobre la interacción sexual no parece fácil de interpretar.

7. Integración de las regulaciones.

Entre los muchos agentes externos que estimulan la carotenogénesis se pueden distinguir cuatro grupos (Bejarano *et al.*, 1988). Estos grupos se establecieron por criterios de sinergia y de dependencia de funciones génicas; dos agentes que son ineficaces en el mismo conjunto de mutantes se atribuyeron al mismo grupo. Entre las mutaciones que bloquean la modificación del contenido de caroteno por agentes externos, muchas causan grandes cambios en las concentraciones de caroteno por sí mismas (por ejemplo, muchos alelos *carS* y *carA*), pero algunas cambian poco el contenido de caroteno (ejemplos, los alelos *carI131* y *carA113*). Ejemplos señeros de los cuatro grupos son la luz, la estimulación sexual, el retinol y el ftalato de dimetilo. Las cuatro activaciones no son completamente independientes: cada una depende de un conjunto diferente de funciones génicas, pero esos conjuntos no son disjuntos. Es decir, algunas mutaciones impiden la activación por agentes de grupos diferentes e identifican presumiblemente productos génicos sobre los que converge la acción de ambos grupos.

7.1. La regulación de la transcripción.

La transcripción de los genes estructurales *carA* y *carRA* sigue un curso predeterminado durante el desarrollo vegetativo del organismo y aumenta bajo dos estímulos externos, la iluminación y la interacción sexual. La luz y el sexo son sinérgicos y aproximadamente aditivos en sus efectos sobre la concentración de caroteno (Murillo *et al.*, 1978; Govind y Cerdá-Olmedo, 1986) y sobre los niveles de ARNm de los genes *carRA* y *carB*. Esta observación corrobora que el aumento de

la transcripción basta para explicar el aumento de la producción de caroteno en los tipos silvestres iluminados o estimulados sexualmente.

La mayor expresión de los genes *carRA* y *carB* ayuda a comprender la mayor actividad carotenogénica *in vitro* de extractos obtenidos a partir de micelios heterocariontes intersexuales o iluminados (Salgado *et al.*, 1991).

Ninguna de las mutaciones que conocemos modifica la transcripción de esos genes, aunque causen grandes cambios en el contenido de caroteno. Cabe imaginar que no se han aislado mutaciones que aumenten la transcripción porque requieren combinaciones infrecuentes de cambios de base. Así es de esperar en el caso de la luz, porque el promotor común a los genes *carB* y *carRA* tiene varios motivos putativos para activación por la luz (Ruiz-Hidalgo *et al.*, 1997). Una vez que los efectos de la luz y del sexo sobre la transcripción de los genes *carRA* y *carB* son independientes se debe esperar que la región promotora común de estos genes tenga también motivos para la estimulación sexual. En *Fusarium fujikuroi* hay mutantes superproductores de carotenoides, llamados *carS*, aunque son muy diferentes de los de *Phycomyces*, en los que se encuentra un aumento de los niveles de ARNm de los genes estructurales (Ávalos y Cerdá-Olmedo, 1987; Prado *et al.*, 2004).

Para la superproducción de carotenos sería conveniente obtener mutantes con transcripción muy activa de los genes de la carotenogénesis y combinarlos con las mutaciones conocidas con el objetivo de incrementar la síntesis a nivel transcripcional y posttranscripcional. Es posible que alteraciones en la región promotora común situada entre los genes *carB* y *carRA* resulten en un incremento de la transcripción de estos genes.

7.2. Regulación posttranscripcional.

Las células contenían ARNm de los genes *carB* y *carRA* en varias circunstancias en las que no sintetizaban caroteno, por ejemplo, en la fase estacionaria, en cultivos iluminados del mutante *carA5* y en cultivos mixtos de *Phycomyces* en presencia de acetato. Debemos postular la existencia de algún mecanismo que impida la expresión de esos ARNm. Las investigaciones desarrolladas no han permitido decidir si tales mecanismos regulatorios actúan

sobre los ARNm, su traducción, la estabilidad y la actividad de las proteínas, el ensamblaje correcto de los agregados carotenogénicos o su actividad.

Sin embargo esta Tesis ha podido demostrar la acción posttranscripcional de dos grupos de agentes químicos: el retinol y sus análogos y el ftalato de dimetilo y otros fenoles, de manera que, de los cuatro grupos de agentes mencionados más arriba, dos actúan sobre la transcripción y otros dos después de la transcripción.

Un grupo numeroso de mutaciones indica la existencia de un mecanismo de regulación por retroinhibición, que detiene la síntesis cuando se ha alcanzado una cierta concentración de caroteno (Murillo y Cerdá-Olmedo, 1976; Cerdá-Olmedo, 1987; Bejarano *et al.*, 1988). La retroinhibición por producto final se atribuye a la acción de un complejo CarA: β -caroteno:CarS, resultado de la interacción del β -caroteno, cuando ha alcanzado una concentración suficiente, con los productos de los genes *carA* y *carS*. El retinol competiría con el β -caroteno y no formaría complejos activos. Esta hipótesis explica, no solo los muchos detalles fenotípicos conocidos de los mutantes de esos genes, sino también la concentración de caroteno en los mutantes *carB* y *carR* y en muchos mutantes dobles y la acción estimuladora del retinol y sus análogos. En todos esos casos hemos encontrado que los niveles de ARNm de los genes estructurales son similares a los de la estirpe silvestre sin activar. Esta observación refuerza el modelo de regulación por producto final y demuestra que es un mecanismo posttranscripcional.

La observación de que la cicloheximidina, un inhibidor de síntesis de proteínas, anula la estimulación de la carotenogénesis por retinol (Eslava *et al.*, 1974) sugiere que la inhibición por producto final actúa sobre la traducción de los ARNm a proteínas. De la misma manera podría interpretarse la observación de que los extractos celulares de los mutantes *carS*, *carB* y *carR* y de los cultivos en presencia de retinol tienen mayor actividad carotenogénica que los silvestres (Salgado *et al.*, 1991). Ninguna de estas observaciones es una prueba segura. Una acción diferente, pero no necesariamente alternativa, es la modificación de la actividad de los complejos carotenogénicos ya formados, como sugiere la acción de CarA en el funcionamiento de heterocariontes de alelos silvestres y mutantes *carR* (Torres-Martínez *et al.*, 1980).

El complejo CarA: β -caroteno:CarS es modificado por las mutaciones en los

genes *carC* y *carD*, cuyos productos génicos silvestres activan e inhiben, respectivamente, la función CarD (Salgado *et al.*, 1989; Salgado y Cerdá-Olmedo, 1992); como sería de esperar, las mutaciones *carC* y *carD* no modifican la transcripción.

La retroinhibición no es el único mecanismo que establece el nivel de caroteno, porque si no hubiera otro, se esperaría que los mutantes sin retroinhibición aumentarían linealmente su concentración de caroteno con el tiempo, como ocurre con la producción de giberelinas en *Fusarium fujikuroi* (Candau *et al.*, 1992). El ftalato de dimetilo representa una regulación posttranscripcional distinta de la del retinol y de todos los mutantes afectados en la retroinhibición.

Dos mutantes, que tienen casi tanto caroteno como el tipo silvestre, fueron aislados por F. J. Murillo en Sevilla como insensibles a la estimulación por retinol. Afectan a distintos genes, el gen estructural *carRA*, alelo *carA113*, y otro gen diferente, *carI*, del que no se conocen otros alelos (Roncero y Cerdá-Olmedo, 1982) y resultaron insensibles al ftalato de dimetilo (Bejarano *et al.*, 1988). Estos mutantes se pueden explicar asumiendo una interacción entre los productos génicos CarI y CarA que es impedida por las mutaciones citadas. El complejo CarI:CarA es necesario para la acción de los dos grupos de activadores químicos conocidos. De esta manera, la proteína CarI, cuando se une a la proteína CarA, que es la sintasa del fitoeno, primera enzima especializada de la ruta, constituye una especie de cerradura que permite a la llave constituida por el complejo CarA: β -caroteno:CarS detener el funcionamiento de todo el complejo carotenogénico y al ftalato de dimetilo y otros fenoles aumentar su actividad.

La discusión precedente y muchas otras observaciones que se encuentran en la literatura se pueden resumir en el esquema de la Figura 36, que describe la acción de los cuatro grupos de agentes estimuladores de la carotenogénesis y el papel de los principales genes descubiertos por el análisis genético.

Al esquema habría que incorporar adiciones menos seguras. El único mutante conocido del gen *carF* acumula muchísimo caroteno pero no difiere del tipo silvestre en sus niveles de ARNm de los genes estructurales. La mutación *carF* es sinérgica con *carS* y con el ftalato de dimetilo, lo que le da una personalidad

propia, pero no es sinérgica con el retinol, lo que indica alguna relación con la retroinhibición (Mehta *et al.*, 1997). La dificultad de obtenerlo sugiere que el mutante contiene una proteína de función especial y que la función normal del gen *carF* es desconocida.

Esta visión global se complica cuando se tienen en cuenta otros aspectos de la estimulación por la luz y el sexo. Como los carotenos coloreados son destruidos por la luz, el efecto estimulador de la luz sobre la carotenogénesis no siempre se puede establecer con facilidad; la literatura contiene afirmaciones contradictorias. Aparecen dos observaciones chocantes. Una es que la luz es incapaz de estimular la carotenogénesis en los mutantes *carA* (Salgado y Cerdá-Olmedo, 1992). El otro es que los mutantes "insensibles" *carA113* y *carI131* no son estimulables por el sexo, ni en cuanto a la producción de caroteno (Govind y Cerdá-Olmedo, 1986), ni en cuanto a la reproducción sexual (Roncero y Cerdá-Olmedo, 1982). Estas observaciones sugieren que el complejo CarI:CarA tiene una función adicional en la regulación de la transcripción.

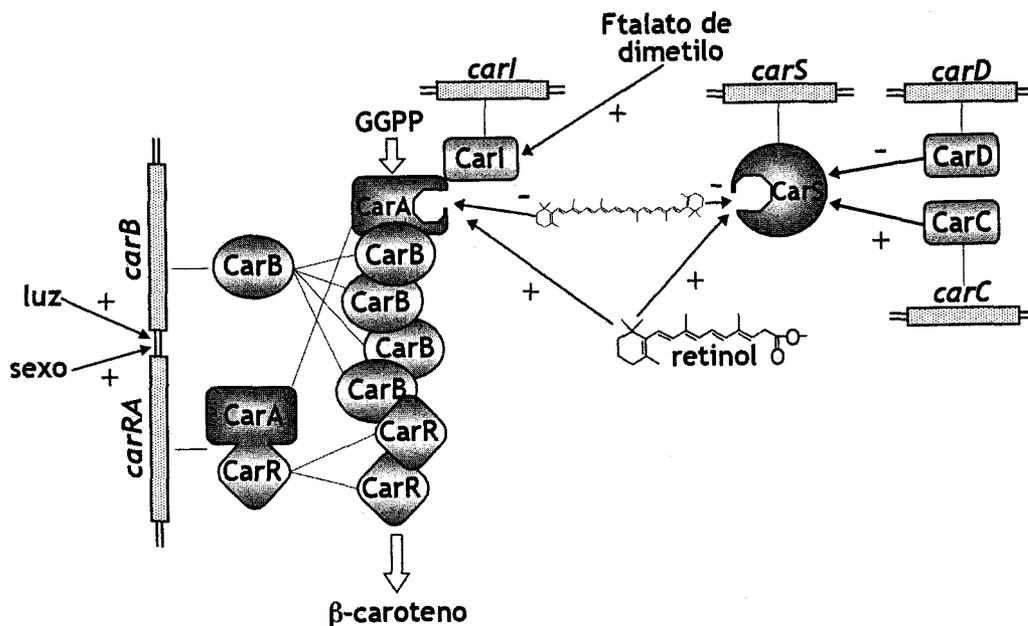


Figura 36: Hipótesis general de la biosíntesis de β-caroteno y su regulación en *Phycomyces*. Se representan los genes, sus productos y las interacciones entre los agentes que modifican la carotenogénesis. Los símbolos + y - representan efectos estimuladores e inhibidores, respectivamente. Los genes *carRA* y *carB* son responsables de las enzimas que convierten el GGPP en caroteno. Los otros genes *car* son reguladores. Las flechas indican acciones reguladoras.

Conclusiones

1. Se han establecido condiciones y métodos apropiados para el estudio de la expresión de los genes involucrados en la carotenogénesis en los hongos *Phycomyces* y *Blakeslea*.
2. Las circunstancias investigadas (estimulación por productos químicos, varios mutantes, interacción sexual, iluminación o efecto conjunto de estos dos últimos factores) no provocaron cambios detectables en los niveles de ARNm de los genes *hmgR* y *hmgS*.
3. La luz y la interacción sexual estimularon de manera sinérgica e independiente la transcripción de los genes *carRA* y *carB* de *Phycomyces*, responsables de las enzimas específicas para la producción de carotenos. El aumento en las concentraciones de ARNm fue aproximadamente el mismo que en el contenido de carotenos.
4. El retinol y el ftalato de dimetilo estimularon la carotenogénesis de *Phycomyces* a través de distintos mecanismos posttranscripcionales.
5. Las mutaciones de los genes *carA*, *carR*, *carB*, *carI*, *carS*, *carD* y *carF* no impidieron que la luz incremente la transcripción de los genes específicos de los genes específicos para la carotenogénesis de *Phycomyces*.
6. *Blakeslea* no se comportó como *Phycomyces* en cuanto a la transcripción del gen *carRA*. En este organismo, la interacción sexual causó un pequeño incremento en el nivel de ARNm del gen *carRA*. Sin embargo, el aumento en la transcripción no justifica la gran acumulación de caroteno en cultivos mixtos lo que sugiere la existencia de un mecanismo posttranscripcional complementario. El acetato inhibió fuertemente la estimulación sexual de la carotenogénesis en *Phycomyces* y en *Blakeslea*, pero solamente abolió el incremento de la transcripción debido al sexo en *Blakeslea*.

7. Las diferencias en las concentraciones de carotenos o en la sensibilidad a estímulos que caracterizan los mutantes *car* no se deben a variaciones en la transcripción de los genes de la carotenogénesis. Las mutaciones analizadas modifican la regulación posttranscripcional de la expresión génica. Los niveles de ARNm de la estirpe silvestre fueron suficientes para que el mutante más carotenogénico produzca setenta veces más caroteno que esa estirpe.

8. La presencia de ARNm de los genes de la carotenogénesis cuando no hay síntesis de carotenos, como en la fase estacionaria y en cultivos mixtos de *Phycomyces* suplementados con acetato, sugiere la existencia de un mecanismo de regulación posttranscripcional que impide la expresión de esos ARNm.

9. La regulación por producto final de la carotenogénesis es un mecanismo posttranscripcional.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Estirpes y plasmidos

1.1. Estirpes

Las estirpes de *Phycomyces blakesleeanus* Burgeff y de *Blakeslea trispora* Thaxter utilizadas en este trabajo se indican en la Tabla M1 junto con su genotipo y origen. La nomenclatura empleada para las estirpes de *Phycomyces* es la de Demerec *et al.* (1966).

Las estirpes de *Blakeslea* se obtuvieron de la Colección Rusa de Microorganismos (VKM Moscú, Rusia). Las estirpes de *Phycomyces* se designan con una o más letras mayúsculas según su procedencia, NRRL1555 y NRRL1554 se obtuvieron del Northern Regional Research Laboratory (ahora llamado National Center for Agricultural Utilization Research, Peoria, Illinois, EE.UU.). A56 y A98 proceden de la colección del Profesor Arturo Pérez Eslava en el Departamento de Genética de la Universidad de Salamanca. Las estirpes C2, C5, C9 y C115 proceden de la colección del profesor Max Delbrück en el California Institute of Technology (Pasadena, California, EE.UU.). Las estirpes designadas con una S son originales de nuestra colección en el Departamento de Genética de la Universidad de Sevilla.

Los signos (+) y (-) designan los sexos, los genotipos de los mutantes se nombran con tres letras minúsculas que indican el proceso biológico afectado. Los genotipos *geo* y *mad* designan respectivamente mutaciones que afectan al geotropismo y al fototropismo. La presencia de la mutación *nicA101* provoca auxotrofia para ácido nicotínico.

Los genotipos *car* señalan mutaciones que afectan a la síntesis de carotenos. Mientras que las estirpes silvestres son de un color amarillento, los mutantes de los genes *carA*, *carRA* y *carB* son blancos, los mutantes del gen *carR* son rojos, los mutantes de los genes *carD*, *carS* y *carF* tienen color amarillo intenso, los doble mutantes *carF carS* son de un color naranja intenso, los mutantes del gen *carC* y el doble mutante *carA carS* son amarillos. El mutante del gen *carI* y la estirpe S119, mutada en el gen *carA*, ambos de color parecido al de las estirpes silvestres, son insensibles a estímulos que incrementan la síntesis de carotenos.

Tabla M1: Estirpes utilizadas en esta tesis

Estirpe	Genotipo	Origen	Referencia
<i>Phycomyces blakesleeanus</i>			
NRRL1555	(-)	Silvestre	
NRRL1554	(+)	Silvestre	
A56	(+)	A32 × NRRL1555	Salgado <i>et al.</i> , 1989
A98	<i>carC652</i> (-)	NRRL1555 (NQO)	Revuelta y Eslava, 1983
C2	<i>carA5</i> (-)	NRRL1555 (NTG)	Bejarano <i>et al.</i> , 1991; Salgado <i>et al.</i> , 1991; Roncero y Cerdá-Olmedo, 1982
C5	<i>carB10 geo-10</i> (-)	NRRL1555 (NTG)	Cerdá-Olmedo y Rau, 1970
C9	<i>carR21</i> (-)	NRRL1555 (NTG)	Roncero y Cerdá-Olmedo, 1982; Bejarano <i>et al.</i> , 1991
C115	<i>carS42 mad-107</i> (-)	NRRL1555 (NTG)	Meissner y Delbrück, 1968
S92	<i>carRA91</i> (-)	NRRL1555 (NTG)	Salgado <i>et al.</i> , 1991
S119	<i>carA113</i> (-)	NRRL1555 (NTG)	Roncero y Cerdá-Olmedo, 1982; Bejarano <i>et al.</i> , 1991
S144	<i>carI131</i> (-)	NRRL1555 (NTG)	Roncero y Cerdá-Olmedo, 1982
S226	<i>carD172 nicA101</i> (-)	NRRL1555 (NTG)	Salgado <i>et al.</i> , 1989
S470	<i>carA87 carS42</i> (-)	C115 × S200	Salgado <i>et al.</i> , 1991; Salgado y Cerdá-Olmedo, 1992
S561	<i>carF181</i> (-)	(S556*B36) × S102	Mehta <i>et al.</i> , 1997
S566	<i>carS42 carF181</i> (+)	(S556*B36) × S102	Mehta <i>et al.</i> , 1997
<i>Blakeslea trispora</i>			
F921	(-)	Silvestre	
F986	(+)	Silvestre	

(+) y (-) designa los sexos. Los genotipos *car*, *geo* y *mad* designan mutaciones que afectan a la carotenogénesis, el geotropismo y el fototropismo respectivamente. El genotipo *nic* causa auxotrofia para el ácido nicotínico. El símbolo * separa los genotipos de los núcleos de los heterocariontes, el símbolo × separa los parentales de los cruzamientos. NTG exposición a N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina; NQO exposición a 4-nitro-quinolina-1-óxido.

1.2. Plásmidos

pKH5 (Obraztsova *et al.*, 2003)

Sus 8,8 kb contienen el plásmido Bluescript II KS (Stratagene, La Jolla, California, EE.UU.), la secuencia completa del gen *carB* de *Phycomyces* y una secuencia autorreplicativa de este organismo. Por digestión con *ScaI* dio un fragmento de 1,1 kb que se utilizó como sonda de *carB* en experimentos de hibridación.

pJR19 (Ruiz Albert, 1999)

Plásmido pGEM-T (Promega, Madison, Wisconsin, EE.UU.) con un fragmento de 130 pb del gen *hmgS* de *Phycomyces*. Por digestión con *ApaI* y *SaII* dio la sonda de *hmgS* usada en experimentos de hibridación.

pJR20 (Ruiz Albert, 1999)

Contiene un fragmento de 3,7 kb con el gen *hmgR* de *Phycomyces* clonado en el sitio *EcoRV* del plásmido Bluescript II KS (+). Por digestión con *EcoRI* y *SaII* dio la sonda de *hmgR* usada en los primeros experimentos de hibridación.

pPLJ1 (Corrochano y Ávalos, 1992)

Contiene un fragmento de 315 pb del gen *hmgR* de *Phycomyces* clonado en el sitio *EcoRV* del pBluescript II KS. Dicho fragmento codifica los aminoácidos 836 a 940 de la proteína HMGR. Por digestión con *EcoRI* e *HindIII* y dio la sonda de *hmgR* usada en la mayoría de los experimentos de hibridación.

2. Medios y condiciones de cultivo

2.1. Medios de cultivo

Tanto *Phycomyces* como *Blakeslea* se cultivaron en medio mínimo (Cerdá-Olmedo y Lipson, 1987) que contiene 20 g/l de glucosa como fuente de carbono; 2 g/l de L-asparagina como fuente de nitrógeno; 5 g/l de KH_2PO_4 ; 0,5 g/l de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 10 ml de una solución 100 veces concentrada de CaCl_2 para obtener una concentración final de 2,8 g/l; y 10 ml de una solución concentrada 100 veces que provee al medio: 0,1 g/l de tiamina; 0,2 g/l de ácido cítrico; 0,15 g/l de $\text{Fe}(\text{NO}_3) \cdot 9\text{H}_2\text{O}$; 0,03 g/l de $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$; 0,005 g/l de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ y 0,005 g/l de $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. Las soluciones concentradas se mantienen más de un año a temperatura ambiente en presencia de unas gotas de cloroformo.

En este trabajo se utilizó un medio mínimo sólido obtenido añadiendo 15 g/l de

agar al medio mínimo. En algunos casos puntuales se utilizó un medio nutritivo obtenido añadiendo al medio mínimo 1 g/l de extracto de levadura.

Cuando fue necesario, el medio mínimo se suplementó como sigue:

Retinol 0,75 mM, en forma de acetato de retinol (Sigma Chemical, St. Louis, Missouri, EE.UU.), disuelto previamente en etanol y emulsionado con monooleato de polioxietilenosorbitol (Tween 80), se añade al medio autoclavado antes de verterlo en cajas de Petri. Las concentraciones finales de etanol y Tween 80 en el medio son de 1,6 ml/l y 5 ml/l respectivamente.

Ftalato de dimetilo 2 mM, suministrado por Fluka Chemika (Buchs, Suiza) y previamente disuelto en etanol cuya concentración final en el medio es 4 ml/l, se añade al medio ya autoclavado.

Acetato sódico 10 mM, 820,3 mg/l fueron añadidos al medio antes de autoclavar.

2.2. Condiciones de cultivo

Las condiciones de cultivo establecidas tras varios ensayos previos fueron las siguientes: se cubrió el agar con un disco de celofán previamente lavado en agua destilada y autoclavado entre hojas húmedas de papel de filtro; la función de este disco es facilitar la recogida de los micelios. Cada caja Petri (8,5 cm de diámetro interno) se inoculó con 100 μ l de una suspensión de esporas frescas (de edad inferior a una semana) en agua destilada que contenía 10^5 esporas previamente activadas por calentamiento durante 15 min a 48 °C. Las esporas se extendieron por toda la superficie del agar con un asa de acero. Los cultivos se incubaron de 2 a 5 días a 22 °C y en oscuridad, salvo en los experimentos de fotoestimulación.

2.3. Condiciones de iluminación

Se compararon los niveles de ARN mensajero de los genes *carRA* y *carB* de micelios cultivados en oscuridad con aquellos de micelios expuestos a fotoestimulación crónica o a fotoestimulación aguda. También se probó el efecto de la luz sobre la transcripción de los genes *carRA* y *carB*, en micelios de tres días que se sometieron a periodos de 12 h de iluminación en distintas etapas de madurez.

El efecto de la fotoestimulación crónica se consiguió en micelios iluminados continuamente con 1 Wm⁻² de luz blanca procedente de una batería de cinco lámparas

fluorescentes (Philips TLD 36 W/54 CE) instaladas sobre una lamina de vidrio difusora. Los cultivos iluminados por 12 h a distintas etapas de maduración estuvieron expuestos a esta esta misma bateria de lámparas.

Para conseguir el efecto de la fotoestimulación aguda sobre el micelio, tras el cultivo en oscuridad, tres cajas de Petri se colocaron en el fondo de una caja oscura iluminada por arriba por un proyector de diapositivas (Hanimex 2100EF) dotado de una lámpara incandescente de 50 W. Entre el proyector y la caja oscura se encontraban dos filtros anticalóricos KG-1 (Schott, Mainz, Alemania). Los micelios recibían un flujo de luz blanca de $9,24 \text{ W m}^{-2}$. Tras el tiempo de iluminación deseado, los micelios se recogían con pinza y se congelaban inmediatamente en nitrógeno líquido.

El flujo luminoso se midió con un fotodiodo de silicio PIN-10DP/SB (United Detector Technology, Hawthorne, California, EE.UU.) conectado a un picoamperímetro 485 (Keithley Instruments, Cleveland, Ohio, EE.UU.).

3. Extracción y análisis de carotenos

3.1. Extracción de carotenos

Se trituró en un mortero con arena de mar lavada (Panreac Química, Barcelona) una masa conocida de micelio liofilizado hasta obtener un polvo fino, que se lavó con éter de petróleo cuantas veces fueron necesarias para la extracción completa de los carotenos. La solución de carotenos se centrifugó 5 min a $1000 \times g$ para eliminar restos de micelio y arena y se evaporó a $45 \text{ }^\circ\text{C}$ en un rotaevaporador (RE 111 Büchi, Flawil, Suiza) conectado a una bomba de vacío D1 (Edwards, Ringoes, New Jersey, EE.UU.). Los carotenos se resuspendieron en 1 ml de *n*-hexano para análisis cromatográfico.

A fin de minimizar la oxidación y la isomerización de los carotenos, las manipulaciones se realizaron, siempre que fue posible, en hielo con luz indirecta y bajo una atmósfera de nitrógeno.

3.2. Análisis de carotenos por HPLC

Para el análisis cualitativo y cuantitativo de los carotenos se inyectó una fracción de 20 μl del extracto en *n*-hexano en un cromatógrafo líquido de alta presión (HPLC) (Series 1100, Hewlett-Packard, Palo Alto, California, EE.UU.) equipado con un detector de diodos G1315A, un inyector automático de muestras G1313A, un degasificador G1322A

y una bomba cuaternaria G1311. Las muestras se eluyeron a temperatura ambiente con una mezcla de metanol:acetonitrilo:cloroformo (47:47:6 v/v/v) a un flujo de 1 ml/min y se separaron en una columna C18 de 4,6 x 100 mm de gel de sílice de 5 µm recubierto de octadecilsilano (Hypersil-ODS, Waters Corporation, Milford, Massachusetts, EE.UU.) protegida por una precolumna de 10 mm con el mismo material (Alltech, Deerfield, Illinois, EE.UU.). El sistema fue calibrado con patrones puros de fitoeno, ζ-caroteno, licopeno, γ-caroteno y β-caroteno, disponibles en el laboratorio.

4. Extracción y manipulación de ácidos nucleicos

4.1. Extracción de ADN de *Phycomyces*

Para obtención de ADN genómico de *Phycomyces* se utilizó un método ya descrito (Weinkove *et al.*, 1998; Giordano *et al.*, 1999) con algunas modificaciones. Se inocularon 10⁶ esporas en 200 ml de medio nutritivo y se incubó en agitación a 22 °C durante 48 h. Se recogió el micelio por filtración, se lavó con agua estéril, se secó con papel de filtro y se trituró en un mortero con nitrógeno líquido. Una vez se obtuvo un polvo fino y antes de que se descongelara se pasó a un tubo de 50 ml con 7 ml de tampón de extracción, se añadieron 0,5 ml de una solución de 100 g/l de dodecil sulfato de sodio (SDS), se mezcló suavemente y se incubó a 65 °C durante 30 min. Luego se añadieron 2 ml de una solución de acetato potásico 5 M, se mezcló suavemente y se incubó en hielo de 30 a 60 min, se centrifugó 10 min a 9000 x g, se transfirió el sobrenadante a un tubo de 50 ml filtrándolo a través de gasa autoclavada, se le añadieron dos volúmenes de etanol 960 ml/l, se mezcló suavemente y se incubó a 4 °C durante una noche. Se centrifugó 10 min a 9000 x g, se descartó el sobrenadante y se enjuagó el precipitado dos veces con 2 ml de etanol 700 ml/l, centrifugando cada vez 10 min a 9000 x g para eliminar el sobrenadante. Se resuspendió el precipitado en 3 ml de tampón TE, se añadieron 15 µl de una solución de 1 g/l de ARNasa, se incubó durante 30 min a 37 °C, se mezcló con un volumen de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1 v/v/v) y se centrifugó a 3500 x g por 5 min. Se pasó la fase acuosa superior a un nuevo tubo al cual se le añadió, lentamente por las paredes, 1 volumen de isopropanol, se mezcló muy suavemente hasta precipitar el ADN, se centrifugó a 1000 x g durante 5 min, se enjuagó el precipitado con 2 ml de etanol (700 ml/l), se centrifugó 10 min a 9000 x g para eliminar el sobrenadante, se dejó secar y se resuspendió el ADN en tampón TE.

Tampón de extracción: Etilen-diaminotetraacetato disódico (EDTA) 20 mM en tampón tris (hidroximetil) aminometano (Tris)-HCl 50 mM pH 7,5.

Tampón TE: EDTA 1 mM en tampón Tris-HCl 10 mM a pH 7,5.

4.2. Extracción de ARN total de *Phycomyces*

Los micelios, cultivados sobre celofán en agar, se recogieron con pinzas y se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido. Para la extracción de ARN total se partió de aproximadamente 75 mg de micelio triturado en mortero con auxilio de nitrógeno líquido. Para cada muestra se lavó el mortero con jabón, se enjuagó sucesivamente con agua destilada, con etanol (960 ml/l) y con cloroformo, se secó y se enfrió con nitrógeno líquido. Una vez obtenido un polvo fino y antes de que se descongelara se pasó a un tubo de 2 ml con la solución de extracción. Se utilizó el *kit RNAgents*, para aislamiento de ARN total (Promega) con el protocolo suministrado por el fabricante. El ARN quedó disuelto en 25 µl de agua. Los micelios congelados en nitrógeno líquido se pueden guardar a -80 °C para uso posterior. Las muestras de ARN se almacenaron a -20 °C.

Durante todos los procesos que implican manipulación de ARN se utilizaron guantes. Todo el material de plástico usado provenía de envases nuevos y se reservaron para uso en manipulación de ARN. A todas las soluciones y el agua destilada que entran en contacto con el ARN se añadieron 1 ml de dietilpirocarbonato por litro, se agitaron para dispersar el producto, se incubaron al menos 2 horas y se autoclavaron antes de ser usadas.

4.3. Cuantificación de ácidos nucleicos

Las muestras de ADN y fragmentos de ADN del fago λ de tamaño y concentración conocidas se fraccionaron por electroforesis en gel de agarosa con 0,5 mg/l de bromuro de etidio. Se estimó la concentración de ADN comparando la fluorescencia de las bandas obtenidas.

Para mayor precisión se midió en espectrofotómetro (DU 640, Beckman, Fullerton, California, EE.UU.) la absorbancia a 260 nm de 100 µl de del ADN en agua destilada. Se asume que 1 unidad de absorbancia equivale a una concentración de 50 mg/l para el ADN bicatenario, de 40 mg/l para ARN y de 37 mg/l para oligonucleótidos.

4.4. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Se empleó para multiplicar fragmentos de ADN usando una polimerasa termoestable y un par de oligonucleótidos que sirven como cebadores de la enzima. Se utilizó la polimerasa de ADN EcoTaq (Ecogen, Barcelona), suministrada con su tampón, y una solución de MgCl₂ a 50 mM. Para las reacciones se mezclaron en frío 10,2 µl de agua, 2 µl de tampón, 0,6 µl de la solución de MgCl₂ a 50 mM, 2 µl de una mezcla de los cuatro dNTPs (2 mM cada uno), 2 µl de cada cebador a 10 µM cada uno, 1 µl de una solución de DNA (aproximadamente 1 ng) y 0,2 µl (1 U) de polimerasa. Las reacciones se incubaron en un termociclador Techgene FT Gene 2D (Techne, Cambridge, Reino Unido) con el siguiente programa: un primer ciclo de 2 min a 94 °C, seguido de 35 ciclos de 1 min a 94 °C (desnaturalización), 1 min a la temperatura establecida empíricamente para cada par de cebadores (apareamiento de cebadores), 1 min por cada kb del producto a 72 °C (polimerización); al final de estos 35 ciclos la reacciones se mantuvieron 10 min a 72 °C.

4.5. Digestión de ADN con restrictasas

Las endonucleasas de restricción que se emplearon para digerir ADN plasmídico se adquirieron a Boehringer Mannheim (Mannheim, Alemania) y Amersham Pharmacia Biotech (Uppsala, Suecia) y se usaron siguiendo las recomendaciones de los fabricantes incubando volúmenes de 20 a 50 µl durante al menos 2 h a la temperatura recomendada.

Se confirmaron las digestiones fraccionando una alícuota de la reacción a través de electroforesis en gel de agarosa.

4.6. Electroforesis de ADN

Los fragmentos de ADN se separaron según sus tamaños mediante electroforesis en gel de agarosa. Los geles se prepararon mezclando agarosa con tampón TAE (10 g/l), calentando en microondas hasta que se disolvió la agarosa, añadiendo bromuro de etidio (0,5 mg/l) y vertiendo la mezcla en una bandeja de electroforesis con un peine. Las muestras se prepararon en tampón de carga. Como patrón de peso molecular se empleó una "escalera de 1 kb" (Gibco brl Life Technologies, Nueva York, NY, EE.UU.). El gel se sumergió en tampón TAE y se sometió a un campo eléctrico de 5 a 12 V/cm de longitud del gel.

Para hacer visible el ADN, los geles se iluminaron con un transiluminador ultravioleta (TFM-40, UVP Ultra-violet Products, Upland, California, EE.UU.).

Tampón TAE: EDTA 1 mM en Tris-acetato 2 M a pH 8,0. Se prepara cincuenta veces más concentrado

Tampón de carga: 100 ml/l de glicerol, con los colorantes xilencianol (2,5 g/l) y azul de bromofenol (0,5 g/l) (ambos, Sigma Chemical). Se prepara cinco veces más concentrado.

4.7. Electroforesis de ARN

Para comprobar la integridad del ARN, se sometió 0,5 μ l de cada muestra a electroforesis siguiendo el procedimiento descrito para el ADN, excepto que se usaron 12g/l de agarosa y que se lavaron todos los materiales con jabón y agua tratada con dietilpirocarbonato.

Para preparar geles desnaturalizantes se suspendió agarosa (12 g/l) en agua destilada tratada con dietilpirocarbonato, se fundió en microondas, se enfrió en un baño a 65 °C, se añadió una décima parte de su volumen de tampón MOPS y formaldehído hasta una concentración final de 0,7 M. Para que solidificara, se vertió en una bandeja de electroforesis con un peine.

Las muestras de ARN se prepararon mezclando 20 μ g de ARN con 2 μ l de tampón MOPS, 3,5 μ l de formaldehído 12,3 M y 10 μ l de formamida en un volumen final entre 20 μ l y 30 μ l, dependiendo de la concentración del ARN. La mezcla se calentó a 65 °C durante 15 min y se le añadió 3 μ l de tampón de carga.

El ARN se fraccionó en el gel de electroforesis sumergido en tampón MOPS diluido 10 veces y sometido a un campo eléctrico de 5 V/cm de longitud de gel.

Tampón de carga para ARN: 500 ml/l de glicerol, EDTA 1 mM a pH 8 y 2,5 g/l de cada uno de los colorantes azul de bromofenol y xilencianol (ambos, Sigma Chemical).

Tampón MOPS: Se disolvió ácido 3-[β -monorfolino]propanosulfónico (0,2 M) y acetato sódico (80 mM) en agua tratada con dietilpirocarbonato. Se ajustó a pH 7 con NaOH 2 N. Se añadió EDTA hasta 1 mM. Si para hacer el tampón se partía de soluciones concentradas (acetato sódico y EDTA), estas eran preparadas en agua tratada con dietilpirocarbonato. El tampón se filtró a través de una membrana con poro de 0,2 μ m de diámetro y se guardó a temperatura ambiente protegido de la luz.

5. Detección de secuencias de ARN por hibridación

5.1. Transferencia de ARN de geles de agarosa a membrana

Una vez finalizada la electroforesis, el ARN fraccionado en el gel se transfirió por capilaridad a una membrana de nailon (Hybond N, Amersham Pharmacia Biotech) en tampón SSC durante 1 a 16 h (Chomczynski y Mackley, 1994). el ARN transferido se fijó covalentemente por irradiación ultravioleta de ambas caras de la membrana (700 J/m^2) en una cámara de irradiación (Ultraviolet crosslinker, Amersham Pharmacia Biotech). Para tener el ARN se bañó la membrana durante 3 min en solución de tinción y se lavó en agua destilada.

Tampón SSC: NaCl 1,5 M y citrato trisódico 0,1 M a pH 7.

Solución de tinción: 2 g/l de azul de metileno en acetato sódico 0,3 M a pH 5,2.

5.2. Sondas para ARN mensajeros

Fueron obtenidas por excisión de un fragmento de un plasmido o por multiplicación por PCR y se describen en la tabla M2.

5.3. Marcaje radioactivo de sondas

Se desnaturalizó el ADN (entre 50 ng y 100 ng en $36,5 \mu\text{l}$ de agua) calentándolo a 100°C por 10 min, se transfirió inmediatamente a agua con hielo, se añadió $5 \mu\text{l}$ de una solución de dATP, dGTP y dTTP (0,5 mM cada uno); $5 \mu\text{l}$ de hexanucleótidos (*Hexanucleotide Mix 10X*, Roche, Mannheim, Alemania); 2 U de polimerasa de ADN de Klenow (Roche) y $2,5 \mu\text{l}$ de $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$ ($0,37 \text{ TBq/l}$, 110 PBq/mol) y se incubó por 1 h a 37°C . Se eliminaron los nucleótidos no incorporados haciendo pasar la muestra a través de una columna de dextrano (Sephadex G-50, Amersham Pharmacia Biotech). La radioactividad incorporada en la sonda se midió en un contador de centelleo (1409, Wallac, Turku, Finlandia) $1 \mu\text{l}$ del producto diluido en 5 ml de líquido de centelleo (cocktail Biogreen 3, Scharlau, Barcelona). La sonda marcada puede ser guardada a -20°C .

Columna de Sephadex G-50: Se quitó la tapa y la corona de dos tubos eppendorf de 1,5 ml, se perforó el fondo de uno y se puso una capa de lana de vidrio siliconizada (Supelco, Bellefonte, Pensilvania, EE.UU.). Dentro de un tubo de 10 ml ($10 \times 1,5 \text{ cm}$) se puso el tubo agujereado sobre el no agujereado y se añadió a aquel $800 \mu\text{l}$ de dextrano

(se hirvió 66,6 g/l de Sephadex G-50 en TE hasta que el dextrano se hinchó). Para empaquetar la columna se centrifugó en cubeta basculante a 900 x g durante 3 min y se descartó el tampón eluído al tubo inferior. Se cargó la sonda marcada sobre la columna, se volvió a centrifugar a 900 x g durante 3 min y se recogió la sonda purificada en un nuevo tubo inferior.

5.4. Hibridación y cuantificación

La membrana de nailon con el ARN fijado se incubó con solución de hibridación bajo agitación suave y constante en un horno a 65 °C durante al menos 1 h. Se cambió la solución de hibridación por otra que llevaba la sonda de ADN marcada y desnaturalizada (se hirvió por 10 min), se incubó de igual manera durante al menos 12 h. Se incubó la membrana hibridada dos veces con solución de lavado precalentada a 55 °C, la primera durante 5 min con agitación suave a temperatura ambiente y la segunda durante 1 h bajo las mismas condiciones de la hibridación. La membrana lavada se envolvió con un filme de plástico para evitar que se secase.

La radioactividad unida al ARN se cuantificó en un analizador de radiación Fla-3000 (Fujifilm) que almacena electrónicamente una densitometría de la radioactividad de la membrana. Esta densitometría se puede imprimir o someter a análisis cuantitativos, estas imágenes son las que se presentan en esta tesis. Además se expuso la membrana a una película Kodak Biomax MR entre pantallas amplificadoras de señal Hyperscreen (Amersham Pharmacia Biotech) a -80 °C para obtener una imagen alternativa.

La radioactividad fijada a la membrana se puede eliminar sumergiéndola en solución de deshibridación hirviendo con agitación; 10 min es usualmente suficiente. Es necesario que la membrana no se seque para que la radioactividad pueda ser eliminada completamente. Las membranas pueden ser hibridadas varias veces y las soluciones de sondas marcadas pueden ser reutilizadas mientras mantengan radioactividad.

Solución SSPE: NaCl 3 N; NaH₂PO₄ 0,2 M y EDTA 20 mM. Se ajustó el pH a 7,4 con NaOH 10 N.

Solución de hibridación: 70 g/l de SDS; EDTA 0,5 M en tampón fosfato sódico 0,5 M a pH 7,0;

Solución de lavado: 5 ml/l de SSPE; 5 g/l de SDS; EDTA 5 mM.

Solución de deshibridación: 10 g/l de SDS; 5 ml/l de SSPE.

Tabla M2: Sondas para ARN mensajeros

Sonda	Contenido	Obtención
Act-P	Fragmento de 874 pb que compone parte de un gen de actina (<i>actA</i>) de <i>Phycomyces</i>	PCR con cebadores: CTCAACCCTAAGTCTAACCG CACCGATCCAGACAGAGTAC
Act-B	Fragmento de 922 pb que contiene parte de un gene de actina (<i>actA</i>) de <i>Blakeslea</i>	PCR con cebadores: GTTGCTCCTGAAGAACACCC AGAGAGGCCAAGATGGAACC
HmgS-P1	Fragmento de 130 pb que contiene parte del gen <i>hmgS</i> de <i>Phycomyces</i>	Digestión de pJR19 con <i>Apal</i> y <i>Sall</i> .
HmgS-P2	Fragmento de 1731 pb con el gen <i>hmgS</i> de <i>Phycomyces</i>	PCR con cebadores: TCGGTGCCTTTTGTCC AGGATGACTATAGACAGCC
HmgR-P1	Fragmento de 3,7 kb con el gen <i>hmgR</i> de <i>Phycomyces</i>	Digestión de pJR20 con <i>EcoRI</i> y <i>Sall</i> .
HmgR-P2	Fragmento de 315 pb que contiene parte de gen <i>hmgR</i> de <i>Phycomyces</i>	Digestión de pPLJ1 con <i>EcoRI-HindIII</i> .
HmgR-P3	Fragmento de 1428 pb que contiene el dominio catalítico del gen <i>hmgR</i> de <i>Phycomyces</i>	PCR con cebadores: CGTACACCGCAAATGTTGAACG TGTAGGTGTGTAAGTGAATG
CarRA-P	Fragmento de 2230 pb con el gen <i>carRA</i> de <i>Phycomyces</i>	PCR con cebadores: GCGCGCATGCTGACTTATATGGAAG CAGTACTAAGCACCATTAC
CarRA-B	Fragmento de 1025 pb que contiene la región <i>R</i> del gen <i>carRA</i> de <i>Blakeslea</i>	PCR con cebadores: ATGTTGACATAGCGTGTATG GCTGATAGTAAGATCATCAAC
CarB-P	Fragmento de 1305 pb con el gen <i>carB</i> de <i>Phycomyces</i>	Digestión de pKH5 con <i>Scal</i> .

6. Análisis de proteínas

6.1. Extracción de proteínas de *Phycomyces*

El micelio cultivado sobre celofán, se recogió con pinzas, se congeló en nitrógeno líquido, se trituró en mortero sumergido en nitrógeno líquido hasta convertirse en un polvo fino. Se pasó aproximadamente 25 mg del polvo congelado a un tubo de 1,5 ml con 20 μ l de tampón de carga para proteínas, se añadió 20 μ l de agua destilada, se hirvió por 5 min para desnaturalizar las proteínas y se centrifugó a 15000 x g durante 5 min. El sobrenadante, en el que sería conveniente estimar la concentración de proteínas, está listo para ser cargado en el gel. Las muestras de proteína se almacenaron a -20 °C.

Tampón de carga para proteínas: 100 ml/l de glicerina; 20 g/l de SDS; 50 ml/l de β -mercaptoetanol; 12,5 mg/l de azul de bromofenol en Tris-HCl 62,5 mM a pH 6,8.

6.2. Fraccionamiento de proteínas en geles desnaturalizantes

Para el fraccionamiento de proteínas se utilizó el método conocido como SDS-PAGE (electroforesis en gel de poliacrilamida y SDS) desarrollado por Laemmli (1970). El gel se compone de una zona de apilamiento, de 1 cm de longitud, en la cual las proteínas se concentran seguida de una zona de fraccionamiento de 5 cm de longitud. Las electroforesis se corrieron en una cubeta (Mini-Protean 3 Cell, Bio-Rad, Munich, Alemania) a la que se aplicó un campo eléctrico de 200 voltios durante 45 min. Como marcador de tamaño se utilizó una mezcla comercial de proteínas (Wide Molecular Weight Range, Sigma Chemical).

Gel de apilamiento: Tris-HCl 125 mM a pH 6,8; 1 g/l de SDS; 40 g/l de acrilamida:N,N`metilenbisacrilamida 29:1 (p/p), para polimerizar 1 g/l de persulfato amónico y 1 ml/l de N,N,N`,N`-tetrametiletilediamida (TEMED).

Gel de fraccionamiento: Tris-HCl 375 mM a pH 8,8; 1 g/l de SDS; 120 g/l de acrilamida:N,N`metilenbisacrilamida 29:1 (p/p), para polimerizar 1 g/l de persulfato amónico y 0,5 ml/l de TEMED.

6.3. Tinción con azul de Coomassie

El gel se incubó en la solución de tinción durante 30 min y en la solución de destinción hasta que se vieron las bandas correspondientes a las proteínas.

Solución de tinción: 0,25 g/l de azul de Coomassie ("brilliant blue" R-250, Sigma

Chemical), 100 ml/l de ácido acético y 100 ml/l de metanol.

Solución de destinción: 100 ml/l de ácido acético y 100 ml/l de metanol.

6.4. Inmunodetección con anticuerpos conjugados con peroxidasa y quimioluminiscencia

Este método permite determinar la presencia y cantidad relativa de los antígenos correspondientes a un anticuerpo. Se fraccionaron los extractos proteicos por electroforesis y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Immobilon-P, Millipore, Billerica, Massachusetts, E.E.U.U.). Para ello se cortó al gel la banda superior, de 1 cm, correspondiente a la zona de apilamiento, se equilibró en tampón de transferencia durante 15 min. La membrana, del mismo tamaño que el gel, se activó sumergiéndola 30 s en metanol, se enjuagó en agua destilada y se sumergió en tampón de transferencia durante 15 min. Seis rectángulos de papel whatman (3 MM) se empaparon en tampón de transferencia y se escurrieron. La transferencia se realizó en una aparato comercial (Trans-Blot Semi-Dry Electrophoretic Cell, Bio-Rad) colocando sobre la placa del ánodo, y en este orden, 3 rectángulos de papel Whatman, la membrana tratada, el gel equilibrado y otros 3 rectángulos de papel Whatman. Se cubrió el conjunto con la placa del cátodo y se aplicó una corriente de 20 V durante 30 min.

Para confirmar la transferencia se tiñó la membrana con solución de Ponceau S durante 3 min y se destiñó con agua hasta ver las proteínas transferidas.

La membrana de nitrocelulosa, con las proteínas adsorbidas, se incubó en solución de bloqueo durante 2 h a temperatura ambiente o toda la noche a 4 °C con agitación suave. Se cambió la solución por una nueva solución de bloqueo a la que se le añadió una solución del suero específico de conejo diluido según indique ensayos previos, y se incubó 2 h a temperatura ambiente o toda la noche a 4 °C con agitación suave. Seguidamente se lavó cuatro veces con solución de lavado, 5 min cada vez, se incubó 90 min a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario conjugado a peroxidasa (Anti-Rabbit IgG (H+L)-HRP Conjugate, Bio-Rad) diluida 5000 veces en solución de lavado y se volvió a lavar como antes.

Para detectar la señal del anticuerpo mediante quimioluminiscencia catalizada por peroxidasa se mezclaron los sustratos de la reacción (reactivos A y B, ECL Western Blotting Reagents, Amersham Pharmacia Biotech) en un volumen final de 1 ml, se extendió

esta mezcla sobre la membrana y se incubó en oscuridad durante 2 min. Inmediatamente se expuso a una película fotográfica de 1 y 30 s según las muestras.

Tampón de transferencia: Tris 25 mM, glicerina 192 mM y 200 ml/l de metanol.

Solución de Ponceau S: 5 ml/l ácido 3-hidroxi-4-[2-sulfo-4-(4-sulfofenilazo)fenilazo]-2,7naftalenedisulfonato sódico (Ponceau S, Sigma Chemical) en 10 ml/l de ácido acético.

Solución de lavado: 2,5 ml/l Tween 20, NaCl 200 mM, Tris-HCl 15 mM a pH 7,5.

Solución de bloqueo: 50 g/l de leche desnatada en polvo (Svelts Nestlé, Vevey, Suiza) en solución de lavado.

BIBLIOGRAFÍA

- Aasen, A. J. y Jensen, S. L. (1965). Fungal carotenoids II. The structure of the carotenoid acid neurosporaxanthin. *Acta Chem. Scand.* 19: 1843-1853.
- Agardh, C. A. (1817). Synopsis Algarum Scandinaviae adjecta dispositione universali algarum. Ex. officina Berlingiana, Lundae. p.46
- Altman, L. J.; Ash, L.; Kowerski, R. C.; Epstein, W. W.; Larsen, B. R., Rilling, H. C.; Muscio, F. y Gregonis, D. E. (1972). Prephytoene pyrophosphate. A new intermediate in the biosynthesis of carotenoids. *J. Am. Chem. Soc.* 94: 3257-3259.
- An, G.; Schuman, D. B. y Johnson, E. A. (1989). Isolation of *Phaffia rodozima* mutants with increased astaxanthin content. *Appl. Environ. Microbiol.* 55: 116-124.
- Aragón, C. M. G.; Murillo, F. J.; De la Guardia, M. D. y Cerdá-Olmedo, E. (1976). An enzyme complex for dehydrogenation of phytoene in *Phycomyces*. *Eur. J. Biochem.* 63: 71-75.
- Arrach, N.; Fernández-Martín, R.; Cerdá-Olmedo, E. y Avalos, J. (2001). A single gene for lycopene cyclase, phytoene synthase, and regulation of carotene biosynthesis in *Phycomyces*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 1687-1692.
- Armstrong, G. (1997). Genetics of eubacterial carotenoid biosynthesis: a colorful tale. *Annu. Rev. Microbiol.* 51: 629-659.
- Austin, D. J.; Bu'lock, J. D. y Gooday, G. W. (1969). Trisporic acids: sexual hormones from *Mucor mucedo* an *Blakeslea trispora*. *Nature* 223: 1178-1179.
- Austin, D. J.; Bu'Lock, J. D. y Drake, D. (1970). The biosynthesis of trisporic acids from β -carotene via retinal and trisporol. *Experientia* 26: 348-349.
- Ávalos, J. y Cerdá-Olmedo, E. (1987). Carotenoid mutants of *Gibberella fujikuroi* *Curr. Genet.* 11: 505-511.
- Ávalos, J. y Cerdá-Olmedo, E. (2004). Fungal carotenoid production. En Arora, D. K. (ed.) . Handbook of fungal Biotechnology. 2ª ed. Marcel Dekker, Inc. New York.
- Ávalos, J.; Bejarano, E. R. y Cerdá-Olmedo, E. (1993). Photoinduction of carotenoid biosynthesis. *Methods Enzymol.* 214: 283-294.
- Bach, T. J. (1995). Some new aspects of isoprenoid biosynthesis in plants. *Lipids* 30: 191-202.
- Baker, K. y Parker, R. (2004). Nonsense-mediatec mRNA decay: terminating erroneous gene expression. *Curr. Opin. Cell Biol.* 16: 293-299.

- Barnett, H. L.; Lilly, V. G. y Krause, R. F. (1956). Increased production of carotene by mixed (+) and (-) cultures of *Choanephora cucurbitarum*. *Science* 123: 141.
- Barrero, A. F.; Oltra, J. E.; Robinson, J.; Burke, P. V.; Jiménez, D. y Oliver, E. (2002). Sterols in *erg* mutants of *Phycomyces*: metabolic pathways and physiological effects. *Steroids* 67: 403-409.
- Bartley, G. E.; Scolnik, P. A. (1995). Plant carotenoids: pigments for photoprotection, visual attraction and human health. *Plant Cell* 7: 1027-1038.
- Bejarano, E. R.; Govind, N. S. y Cerdá-Olmedo, E. (1987). ζ -Carotene and other carotenes in a *Phycomyces* mutant. *Phytochemistry* 26: 2251-2254.
- Bejarano, E. R.; Parra, F.; Murillo, F. J. y Cerdá-Olmedo, E. (1988). End-product regulation of carotenogenesis in *Phycomyces*. *Arch. Microbiol.* 150: 209-214.
- Bejarano, E. R. y Cerdá-Olmedo, E. (1989) Inhibition of phytoene dehydrogenation and activation of carotenogenesis in *Phycomyces*. *Phytochemistry* 28: 1623-1626.
- Bejarano, E. R.; Avalos, J.; Lipson, E. D.; Cerdá-Olmedo, E. (1991). Photoinduced accumulation of carotene in *Phycomyces*. *Planta* 183: 1-9.
- Bejarano, E. R. y Cerdá-Olmedo, E. (1992). Independence of carotene and sterol pathways of *Phycomyces*. *FEBS Lett.* 306: 209-212.
- Bergman, K.; Eslava, A. P. y Cerdá-Olmedo, E. (1973). Mutants of *Phycomyces* with abnormal phototropism. *Mol. Gen. Genet.* 123: 1-16.
- Blakeslee, A. F. (1904). Sexual reproduction in the Mucorineae. *Proc. Am. Acad. Arts Sci.* 40: 205-319.
- Blasco, J. L.; Roebink, D.; Iturriaga, E. A.; Eslava, A. P. y Galland, P. (2001). Photocarotenogenesis in *Phycomyces*: Expression of the *carB* gene encoding phytoene dehydrogenase. *J. Plant Res.* 114: 25-31.
- Böhm, F.; Edge, R.; Burke, M. y Truscott, T. G. (2001). Dietary uptake of lycopene protects human cells from singlet oxygen and nitrogen dioxide-ROS components from cigarette smoke. *J. Photochem. Photobiol.* 64: 176-178
- Bohne, F. y Linden, H. (2002). Regulation of biosynthesis genes in response to light in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biochim. Biophys. Acta* 1579: 26-34.
- Borchert, R. (1963). Über die azetat-aktivierung der sporangiosporen von *Phycomyces blakesleeanus*. *Beiträge zur Biologie der Pflanzen* 38: 31-61.

- Bramley, P. M. y Davies, B. H. (1975). Carotene biosynthesis by cell extracts of mutants of *Phycomyces blakesleeanus*. *Phytochemistry* 14: 463-469.
- Bramley, P. M. (1985). The *in vitro* biosynthesis of carotenoids. *Advances in Lipid Research*. 21: 243-279.
- Brown, M. S. y Goldstein, J. L. (1999). A proteolytic pathway that controls the cholesterol content of membranes, cells, and blood. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 11041-11048.
- Burgeff, H. (1912). Über Sexualität, Variabilität und Vererbung bei *Phycomyces nitens*. *Ber. Dtsch. Bot. Ges.* 30: 679-685.
- Burgeff, H. (1914). Untersuchungen über Variabilität, Sexualität und Erbllichkeit bei *Phycomyces nitens* Kuntze I. *Flora* 107: 259-316.
- Burgeff, H. (1925). Über Arten und Artkreuzung in der Gattung *Phycomyces* Kunze. *Flora* 118-119: 40-46.
- Burgeff, H. (1928). Variabilität, Vererbung und Mutation bei *Phycomyces blakesleeanus* *BGFV Vererbungsl.* 49: 26-94.
- Caglioti, L.; Cainelli, G.; Camarino, B.; Mondelli, R.; Prieto, A.; Salvatori, T. y Selva, A. (1966). The structure of trisporic-C acid. *Tetrahedron Supplement* 7: 175-187.
- Campbell, J. K.; Canene-Adams, K.; Lindshield, B. L.; Boileau, T. W.; Clinton, S. K. y Edman, J. W. (2004). Tomato phytochemicals and prostate cancer risk. *J. Nutr.* 134: 3486S-3492S.
- Candau, R.; Bejarano, E. R. y Cerdá-Olmedo, E. (1991). *In vivo* Channeling of substrates in an enzyme aggregate for β -carotene biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 4936-4940.
- Candau, R.; Ávalos, J. y Cerdá-Olmedo, E. (1992). Regulation of gibberellin biosynthesis in *Gibberella fujikuroi*. *Plant Physiol.* 100: 1184-1188.
- Carnoy, J.B. (1870). Recherches anatomiques et physiologiques sur les champignons. *Bull. Soc. R. Bot. Belg.* 9: 157-321.
- Cerdá-Olmedo, E. y Hüttermann, A. (1986). Förderung und Hemmung der Carotinsynthese bei *Phycomyces* durch Aromaten angew. *Botanik.* 60: 59-70.
- Cerdá-Olmedo, E. y Lipson, E. D. (ed.) (1987). *Phycomyces*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, N. Y.
- Cerdá-Olmedo, E. y Ávalos, J. (1994). Oliginous Fungi: carotene-rich oil from *Phycomyces*. *Lipid Res.* 33: 185-192.

- Chappell, J. (1995). The biochemistry and molecular biology of isoprenoid metabolism. *Plant Physiol.* 107: 1-6.
- Chew, B. P. y Park, J. S. (2004). Carotenoid action on the immune response. *J. Nutr.* 134: 257S-261S.
- Chichester, C. O.; Nakayama, T.; Mackinney, G. y Goodwin, T. W. (1955). Incorporation of labeled leucine into carotene by *Phycomyces*. *J. B. C.* 214: 515-517.
- Ciegler, A. (1965). Microbial carotenogenesis. *Adv. Appl. Microbiol.* 7, 1-34.
- Clarke, E.; De la Concha, A.; Murillo, J. F.; Sandmann, G.; Skone, E. J. y Bramley, P. M. (1983). The effect of diphenilamine on carotenogenesis in *Phycomyces blakesleeanus*. *Phytochemistry* 22: 435-439.
- Coggins, C. W.; Henning, G. L. e Yokoyama, H. (1970). Lycopene accumulation induced by 2-4-chlorophenylthiotrithylaminehydrochloride. *Science* 168: 1589-1590.
- Corrochano L. M. y Cerdá-Olmedo, E. (1988). Photomorphogenesis in *Phycomyces*: dependence on environmental conditions. *Planta* 174: 309-314.
- Corrochano, L. M.; Galland, P.; Lipson, E. D. y Cerdá-Olmedo, E. (1988). Photomorphogenesis in *Phycomyces*: fluence-response curves and action spectra. *Planta* 174: 315-320.
- Darlix, J. L.; Gabus, C.; Nugeyre, M. T. y Barre-Sinoussi, F. (1990). Cis elements and trans-acting factors involved in the RNA dimerization of the human immunodeficiency virus HIV-1. *J. Mol. Biol.* 216: 689-699.
- Davies, B. H. (1973). Carotene biosynthesis in fungi. *Pure Appl. Chem.* 35: 1-28.
- De la Concha, A.; Murillo, F. J.; Skone, E. J. y Bramley, P. M. (1983). *In vitro* carotenogenesis by wild type and mutants of *Phycomyces blakesleeanus*. *Phytochemistry* 22: 441-445.
- De la Guardia, M. D.; Aragón, C. M. G. y Cerdá-Olmedo, E. (1971). A carotenogenic enzyme aggregate in *Phycomyces*: evidence from quantitative complementation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 68: 2012-2015.
- Demerec, M.; Adelber, E. A.; Clark, A. J. y Hartman, P. E. (1966). A proposal for a uniform nomenclature in bacterial genetics. *Genetics* 54: 61-76.
- Dickson, H. (1932). The effects of x-rays, ultraviolet light, and heat in producing saltants in *Chaetomium cochliodes* and other fungi. *Ann. Botany* 46: 389-405.

- Edge, R.; McGarvey D. y Truscott, T. (1997). The carotenoids as antioxidants - a review. *J. Photochem. Photobiol.* 41: 189-200.
- Endo, A. (1992). The discovery and development of HMG-CoA reductase inhibitors. *J. L. R.* 33: 1569-1582.
- Eslava, A. P. y Cerdá-Olmedo, E. (1974). Genetic control of phytoene dehydrogenation in *Phycomyces*. *Plant Sci. Lett.* 2: 9-14.
- Eslava, A. P.; Álvarez, M. I. y Cerdá-Olmedo, E. (1974). Regulation of carotene biosynthesis in *Phycomyces* by vitamin A and β -ionone. *Eur. J. Biochem.* 48: 617-623.
- Franchi, L.; Fluci, V. y Macino, G. (2005). Protein kinase C modulates light responses in *Neurospora* by regulating the blue light photoreceptor WC-1. *Mol. Microbiol.* 56: 334-335.
- Fraser, P.D. y Bramley, P. M. (2004). The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids. *Prog. Lipid. Res.* 43: 228-265.
- Furch, B. y Gooday, G. (1978). Sporopollenin in *Phycomyces blakesleeanus*. *Trans. Br. mycol. Soc.* 70: 307-309.
- Galland, P. y Lipson, E. D. (1987). Blue-light reception in *Phycomyces* phototropism: evidence for two photosystems operating in low- and high-intensity ranges. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 104-108.
- Garton, G. A.; Goodwin, T. W. y Lijinsky, W. (1951). Studies in carotenogenesis I. General conditions governing β -carotene synthesis by the fungus *Phycomyces blakesleeanus* Burgeff. *Biochem. J.* 48: 154-163.
- Giordano, W.; Ávalos, J.; Fernández-martín, R.; Cerdá-Olmedo, E. y Doménech, C. E. (1999). Lovastatin inhibits the production of gibberellins but not sterol or carotenoid biosynthesis in *Gibberella fujikuroi*. *Microbiology* 145: 2997-3002.
- Goldstein, J. L. y Brown, M. S. (1990). Regulation of the mevalonate pathway. *Nature* 343:425-430
- Gooday, G. W. (1978). Functions of trisporic acid. *Phyl. Trans. R. Soc. Lond. B.* 284: 509-520.
- Goodwin, T. W. (1952). Studies in carotenogenesis: 3. Identification of the minor polyene components of the fungus *Phycomyces blakesleeanus* and a study of their synthesis under various cultural conditions. *Bioch. J.* 50. 550-558.

- Goodwin, T. W.; Jamikronn, M. y Willmer, J. S. (1953). Studies in carotenogenesis: 7. Further observations concerning the action of diphenylamine in inhibiting the synthesis of β -carotene on *Phycomyces blakesleeanus* *Biochem J.* 53: 531-538.
- Goodwin, T. W. (1980). The biochemistry of carotenoids. *Plants* 2^o ed. Chapman & Hall, London 1: 257-290.
- Govind, N. S. y Cerdá-Olmedo, E. (1986). Sexual activation of carotenogenesis in *Phycomyces blakesleeanus*. *J. Gen. Microbiol.* 132: 2775-2780.
- Greathouse, J. y Lever, A. (1998). Retroviral RNA dimer linkage. *J. Gen. Virol.* 79: 2877-2882.
- Hausmann, A. y Sandmann, G. (2000). A single five-step desaturase is involved in the carotenoid biosynthesis pathway to β -carotene and torulene in *Neurospora crassa*. *Fungal Genet. Biol.* 30: 147-153.
- Heisenberg, M. y Cerdá-Olmedo, E. (1968). Segregation of heterocaryons in asexual cycle of *Phycomyces*. *Mol. Gen. Genet.* 102: 187-195.
- Howes, C. D. y Batra, P. P. (1970). Accumulation of lycopene and inhibition of cyclic carotenoids in *Mycobacterium* in the presence of nicotine. *Biochim. Biophys. Acta.* 222: 174-179.
- Iturriaga, E. A.; Velayos, A.; Eslava, A. P. y Alvarez, M. I. (2001). The genetics and molecular biology of carotenoid biosynthesis in *Mucor*. *Recent Res. Devel. Genet.* 1: 79-92.
- Jayaram, M.; Presti, D. y Delbrück, M. (1979). Light-induced carotene synthesis in *Phycomyces*. *Exp. Mycol.* 3: 42-52.
- Johnson, E. A. y Lewis, M. J. (1979). Astaxanthin formation by the yeast *Phaffia rodozima*. *J. Gen. Microbiol.* 115: 173-183.
- Kharasch, M. S.; Conway, E. A. y Bloom, W. (1936). Some chemical factors influencing growth and pigmentation of certain microorganisms. *J. Bacteriol.* 32: 533-540.
- Kishore, H. (1940). A study of the conditions affecting zigospore formation in certain members of the Mucoraceae and Choanephoraceae. *University of Allahabad Studies in Botany* 5: 23-71.
- Kunze, G. (1817). *Phycomyces*. *Mykologische Helfte* 1: 113-114.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.

- Lee, P. C. y Schmidt-Dannert, C. (2002). Metabolic engineering towards biotechnological production of carotenoids in microorganisms. *App. Microbiol. Biotechnol.* 60: 1-11.
- López-Díaz, I. y Cerdá-Olmedo, E. (1980). Relationship of photocarotenogenesis to other behavioural and regulatory responses in *Phycomyces*. *Planta* 150: 134-139.
- Marouf, B. A. y Malhotra, S. K. (1976). Alteration in lipid composition during the germination and growth of spores of *Phycomyces blakesleeanus*. *Microbios Letters* 1: 117-123.
- Massart, J. (1888). Recherches sur les organismes inférieurs 1. La loi Weber vérifiée pour l'héliotropisme du champignon. *Bull. Acad. R. Sci. Belg.* 16: 590-601.
- Mayne, S. T. (1996). β -carotene, carotenoids and disease prevention in humans. *FASEB J.* 10: 690-701.
- Mehta, B. J.; Salgado, L. M.; Bejarano, E. R. y Cerdá-Olmedo, E. (1997). New mutants of *Phycomyces blakesleeanus* for β -carotene production. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 3657-3661.
- Mehta, B. J. y Cerdá-Olmedo, E. (2001). Intersexual partial diploids of *Phycomyces*. *Genetics* 158: 635-641.
- Mehta, B. J.; Obraztsova, I. N. y Cerdá-Olmedo, E. (2003). Mutants and intersexual heterokaryons of *Blakeslea trispora* for production of β -carotene and lycopene. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 4043-4048.
- Meissner, G. y Delbrück, M. (1968). Carotenes and retinal in *Phycomyces* mutants. *Plant Physiol.* 438: 1279-1282.
- Muriaux, D.; De Rocquigny, H.; Roques, B. y Paoletti, J. (1996). NCp7 Activates HIV-1 RNA dimerization by converting a transient loop-loop complex into a stable dimer. *J. Biol. Chem.* 271: 33686-33692.
- Murillo, F. J. y Cerdá-Olmedo, E. (1976). Regulation of carotene synthesis in *Phycomyces*. *Molec. gen. genet.* 148: 19-24.
- Murillo, F. J.; Calderón, I. L.; López-Díaz, I. y Cerdá-Olmedo, E. (1978). Carotene-superproducing strains of *Phycomyces*. *Appl. Environ. Microbiol.* 36: 639-642.
- Murillo, F. J.; Torres-Martinez, S.; Aragon, C. M. G. y Cerdá-Olmedo, E. (1981). Substrate transfer in carotene biosynthesis in *Phycomyces*. *Eur. J. Biochem.* 119: 511-516.

- Nelson, M. A.; Morelli, G.; Carrattoli, A.; Romano, N. y Macino, G. (1989). Molecular cloning of *Neurospora crassa* carotenoid biosynthetic gene (albino-3) regulated by light and the products of the white collar genes. *Mol. Cell Biol.* 9: 1271-1276.
- Obraztsova, I. N.; Prados, N.; Holzmann, K.; Avalos, J. y Cerdá-Olmedo, E. (2004). Genetic damage following introduction of DNA in *Phycomyces*. *Fungal Genet. Biol.* 41: 168-180.
- Ootaki, T.; Lighty, A. C. y Delbrück, M. (1973). Complementation between mutants of *Phycomyces* deficient with respect to carotenogenesis. *Molec. Gen. Genet.* 121:57-70.
- Palozza, P.; Serini, S.; Di Niculo, F. y Calviello, G. (2004). Modulation of apoptotic signalling by carotenoids in cancer cells. *Arch. Biochem. Biophys.* 430: 104-109.
- Prado, M. M.; Prado-Cabrero, A.; Fernandez-Martin, R. y Ávalos J. (2004). A gene of opsin family in the carotenoid gene cluster of *Fusarium fujikuroi*. *Curr. Genet.* 46: 47-58.
- Ren, X.; Gérald G.; Li, H.; Ying, L.; Klenerman, D. y Balasubramanian, S. (2003). Identification of a new RNA-RNA interactionsite for human telomerase RNA (hTR): structural implications for hTR accumulation and a dyskeratosis congenita point mutation. *Nucleic Acids Res.* 31: 6509-6515.
- Revuelta, J. L. y Eslava, A. P. (1983). A new gene (*carC*) involved in the regulation of carotenogenesis in *Phycomyces*. *Mol. Gen. Genet.* 192: 225-229.
- Robbins, W. J.; Kavanagh, V. W. y Kavanagh, F (1942). Growth substances and dormancy of spores of *Phycomyces*. *Bot. Gaz.* 104: 224-242.
- Rodríguez-Sáiz, M.; Paz, B.; de la Fuente, J. L.; López-Nieto, M. J.; Cabri, W. y Barredo, J. L. (2004). *Blakeslea trispora* Genes for carotene biosynthesis. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 5589-5594.
- Rohmer, M.; Knani, M.; Simonin, P.; Sutter, B. y Sahm, H. (1993). Isoprenoid biosynthesis in bacteria: a novel pathway for the early steps leading to isopentenyl diphosphate. *Biochem. J.* 295: 517-524.
- Roncero, M. I. y Cerdá-Olmedo, E. (1982). Genetics of carotene biosynthesis in *Phycomyces*. *Curr. Genet.* 5: 5-8.
- Roncero, M. I.; Zabala, C. y Cerdá-Olmedo, E. (1984). Mutagenesis in multinucleate cells: the effects of N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine on *Phycomyces* spores. *Mutat. Res.* 125: 195-204.

- Ruiz-Albert, J.; Cerdá-Olmedo, E. y Corrochano, L. M. (2002). Genes for mevalonate biosynthesis in *Phycomyces*. *Mol. Genet. Genomics* 266: 768-777.
- Ruiz-Díez, B. (2002). Strategies for the transformation of filamentous fungi. *J. Appl. Microbiol.* 92: 189-195.
- Ruiz-Hidalgo, M. J.; Benito, E. P.; Sandmann G. y Eslava, A. P. (1997). The phytoene dehydrogenase gene of *Phycomyces*: regulation of its expression by blue light and vitamin A. *Mol. Gen. Genet.* 253: 734-744.
- Salgado, L. M.; Bejarano, E. R. y Cerdá-Olmedo, E. (1989). Carotene superproducing mutants of *Pycomyces blakesleeanus*. *Exp. Mycol.* 13: 332-336.
- Salgado, L. M. y Cerdá-Olmedo, E. (1992). Genetic interactions in the regulation of carotenogenesis in *Phycomyces*. *Curr. Genet.* 21: 67-71.
- Salgado, L. M.; Avalos, J.; Bejarano, E. R. y Cerdá-Olmedo, E. (1991). Correlation between *in vivo* and *in vitro* carotenogenesis in *Phycomyces*. *Phytochemistry* 30: 2587-2591.
- Sandmann G.; Bramley, P. M. y Böger, P. (1980) The inhibitory mode of action of the pyridazinone herbicide norflurazon on a cell-free carotenogenic enzyme system. *Pestic. Biochem. Physiol.* 14: 185-191.
- Schmidhauser, T. J.; Lauter, F. R.; Russo, V. E. A. e Yanofsky, C. (1990). Cloning, sequence, and photoregulation of *al-1*, a carotenoid biosynthetic gene of *Neurospora crassa*. *Mol. Cell. Biol.* 10: 5064-5070.
- Schmidhauser, T. J.; Lauter, F. R.; Schumacher, M.; Zhou, W.; Russo, V. E. A. e Yanofsky, C. (1994). Cloning, sequence analysis, and photoregulation. *J. Biol. Chem.* 269: 12060-12066.
- Schmidt, A. y Sandmann, G. (1990). *In vitro* characterization of two different *Phycomyces blakesleeanus* mutants with impaired phytoene desaturation. *J. Bacteriol.* 172: 4103-4105.
- Schopfer, W. H. (1934). Les vitamines cristallées B comme hormones de croissance chez un microorganisme (*Phycomyces*). *Arch. Microbiol.* 5: 511.
- Schopfer, W. H. (1935). Sur l'identification d'un caroténoïde de champignon. *C. R. Soc. Biol.* 118: 3.
- Schopfer, W. H.; Jung, A. (1935). Recherches sur l'activité vitaminique A du thalle d'une Mucorinée. *C. R. Soc. Biol.* 120: 1093.

- Sanz, C.; Alvarez, M. I.; Orejas, M.; Velayos, A.; Eslava, A. P. y Benito, E. P. (2002). Interallelic complementation provides genetic evidence for the multimeric organization of the *Phycomyces blakesleeanus* phytoene dehydrogenase. *Eur. J. Biochem.* 269: 902-908.
- Sies, H. y Stahl, W. (2004). Nutritional protection against skin damage from sunlight. *Annu. Rev. Nutr.* 24: 173-200.
- Spiller, G. H.; Threlfall, D. R. y Whistance, G. R. (1968). Biosynthesis of ubiquinone in yeast, *Phycomyces blakesleeanus*, and *Agaricus campestris*. *Arch. Biochem. Biophys.* 125: 786-796.
- Spohr, G.; Mirault, M.; Imaizumi, T. y Scherrer, K. (1976). Molecular-weight determination of animal-cell RNA by eletrophoresis in formamide under fully denaturing conditions on exponential polyacrylamide gels. *Eur. J. Biochem.* 62: 313-322.
- Staudinger, H. (1920). Über Polymerization *Ber. Deut. Chem. Ges.* 53: 1073-1085.
- Staudinger, H. y Fritsch, J. (1922). Über Isopren und Kautschuk. 5. Mitteilung. Über die Hydrierung des Kautschuks und über seine Konstitution, *Helv. Chim. Acta* 5: 785-806.
- Sutter, R. P. (1970a). Trisporic acid synthesis in *Blakeslea trispora*. *Science* 168: 1590-1592.
- Sutter, R. P. (1970b). Effect of light on β -carotene accumulation in *Blakeslea trispora*. *J. Gen. Microbiol.* 64: 215-221.
- Sutter, R. P. (1977). Regulation of the first stages of sexual development in *Phycomyces blakesleeanus* and in other mucoraceous fungi. En D. H. O'Day y P. A. Horgen (ed.). *Eucariotic microbes as model developmental system*. p. 251 Marcel Dekker, New York.
- Sutter, R. P.; Whitaker, J. P. (1981). Zygothore-stimulating precursors (pheromones) of trisporic acids active in (-)-*Phycomyces blakesleeanus*. Acid-catalized anhydro derives of methyl 4-dehydrotrisporate-C and 4-dihydrotrisporate-C. *J. Biol. Chem.* 256: 2334-2341.
- Sutter, R. P. (1987). Sexual development. En Cerdá-Olmedo, E. y Lipson, E. D. (ed.). *Phycomyces*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, N. Y.
- Talora, C.; Franchi, L.; Linden, H. Ballario, P. y Macino, G. (1999). Role of white collar-1-white collar-2 complex in blue-light signa transduction. *EMBO J.* 18: 4961-4968.

- Taylor, P. R. y Greenwald, P. (2005). Nutritional interventions in cancer prevention. *J. Clin. Oncol.* 10: 333-345.
- Thaxter, R. (1914). New or peculiar Zygomycetes: III. *Blakeslea*, *Dissophora* and *Haplosporangium*, nova genera. *Botanical Gazette* 58: 353-366.
- Torres-Martinez, S.; Murillo, F.J. y Cerdá-Olmedo, E. (1980). Genetics of lycopene cyclization and substrate transfer in β -carotene biosynthesis in *Pycomyces*. *Genet. Res.* 36: 299-309.
- Tsolakis, G.; Parashi, E.; Galland, P. y Kotzabasis, K. (1999). Blue light signaling chains in *Phycomyces*: phototransduction of carotenogenesis and morphogenesis involves distinct protein kinase/phosphatase elements. *Fungal Genet. Biol.* 28: 201-213.
- van den Ende, H.; Werkman, B. A. y van del Briel. (1972). Trisporic acid synthesis in mated cultures of fungus *Blakeslea trispora*. *Arch. Mikrobiol.* 68: 175.
- Van Mulders, R. M.; Van Laere, A. J.; Verbeke, M. N (1986). Effects pH and cations on the germination induction of *Phycomyces* spores with carboxylic acids. *Biochem. Physiol. Pflanzen.* 181: 103-115.
- Velayos, A.; Blasco, J. L.; Alvarez, M. I.; Iturriaga, E. A. y Eslava, A. P. (2000a). Blue-light regulation of phytoene dehydrogenase (*carB*) gene expression in *Mucor circinelloides*. *Planta* 210; 938-946.
- Velayos, A.; Eslava, A. P. e Iturriaga, E. A. (2000b). A bifunctional enzyme with lycopene cyclase and phytoene synthase activities is encoded by the *carRP* gene of *Mucor circinelloides*. *Eur. J. Biochem.* 267; 5509-5519.
- Voigt, K. y Wöstemeyer, J. (2001). Phylogeny and origin of 82 zygomycetes from all 54 genera of the Mucorales and Mortierellales based on combined analysis of actin and translation elongation factor EF-1alpha genes. *Gene* 270: 113-120.
- Von Lintig, J.; Welsch, R.; Bomk, M.; Giuliano, G.; Batschauer, A. y Kleinig, H. (1997). Light-dependent regulation of carotenoid biosynthesis occurs at the level of phytoene synthase expression and is mediated by phytochrome in *Sinapis alba* and *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Plant J.* 12: 625-634.
- Weinkove, D.; Poyatos, J. A.; Greiner, H.; Oltra, E.; Avalos, J.; Fukshansky, L.; Barrero, A. F.; Cerdá-Olmedo, E. (1998). Mutants of *Phycomyces* with decreased gallic acid content. *Fungal Genetics and Biology* 25: 196-203.
- Weber G. F. y Wolf, F. A. (1927). *Micologia* 19: 302-307

- Webster, J. (1993). *Introduction to fungi*. 2^a ed., Cambridge University Press, Cambridge.
- Welsch, R.; Medina, J.; Giuliano, G.; Beyer, P. y Von Lintig, J. (2002). Structural and functional characterization of the phytoene synthase promoter from *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 216: 523-534.
- Yokoyama, H.; Chichester, C. O. y Mackinney, G. (1960). Formation of carotene *in vitro*. *Nature* 185: 687-688.
- Yokoyama, H.; Nakayama, T. O. M. y Chichester, C. O. (1962). Biosynthesis of β -carotene by cell-free extracts of *Phycomyces blakesleeanus*. *J. Biol. Chem.* 237: 681-686.
- Yu, M. Q. y Ko, W. H. (1997). Factors affecting germination and the mode of germination of zygospores of *Choanephora cucurbitarum*. *J. Phytopathol.* 145: 357-361.
- Zycha, H; Siepmann, R. y Linnemann, G. (1969). Mucorales. Cramer, Lehre. Alemania.

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

Reunido el Tribunal de Estudios de la Facultad de Ciencias de

en el día de la fecha, se acordó celebrar el curso de

D. Eduardo Roda Amelboues de Almeida
titulado "Exposición de los genes de la carotenogénesis
en los hongos micorrízicos".

acordó otorgarle la calificación de 2005

Sevilla, 29 de Noviembre 2005

El Vocal,

F. J. R. C.
El Vocal

[Signature]

Lucas Denis
El Secretario,

Edmundo Almeida
El Doctorado

El PRESIDENTE,

[Signature]
ELI