

TA
611

R. 6633



GENÉTICA Y FISIOLÓGICA DE LA RESISTENCIA A NICOMICINA
EN Phycomyces

Trabajo realizado en el Departamento de Genética y Biotecnia de la Universidad de Sevilla, para optar al grado de Doctor en Biología, por la Licenciada

BEATRIZ CUBERO GARCIA

Sevilla, 21 de Noviembre de 1989

Director y Ponente

UNIVERSIDAD DE SEVILLA
SECRETARÍA GENERAL

Queda registrada esta Tesis Doctoral
al folio 33 número 59 del libro
correspondiente. 23 NOV. 1989

E. Cerdá Olmedo

Enrique Cerdá Olmedo

El Jefe del Negociado de Tesis,

Alma Soffitte

Catedrático de Genética de
la Universidad de Sevilla

INDICE

RESUMEN Y CONCLUSIONES	1
INTRODUCCION	2
CICLO DE VIDA DE <u>Phycomyces</u>	3
Ciclo asexual	3
Ciclo sexual	5
PARED CELULAR	6
Componentes de la pared celular y su síntesis	7
Quitina	7
Quitosana	12
Celulosa	14
Glucanas	15
Glicoproteínas	15
Estructura de la pared celular	16
INHIBIDORES DE LA SINTESIS DE PARED CELULAR	18
Síntesis de quitina	18
Polioxinas	18
Nicomycininas	18
Polienos	19
Otros inhibidores	21
Síntesis de manoproteínas	21
Tunicamicina	21
Bacitracina	21
Síntesis de beta-glucana	22
MATERIALES Y METODOS	23
ESTIRPES	23
CONDICIONES DE CULTIVO	25
METODOS GENETICOS	27
Mutagénesis	27
Formación de heterocariontes intrasexuales	27

Formación de heterocariontes intersexuales	28
Cruzamientos	28
METODOS BIOQUIMICOS	29
Determinación de la síntesis de quitina in vivo	29
Determinación de la actividad sintetasa de quitina in vitro	29
Determinación de la actividad transferasa de manosa	31
Determinación de la actividad invertasa	31
Determinación de la entrada de nicomicina en el esporangióforo	32
Extracción de nicomicina	33
RESULTADOS	35
MUTANTES RESISTENTES A NICOMICINA	35
Inhibición del crecimiento del tipo silvestre por la nicomicina	35
Aislamiento de mutantes resistentes a nicomicina	36
Morfología de los mutantes	36
Pautas de ramificación	37
Influencia del pH y la presión osmótica en el crecimiento	37
Determinación de la entrada de nicomicina en el micelio	40
ANALISIS GENETICO	43
Análisis genético por recombinación	43
Segregación de colonialidad y resistencia	44
Análisis genético por recombinación de las mutaciones <u>squ</u>	46
Análisis genético por complementación	48
Recesividad de las mutaciones <u>squ</u> y <u>col</u>	48
Establecimiento de grupos de complementación en los mutantes <u>squ</u>	50
CARACTERIZACION BIOQUIMICA DE LOS MUTANTES	51
Efecto de la nicomicina sobre la síntesis de quitina	51

Efecto de la nicomicina sobre la síntesis de glicoproteína	61
Efecto de la nicomicina sobre la actividad transferasa de manosa	61
DISCUSION	64
BIBLIOGRAFIA	71
AGRADECIMIENTOS	85

RESUMEN Y CONCLUSIONES

Entre los componentes de la pared celular de Phycomyces la quitina destaca como polímero estructural mayoritario. Para comprender su mecanismo de síntesis se han aislado mutantes resistentes a nicomicina, inhibidor por analogía estructural con el sustrato de la sintetasa de quitina. Estos mutantes se han sometido a estudios genéticos y bioquímicos. A la luz de los resultados obtenidos se concluye que:

1. Todos los mutantes resistentes obtenidos están alterados en un mismo gen, squA y presentan fenotipo colonial.

2. El fenotipo colonial se debe a una mutación independiente de squA, a la que llamamos col, que provoca cambios en el patrón de ramificación de hifas de los micelios que la portan.

3. El gen col está ligado al locus sexual.

4. Las mutaciones squA y col son recesivas.

5. La nicomicina actúa como inhibidor competitivo de la síntesis de quitina de Phycomyces y no afecta de forma directa a otros procesos biosintéticos celulares.

6. Los mutantes squA son resistentes a nicomicina por alteración de la sintetasa de quitina.

=====

INTRODUCCION

=====

Los hongos filamentosos, como las plantas y otros organismos poseen gruesas paredes celulares. La pared es una barrera mecánica y química que protege de agentes externos, una vía de entrada e intercambio de metabolitos, un soporte que impide la lisis en medios hipotónicos y el principal responsable de la apariencia general del organismo. Esta variedad de funciones presenta exigencias estructurales contradictorias: una pared gruesa e impermeable parece ideal para servir de barrera y soporte e inconveniente para los intercambios químicos de las células con su entorno. Las funciones de la pared, y por tanto su estructura, varían a lo largo de la vida del organismo, de unas células a otras, y de un lugar a otro de una misma célula. Aun parece más difícil que la pared crezca y se divida con las células, un problema que no pudieron resolver los fabricantes de armaduras ni nuestra propia industria textil.

Para investigar algunos aspectos de la síntesis de pared se ha elegido a Phycomyces blakesleeanus, un hongo filamentoso cenocítico, con una morfología relativamente variada a lo largo de su ciclo de vida. Tiene a su favor la facilidad de cultivo, la posibilidad de estudios genéticos, bioquímicos y morfológicos y la larga tradición de los estudios de su pared celular: hace más de medio siglo que se demostró que contiene quitina estructuralmente idéntica a la de los crustáceos (Diehl y van Iterson, 1935)

CICLO DE VIDA DE PHYCOMYCES

El género Phycomyces pertenece a la clase Cigomicetos, al orden Mucorales y a la familia Mucoráceas. Es un saprófito terrestre con dos ciclos de vida, uno asexual y otro sexual (Fig. 1).

Ciclo asexual

Comienza con una espora vegetativa generalmente multinucleada de forma elipsoidal y unas dimensiones medias de 9 μ m en su eje mayor y 6 μ m en el menor (Benjamin y Heseltine, 1959). Al microscopio óptico las esporas de Phycomyces aparecen como estructuras refringentes, con una gruesa pared celular y algunos gránulos en su interior.

Colocada en un medio apropiado, la espora se hincha y emite una o varias hifas cilíndricas no tabicadas. Las hifas crecen por su ápice y se ramifican, formando un entramado complejo capaz de crecer ilimitadamente a razón de unos 2 centímetros por día. A pH bajo, o en presencia de ciertos detergentes, la expansión del micelio se ve fuertemente limitada y cada espora origina una colonia. Los núcleos contenidos en el micelio se dividen por elongación y constricción sin pérdida de la membrana nuclear (Robinow, 1957; Franke y Reau, 1973).

Al cabo de unos 2-3 días de crecimiento en las condiciones apropiadas comienza un proceso de diferenciación llamado forogénesis: el micelio emite esporangióforos, grandes hifas aéreas no ramificadas, de sección cilíndrica y unos 100 μ m de diámetro. El esporangióforo crece inicialmente por su ápice (estadio I), diferencia un esporangio esférico (estadio II) que se tabica formando unas 10^5 esporas (estadio III). A continuación comienza de nuevo el crecimiento vertical (estadio

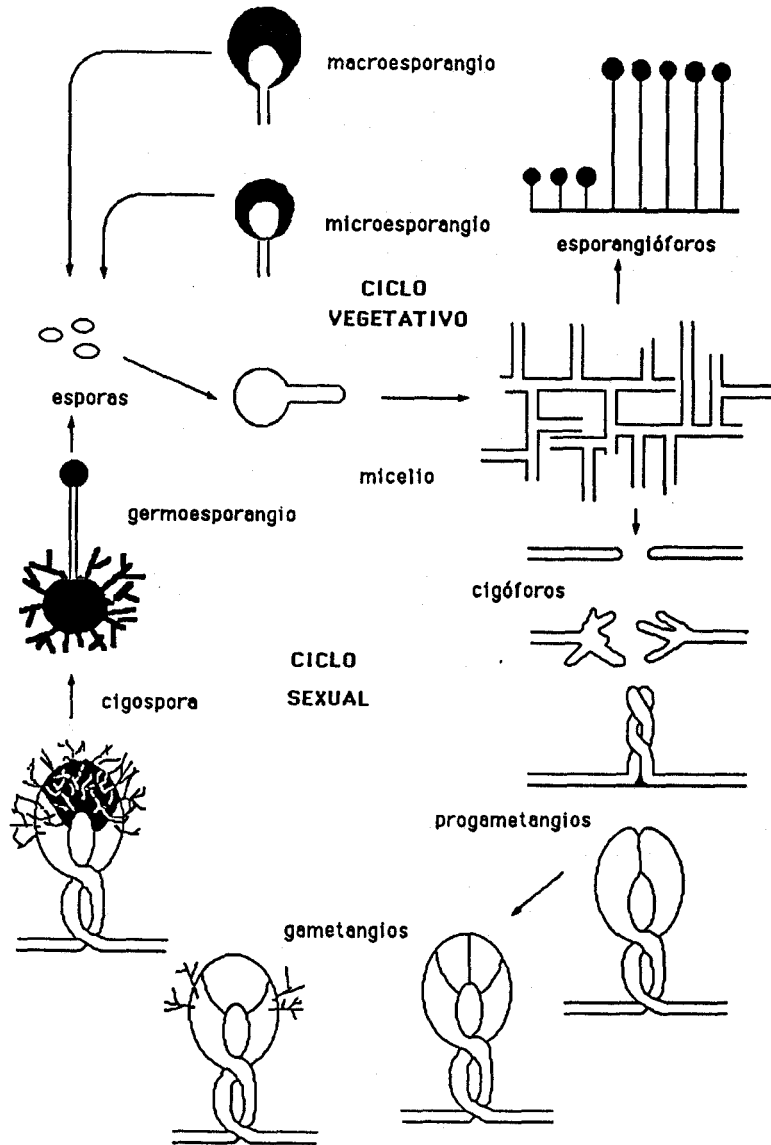


Figura 1. Ciclo de vida de *Phycomyces*. Las esporas, activadas e incubadas en un medio adecuado germinan y producen un micelio tupido de hifas ramificadas. Las estructuras fructíferas vegetativas pueden ser de dos tipos: macróforos y micróforos. En ambos casos llevan un esporangio que contiene las esporas. Cuando dos micelios de tipos opuestos se encuentran se produce una serie de hechos bioquímicos y morfológicos complejos que culmina con la formación de una cigospora. La cigospora germina tras un largo período de latencia y produce germoesporas, contenidas en un germoesporangio. Las germoesporas son producto de la recombinación genética y al germinar comienzan un nuevo ciclo vegetativo.

IV), localizado en un segmento de unos dos mm de longitud debajo del esporangio. En condiciones fijas, este crecimiento se mantiene notablemente constante durante muchas horas; su regulación por la luz y otros agentes ha sido el aspecto más investigado de la biología de Phycomyces.

El micelio de Phycomyces es un cenocito donde millones de núcleos coexisten en un citoplasma común. Las esporas reciben durante la esporogénesis una muestra aleatoria de la población existente en el micelio (Heisenberg y Cerdá-Olmedo, 1968). Un micelio se define como homocariote si todos los núcleos presentes son genéticamente idénticos y heterocariote en el caso contrario. Las mutaciones espontáneas impiden mantener una estricta homocariosis en micelios de Phycomyces de cierta envergadura, pero este tipo de heterocariosis, a no ser que se produzca en fases muy tempranas del ciclo vegetativo no es fácilmente detectable. Generalmente se habla de heterocariosis cuando los distintos tipos de núcleos presentes tienen frecuencias comparables. La detección se realiza bien por el fenotipo del micelio heterocariote o por la heterogeneidad de la población de esporas descendientes.

Ciclo sexual

En Phycomyces existen dos tipos sexuales, llamados (+) y (-), que son indistinguibles morfológicamente y contribuyen de forma simétrica al proceso sexual. La proximidad de micelios de distinto sexo induce en ambos una serie de cambios que dan lugar a unas hifas especializadas llamadas cigóforos. El contacto de cigóforos de distinto sexo da lugar a una serie de estructuras peculiares, la última de las cuales es una esfera de color negro llamada cigospora, que contiene por igual citoplasma y núcleos aportados por ambos sexos.

La cigospora madura permanece durmiente durante varios meses, al cabo de los cuales produce un germoesporangióforo, parecido a los esporangióforos del ciclo asexual. El correspondiente germoesporangio contiene algunos miles de germoes-

poras, que pueden iniciar un ciclo asexual normal. La mayoría de las germoesporas son multinucleadas. A diferencia de las esporas de los heterocariontes del ciclo vegetativo, las germoesporas son casi siempre homocarióticas, porque sus varios núcleos proceden de uno solo presente en el primordio de la espora.

Usualmente, las germoesporas de un mismo germoesporangio proceden de la meiosis de un solo núcleo diploide presente en la célula. Los cuatro productos haploides de la meiosis se multiplican vegetativamente: en cruzamientos entre parentales genéticamente distintos cada germoesporangio contiene por lo general cuatro tipos distintos de esporas.

Para mas información sobre los aspectos generales de la biología de Phycomyces puede consultarse el libro "Phycomyces" (E. Cerdá-Olmedo y E. Lipson eds., Cold Spring Harbor, 1987).

PARED CELULAR

La pared provee a los hongos de un hogar permanente y versátil, en expansión continua durante el crecimiento e intensamente remodelado durante el desarrollo. En último extremo, la morfogénesis de un hongo se reduce a la morfogénesis de su pared.

Físicamente, la pared es una red de microfibrillas inmersas en una matriz amorfa. Como en el hormigón armado, los compuestos estructurales confieren resistencia a la tensión y los cementantes a las presiones. Todos los componentes estructurales están formados por polisacáridos con enlaces beta. En muchos hongos el componente fibrilar predominante es la quitina, y en otros la celulosa. Las levaduras se separan de los demás hongos en que el componente fibrilar mayoritario es la glucana no celulósica.

El material cementante se compone de proteínas, gluco-proteínas y polisacáridos no cristalinos unidos predominantemente por enlaces alfa (glucanas, mananas, galactanas, heteropolisacáridos varios). A veces también están presentes cantidades importantes de pigmentos y, en mucha menor proporción, lípidos, polifosfatos e iones inorgánicos. La composición química particular de una pared y la forma en que se ordenan en el espacio sus elementos definen de forma muy precisa a su propietario. Tanto es así que existen clasificaciones taxonómicas de hongos basadas en estas características (Bartnicki-García, 1968).

Componentes de la pared celular y su síntesis

Quitina

Es el componente estructural predominante de la pared celular de los hongos cigomicetos y, entre ellos, Phycomyces blakesleeanus. Está presente en muchos grupos de hongos (hifoquitridiomycetos, quitridiomycetos, ascomycetos, basidiomycetos, deuteromycetos, esporobolomycetos y rodotoruláceos) y en animales (protozoos, hidrozooos, nematodos, rotíferos y artrópodos).

Está formada por monómeros de N-acetilglucosamina unidos por enlaces beta-1,4 que producen una cadena lineal (Figura 2). El conjunto se estabiliza por puentes de hidrógeno que se establecen entre el grupo hidroxilo de un carbono 3 y el átomo de oxígeno del residuo siguiente. Cada cadena tiene un extremo reductor y una dirección determinada por la posición de este extremo y la orientación de cada monómero. A partir de la relación entre el número de extremos reductores y el peso molecular se estima que las cadenas tienen como media unos 2000 monómeros.

Las cadenas se unen unas a otras por puentes de hidrógeno entre grupos acetilo y grupos amino. Entre 40 y 200 cadenas se unen para formar microfibrillas de quitina. En la pared celular de los hongos la quitina está en forma alfa, en la que las cadenas son antiparalelas unas a otras. Existe otra forma de quitina, la quitina beta, que no es cristalina: sus cadenas se disponen en paralelo.

La quitina fue uno de los primeros polisacáridos sintetizados *in vitro* (Glaser y Brown, 1957). Es mucho más fácil obtener sistemas enzimáticos para sintetizar quitina *in vitro* que para sintetizar celulosa, mucopolisacáridos o glucana. Las preparaciones de sintetasa de quitina catalizan la transferencia de unidades de N-acetilglucosamina desde UDP-N-acetilglucosamina a una cadena de poli-N-acetilglucosamina. La actividad se detecta por el paso de UDP-N-acetilglucosamina radioactiva de soluble a insoluble en álcali y ácido.

Un aspecto muy importante de la regulación de la sintetasa de la quitina en la célula es el fenómeno de la zimogenidad, descrito por Cabib y colaboradores en 1979: la actividad es muy baja en los extractos libres de células, a no ser que se sometan a activación, generalmente mediante proteasas.

De los estudios sobre sintetasa de quitina de distintas fuentes se desprende que ésta, aun estando presente en todas las subfracciones celulares aisladas de un extracto celular, se encuentra predominantemente asociada a las membranas. Esta localización parece lógica porque permitiría el acceso a la enzima de sustrato y efectores citoplásmicos y la inserción del producto en la pared. Un agregado organizado de monómeros de sintetasa de quitina podría así originar directamente la microfibrillas de quitina cristalina. Mediante técnicas de autoradiografía y fluorescencia, Cabib y Bowers (1979) demostraron que la enzima se encontraba dispersa en toda la membrana celular de Saccharomyces cerevisiae. Pero también se encuentra una importante fracción de la sintetasa de la quitina celular en partículas citoplásmicas llamadas quitosomas. Los quitosomas fueron descritos por primera vez como gránulos

asociados a la síntesis de microfibrillas de quitina en Mucor rouxii (Ruiz-Herrera et al, 1975). Son pequeñas microvesículas (40-70 nm de diámetro, 105 S) que se encuentran en extractos libres de células de muchos hongos y contienen sintetasa de quitina activable por proteasas.

Para el aislamiento y observación de quitosomas de distintas especies de hongos con pared quitinosa se usan técnicas de fraccionamiento de extractos libres de células y tinción negativa y se observa que las muestras tomadas de fracciones con la máxima actividad sintetasa de quitina y observadas al microscopio electrónico contienen estructuras vesiculares características en cuyo interior se ven a veces finas microfibrillas (Bartnicki-García et al., 1978).

Mediante tratamiento con digitonina los quitosomas pueden disociarse en subunidades de un peso molecular de aproximadamente 500 Kdal (Ruiz-Herrera et al., 1980) que sintetizan quitina. Cuando se elimina la digitonina del medio las subunidades se reasocian en estructuras laminares que parecen piezas de quitosomas. A diferencia de la quitina nativa, que está en forma de largas cintas, la que sintetizan las subunidades de quitosoma aparece como cortas agujas de forma rómbica (Bartnicki-García et al., 1977). Es posible que la ordenación espacial de la sintetasa de la quitina en los quitosomas sea necesaria para la elaboración de la típicas microfibrillas. Los quitosomas pueden ser los vehículos naturales de la sintetasa de la quitina desde su lugar de síntesis, probablemente el retículo endoplásmico rugoso, al sitio de acción, en la interfase membrana-pared. Cada quitosoma contiene la enzima necesaria para sintetizar una microfibrilla. Los quitosomas no son artefactos: aparecen tanto en extractos libres de células obtenidos a partir de protoplastos rotos por choque osmótico como en los obtenidos por métodos mas convencionales (Bartnicki-García et al, 1980) y también en citoplasma extraído con microjeringa de esporangióforos de Phycomyces (Herrera-Estrella et al., 1982). Además, las membranas de los quitosomas difieren de la membrana plasmá-

tica y otras membranas internas; por ejemplo, no poseen sitios de unión a concanavalina A, un agente que es conocido por su capacidad a unirse a la membrana plasmática de los hongos (Bartnicki-García et al, 1985).

En general la enzima utiliza como sustrato UDP-N-acetilglucosamina, y requiere algun catión divalente para actuar, preferentemente Mg^{++} . El valor de k_m para el sustrato está en torno a 1 mM (Gooday y Trinci, 1980). Se han hecho estimaciones de la concentración intracelular de UDP-N-acetilglucosamina que están, según los casos entre 0.4 y 3.8 mM (Gooday y Trinci, 1980) e indica que la disponibilidad del sustrato no es un factor limitante in vivo para la acción del enzima. No hay pruebas de la compartimentación de las pozas de sustrato en la célula (Martínez et al, 1987).

En todos los sistemas estudiados la sintetasa de quitina muestra una cinética poco convencional: la representación de l/v frente a l/s es sigmoideal, lo que sugiere comportamiento alostérico de la enzima (Ruiz-Herrera et al., 1977). La N-acetilglucosamina estimula la sintetasa de quitina en la práctica totalidad de los sistemas estudiados (Glaser y Brown, 1957; Camargo et al, 1967; Keller y Cabib, 1971; López-Romero y Ruiz-Herrera, 1976). Parece ser que actúa como activador alostérico (McMurrough y Bartnicki-García, 1971; Ruiz-Herrera et al, 1977) puesto que con altas concentraciones de N-acetilglucosamina (entre 4.5 y 12.5 mM) el carácter sigmoideal de la cinética es menos acusado. La alta concentración de N-acetilglucosamina usualmente empleada para obtener buena estimulación del enzima no se encuentra en el citoplasma. Como bajas concentraciones de UDP-N-acetilglucosamina producen el mismo efecto estimulador, se concluyó que la N-acetilglucosamina probablemente no tiene papel activador in vivo, y presenta efecto in vitro debido a que reproduce el efecto de la UDP-N-acetilglucosamina, el verdadero efector. No obstante, se ha sugerido que la N-acetilglucosamina puede tener función reguladora coordinando la síntesis y degradación de quitina porque debido a la hidrólisis de la quitina

en las proximidades de la sintetasa de la quitina in vivo puede haber concentraciones tan altas de N-acetilglucosamina como para producir efectos sobre la enzima (Gooday, 1977).

En casi todos los casos, las preparaciones de sintetasa de quitina contienen una parte de enzima inactiva (zimógeno) que puede activarse mediante adición de enzimas proteolíticas. La proporción de zimógeno varía dependiendo del modo de preparación, y las actividades de distintas proteasas son diferentes en distintas preparaciones (Ruiz-Herrera y Bartnicki-García, 1976; Hardy y Gooday, 1978). El mecanismo molecular exacto de la activación proteolítica no está claro: Los quitosomas disociados con digitonina requieren tratamiento proteolítico para la expresión de la actividad de síntesis por lo que la activación no sirve únicamente para abrir las partículas membranosas donde se encuentra el enzima. El factor activador de la sintetasa de la quitina in vivo no se conoce. Se ha sugerido que en levaduras es la proteinasa B, pero el aislamiento de mutantes proteinasa⁻ que crecen normalmente y sintetizan quitina contradicen esta hipótesis. Puede que otras proteasas específicas sirvan como activadores fisiológicos. Campbell y Peberdy caracterizaron en Aspergillus una proteasa neutra que activaba muy eficazmente al enzima. En Mucor, Sentandreu y Ruiz-Herrera han sugerido que el activador es una proteasa ácida.

Se ha observado que en presencia de agentes quelantes, la actividad sintetasa de quitina de extractos libres de células es mucho menor que la correspondiente a extractos obtenidos en ausencia de dichos agentes (Martínez-Cadena y Ruiz-Herrera, 1987). Esto sugiere la posible participación de algún catión divalente en el proceso. Tanto el calcio como el cobalto aumentan la actividad basal del enzima, pero otros cationes como el Mg⁺⁺, que es el más eficiente en la estimulación de la actividad, no tienen efecto en la activación. En contraste con las preparaciones crudas, los quitosomas solo se activan con proteasas. En la activación por calcio no parece que estén implicados procesos de proteólisis: la presencia de inhibidores de proteasas no afecta a los niveles

de actividad enzimática obtenidos. Los mismos autores sugieren que en el mecanismo de activación podría estar implicada la calmodulina, tal vez en un proceso en el que se produzcan fusiones de membrana.

En Phycomyces la quitina es el componente estructural mayoritario de la pared celular del hifas y esporangióforos. La cantidad de quitina y de otro polímero estructural muy relacionado con ella, la quitosana es función del contenido en aminoazúcares de hidrolizados de pared celular. En los esporangióforos, los aminoazúcares constituyen el 90% de los azúcares totales, y en las hifas el 45%. En las esporas la presencia de quitina es mucho menor: solo el 10% de los azúcares totales son aminoazúcares (Van Laere et al., 1977).

Quitosana

La quitosana es un análogo desacetilado de la quitina que se encuentra presente en las paredes de los hongos zigomicetos (Bartnicki-García, 1968). Está formada por cadenas de monómeros de azúcar unidos por enlaces beta:1,4. Aproximadamente el 75% de los azúcares son moléculas de glucosamina, y el resto es N-acetil-glucosamina.

Aunque los mecanismos de biosíntesis de la quitosana no están tan bien conocidos como en el caso de la sintetasa de la quitina parece claro que la quitosana se produce a partir de quitina mediante un proceso de desacetilación por la acción concertada de la sintetasa de quitina y de una desacetilasa de quitina (Araki e Ito, 1974; Davis y Bartnicki-García, 1984). La organización espacial de la sintetasa de quitina parece esencial para la síntesis de quitosana. Se ha propuesto (Davis y Bartnicki-García, 1984) que la organización de la sintetasa de quitina en quitosomas proporciona la configuración idónea para la producción de microfibrillas de quitina y la rápida cristalización de las cadenas nacientes. Esto dejaría poca ocasión de actuar a la desacetilasa. (la quitina cristalina o "madura" no es sensible a la deacetila-

sa). El tratamiento de los quitosomas con digitonina hace mas lenta la cristalización de la quitina y más eficaz su desacetilación. La relación de quitina a quitosana sería un indicador del estado, disociado o agregado, de los complejos enzimáticos que sintetizan la quitina. Calvo-Méndez y Ruiz-Herrera (1987) sugieren que la síntesis de quitosana se lleva a cabo mediante la acción concertada de la sintetasa de quitina y de una desacetilasa de membrana que actúa solamente sobre algunas de las cadenas de quitina que están siendo sintetizadas y la acción posterior de una desacetilasa extracelular sobre las cadenas parcialmente desacetiladas.

Clonación de la sintetasa de quitina

Los mutantes *chs1* de *Saccharomyces cerevisiae* son incapaces de sintetizar quitina. Mediante la complementación de esta mutación se clonó el gen *Chs1*, gen estructural putativo de la sintetasa de quitina. Por experimentos de disrupción génica se vió que las estirpes carentes del gen no pueden sintetizar quitina in vitro pero crecen y se dividen normalmente (Bulawa et al., 1986). En estas estirpes se detectó una segunda actividad sintetasa de quitina a la que se asigna la síntesis de quitina in vivo (Orlean, 1987). Esta actividad posee algunas características comunes con la sintetasa de quitina I, incluyendo la activación por proteasas y la localización en la membrana plasmática: difiere en la dependencia de cationes y el pH óptimo al que actúa. La clonación del gen *Chs2* se ha realizado por inducción de superproducción de actividad sintetasa de quitina II mediante la transformación con plásmidos multicopia de una cepa carente de actividad *Chs1* (Silverman et al., 1988). Por experimentos de disrupción génica se ha visto que el gen *Chs2* es esencial para la división celular tanto en fondos genéticos *Chs1⁻* como *Chs1⁺*.

Celulosa

Es el compuesto orgánico mas abundante en la Tierra. La celulosa es un polímero lineal compuesto por cadenas de unos 14.000 residuos anhidroglucosa en configuración de silla, unidos por enlaces beta-1,4. Como cada residuo está girado 180 grados en torno al eje principal respecto al residuo siguiente la unidad básica de la celulos es el disacárido celobiosa. Las cadenas de celulosa, antiparalelas respecto a sus compañeras, se asocian mediante puentes de hidrógeno para formar fibrillas insolubles. Se ha visto que la red de puentes de hidrógeno consiste en uniones inter e intra moleculares entre residuos de dextrosa sucesivos y adyacentes. Varias fibrillas se agregan para formar las fibras de celulosa típicas, inertes, insolubles y de gran resistencia. En las fibras de celulosa hay áreas cristalinas y otras menos ordenadas o amorfas. La cristalinidad del material nativo es uno de los factores que le confieren elevada resistencia a la hidrólisis enzimática. Al microscopio electrónico la celulosa se presenta como fibrillas de 3.5 nm de ancho que tienden a agregarse en fibras mayores.

No se conoce prácticamente nada de la síntesis de la celulosa, y no deja de ser llamativo que un material tan abundante en la naturaleza no haya sido aun sintetizado in vitro. En extractos libres de células se consigue la síntesis de un polímero de glucosa unida por enlaces beta-1,4 que a diferencia de la celulosa nativa, es sensible a celulasas, dando restos de celobiosa. No se trata de verdadera celulosa porque carece de la ordenación de fibrillas característica de esta sustancia. Las paredes celulares de Phycomyces carecen de celulosa en todas las fases de su ciclo de vida.

Glucanas

Este polisacárido es un componente esquelético típico en muchos hongos. Está compuesto por D-glucosa unida por enlaces beta-1,3 y beta-1,6. La proporción de un tipo u otro de enlaces varía mucho en distintos hongos. El grado de ramificación, dado por el número de enlaces 1,6 influye grandemente en la cristalinidad del polímero. Las paredes de Saccharomyces cerevisiae contienen tres tipos de glucana-R. Uno es un polímero insoluble, de alto peso molecular que se presenta en cadenas lineales con enlaces beta-1,3 y un 3% de enlaces beta-1,6 que representan ramificaciones. Los otros dos tipos son relativamente solubles: en uno de ellos, soluble en álcali, predominan los enlaces 1,6 y solo presenta un 19% de enlaces 1,3, que sirven principalmente de unión entre moléculas. El tercer tipo posee enlaces 1,6 y es soluble en ácido. La baja longitud media y el alto grado de ramificación dificultan el alineamiento de las cadenas y la formación de agregados insolubles se ve muy restringida (Farkas, 1985).

La glucana-S es un polímero lineal de D-glucosa con enlaces alfa-1,3 que se localiza principalmente en la capa externa de la pared, donde forma gruesas e irregulares fibrillas. En algunos hongos se utiliza como polisacárido de reserva (Gooday y Trinci, 1980)

Glucoproteínas

Constituyen un grupo bastante heterogéneo de moléculas caracterizadas por la presencia de enlaces covalentes entre una parte proteica y otra glucídica que desempeñan un papel cementante en la pared. El tamaño y la composición de la parte glucídica son muy variables. La unión a la proteína puede realizarse mediante enlaces N-glicosídicos entre una N-acetilglucosamina y un resto asparragínico o por enlace

O-glicosídico a serina o treonina. De los complejos glucoproteicos, uno de los mas estudiados ha sido la manana de levaduras. Contiene esencialmente dos tipos de residuos glucídicos que difieren en tamaño, composición y forma de enlace a la proteína: una cadena externa, constituida por unas 150 unidades de manosa, y un pequeño núcleo interno de unas 15 unidades. Las manosas están unidas por enlaces alfa-1,4 con cadenas laterales unidas por enlaces alfa-1,2 y 1,3.

La glicosilación de las proteínas ocurre por un mecanismo que parece caracterizar a todas las células eucariotas y en el que participan moléculas de azúcares activados en forma de nucleótidos y alcoholes isoprenoides de alto peso molecular, llamados dolicoles, que acarrean las moléculas de azúcar por los sistemas membranosos. La intervención de los dolicoles en la síntesis de manoproteínas de levadura fué descubierto por Sentandreu y Lampen en 1969 de forma simultánea.

Estructura de la pared celular.

Se han hecho relativamente pocos intentos de determinación de la estructura de la pared de la punta de la hifa. Este tipo de estudios serían muy útiles para una mejor comprensión de la morfogénesis celular, porque está claro que las propiedades y el comportamiento de la pared primaria son cruciales en el ulterior desarrollo de los organismos. Dada la velocidad de crecimiento de muchos hongos, es obvio que el ensamblaje y la deposición de microfibrillas deben ser extremadamente rápidos. Además las microfibrillas deben ser sintetizadas a través de la zona de crecimiento, porque su número por unidad de volumen de pared permanece constante, o a lo sumo se incrementa ligeramente desde la punta a la base de la zona de extensión (Burnett, 1979). El espesor de la zona es constante, lo que sugiere que el gradiente en la tasa de expansión de la zona superficial es paralelo a la tasa de deposición de pared y membrana.

La pared primaria que se forma en el extremo de la hifa forma la capa mas interna de la pared madura. Las observaciones realizadas usando técnicas de fluorescencia muestran que la quitina en la pared primaria es mas accesible a tinciones con colorantes específicos que la quitina de la pared madura, quizás porque el material de la pared secundaria se deposita por encima (Gull y Trinci, 1974; Murgui et al, 1986).

La orientación de las microfibrillas en las puntas de las hifas de numerosos hongos ha sido estudiada por Roelofsen (1965) que encontró que las microfibrillas depositadas en la superficie interna de la pared de los esporangióforos de estadio I de Phycomyces blakesleeanus exhibían una orientación predominantemente transversa, mientras que las microfibrillas de la parte externa tenían orientación isotrópica. Scurfield (1967) realizó parecidas observaciones en las hifas de Polyporus myllitae. Roelofson y Houwink propusieron en 1953 la teoría multirred del crecimiento: Las nuevas microfibrillas se depositarían en la cara interna de la pared y gradualmente se irían desplazando hacia fuera como resultado de la nueva deposición de fibras. La extensión de la pared causaría que las fibras cambiaran su orientación a lo largo del tiempo de transversales a aproximadamente isotrópicas e incluso axiales. Sin embargo, Aronson y Preston (1960) encontraron que en Allomyces macrogynus la fibras de la cara interna de la pared se orientaban paralelas al eje longitudinal del rizoide. Lo mismo encontraron Tokunaga y Bartnicki-García en 1971 en Phytophthora palmivora. Es posible que el crecimiento propuesto en la teoría multirred ocurra solo en hongos como Phycomyces blakesleeanus que tienen grandes áreas de extensión y gruesas paredes primarias compuestas a su vez de varias capas.

INHIBIDORES DE LA SINTESIS DE PARED CELULAR

Síntesis de quitina

Polioxinas

Las polioxinas son una familia de antibióticos antifúngicos aislados a partir de Streptomyces cacaoi. Inhiben la síntesis de quitina por competición con la UDP-N-acetilglucosamina con la que poseen un cierto parecido estructural. Los valores de k_i de la polioxina D para la síntesis de quitina de varios de hongos sensibles va de 0.6 a 3 μM (Gooday, 1977) y son mucho menores que la k_m para el sustrato UDP-N-acetilglucosamina, que está en torno a 1 mM.

La inhibición del crecimiento de células enteras requiere concentraciones mucho mayores de polioxina que la inhibición in vitro. No existe una explicación satisfactoria de esta discrepancia, aunque se barajan diversas hipótesis. Las más plausibles son los problemas de transporte y la inactivación en el interior de las células. El estudio de la actividad biológica de diversas modificaciones químicas de polioxinas (Emmer et al., 1984; Smith et al., 1986) sugiere que la cadena peptídica es esencial para la inhibición, ya que pequeñas variaciones de esta región pueden conducir a una pérdida considerable de la actividad inhibitoria.

Nicomincinas

Las nicomicinas fueron aisladas por Dahn en 1976 a partir de cultivos de Streptomyces tendae. Tanto en estructura (Figura 3) como en modo de actuación están muy relacionadas con las polioxinas, y al igual que éstas inhiben con altísima

eficacia la sintetasa de la quitina de una amplia variedad de organismos en sistemas libres de células. Parece que el mecanismo de entrada en las células es, al igual que ocurre en el caso de las polioxinas, a través de sistemas de transporte de péptidos. A diferencia de éstas no sufren el efecto antagonista de la presencia de péptidos en el medio de cultivo. Esto se explica por la mayor afinidad de las nicomicinas por dichos sistemas: el efecto inhibitorio de las nicomicinas in vivo se aproxima mas al conseguido in vitro que en condiciones paralelas utilizando polioxinas (Furter y Rast, 1985).

Polienos

Algunos antibióticos poliénicos inhiben la síntesis de quitina en quitosomas aislados de Mucor rouxii. Los efectos son variables según el polieno de que se trate. La anfotericina B inhibe de modo no competitivo la enzima aislada a concentraciones por encima de 10 μM . La acción de la nistatina parece ser mas compleja: a altas concentraciones inhibe la sintetasa de quitina, pero en la región de 50 μM se observa una marcada estimulación. La filipina y la pimaricina también inhiben la síntesis de quitina. La concentración mínima inhibitoria de estos compuestos para el crecimiento de Mucor rouxii van desde 1 μM para la anfotericina B a 6 μM para la filipina, valores al menos un orden de magnitud por debajo de los necesarios para dar una inhibición sustancial de la sintetasa de quitina in vitro, y es poco probable que la inhibición del enzima esté implicada en los efectos de inhibición del crecimiento de los polienos. Se interpretan estos datos como evidencias de la existencia de lugares específicos de unión de polienos, posiblemente esteroides, asociados con la sintetasa de quitina, y sugiere que los esteroides podrían tener un papel en la actividad del enzima.

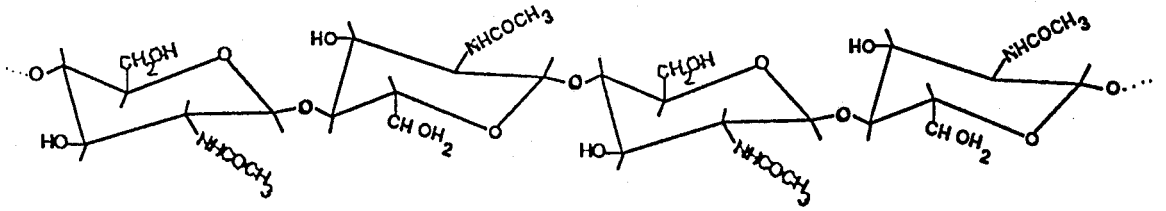


Figura 2. Fórmula estructural de la quitina.

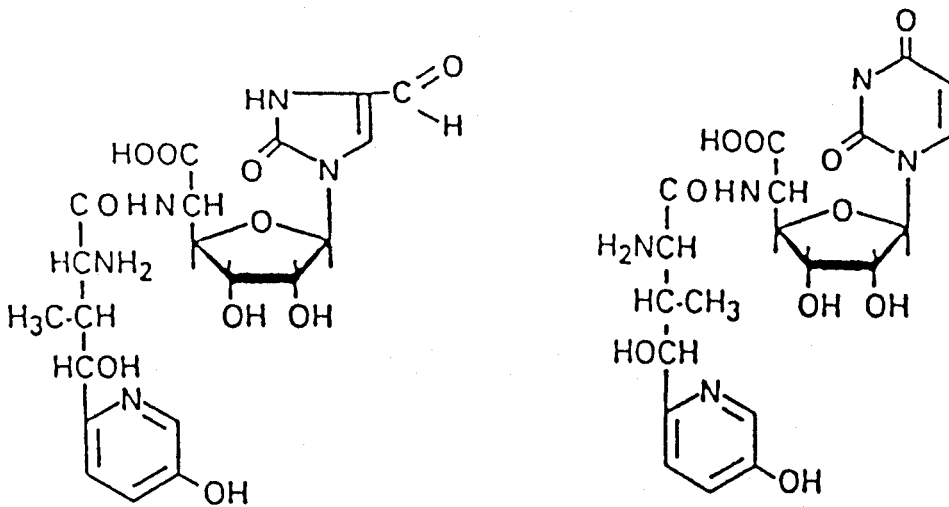


Figura 3. Fórmula estructural de las nicomicinas X y Z.

Otros inhibidores

la avermectina es un antibiótico macrocíclico actone producido durante la fermentación de Streptomyces avermitilis que afecta el metabolismo de la quitina en hongos y artrópodos (Calcott y Fatig, 1984)

La primulina ha sido usada extensamente como tinción para la quitina. In vitro actúa como inhibidor no competitivo de la sintetasa de quitina, con una constante de inhibición aparente de aproximadamente 14 μM (Selitrenikoff, 1985).

La tetaína inhibe la síntesis de quitina y manoproteína mediante la inhibición de la enzima glucosamina-6-fosfato sintetasa, un enzima clave en la síntesis de estos dos tipos de moléculas (Milewski et al., 1986).

Síntesis de manoproteínas

Tunicamicina

Es un antibiótico complejo producido por Streptomyces liposuperificus. El antibiótico inhibe la formación de dolicol-P-P-N-acetilglucosaminaa partir de UDP-N-acetilglucosamina y dolicol-fosfato, en un estadio temprano de la síntesis del componente glucídico de las manoproteínas.

Bacitracina

Es una mezcla compleja de péptidos cíclicos producida por algunos Bacillus. En sistemas bacterianos se unen a un C₅₅-poliprenol-difosfato, e impiden que actúe como transportador en la síntesis de peptidoglucano porque inhiben la hidrólisis de este compuesto a monofosfato. En Saccharomyces al parecer inhibe la formación de dolicol-fosfato-quitobiosabranosas de Sacch. es distinto en que aparentemente inhibe la formación de unidades de dolicol difosfato-quitobiosa, con la consiguiente acumulación de derivados dolicol-difosfato-N-acetilglucosamina.

Síntesis de beta-glucana

Equinocandina y papulacandina

Ambas inhiben la incorporación de glucosa a beta-glucana. La síntesis de glucana in vitro en Candida albicans es sensible a concentraciones de equinocandina equivalentes a las requeridas para inhibir el crecimiento. A concentraciones altas la equinocandina reduce la tasa de síntesis inicial en un 80%. Aparentemente hay poco efecto del antibiótico sobre el valor de k_m para el sustrato. Similares efectos inhibitorios se han visto para la inhibición por papulacandina B y la aculeacina A (antibiótico similar a la equinocandina) en síntesis de glucana de Geotrichum lactis Pérez et al., 1981). Los rápidos cambios morfológicos que culminan en la lisis celular que ocurren al añadir equinocandina a cultivos de C. albicans concuerdan con la idea de que ésta ejerce efectos inhibitorios sobre la síntesis de glucanas de la pared.

MATERIALES Y METODOS

Estirpes

La tabla 1 muestra las estirpes de Phycomyces blakesleeanus usadas en este trabajo junto con sus genotipos y orígenes, y los heterocariontes con sus fenotipos. Todos ellos derivan de la estirpe silvestre NRRL1555, usual en los estudios genéticos y fisiológicos, y de la estirpe A56, isogénica con aquella pero de sexo opuesto (Alvarez y Eslava, 1983).

Para la obtención de estreptozima se utilizó Streptomyces nº 6, generosamente cedido por el Prof. S. Torres Martínez, del Departamento de Genética de la Universidad de Murcia. Para la obtención de nicomicina se utilizó Streptomyces tendae Tü 901, generosamente cedido por el Dr. H.P. Fiedler, del Institut für Mikrobiologie, Universidad de Tubinga.

=====
 Tabla 1. Estirpes de Phycomyces blakesleeanus utilizadas en este trabajo. Las estirpes se designan con una letra mayúscula según el laboratorio donde fueron obtenidas: C el Instituto de Tecnología de California, Pasadena; A el Departamento de Genética de la Universidad de Salamanca; S el Departamento de Genética de la Universidad de Sevilla. En la descripción de genotipos squ designa mutaciones que afectan a la sintetasa de la quitina, col crecimiento colonial en todas las condiciones de cultivo, nic auxotrofia para ácido nicotínico, car mutación que afecta a la síntesis de beta-caroteno, (+) y (-) los dos sexos de Phycomyces. Las estirpes cuyo origen se indica por NG se aislaron tras la exposición de esporas a N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina; iso es isogénico de la estirpe silvestre NRRL 1555 obtenido por retrocruzamiento; en el caso de descendientes de un cruzamiento se indican los parentales del mismo. En los heterocariontes, el asterisco separa los dos tipos de núcleos presentes en el micelio.

Estirpe	Genotipo	Origen
A56	Silvestre (+)	iso
C2	<u>carA5</u> (-)	NRRL1555 NG
S102	<u>nicA101</u> (-)	NRRL1555 NG
S473	<u>nicA101</u> <u>col-1</u> <u>squA1</u> (-)	S102 NG
S474	<u>nicA101</u> <u>col-2</u> <u>squA2</u> (-)	S102 NG
S492	<u>nicA101</u> <u>col-3</u> <u>squA3</u> (-)	S102 NG
S493	<u>nicA101</u> <u>col-4</u> <u>squA4</u> (-)	S102 NG
S475	<u>nicA101</u> <u>col-5</u> <u>squA5</u> (-)	S102 NG
S494	<u>nicA101</u> <u>col-6</u> <u>squA6</u> (-)	S102 NG
S544	<u>nicA101</u> <u>squA1</u> (+)	A56 x S473
S546	<u>squA3</u> (+)	A56 x S474
S548	<u>nicA101</u> <u>squA4</u> (+)	A56 x S493

Heterocariontes	Fenotipo
C2 * S492	Silvestre
C2 * S493	Silvestre
S473 * S546	Resistente a nicomicina
S473 * S547	Resistente a nicomicina
S474 * S544	Resistente a nicomicina
S474 * S546	Resistente a nicomicina
S475 * S546	Resistente a nicomicina
S475 * S548	Resistente a nicomicina

=====

Condiciones de cultivo

Phycomyces. Como medio mínimo se utilizó el descrito por Sutter (1975) con 2 g/l de L-asparagina como fuente de nitrógeno. Para el crecimiento de los mutantes Nic^- se añadieron 20 mg/l de ácido nicotínico a partir de una solución concentrada en agua estéril. Como medio completo se usó el mismo suplementado con 1 gramo de extracto de levadura por litro. El medio sólido contenía 15 gramos de agar por litro. Para conseguir crecimiento colonial de las estirpes silvestres los medios mínimo y completo se acidificaron con 0.7 ml de ácido clorhídrico 35% (pH final 3.3). Como agares nutritivos se usaron el agar mínimo suplementado con 1 gramo de extracto de levadura por litro; y los agares YP (3 g/l de extracto de levadura, 10 g/l de peptona, 20 g/l de agar, pH 4.5), YPG (YP con 20 g/l de glucosa) e YPGlcNAc (YP con 0,2 g/l de N-acetil-glucosamina)

Los cultivos de *Phycomyces* se iniciaron a partir de esporas expuestas a choque térmico (48°C, 15 min) o mediante transplante de pequeños trozos de micelio fresco y se incubaron a 22 °C. Los cultivos con nicomicina se incubaron en la oscuridad.

Streptomyces nº 6. Se cultivó a 26°C en el medio descrito por Jeniaux (1966) (1 g/l de PO_4HK_2 , 0.5 g/l de $SO_4Mg \cdot 7H_2O$, 1 g/l de $Cl_3Fe \cdot 6H_2O$, 0.5 g/l de $ClNa$, 3 g/l de extracto de levadura y 5 g/l de glucosa). El medio sólido contenía 15 gramos de agar por litro. Para la inducción de enzimas líticas se utilizó el mismo medio, sustituyendo el extracto de levadura por 0.5% (p/v) de quitina, 0.1% (p/v) de quitosana reprecipitada (Van Heeswickj, 1984) y 1% de paredes celulares de Phycomyces.

Streptomyces tendae. Se cultivó a 27°C en el medio descrito por Dahn et al. (1974) (4 g/l de extracto de levadura, 10 g/l de extracto de malta, 4 g/l de glucosa, 20 g/l de agar). Para la producción de nicomicina se usó un medio que contenía 10 g/l de almidón,, 10 g/l de extracto de levadura, 30 g/l de manitol y 20 g/l de harina de soja en agua no destilada

METODOS GENETICOS

Mutagénesis

Se utilizó el mutágeno N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguani-
dina según el método descrito por Roncero et al. (1984). Se
expusieron 5×10^8 esporas de la estirpe S102, sensible a
nicomicina, a 100 ug/ml de mutágeno durante 20 minutos y se
sembraron en medio rico aproximadamente 10^5 esporas viables
por caja. Después de un ciclo vegetativo completo las esporas
de cada caja se recogieron por separado y se sembraron en me-
dio selectivo (medio mínimo con 40 uM nicomicina) aproxima-
damente 5×10^5 esporas por caja. Tras dos días de incubación
se aislaron las colonias de crecimiento mas evidente (no mas
de una por reciclado) y se mantuvieron durante tres ciclos
vegetativos completos en medio selectivo.

Formación de heterocariontes intrasexuales

Como fuente de actividad quitinasa se utilizó Novozym 234
(Novo Industry, Bagsvaerd, Dinamarca). Para completar el
efecto lítico de este preparado comercial se obtuvo estrep-
tozima con actividad quitosanasasa purificando parcialmente el
caldo de Streptomyces nº 6, según el método descrito por Suá-
rez et al (1987). La actividad lítica se valoró de acuerdo
con Van Heeswickj (1984).

La fusión de protoplastos se realizó según el método descrito por Suárez et al. (1987). La tabla 1 indica las estirpes utilizadas en las fusiones. Los heterocariontes son amarillos por complementación de la mutación *carB* y protótrofos por complementación de la auxotrofia para ácido nicotínico.

Formación de heterocariontes intersexuales

Se obtuvieron mediante el método descrito por Gauger et al. (1980) transfiriendo a cajas de medio agar-patata cigosporas inmaduras y seleccionando las zonas de crecimiento que presentan aspecto granuloso, color amarillo más intenso que las estirpes parentales y pseudóforos (estructuras en forma de tirabuzón características de este tipo de heterocariontes).

Cruzamientos

Para realizar los cruzamientos se siguió el método descrito por Eslava y Alvarez (1987). Los análisis de tétradas se hicieron recogiendo las germo esporas de cada germo esporangio en tubos con 1 ml de agua estéril y sembrando alícuotas en los medios apropiados.

METODOS BIOQUIMICOS

Determinación de la síntesis de quitina in vivo

Se inocularon 400 ml de medio YPGlcNAc con esporas previamente activadas de la estirpe S102 a una concentración final de 5×10^5 por ml. Tras 14-15 horas de agitación a 24°C las germínulas se lavaron con caldo YP y se suspendieron en 5 mililitros del mismo, donde se mantuvieron durante 30 minutos en agitación. A continuación se añadieron nicomicina (25 μ M) y 3H GlcNAc (0.1 uC/ml); y a los tiempos indicados se sacaron muestras de 1 ml. A cada muestra se añadió 1 ml de HCl 2 N, se centrifugó y el precipitado se resuspendió en 1 ml de etanol al 66% en 1N NaOH (v/v), manteniéndolas luego durante cinco minutos en agua hirviendo. Las muestras se filtraron a través de filtros de fibra de vidrio Schleicher&Schull nº6 y el material retenido se lavó con una mezcla de ácido acético 1N y etanol (70:30 v/v). Tras secar los filtros a 60°C se midió la radiactividad presente en ellos utilizando un contador de centelleo Beckman modelo LS 7800. Este es esencialmente el método descrito previamente por Bartnicki- García y Lippmann (1977).

Determinación de la actividad sintetasa de quitina in vitro.

Se prepararon los extractos según el método descrito por Martínez-Cadena y Ruiz-Herrera (1987): mediante filtración a través de papel Whatman nº1 se recogieron y lavaron con abundante agua destilada germínulas de Phycomyces de 14-15 horas de edad crecidas en medio YPG y se resuspendieron en

tampón Tris-HCl 50 mM pH 7.8 con sacarosa 20% y EGTA 1 mM. El volumen final (alrededor de cuatro ml por gramo de peso húmedo de germinulas) se mezcló con medio volumen de perlas de vidrio de 0.45-0.5 mm de diámetro y se rompieron las células en un homogenizador Braun modelo MSK (Braun, Melsungen, RFA), durante 60 segundos en frío. Todas las operaciones siguientes se hicieron a 0-4°C. El homogenado se centrifugó a 3000 rpm para eliminar las paredes celulares, y el sobrenadante se centrifugó a 6500 g durante 30 minutos. El nuevo sobrenadante se mezcló con suficiente solución saturada de sulfato amónico a pH 7.8 para que la concentración final de la sal fuera de 400 g/l, y se agitó ocasionalmente durante 1 hora. Se recogió el precipitado por centrifugación a 27000 g durante 20 minutos, y se resuspendió en un volumen pequeño (1-2 ml) de tampón Tris-HCl a pH 7.8, con 200 g/l de sacarosa y EGTA 1 mM. Se hizo pasar este extracto por una columna de 40 ml de Bio-gel A5m (Bio-rad), eluyendo con el mismo tampón. Se recogieron fracciones de 2 ml y las más turbias, que corresponden al volumen de exclusión, se usaron para los ensayos de la actividad sintetasa de quitina.

La actividad sintetasa se midió según el método descrito por Herrera-Estrella y Ruiz-Herrera (1983). La activación de la sintetasa de la quitina se llevó a cabo mediante tratamiento con tripsina (100 ug/ml) durante 30 minutos. La proteólisis se detuvo al tiempo deseado añadiendo 200 ug/ml de inhibidor de tripsina de soja. Las mezclas de reacción contienen 50 ul del extracto enzimático, MgCl₂ 20 mM, 22500 cpm ¹⁴C UDPGlcNAc (actividad específica 11.1 GBq/mmol) y distintas cantidades de UDP-N-acetil-glucosamina (sustrato), N-acetil-glucosamina (efector alostérico) y nicomicina (inhibidor)

En experimentos preliminares se utilizaron para el mismo fin fracciones mixtas de membrana, obtenidas por centrifugación a 35000 rpm de extractos libres de células. En algunos experimentos en los que se utilizó la fracción mixta de membranas, la activación proteolítica se realizó añadiendo directamente tripsina a las mezclas de reacción.

Determinación de la actividad transferasa de manosa

Se partió de 2×10^7 germínulas de Phycomyces de 15 horas de edad, obtenidas por incubación en medio YPG a 24°C y resuspendidas en 10 ml de tampón tris-maleato 50 mM pH 6.8. Después de homogenizar y eliminar las paredes celulares por centrifugación como en el apartado anterior se obtuvo la fracción mixta de membranas centrifugando a 25000 g durante 45 minutos a 0°C. Con la ayuda de un homogenizador de tejidos, se resuspendió esta fracción en 2.5 ml de tampón, y este extracto se utilizó como fuente de enzima. Se midió actividad por el método de Gutiérrez-Corona y Ruiz-Herrera (1979). Las mezclas de incubación contienen 50 μ l de extracto, MnCl_2 120 mM, 0.1 nmol de ^{14}C GDP manosa (actividad específica 9 GBq/mmol), y distintas cantidades de nicomicina. La reacción se detuvo con ácido tricloroacético al 10% y las muestras se filtraron por fibra de vidrio Schleicher&Schull n°6, y se lavó el material retenido con ácido tricloroacético al 5% y etanol. La radiactividad del material insoluble se midió en un contador de centelleo Beckman modelo LS7800.

Determinación de la actividad invertasa.

Se transfirieron 5×10^7 germínulas de Phycomyces de 14-15 horas de edad obtenidas por cultivo en medio YPG a 100 ml de medio YP y se cultivaron en agitación a 24 °C durante 70 minutos. Se añadió nicomicina a una concentración final de 25 μ M y sucesivamente se tomaron muestras de 1 ml. Las células se lavaron por centrifugación y se resuspendieron en 1 ml de tampón acetato 50 mM pH 4.9 a 0°C. La capacidad de las célu-

las para producir y excretar invertasa fué determinada por el método de Gascón (1968). Se mezclan 200 ul de muestra, 100 ul de sacarosa 0.5 M y 100 ul de tampón acetato, se incuban a 30°C en agitación durante 30 minutos, se añaden 200 ul de K_2HPO_4 0.5M y se hierve la mezcla durante 5 minutos. Se deja enfriar a temperatura ambiente y se añaden 2 ml de reactivo de color: 0,3 mg/ml de ortodianisidina, 5 mg/ml de peroxidasa de rábano, 2 unidades de oxidasa de glucosa (una unidad oxida 1 umol de glucosa por minuto), NaH_2PO_4 0.1 M ,pH 7.0. Después de 10 minutos a 30°C en agitación se añaden 2.5 ml de HCl 6N y se mide la absorbencia a 540 nm. Los resultados se comparan con los de muestras con cantidades conocidas de glucosa. Se define que una unidad de invertasa libera 1 umol de glucosa por minuto a 30°C.

Determinación de la entrada de nicomicina en el esporangióforo.

Se sembraron esporas de Phycomyces activadas por calor sobre discos de membrana de diálisis de 8 cm de diámetro en cajas de agar mínimo y se incubaron 48 horas a 22 °C. Los discos se transfirieron a cajas del mismo medio que contenían nicomicina 100 μ M y se incubaron 24 horas a 22°C. Se recogieron los esporangióforos formados cortándolos por encima del micelio, se liofilizaron y se trituraron en un mortero en presencia de nitrógeno líquido. El homogenado se resuspendió en H_2O destilada (3 mg en 100 ul) y se centrifugó para quitar los restos de pared celular. El sobrenadante se añadió a 100 ul de caldo mínimo doblemente concentrado que contenía esporas de la estirpe #102 de Phycomyces (5×10^5 esporas por ml). Después de 15 horas de incubación en oscuridad a 22°C se observaron al microscopio las esporas y se compararon con esporas expuestas a concentraciones conocidas de nicomicina.

Extracción de nicomicina

Las determinaciones cuantitativas se hicieron con nicomicina purificada no comercial, generosamente cedida por el Dr. H. P. Fiedler, de la Universidad de Tubinga. Para otros usos se preparó nicomicina cultivando Streptomyces tendae durante 100 horas a 27 °C. El caldo (11) se acidificó con HCl 0,1 N y se aplicó a una columna Dowex 50Wx4(Na⁺) que se eluyó con 500 ml de hidróxido amónico 0.05N. Se recogió un volumen de salida de 500 ml. Este volumen se aplicó a una columna Amberlite IRA 401 S (OH⁻) con una velocidad de flujo de 1/6 de ml/s y se eluyó con ácido fórmico al 1%. El producto (400 ml) se aplicó a una columna SP-Sephadex C-25 (Pyr⁺) y se eluyó con tampón piridina-acetato 0,05N pH 4,7. Se recogieron fracciones de 10 ml y se determinó la presencia de nicomicina según la absorbencia a 280/340 nm (Figura 4). Las fracciones con nicomicina (de la número 3 a la 16) se liofilizaron y se almacenaron a 4 °C. La cantidad de nicomicina biológicamente activa se determinó comparando sus efectos sobre la germinación de esporas de la estirpe S102 con los de cantidades conocidas de nicomicina purificada.

RESULTADOS

MUTANTES RESISTENTES A NICOMICINA

Inhibición del crecimiento del tipo silvestre por la nicomicina

Las esporas de la estirpe silvestre pueden germinar y crecer normalmente en medio de cultivo que contenga nicomicina a concentración 1 μM . Con 5 μM las esporas se hinchan, pero no emiten tubos germinales. A concentraciones mayores, a partir de 10 μM , se inhiben tanto el hinchamiento como la formación de tubo germinal y la pared de la espora se rompe en un punto por el que el citoplasma sale al exterior. El micelio silvestre obtenido en agar mínimo no selectivo y transferido a agar mínimo con nicomicina 5 μM no crece en superficie, pero emite numerosos esporangióforos muy finos.

Aislamiento de mutantes resistentes a nicomicina

Se buscaron mutantes de Phycomyces resistentes a nicomicina por el procedimiento de Roncero y Cerdá Olmedo (1984). En esencia, se expusieron esporas de la estirpe S102, silvestres para la respuesta a la nicomicina, al mutágeno N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina; en dos experimentos similares sobrevivieron al mutágeno el 5.7 % y el 12.2 % de las esporas, respectivamente. Para seleccionar crecimiento vegetativo normal, los supervivientes se "reciclaron", es decir, se sembraron en agar nutritivo (18 cajas, 10^5 esporas viables en cada una) y se recogieron por separado suspensiones de esporas de cada caja. Para seleccionar los mutantes, las esporas recicladas se sembraron en agar mínimo con nicomicina (40 μM 240 cajas, 5×10^5 esporas en cada una); a los dos días se observa un apreciable crecimiento de fondo y algunas masas miceliales más densas. Se aislaron fragmentos de micelio denso procedentes de suspensiones distintas, se purificaron y se denominaron S473, S474, S475, S492, S493 y S494.

Los mutantes crecen normalmente en agar mínimo con 40 μM de nicomicina, ya se inoculen como esporas o como fragmentos de micelio.

Morfología de los mutantes resistentes a nicomicina

Tanto en presencia como en ausencia del antibiótico, los mutantes crecen como colonias densas y definidas, cuyo crecimiento limitado contrasta con el indefinido del tipo silvestre en los medios usuales sin antibiótico.

Pautas de ramificación

Los micelios de Phycomyces se componen de hifas que crecen por su ápice y, en una superficie de agar, se ramifican lateralmente formando una estructura bidimensional. La pauta de crecimiento, colonial en los mutantes resistentes a nicomicina e indefinido en el tipo silvestre, se relaciona con el modo de ramificación (Figura 5). Las ramas laterales son casi perpendiculares a la hifa inicial, tanto en el tipo silvestre como en los mutantes. Podemos llamar "entrenudos" a los espacios entre dos ramificaciones consecutivas de un tubo germinal de una espora, por analogía con las plantas, pero recordando que se trata de partes de una misma célula. Los entrenudos son más cortos en micelios mutantes que en el silvestre (Tabla 2). Al menos entre los diez primeros entrenudos de un tubo germinal no se observaron tendencias a variaciones sistemáticas de tamaño, tales como un progresivo aumento o disminución de la longitud.

En el tipo silvestre las ramas sucesivas se disponen al azar, con probabilidades iguales de aparecer en el mismo lado que la rama anterior o en el opuesto. En los mutantes, casi todas las ramificaciones son alternas (Tabla 2).

Influencia del pH y la presión osmótica en el crecimiento

En medios ácidos (pH 3,3) o en presencia de detergentes (por ejemplo, 0,5 % Triton X-100) el tipo silvestre desarrolla una morfología colonial, parecida a la de los mutantes resistentes a nicomicina en los medios usuales. Para determinar si la particular morfología de los mutantes se debe a una respuesta distinta a la de la estirpe silvestre a

=====

TABLA 2. Ramificación de las estirpes S474 y S493, resistentes a nicomicina, y de la estirpe parental S102 cultivadas durante 24 horas en agar mínimo a pH 4,5 y 22°C. Se consideran sólo las 8 a 10 primeras ramificaciones de cada tubo germinal. Se miden las distancias entre ramas sucesivas (longitud de entrenudo) y los ángulos que forman las ramas con el tubo germinal; los valores indicados son la media y su error típico. Se indican también las ramas que surgen en el lado opuesto al de la rama anterior (alternancia) y las que surgen en el mismo lado.

	Estirpes		
	S102	S474	S493
Ramas medidas	40	38	40
Longitud de entrenudo (uM)	153±97	26±14	33±16
Angulo de ramificación	75±11	85±9	83±6
Alternancia			
Si	25	32	33
No	19	2	3

=====

algún componente del medio, cualitativo o cuantitativo, se midió el crecimiento de la estirpe S102 y de varios mutantes resistentes a la nicomicina en distintos medios de cultivo. Las variables fueron: presencia de nicomicina, pH y concentración de sorbitol, utilizado como generador de presión osmótica. El crecimiento de los mutantes es indistinguible del silvestre en ausencia de nicomicina. No hay crecimiento silvestre en presencia de nicomicina, independientemente de la presión osmótica del medio. El ligero crecimiento que se observa a pH alto se debe probablemente a una inactivación parcial de la nicomicina. Los distintos mutantes resistentes a nicomicina presentan una inhibición parcial del crecimiento, alrededor del 50% en medios con nicomicina no osmoestabilizados. Esta inhibición concuerda cuantitativamente con la inhibición por nicomicina de la síntesis de quitina in vivo en los mutantes. La presencia de sorbitol mejora notablemente el crecimiento en nicomicina (Figura 6).

Determinación de la entrada de nicomicina en el micelio

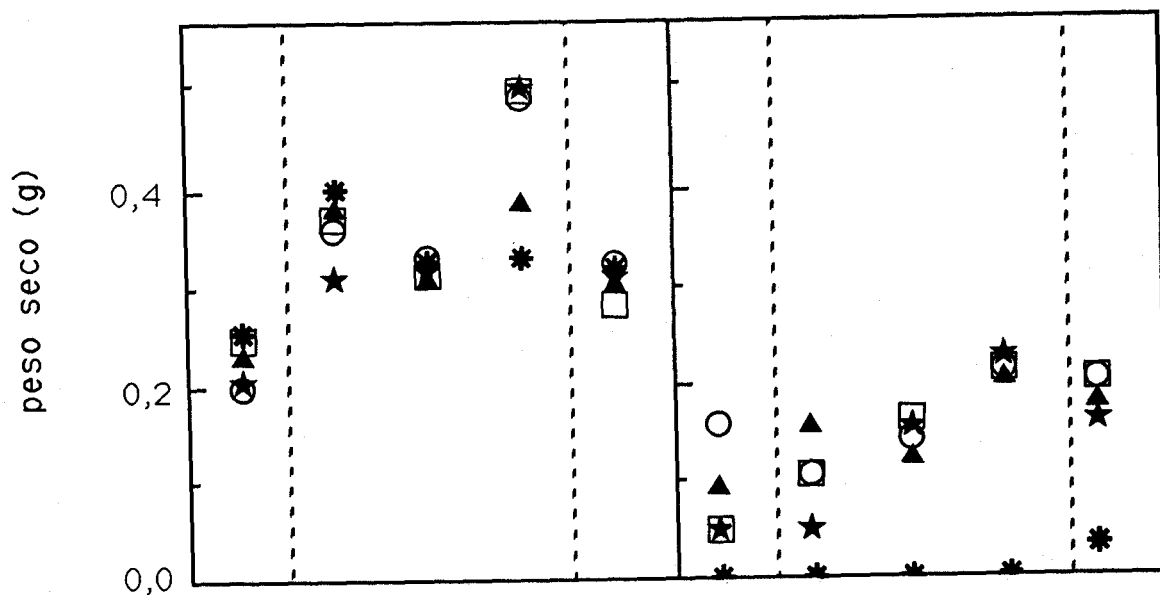
Las nicomicinas entran en las células mediante permeasas de péptidos (Yadan et al., 1984). Para determinar la presencia de nicomicina activa en el citoplasma de Phycomyces se prepararon extractos de macroesporangióforos de las estirpes S492, S493, S473, S474 y S102 producidos en presencia o ausencia de nicomicina 100 μM y se probó su efecto inhibitorio sobre la germinación de esporas silvestres (Tabla 3). Se observa que los extractos de todas las estirpes permiten la germinación normal de las esporas silvestres, es decir, que Phycomyces no es tóxico para sí mismo. Los extractos obtenidos de células cultivadas en presencia de nicomicina sí inhiben el crecimiento silvestre. Esto indica por un lado que la nicomicina entra en las células, y que por tanto el meca-

nismo de resistencia en los mutantes no es una pérdida de la función permeasa. Por otro, que la nicomicina presente en el citoplasma es biológicamente activa: la resistencia tampoco se debe a degradación interna de nicomicina, por enzimas o parámetros físicos del micelio mutante desfavorables a la acción del antibiótico.

=====
 Tabla 3. Efecto de extractos de esporangióforos producidos en presencia o ausencia de nicomicina sobre la germinación de 200 esporas silvestres que se clasifican en NG (no germinan), V (vacuolizadas sin tubo germinal), E (estallido de las germinulas con extrusión de citoplasma) y G (germinulas de aspecto normal). Las observaciones fueron realizadas 24 horas después de la adición de los extractos a esporas silvestres activadas por calor e incubadas en caldo mínimo a 22°C.

Estirpe	Extracto nicomicina	Observación de esporas			
		E	G	NG	V
S102	No	0	115	29	56
	Si	165	0	20	15
S492	No	0	107	37	56
	Si	107	21	33	39
S493	No	0	123	16	61
	Si	167	0	22	11
S473	No	1	152	20	23
	Si	148	0	11	41
S474	No	0	163	16	21
	Si	110	0	22	68
Testigos sin extracto					
Nicomicina	0uM	0	139	26	35
	1uM	97	23	54	26
	10uM	161	0	39	0
	100uM	166	0	34	0

=====



nicomicina (μM)	0					50				
pH	3,3	4,5	4,5	4,5	7	3,3	4,5	4,5	4,5	7
sorbitol (M)	0	0	0,4	0,7	0	0	0	0,4	0,7	0

Figura 6. Crecimiento de la estirpe silvestre y de mutantes resistentes a nicomicina en distintas condiciones de pH y presión osmótica en presencia y ausencia del inhibidor.

* S102 (silvestre); Δ , S473; \star , S474; \circ , S492; \square , S495.

ANALISIS GENETICO

Análisis genético por recombinación

La estructura mas llamativa del ciclo sexual de Phycomyces, la cigospora, es el producto de fusión de dos gametangios de distinto sexo. La germinación de la cigospora produce varios miles de germoesporas que son en la mayoría de los casos el producto de la meiosis de un solo núcleo diploide, formado por fusión de dos núcleos haploides de sexos opuestos. Como los cuatro productos haploides de una meiosis constituyen una tétrada, el conjunto de las germoesporas de un germoesporangio se puede considerar una tétrada expandida.

El análisis genético por recombinación puede hacerse por análisis en masa de las germoesporas descendientes de un cruce provenientes de al menos cien cigosporas o por análisis de tétradas, caracterizando fenotípicamente las germoesporas de cada germoesporangio. El análisis en masa proporciona información sobre el ligamiento de marcadores, mientras que el análisis de tétradas da, además, información sobre su posición respecto al centrómero.

Cuando se consideran dos marcadores genéticos determinados las tétradas se clasifican en ditipos parentales, que contienen ambos genotipos parentales; ditipos recombinantes, que contienen los dos genotipos recombinantes y tetratipos, que contienen las cuatro combinaciones posibles de genotipos. Cuando la frecuencia de ditipos parentales supera la de ditipos recombinantes los marcadores están ligados. Si ambas frecuencias son iguales, los marcadores son independientes. En el caso de genes independientes una baja frecuencia de tetratipos indica la proximidad de ambos genes a sus respectivos centrómeros.

A veces aparecen tétradas incompletas en las que faltan uno o más de los cuatro productos meióticos. Los tritipos y los ditipos anómalos (un genotipo parental y un genotipo recombinante) proceden de tetratipos que han perdido una o dos clases de descendientes. Los monotipos pueden provenir de ditipos parentales o recombinantes o, menos probablemente, de tetratipos que han perdido tres clases de descendientes.

La distancia entre dos genes ligados se calcula dividiendo el número de ditipos recombinantes mas la mitad del número de tetratipos por el número total de tétradas.

Segregación de colonialidad y resistencia

Para analizar genéticamente los nuevos mutantes se cruzaron las estirpes S473, S474, S475, S492, S493 y S494 por la silvestre. Todos los mutantes son fértiles, es decir, producen cigosporas capaces de germinar. En el caso de S494 se obtuvieron muy pocas cigosporas y se observaron muy pocas germinaciones. De los demás cruzamientos se eligieron arbitrariamente para análisis detallado los de S473, S492 y S493 con el silvestre (Tabla 4).

Los resultados de los cruzamientos indican que el fenotipo de los mutantes se debe a la presencia de dos mutaciones independientes col y squ, responsables respectivamente de la colonialidad y la resistencia. Al menos una de ellas está alejada del centrómero.

En los mismos cruzamientos se determinó la posición del marcador col respecto al sexo (Tabla 4). Se concluye que ambos genes marcadores están ligados. La distancia, medida como tanto por ciento de recombinación, es de 1.6, 2.9 y 2.1 % para los cruzamientos 1, 2 y 3 respectivamente. Al aplicar a estos valores la transformación arcoseno para distribucio-

=====
 Tabla 4. Análisis genético por recombinación de los mutantes S473, S492 y S493. Análisis de tétradas de la colonialidad y la resistencia (A) y la colonialidad y el sexo (B).
 =====

	Cruce		
	1	2	3
Cruce Núm. 1	S473 x A56		
Genotipos	<u>nicA101</u> <u>squ-1</u> <u>col-1</u> (-)	x	(+)
Cruce Núm. 2	S492 x A56		
Genotipos	<u>nicA101</u> <u>squ-3</u> <u>col-3</u> (-)	x	(+)
Cruce Núm. 3	S493 x A56		
Genotipos	<u>nicA101</u> <u>squ-4</u> <u>col-4</u> (-)	x	(+)
	1	2	3
Latencia (días)	116	120	98
Germoesporangios estudiados	50	60	60
Germoesporangios estériles	11	3	8
Germoesporangios semiestériles	7	4	6
Germoesporangios analizados	32	53	46
Colonias estudiadas	980	1972	1937
Germoesporas/germoesporangióforo	39,2	48,1	46,1
Varianza	11,5	9,4	10,4
A			
Tétradas regulares	21	33	32
Ditipos parentales	3	7	6
Ditipos recombinantes	4	9	3
Tetratipos	14	17	23
Tétradas irregulares	11	20	14
Monotipos parentales	3	3	3
Monotipos recombinantes	0	0	0
Ditipos anómalos	2	6	3
Tritipos	6	11	8
B			
Tétradas regulares	28	51	42
Ditipos parentales	28	50	40
Ditipos recombinantes	0	1	0
Tetratipos	0	0	2
Tétradas irregulares	4	2	4
Monotipos parentales	3	1	4
Monotipos recombinantes	0	0	0
Ditipos anómalos	1	1	0
Tritipos	0	0	0

=====

nes binomiales resultan formar parte de una misma distribución normal. Por tanto, se considera que las tres mutaciones pertenecen al mismo locus, con un valor medio de recombinación respecto al sexo del 2%.

En estos cruzamientos se obtienen descendientes squ (+), necesarios para llevar a cabo el análisis genético de las mutaciones squ como parentales en cruces squ x squ y para la construcción de heterocariontes intersexuales entre mutantes squ.

Análisis genético por recombinación de las mutaciones squ

Para determinar la relación entre los distintos marcadores squ se cruzaron mutantes resistentes a nicomicina y de distinto sexo y se hizo un análisis en masa de la descendencia (Tabla 5). La casi absoluta falta de recombinantes indica un estrecho ligamiento entre los cuatro marcadores involucrados. Como en la descendencia son indistinguibles los mutantes sencillos y los dobles, la frecuencia de recombinación entre los dos marcadores es el doble de la frecuencia de micelios silvestres entre el total de los descendientes.

=====

Tabla 5. Análisis genético por recombinación de los marcadores de resistencia a nicomicina.

Cruce	<u>S473 x S546</u>	<u>S473 x S548</u>	<u>S474 x S548</u>	<u>S492 x S548</u>
Genotipo relevante	<u>squ-1xsqu-3</u>	<u>squ-1xsqu-4</u>	<u>squ-2xsqu-4</u>	<u>squ-3xsqu-4</u>
Latencia (d)	119	97	106	115
Germoesporang. reunidos	69	45	92	50
Germoesporas investigadas	310	342	360	426
Recombinantes silvestres	1	0	0	0
% recombinación	0.6	0	0	0

=====

Análisis genético por complementación

En Phycomyces no se conocen diploides estables; el análisis genético por complementación se lleva a cabo mediante la construcción de heterocariontes. Los heterocariontes de Phycomyces son estables durante el ciclo miceliar y la proporción de núcleos de distinto tipo se mantiene constante en todo el micelio. Las esporas contienen muestras aleatorias de núcleos presentes en el micelio y pueden ser homocariontes o heterocariontes con distintas proporciones de cada tipo de núcleo. El estudio fenotípico de las esporas producidas por un micelio heterocarionte permite establecer su proporción nuclear (Heisenberg y Cerdá-Olmedo, 1968). El fenotipo de un heterocarionte informa sobre la dominancia o recesividad de una mutación y permite establecer grupos de complementación dentro de un conjunto de mutantes.

Recesividad de las mutaciones squ y col

Para caracterizar las mutaciones de resistencia a nicomicina se fabricaron heterocariontes de cada uno de los nuevos mutantes y la estirpe C2. Los heterocariontes se reconocen porque son micelios amarillos protótrofos cuyas esporas producen micelios blancos y amarillos. Todos los heterocariontes resultaron ser sensibles a concentraciones de nicomicina toleradas por el parental mutante (Tabla 6) y crecen indefinidamente en agar a pH 4.5. Se concluye que las mutaciones responsables de la resistencia a nicomicina y del crecimiento colonial son recesivas.

=====

TABLA 6. Recesividad de la resistencia a nicomicina. Crecimiento relativo de transplantes de micelio de las estirpes indicadas en agar mínimo con ácido nicotínico y las cantidades indicadas de nicomicina; p es la proporción de alelos silvestres squA.

Estirpe	Genotipo relevante	p	Nicomicina, μM					
			0	2.5	5	10	20	100
C2	Silvestre	1	+	+/-	-	-	-	-
S492	<u>squA3</u>	0	+	+	+	+	+	+
C2 * S492	Heteroc.	0.78	+	+/-	-	-	-	-
C2 * S492	Heteroc.	0.43	+	+/-	+/-	-	-	-
S493	<u>squA4</u>	0	+	+	+	+	+	+
C2 * S493	Heteroc.	0.82	+	+/-	-	-	-	-
C2 * S493	Heteroc.	0.35	+	+/-	+/-	-	-	-

=====

Establecimiento de grupos de complementación en los mutantes squ

Para determinar la complementación entre mutaciones squ se construyeron heterocariontes intersexuales según el método de Gauger entre mutantes squ de sexo (-) y los descendientes squ (+) de los cruzamientos de la tabla X. En agar mínimo con ácido nicotínico y una concentración de nicomicina de 20 uM, que distingue nítidamente los mutantes del tipo silvestre, crecen todos los heterocariontes intersexuales obtenidos:

S473 * S546, S473 * S548, S474 * S544, S474 * S546,
S475 * S546 y S475 * S548. Se concluye que las mutaciones squ-1, squ-2, squ-3, squ-4 y squ-5, presentes en estos heterocariontes, pertenecen al mismo grupo de complementación. Llamamos squA al nuevo gen definido por los alelos squ-1 a squ-5. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en el análisis genético en masa de la descendencia de cruzamientos squ x squ que indican la proximidad de las mutaciones en el mapa genético.

La estirpe S494 no completó la reacción sexual con las estirpes S546 y S547, por lo que no se consiguieron heterocariontes intersexuales. Por tanto se ignora si la mutación squ-6 pertenece al gen squA.

CARACTERIZACION BIOQUIMICA DE LOS MUTANTES

Efecto de la nicomicina sobre la síntesis de quitina

Se midió el efecto de la nicomicina sobre la síntesis de quitina "in vivo" incubando germínulas de 14 horas en presencia de ^{14}C GlcNAc con o sin nicomicina 25 μM . A intervalos se midió la cantidad de radiactividad incorporada a material insoluble en ácido y álcali. En las condiciones en que se lleva a cabo el experimento, la incorporación de sustrato a quitina en ausencia de nicomicina es lineal durante los primeros diez minutos, tanto en la estirpe silvestre, S102, como en los mutantes. La adición de nicomicina inhibe rápida y efectivamente la síntesis de quitina silvestre y en mucho menor grado la correspondiente a los mutantes. En ambos casos la incorporación es lineal durante al menos 30 minutos (Figura 7). Para estimar el grado de inhibición calculamos la relación entre las pendientes de las rectas que representan la incorporación en presencia y ausencia de antibiótico. En la estirpe silvestre esta relación tiene un valor medio de 8.4 %; en el mutante S492, 42 % y en el mutante S493 es del 42.3%

La actividad sintetasa de quitina ensayada in vitro es la misma en los mutantes que en el tipo silvestre y es igualmente sensible a nicomicina. Estas observaciones se cumplen cuando la preparación enzimática es una fracción mixta de membranas de homogenados celulares (Figura 8).

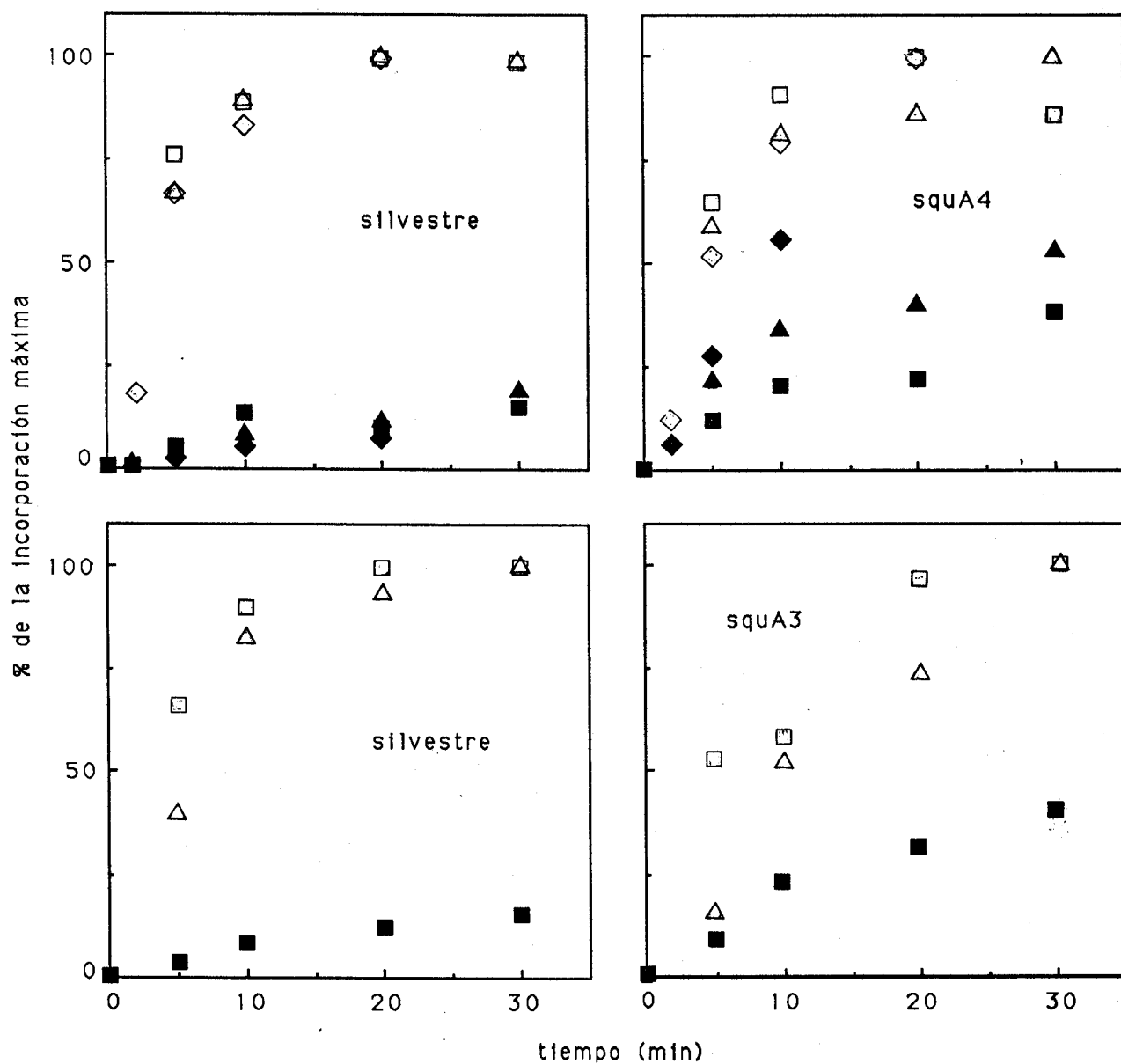


Figura 7. Efecto de la nicomicina sobre la síntesis de quitina in vivo. Símbolos vacíos = sin nicomicina. Símbolos llenos = nicomicina 25 μ M. Estirpes: S102, silvestre para síntesis de quitina; S492, *col-3 squA3*; S493, *col-4 squA4*.

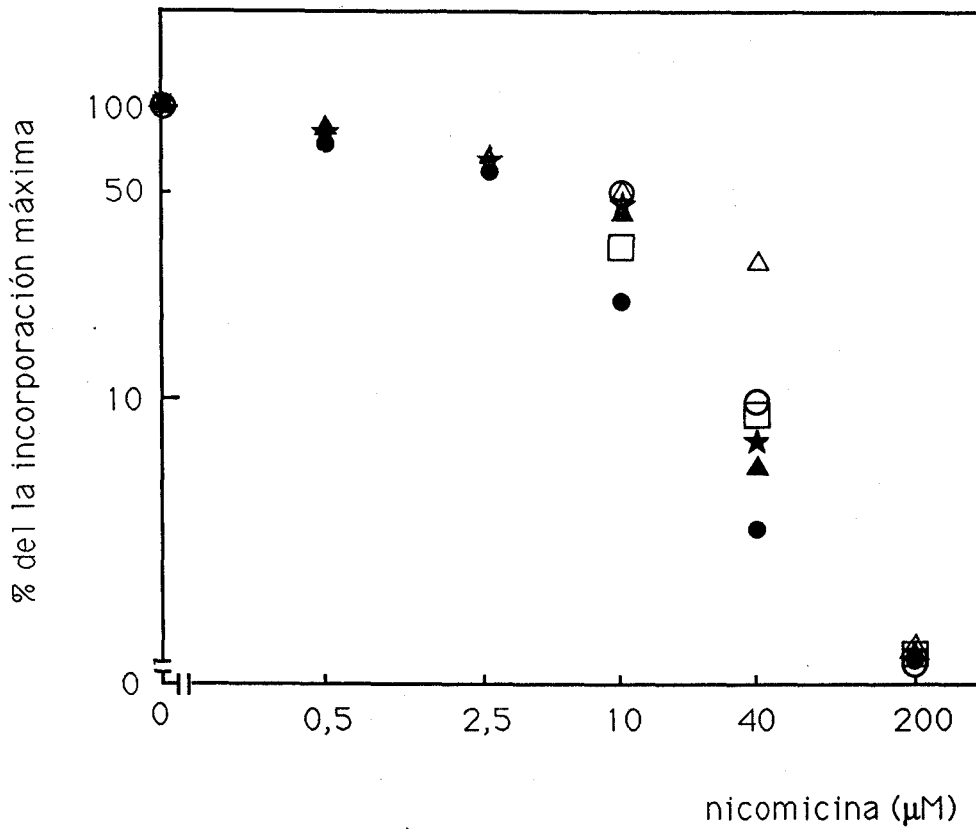


Figura 8. Efecto de la nicomicina sobre la actividad "in vitro" de la sintetasa de quitina de la estirpe silvestre, S102, y de cinco mutantes *squA*. Las preparaciones enzimáticas son la fracción mixta de membranas de homogenados celulares. ● S102; □, S473; Δ , S474; ○, S492; ★, S493 y ▲, S474. Los valores de incorporación máxima de precursor radiactivo son, respectivamente, 178, 168, 159, 106, 155 y 189 Bq/s g de proteína.

Preparaciones purificadas por cromatografía en gel de un precipitado por sulfato amónico de extractos libres de células responden del mismo modo al inhibidor. Las concentraciones de nicomicina necesarias para inhibir la actividad in vitro son mucho mayores que las efectivas in vivo. Las preparaciones mencionadas fueron preactivadas con tripsina durante media hora y se añadió un inhibidor de tripsina antes de los ensayos. Existe no obstante una pequeña actividad basal que se comporta de manera idéntica a la forma activada (Figura 9). Tampoco se observan diferencias entre mutante y silvestre cuando se utiliza como agente activador calcio en lugar de tripsina (Figura 10) o cuando se activa la preparación con tripsina durante los ensayos.

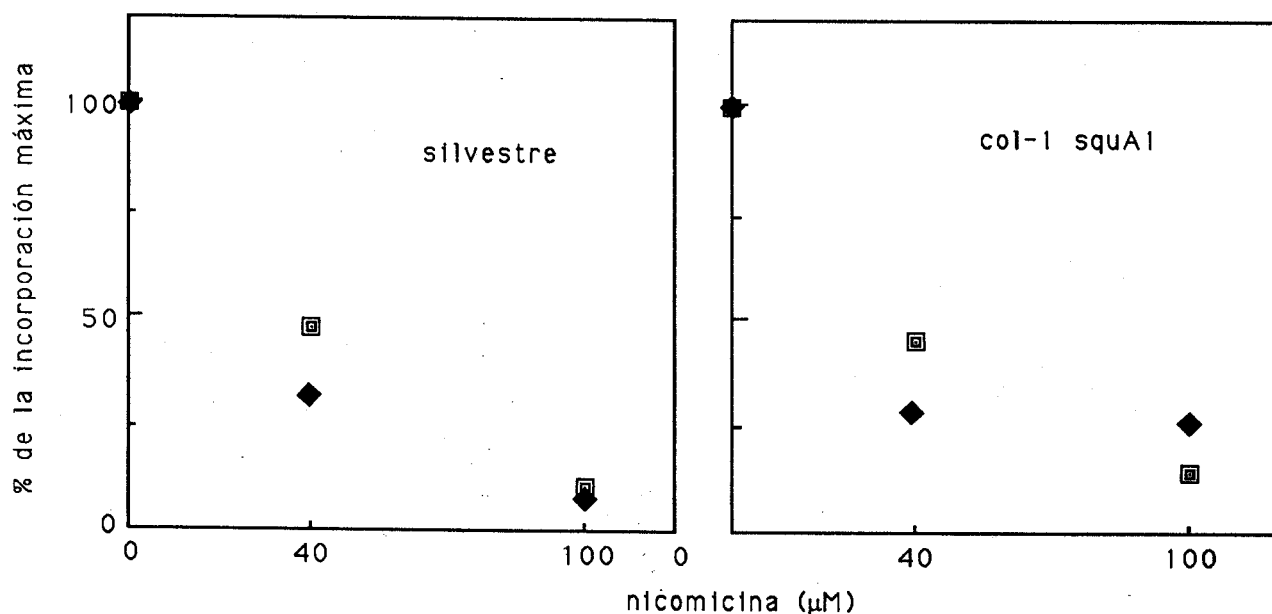


Figura 9. Efecto de la nicomicina sobre la actividad sintetasa de quitina de la estirpe silvestre y del mutante S473. ◆ = sin activación por tripsina; ◻ = con activación por tripsina. Los valores de actividad máxima son, para la estirpe silvestre, 190 (con activación) y 29 (sin activación) Bq/s g de proteína. Para el mutante, 141 y 14 Bq/s g de proteína en las mismas condiciones.

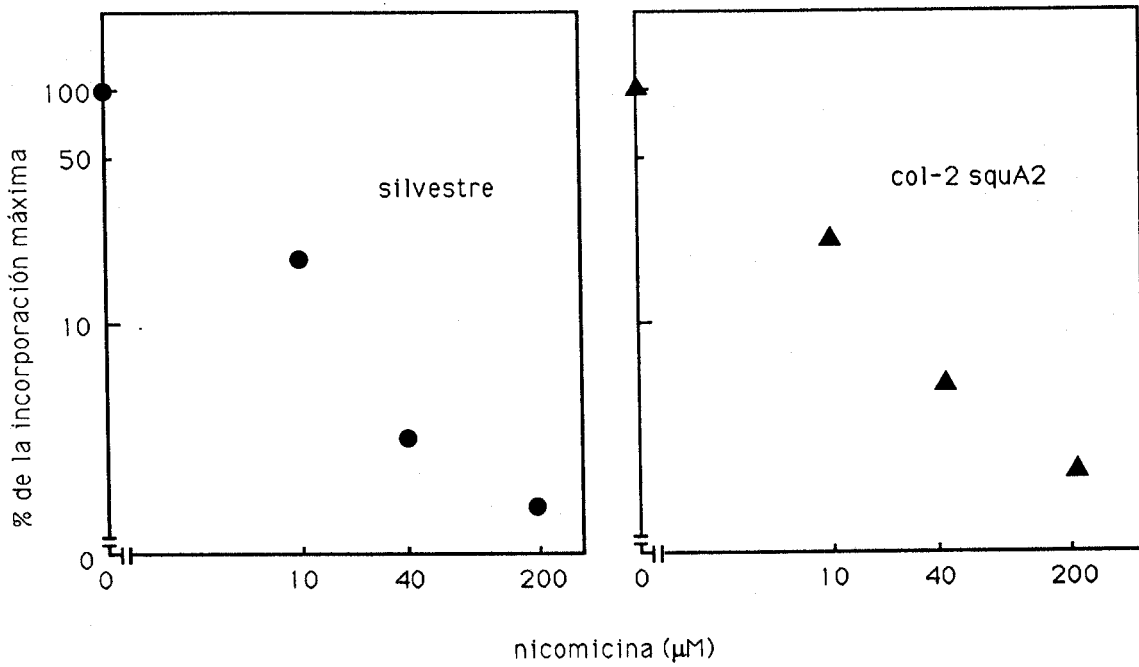


Figura 10. Actividad in vitro de la sintetasa de quitina en extractos activados con cloruro cálcico 5 mM. La velocidad de incorporación máxima es la estirpe silvestre es de 20 Bq/s g de proteína y en el mutante $\Delta 474$ 28 Bq/s g de proteína.

La semejanza de conducta global sugirió un estudio detallado de las propiedades cinéticas de la sintetasa de quitina del tipo silvestre y de los mutantes. La afinidad de la enzima silvestre y la mutante por el sustrato, UDP-N-acetilglucosamina, es muy parecida (Figura 11). No así por el efector alostérico, donde la diferencia es notable (Figura 12). En cuanto a la cinética de inhibición y la afinidad por el antibiótico, la estirpe silvestre y las mutantes presentan diferencias tanto cualitativas (inhibición competitiva en el silvestre; no competitiva en los mutantes) como cuantitativas (Figuras 13 y 14; tabla 7)

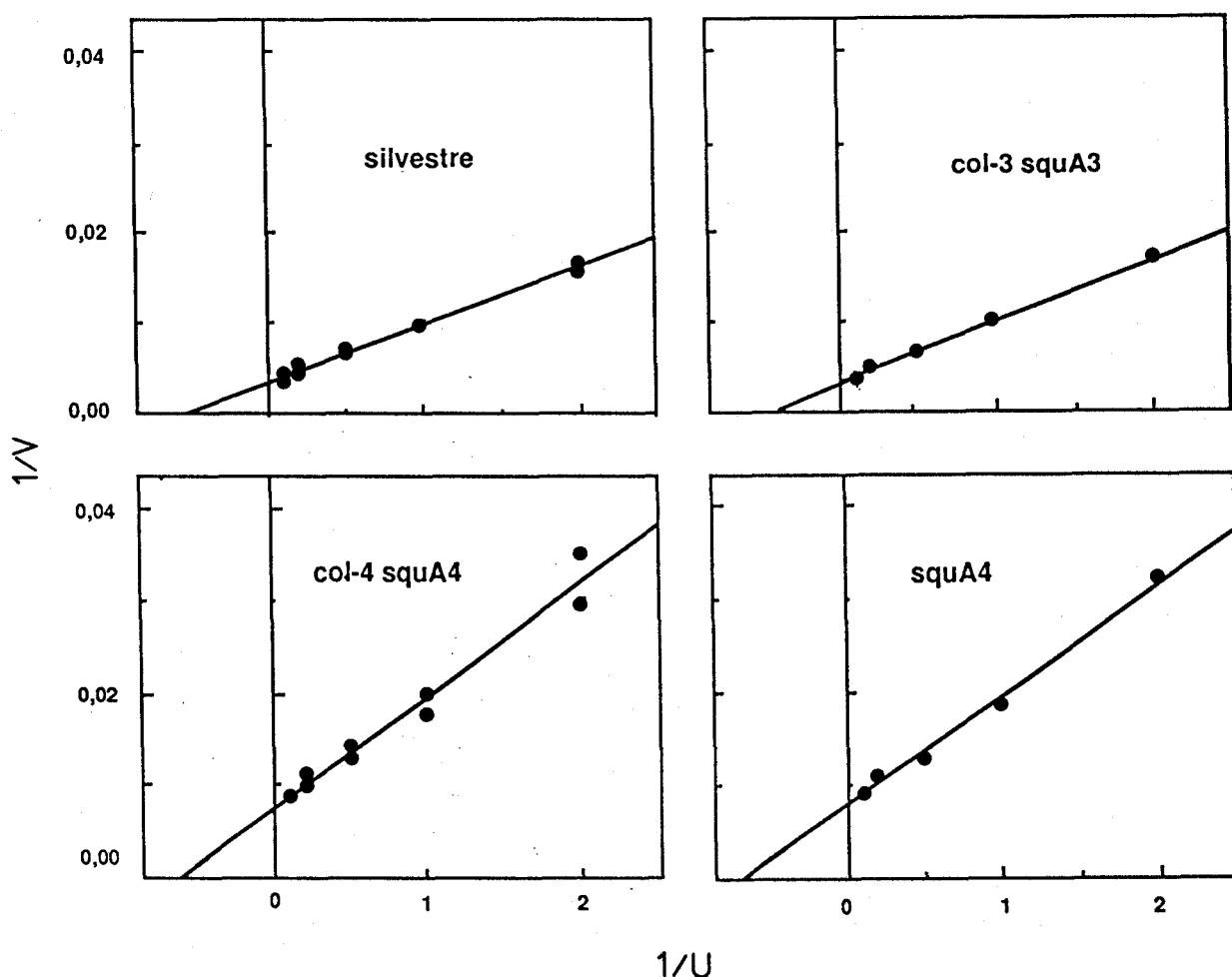


Figura 11. Velocidad de síntesis de quitina en función de la concentración de sustrato, UDP-N-acetilglucosamina. Extractos purificados preactivados con tripsina; 40 mM N-acetilglucosamina. Estirpes: S102, silvestre para síntesis de quitina; S492, genotipo col-3 squA3; S493, genotipo col-4 squA4; S548, genotipo squA4.

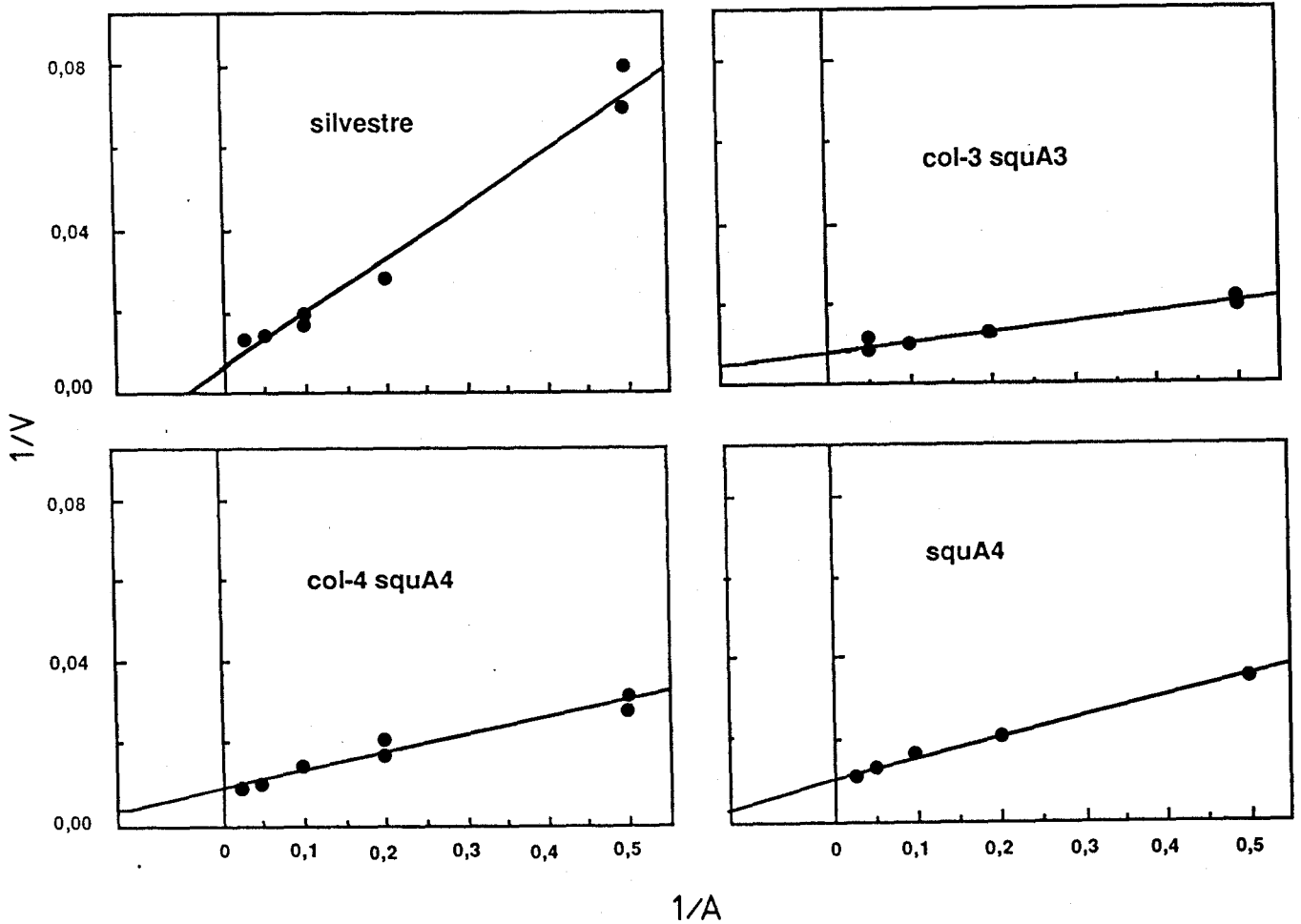


Figura 12. Velocidad de síntesis de quitina en función de la concentración de N-acetilglucosamina. Extractos purificados preactivados con tripsina; 2 mM UDP-N-acetilglucosamina. Estirpes: S102, silvestre para síntesis de quitina; S492, genotipo col-3 squA3; S493, genotipo col-4 squA4; S548, genotipo squA4.

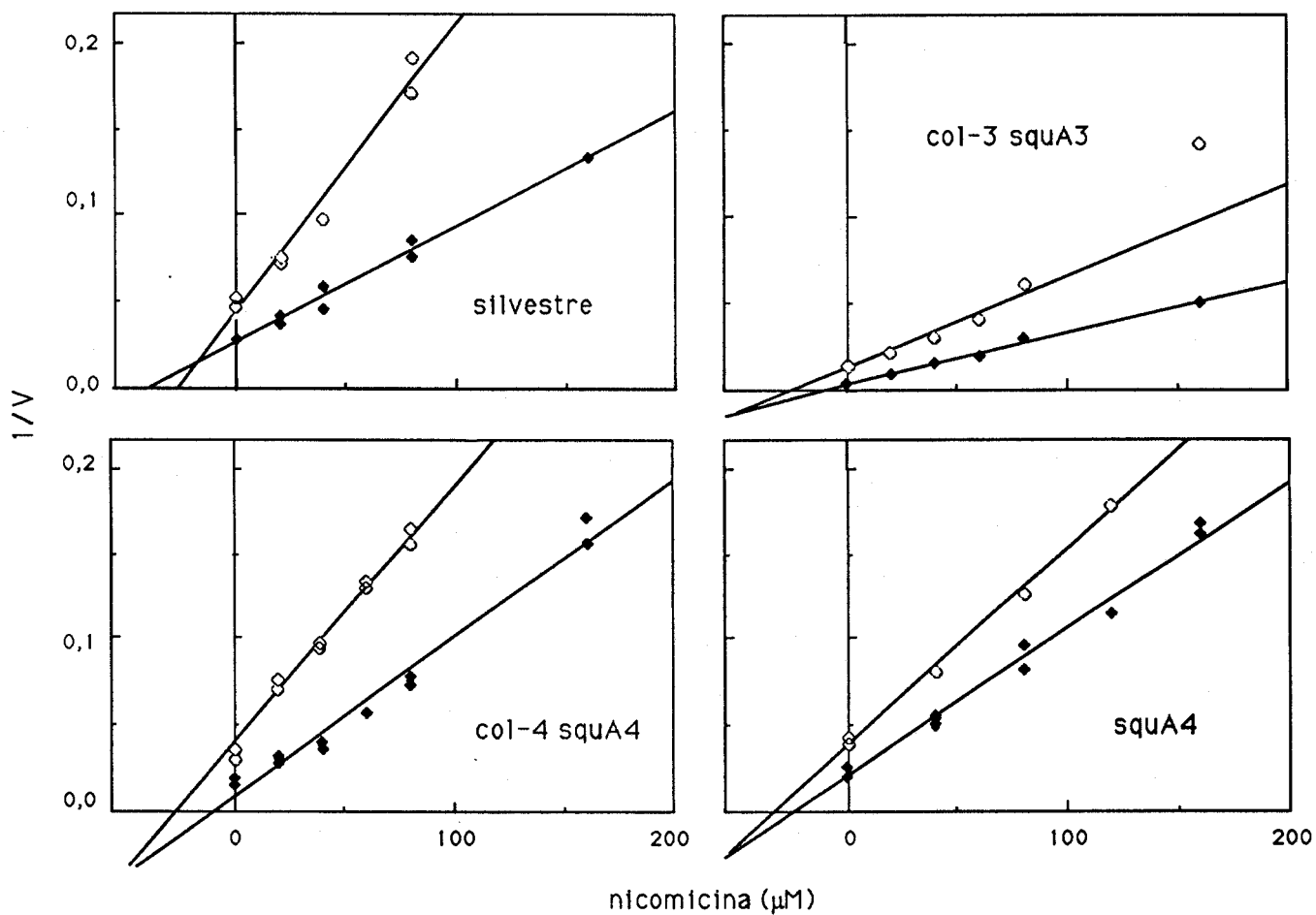


Figura 13. Velocidad de síntesis de quitina en función de la concentración de nicotinicina. Extractos purificados preactivados con tripsina; 40 mM N-acetilglucosamina; 0,5 mM UDP-N-acetilglucosamina (símbolos vacíos), 1 mM UDP-N-acetilglucosamina (símbolos llenos). Estirpes: S102, silvestre para síntesis de quitina; S492, genotipo col-3 squA3; S493, genotipo col-4 squA4; S548, genotipo squA4.

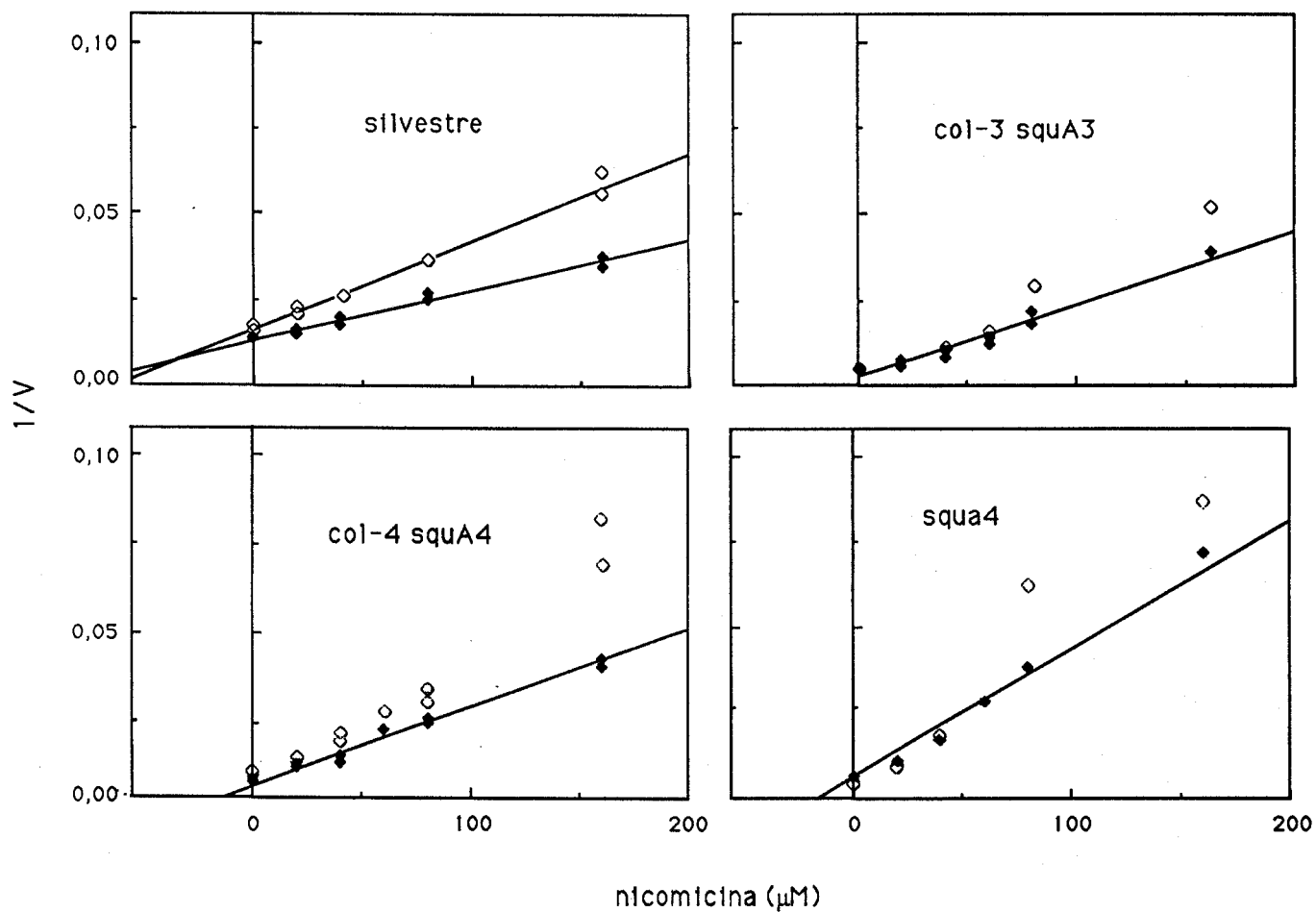


Figura 14. Velocidad de síntesis de quitina en función de la concentración de nicotinicina. Extractos purificados preactivados con tripsina; 2 mM UDP-N-acetilglucosamina; 20 mM N-acetilglucosamina (símbolos vacíos) 40 mM N-acetilglucosamina (símbolos llenos). Estirpes: S102, silvestre para síntesis de quitina; S492, genotipo col-3 squA3; S493, genotipo col-4 squA4; S548, genotipo squa4.

=====

Tabla 7. Parámetros cinéticos de la actividad sintetasa de quitina en la estirpe silvestre, S102 y en los mutantes S492, S493 y S548. A = N-acetilglucosamina; U = UDP-N-acetilglucosamina.

=====

Estirpe	Ki(A) (uM)	Ki(U) (uM)	Km(A) (mM)	Km(U) (mM)
S492		50.8 45.6	4.9 4.5	2.33 2.18
S493		34 38.2	4.5 5.2	1.7 1.9
S548		31 35	3.12 2.11	1.7 1.5
S102	22.6 20.3	13 17.5	22 26	1.8 1.8

=====

Efecto de la nicomicina sobre la síntesis de glicoproteína

Para determinar el posible efecto de la nicomicina sobre otros usos celulares de la UDP-N-acetilglucosamina se midió la biosíntesis de invertasa en la estirpe silvestre y en los mutantes S492, S493 y S548. La invertasa es una glicoproteína generalmente asociada a la pared celular de hongos, y su síntesis está sujeta a represión catabólica (Martínez-Corona y Ruiz-Herrera, en prensa). Las germinulas de Phycomyces fueron cultivadas en medio con glucosa y transferidas a medio sin fuente de carbono. Simultáneamente se añadió nicomicina a una concentración final de 25 μ M. A lo largo de 100 minutos se tomaron alícuotas a distintos tiempos y se realizó una medida de la actividad invertasa en cada una de ellas. La nicomicina no afecta la síntesis de invertasa en el tipo silvestre, ni en los mutantes (Fig. 15).

Efecto de la nicomicina sobre la actividad transferasa de manosa.

Se midió el efecto de la nicomicina sobre la actividad transferasa de manosa usando como fuente de enzima una fracción mixta de membranas. No se observó efecto inhibitor del antibiótico usando extractos libres de células de las estirpes silvestre y mutante (tabla 8). De hecho, lo que parece haber es una ligera estimulación en ambos casos, incluso a muy altas concentraciones de inhibidor. No ha sido determinada la razón de este posible efecto.

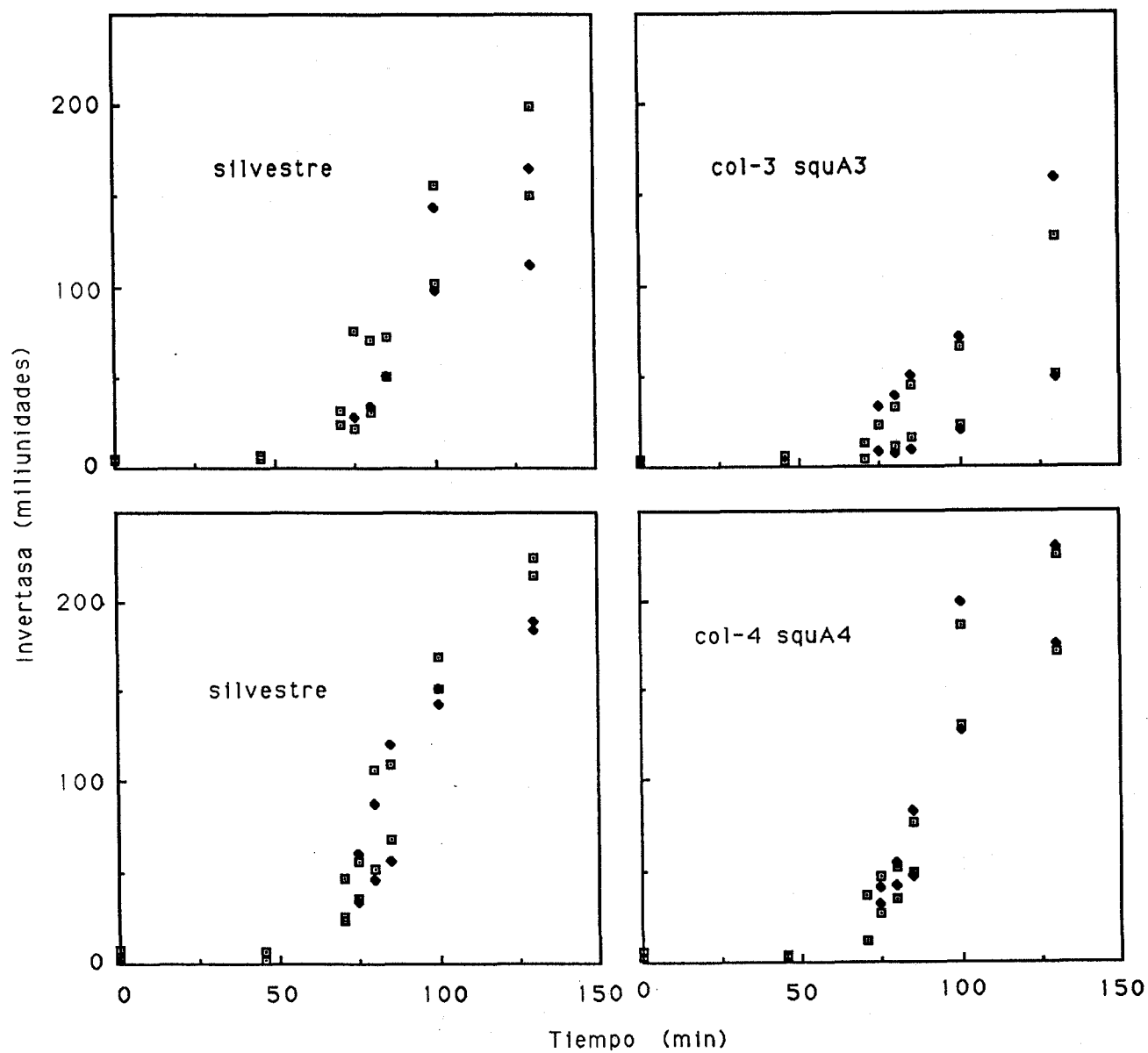


Figura 15. Efecto de la nicomicina sobre la secreción de invertasa en *Phycomyces blakesleeana*. Símbolos vacíos = sin nicomicina. Símbolos llenos = nicomicina 20 μ M. Estirpes: S102, silvestre para síntesis de quitina; S492, col-3 squA3; S493, col-4 squA4.

=====
 Tabla 8. Efecto de la nicomicina sobre la actividad transferasa de manosa de Phycomyces. La actividad enzimática está expresada en picomoles de GDP-manosa incorporados por segundo y gramo de proteína.

Estirpe	Genotipo relevante	Nicomicina (UM)		
		0	20	100
S102	Silvestre	31	37	40
		33	38	42
S492	<u>squA3</u>	29	37	37
		31	45	46

=====

DISCUSION

El aislamiento y caracterización de mutantes resistentes a inhibidores de procesos biológicos proporciona información sobre el proceso y sobre el modo de acción del inhibidor. Se ha aplicado esta estrategia a la biosíntesis de quitina y a su inhibición por el antibiótico nicomicina en el hongo Phycomyces blakesleeanus.

La quitina es un producto natural muy abundante, con muchas aplicaciones potenciales, pero su síntesis es un proceso biológico poco conocido. La nicomicina, un agente antifúngico relativamente nuevo y cuyas posibilidades están aún poco exploradas, ofrece una vía para investigar la síntesis de quitina simultaneando los enfoques genéticos y bioquímicos.

Aislamiento de los mutantes

El aislamiento de mutantes de Phycomyces resistentes a nicomicina no presentó dificultades especiales. Se indujo una gran heterogeneidad genética en una población de esporas por exposición a un mutágeno eficaz, la N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina, y se permitió su fijación y expresión durante un ciclo de crecimiento vegetativo. Se sembraron las esporas en un medio que contenía una concentración de inhibidor varias veces mayor que la necesaria para inhibir el crecimiento silvestre y se seleccionaron las colonias que mejor crecieron.

La frecuencia con que aparecieron tales mutantes fue muy baja, mucho menor que la usual cuando se selecciona la pérdida de función de un gen determinado, pero no sorprendente en mutantes que han sufrido una modificación muy específica de una proteína determinada.

El análisis genético deparó la sorpresa de que todos los mutantes son dobles, con una mutación squ, responsable de la resistencia a nicomicina, y una mutación col, que confiere un crecimiento colonial. ¿Por qué son todos col squ? Hay que tener en cuenta las condiciones en que se aislaron los mutantes. La altísima densidad de siembra y la eventual descomposición del inhibidor dan lugar a un apreciable crecimiento de fondo en los medios selectivos iniciales. Los mutantes coloniales crecen mucho más densamente que las formas miceliales normales y destacan por tanto nítidamente sobre el fondo. En experimentos "de reconstrucción", en los que se sembraron conjuntamente esporas silvestres y esporas de las versiones colonial y micelias de un mutante resistente en presencia de inhibidor, la versión colonial destacó siempre sobre las miceliales y la versión micelias del mutante se confundió en un primer momento con crecimiento de fondo.

Las mutaciones squ estudiadas afectan a un mismo gen, que llamamos squA. Las tres mutaciones col localizadas por recombinación están estrechamente ligadas al sexo, pero son independientes de squA. Es decir, las dos mutaciones inducidas simultáneamente afectan a las mismas regiones cromosómicas, muy distantes entre sí.

Muchos mutantes de distintos organismos aislados tras exposición a N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina son dobles mutantes (Cerdá-Olmedo y Ruiz-Vázquez, 1979). Este hecho no debe sorprender tratándose de un mutágeno muy poderoso: si la probabilidad de inactivar un gen es de 10^{-3} y un genomio tiene varios miles de genes, los mutantes dobles deben ser muy frecuentes. Lo sorprendente es que las combinaciones no son aleatorias. Al exponer Escherichia coli a este mutágeno y seleccionar mutantes de un gen determinado, la probabilidad de hallar mutaciones en genes vecinos es de hasta un 3 %, muy superior a la de hallar mutaciones en otros genes. La comutación de genes vecinos se debe a su replicación casi simultánea.

nea (Guerola et al., 1971). En Saccharomyces no se encontraron mutaciones inducidas simultáneamente en genes vecinos, pero sí en genes distantes que se replican a la vez; la frecuencia de comutación tampoco es muy alta, próxima al 1 % (Calderón y Cerdá-Olmedo, 1982).

La exposición de Phycomyces a N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina ha dado lugar muchas veces a dobles mutantes. Un precedente del de este trabajo son los numerosos mutantes blancos y ciegos aislados por A. Pérez Eslava (Bergman et al., 1973), cuyos rasgos fenotípicos se deben a dos mutaciones independientes (Roncero y Cerdá-Olmedo, 1982). Podemos suponer que los genes que comutan con alta frecuencia tienen alguna relación, posiblemente simultaneidad en la replicación, aunque no sean próximos. Nuestra ignorancia de la replicación del ADN en las esporas de Phycomyces impide discutir este tema con más detalle.

La naturaleza genética de los mutantes

En los efectos biológicos de los inhibidores se pueden dar dos situaciones extremas. El inhibidor puede afectar, con parecidos umbrales de concentración, a muchos componentes o procesos celulares. La adquisición de resistencia genética al inhibidor implica cambios en un conjunto muy amplio de genes, que pueden ser la mayoría de los del organismo. Así ocurre con los niveles intolerables de etanol o de temperatura. Generalmente en estos casos no es posible obtener mutantes resistentes a grandes dosis de inhibidor en un solo paso de selección a partir de la estirpe silvestre, sino que la resistencia aumenta gradualmente a lo largo de ciclos de selección sucesivos. (Jiménez y Benítez, 1987)

El caso opuesto lo constituyen los inhibidores con una acción celular muy específica. La resistencia se adquiere por modificación, aparición o desaparición de una sola función celular. Hay numerosos ejemplos de este tipo, tanto en procariontes como en eucariontes: la resistencia a estreptomicina en bacterias (Traub y Nomura, 1968) por modificación de una proteína ribosómica, la resistencia a canavanina en Saccharomyces (Grenson et al., 1966) o a deazariboflavina en Phycomyces (Delbrück y Ootaki, 1979) por pérdida de una permeasa específica para el análogo fisiológico del inhibidor. En estos casos un solo cambio celular, incluso un solo cambio de base en el ADN, puede conferir un grado muy alto de resistencia en una sola generación.

Los inhibidores con blancos múltiples pueden ser contrarrestados a veces por una sola función. Así, la penicilina afecta a varias enzimas responsables de la síntesis de pared celular en las bacterias. La selección de mutantes ofrece mejoras graduales en ciclos sucesivos de selección. Sin embargo, la introducción en la célula de un solo gen para una beta-lactamasa, como la que se encuentra en muchos plásmidos, proporciona una resistencia elevada en un solo paso.

La nicomicina pertenece al grupo de los inhibidores con blancos celulares muy específicos. La resistencia mutacional se debe en primera instancia al cambio de un gen determinado que afecta a una cierta función celular.

Recesividad de las mutaciones.

La dominancia o recesividad de las mutaciones que confieren resistencia a un inhibidor dependen del mecanismo de resistencia. En general, las mutaciones por pérdida de función son recesivas y las adquisiciones de funciones nuevas, dominantes. Así la pérdida de permeasas específicas, responsable de la resistencia a canavanina en Saccharomyces y a 5-deazariboflavina en Phycomyces, es recesiva; la resistencia a penicilina debida a una beta-lactamasa es dominante.

Estas generalizaciones no son siempre válidas. No es obvia "a priori" la dominancia o recesividad de las mutaciones que modifican una función celular. La conducta de una mezcla de subunidades resistentes y sensibles es difícil de prever cuando una acción celular exige una cooperación o una disposición espacial determinada entre los componentes de un agregado multimérico. Así, en un proceso de síntesis, la resistencia será recesiva si todas las subunidades implicadas (o la gran mayoría) deben ser funcionales en presencia del inhibidor para que se forme el producto deseado.

La naturaleza bioquímica de los mutantes

La nicomicina inhibe el crecimiento celular de Phycomyces, a partir de la germinación de las esporas hasta el crecimiento miceliar. La presencia de nicomicina, 5 μM , inhibe el hinchamiento y la emisión de un tubo geminal durante la germinación del tipo silvestre e induce la lisis celular. Durante el crecimiento vegetativo provoca el estallido de los extremos de las hifas y la muerte del micelio. La osmoprotección retarda estos efectos, pero no los impide. En los mutantes resistentes estos efectos ocurren a concentraciones en torno a 100 μM .

Teniendo en cuenta los datos sobre el efecto de la nicomicina en otros organismos, cabía esperar que en Phycomyces el blanco celular de la inhibición fuera la síntesis de pared, y más concretamente la síntesis de quitina. Apoya esta suposición la observación de que, en el tipo silvestre, las concentraciones de nicomicina que inhiben el crecimiento celular inhiben completamente la síntesis de quitina in vivo; las mismas concentraciones inhiben mucho menos la de los mutantes. Alternativamente, la detección de nicomicina activa en los esporangióforos de los mutantes resistentes nos lleva a descartar que la resistencia se deba a detoxificación o falta de acceso del tóxico a las células.

Los ensayos de sintetasa de quitina in vitro son muy artificiosos y hacen dudar sobre su relación con la conducta de la enzima in vivo. En este trabajo se necesitó una concentración mucho más alta de nicomicina para inhibir la enzima in vitro que in vivo. También se observó que tanto los extractos silvestres como de mutantes son sensibles a la nicomicina in vitro. Para explicar estas dos observaciones podría suponerse la pérdida durante la extracción de un elemento importante en la naturaleza. Así, podría haber dos sintetasas de quitina; una de ellas, predominante in vivo y modificada por las mutaciones de resistencia, no se detectaría in vitro. De manera análoga, la sensibilidad a concentraciones micromolares de nicomicina podría deberse a una subunidad o cofactor de la enzima que se perdiera durante la extracción.

Estas interpretaciones no son aceptables cuando se observa que in vitro la cinética de la sintetasa de la quitina de los mutantes difiere significativamente de la silvestre. Por lo tanto los mutantes, incluso los "limpiados" por recombinación, llevan una mutación responsable de los cambios cinéticos in vitro; es difícil de creer que tenga otra mutación responsable de la enzima o subunidad que se pierde durante la extracción.

La diferencia entre los ensayos de síntesis de quitina in vivo e in vitro podría deberse a un cambio de conformación (por ejemplo, una reordenación de subunidades) durante la extracción. En este sentido se debe recordar que el entorno hidrofóbico parece ser crítico para la actividad sintetasa de quitina: se ha sugerido que el efecto de la temperatura sobre la actividad sintetasa de quitina, que se interpreta como un cambio en la energía de activación de la enzima, representa la transición térmica de fase de los lípidos que conforman el ambiente hidrofóbico de la enzima.

Aunque no se comprendan las diferencias entre los ensayos in vivo e in vitro, los resultados permiten llegar a una conclusión clara sobre la naturaleza de la mutación. La cinética de la enzima en las estirpes silvestre y mutante in vitro difiere significativamente, sobre todo en el comportamiento frente a la nicomicina y a la N-acetilglucosamina. Los

parámetros cinéticos varían cuantitativa y cualitativamente, pero parecen particularmente probatorios los últimos. La nicomicina está descrita como inhibidor competitivo de la síntesis de quitina en el hongo Mucor rouxii (Muller et al., 1981). La inhibición en la estirpe silvestre de Phycomyces también es competitiva. En los mutantes squA, sin embargo, la cinética es claramente no competitiva.

La conclusión inevitable es que las mutaciones squA acarrear alteraciones genéticas en los elementos responsables de los parámetros cinéticos de la sintetasa de la quitina in vitro. Es decir, que el gen squA es responsable de la sintetasa de la quitina, o al menos de una de sus subunidades, si tuviera varias.

=====

BIBLIOGRAFIA

=====

- Adjimani, J. P. y Manocha, M. S. (1985) A comparative study of properties of chitin synthetase from two Mortierella species. *Can J Microbiol.* 31, 1035-1040
- Alvarez, M. I. y Eslava, A. P. (1983) Isogenic strains of Phycomyces blakesleeanus suitable for genetic analysis. *Genetics.* 105, 873-879
- Arnau, J. (1988) Transformación genética y búsqueda de secuencias promotoras en Phycomyces blakesleeanus. Tesis Doctoral. Universidad de Murcia.
- Aronson, J. M. y Preston, R. D. (1960) The microfibrillar structure of the cell walls of the filamentous fungus Allomyces. *J of Biophys and Biochem Cytol.* 8, 247-256
- Bacon, J. S. D., Davidson, E. D., Jones, D. y Taylor, I. F. (1966) The localization of chitin in the yeast cell wall. *Biochem. J.* 101, 36-38.
- Bartnicki-García, S., Bartnicki, I. y Sentandreu, R. (1985) Chitosomes lack concanavalin-A-binding sites. *Curr. Microbiol.* 12, 141-146
- Bartnicki-García, S., Bracker, C. E., Lippman, E. y Ruiz Herrera, J. (1984) Chitosomes from the wall-less "slime" mutant of Neurospora crassa. *Arch Microbiol.* 139, 105-112
- Bartnicki-García, S. y Lippman, E. (1977) Polarization of cell wall synthesis during spore germination of Mucor rouxii. *Exp Mycol.* 1, 230-240
- Bergman, K., Eslava, A. P. y Cerdá-Olmedo, E. (1973) Mutants of Phycomyces with abnormal phototropism. *Molec Gen Genet.* 123, 1-16

- Briza, P., Ellinger, A., Winkler, G. y Breitenbach, M. (1988) Chemical composition of the yeast ascospore wall. *J Biol Chem.* 263, 11569-11574
- Bulawa, C. E., Slater, M., Cabib, E., Au-Young, J., Sburlati, A., Adair, W. L. y Robbins, P. W. (1986) The Saccharomyces cerevisiae structural gene for chitin synthetase is not required for chitin synthesis in vivo. *Cell.* 46, 213-225
- Cabib, E. (1987) The synthesis and degradation of chitin. *Adv Enzymol.* 59, 59-101
- Calcott, P. y Fatig, R. (1983) Inhibition of chitin metabolism by avermectin in susceptible organisms. *The Journal of Antibiotics.* 37, 253-259.
- Calderón, I. L. y Cerdá-Olmedo, E. (1982) Simultaneous induction of multiple mutations by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine in the yeast Saccharomyces cerevisiae. *Curr Genet.* 6, 237-243
- Calvo-Méndez, C. y Ruiz-Herrera, J. (1987) Biosynthesis of chitosan in membrane fractions from Mucor rouxii by the concerted action of a chitin synthetase and a particulate deacetylase. *Exp Mycol.* 11, 128-140
- Cellini, A., Braun, P. y Calderone, R. A. (1978) Chitin synthesis in Candida albicans: comparison of yeast an hyphal forms. *J. Bacteriol.* 135, 1472-1477.
- Cerdá-Olmedo, E. y Ruiz-Vázquez, R. (1979) Nitrosoguanidine mutagenesis. En "Genetics of Industrial Microorganisms" O.K. Sebek y A.I. Laskin eds. Amer Soc Microbiol., Washington D. C.
- Cohen, J. Katz, D. y Rosenberger, R. F. (1969) Temperature sensitive mutant of Aspergillus nidulans lacking amino-sugars in its cell wall. *Nature* 224, 713-715.
- Dahn, U., Hagenmaier, H., Hohne, H., König, W. A., Wolf, G. y Zahner, H. (1976) Nikkomycin, ein neuer Hemmstoff der Chitinsynthese bei Pilzen. *Arch Microbiol.* 107, 143-160

Davis, L. L. y Bartnicki-García, S. (1984) The co-ordination of chitosan and chitin synthesis in Mucor rouxii. J Gen Microbiol. 130, 2095-2102

Davis, L. L. y Bartnicki-García, S. (1984) Chitosan synthesis by the tandem action of chitin deacetylase from Mucor rouxii. Biochemistry. 23, 1065-1073.

Delbrück, M. y Ootaki, T. (1979) An unstable nuclear gene in Phycomyces. Genetics. 92, 27-48

Diehl, J. M. y Van Iterson, G. (1935) Die Doppelbrechung von Chitinsehnen. Kolloid Zeitschrift. 73, 142-146

Duran, A., Cabib, E. y Bowers, B. (1979). Chitin synthetase distribution on the yeast plasma membrane. Science 203, 363-365.

Elorza, M. V., Murgui, A., Rico, H., Miragall, F. y Sentandreu, R. (1987) Formation of a new cell wall by protoplasts of Candida albicans: effect of papulacandin B, tunicamycin and nikkomycin. J Gen Microbiol. 133, 2315-2325

Emmer, G., Ryder, N. S. y Grassberger, M. A. (1985) Synthesis of new polioxin derivatives and their activity against chitin synthase from Candida albicans. J Med Chem. 28, 278-281

Eslava, A. P. (1973) Genética de la sensibilidad en Phycomyces. Tesis doctoral, Universidad de Sevilla.

Eslava, A. P. y Alvarez, M. I. (1987) Crosses. En "Phycomyces" Cold Spring Harbor. E. Cerdá Olmedo y E. D. Lipson eds. 361

Farkas, V. (1985) The fungal cell wall. En "Fungal Protoplasts. Applications in Biochemistry and Genetics" J. F. Peberdy y L. Ferenczy eds. Marcel Dekker, Inc, N. Y.

- Fiedler, H. P. (1981) Quantitation of nikkomycins in biological fluids by ion pair reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J Chromatography* 204, 313-318.
- Furch, B. y Pambor, L. (1978) Cell wall constituents of Phycomyces blakesleanus. Carbohydrate and protein composition of sporangiospore cell walls in relation to heat-induced germination. *Microbios letters* 8, 71-78
- Gascón, S y Lampen, J. O. (1968) Purification of the internal invertase of yeast. *J Biol Chem.* 243, 1567-1572
- Gascón, S., Neuman, N. P. y Lampen, J. O. (1968) Comparative study of the properties of the purified internal and external invertases from yeast. *J. Biol. Chem.* 243, 1573-1577
- Gauger, W., Peláez, M. I., Alvarez, M. I. y Eslava, A. P. (1980) Mating type heterocaryons in Phycomyces blakesleanus. *Exp. Mycol.* 4, 56-64
- Georgopapadakou, N. H. y Smith, S. A. (1985) Chitin synthase in Candida albicans: comparison of digitonin-permeabilized cells and spheroplast membranes. *J Bacteriol.* 162, 826-829
- Gooday, G. W. y Rousset-Hall, A. (1975) Properties of chitin synthetase from Coprinus cinereus. *J Gen Microbiol.* 89, 137-145.
- Gooday, G. W. y Trinci, A. P. (1980) Wall structure and biosynthesis in fungi. En "The Eukaryotic Microbial Cell". G. W. Gooday, D. Lloyd y A. P. Trinci Eds. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 207-251
- Gozalbo, D., Dubon, F., Schwenke, J. y Sentandreu, R. (1987) Characterization of chitosomes in Candida albicans protoplasts. *Exp Mycol.* 11, 331-338

Gow, L. A. y Selitrenikoff, C. P. (1984) Chitin synthetase of *Neurospora crassa*: inhibition by nikkomycin, polyoxin B and UDP. *Curr Microbiol.* 11, 211-216

Grenson, M., Mousset, M., Wiame, J. M. y Bechet, J. (1966) Multiplicity of the amino acid permeases in *Saccharomyces cerevisiae*. I. Evidence for a specific arginine-transporting system. *Biochim Biophys Acta.* 127, 325-338

Grove, S. N. y Bracker, C. C. (1979) Protoplasmic organization of hyphal tips among fungi: vesicles and spitzenkorper. *J Bacteriol.* 104, 989-1009.

Guerola, N., Ingraham, J. L. y Cerdá-Olmedo, E. (1971) Induction of closely linked multiple mutations by nitrosoguanidine. *Nature Neww Biology.* 230, 122-125

Gull, K y Trinci, A. P. J. (1974) detection of areas of wall differentiation in fungi using fluorescent staining. *Archiv für Mokrobiol.* 96, 53-57

Gutiérrez, F. y Ruiz-Herrera, J. (1979) Mannosyl transferase from yeast and hyphal forms of *Mucor rouxii*. *Exp Mycol.* 3, 351-362

Hanseler, E., Nyhlèn, L. E. y Rast, D. M. (1983) Isolation and properties of chitin synthetase from *Agaricus bisporus* mycelium. *Exp Mycol.* 7, 17-30

Hayashi, S., Cho, T., Kaminishi, H., Hagighara, Y. y Watanabe, K. (1987) Metabolism of L-proline to N-acetylglucosamine during germ tube formation of *Candida albicans*. *Curr Microbiol.* 15, 41-44

Hector, R. F. y Braun, P. C. (1986) Synergistic action of nikkomycins X and Z with papulacandin B on whole cells and regenerating protoplasts of Candida albicans. Antimicrob Agents Chemoter. 29, 389-394

Herrera-Estrella, L., Chávez, B. y Ruiz-Herrera, J. (1982) Presence of chitosomes in the citoplasm of Phycomyces blakesleeanus and the synthesis of chitin microfibrils. Exp Mycol. 6, 385-388

Herrera-Estrella, L. y Ruiz-Herrera, J. (1983) Light response in Phycomyces blakesleeanus: evidence for roles of chitin biosynthesis and breakdown. Exp Mycol. 7, 362-369

Hilenski, L. L., Naider, F. y Becker J. M. (1986) Polyoxin D inhibits colloidal gold-wheat germ agglutinin labelling of chitin in dimorphic forms of Candida albicans. J Gen Microbiol. 132, 1441-1451

Huizar, H. E. y Aronson, J. M. (1985) Chitin synthase of Apodachlya sp. Exp Mycol. 9, 302-309

Jeniaux, C. (1966) Chitinases. En "Methods in Enzimology", vol 8, E. F. Neufeld y V. Ginsburg eds. Academic Press, N.Y.

Jenkinson, H. F. y Shepherd, M. G. (1987) A mutant of Candida albicans deficient in beta-N-acetilglucosaminidase (chitobiase). J Gen Microbiol. 133, 2097-2106

Jiménez, J. y Benítez, T. (1987) Genetic analysis of highly ethanol-tolerant wine yeasts. Curr Genet. 12, 421-428

Kang, M. S., Elango, N., Mattia, E., Au-Young, J., Robbins, P. y Cabib, E. (1984) Isolation of chitin synthetase from Saccharomyces cerevisiae. Purification of an enzyme by entrapment in the reaction product. J Biol Chem. 259, 14966-14972

- Kang, M. S., Au-Young, J. y Cabib, E. (1985) Modification of yeast plasma membrane density by concanavalin A attachment. *J Biol Chem.* 260, 12680-12684
- Katz, D. y Rosenberg, R. (1979) A mutation in Aspergillus nidulans producing hyphal walls which lack chitin. *Biochim Biophys Acta.* 208, 452-460
- Manocha, M. S. y Begum, A. (1985) Properties of chitin synthetase from mucoraceous hosts of a mycoparasite. *Can J Microbiol.* 31, 6-12
- Manocha M.S y Balasubramanian R. (1988). In vitro regulation of chitinase and chitin synthase activity of two mucoraceous host of mycoparasite. *Can. J. Microbiol.* vol 34 116-1121.
- Martínez, J. P., Giménez, G. y Bartnicki-García, S. (1987) Intracellular localization of UDP-N-acetylglucosamine in Neurospora crassa wild type and slime mutant strains. *Exp Mycol.* 11, 278-286
- Martínez-Cadena, G., López-Romero, E., Acosta, I., Gonzales, C. y Ruiz-Herrera, J. (1987) Stabilization of chitin synthetase and purification of chitosomes from several mycelial Mucorales. *Ant Van Leeuwenhoek Microb Lett.* 53, 171-181
- Martínez-Cadena, G. y Ruiz-Herrera, J. (1987) Activation of chitin synthetase by calcium and calmodulin. *Arch Microbiol.* 148, 280-285
- McCarthy, P. J., Newman, D. J., Nisbet, L. J. y Kingsbury, W. D. (1985) Relative rates of transport of peptidyl drugs by Candida albicans. *Antimicrob Agents Chemother.* 28, 494-499
- McCarthy, P., Troke, P. F. y Gull, K. (1985) Mechanism of action of nikkomycin and the peptide transport system of Candida albicans. *J Gen Microbiol.* 131, 775-780

- McMurrough, I., Flores-Carreón, A. y Bartnicki-García, S. (1971) Pathway of chitin synthesis and cellular localization of chitin synthetase in Mucor rouxii. J Biol Chem. 246, 3999-4007.
- Milewski, S., Chmara, H. y Borowski, E. (1986) Antibiotic tetaine - a selective inhibitor of chitin and mannoprotein biosynthesis in Candida albicans. Arch Microbiol. 145, 234-240
- Muller, H., Furter, R., Zahner, H. y Rast, D. M. (1981) Inhibition of chitosomal chitin synthetase and growth of Mucor rouxii by nikkomycin Z, nikkomycin X and polyoxin A: a comparison. Arch Microbiol. 130, 195-197
- Murgui, A., Elorza, M. V. y Sentandreu, R. (1986) Tunicamycin and papulacandin B inhibit incorporation of specific mannoproteins into the wall of Candida albicans regenerating protoplasts. Biochim Biophys Acta. 884, 550-558
- Novick, P. y Botstein, D. (1985) Phenotypic analysis of temperature-sensitive yeast actin mutants. Cell. 40, 405-416
- Orlean, P. (1987) Two chitin synthetases in Saccharomyces cerevisiae. J Biol Chem. 262, 5732-5739
- Peberdy, J. F. y Moore P. M. (1975). Chitin synthase in Mortierella vinacea: properties, cellular location and synthesis in growing cultures. J Gen Microbiol. 90, 228-236
- Pérez, P., Varona, R., García-Acha, I y Durán, A. (1981) Effect of papulacandin B and aculeacin A on beta- 1,3-glucan synthase from Geotrichum lactis. FEBS Lett. 129, 249-254
- Rico, H., Miragall, F. y Sentandreu, R. (1985) Abnormal formation of Candida albicans walls produced by calcofluor white: an structural and stereological study. Exp Mycol. 9, 241-253

Roelofsen, P. A. (1965) Ultrastructure of the wall in growing cells and its relation to the direction of growth. *Advances of Botanical Research*. R. D. Preston ed. Academic Press, N. Y.

Roelofsen, P. A. y Houwink, A. L. (1953) Architecture and growth of the primary cell wall in some plant hairs and in the Phycomyces sporangiophore. *Acta Botanica Neerlandica*. 2, 218-225

Roncero, M. I. G. , Zabala, C. y Cerdá-Olmedo, E. (1984) Mutagenesis in multinucleate cells: the effects of N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine on Phycomyces spores. *Mut Res.* 125, 195-204

Roncero, C. y Durán, A. (1985) Effect of calcofluor white and congo red on fungal cell wall morphogenesis: in vivo activation of chitin polimerization. *J Bacteriol.* 170, 1945-1949

Roncero, C., Valdivieso, M. H., Ribas, J. C. y Durán, A. (1988) Effect of calcofluor white on chitin synthases from Saccharomyces cerevisiae. *J Bacteriol.* 170, 1945-1949

Roncero, C., Valdivieso, M. H., Ribas, J. C. y Durán, A. (1988) Isolation and characterization of Saccharomyces cerevisiae mutants resistant to calcofluor white. *J Bacteriol.* 170, 1950-1954

Roncero, M. I. G. y Cerdá-Olmedo, E (1982) Genetics of carotene biosynthesis in Phycomyces. *Curr Genet.* 5, 5-8

Rousset-Hall, A. y Gooday, G. W. (1975) A kinetic study of a solubilized chitin synthetase preparation from Coprinus cinereus. *J Gen Microbiol.* 89, 146-154

Ruiz-Herrera, J. (1982) Synthesis of chitin microfibrills 'in vitro'. En " Cellulose and others natural polymer systems". R. M. Brown, ed. Plenum Press, N. Y.

Ruiz-Herrera, J. (en prensa) La síntesis de la quitina. En "Microbiología 1990" J. Casadesús y F. Ruiz Berraquero eds. Publicaciones de la Universidad de Sevilla, Sevilla.

Ruiz-Herrera, J y Bartnicki-García, S. (1974) Synthesis of cell wall microfibrils in vitro by a "soluble" chitin synthetase from Mucor rouxii. science vol.186, 357-359

Ruiz-Herrera, J y Bartnicki-García, S. (1976) Proteolytic activation and inactivation of chitin sythetase from Mucor rouxii. J.Gen Microbiol. 97, 241-249

Ruiz-Herrera, J., Bartnicki-García, S. y Bracker, C. E. (1980) Dissociation of chitosomes y digitoni into 16s subunits with chitin synthetase activity. Biochimica et Biophysica Acta 629, 201-206

Ruiz-Herrera, J., López-Romero, E. y Bartnicki-García, S. (1977) Properties of chitin synthetase in isolated chitosomes from yeast cells of Mucor rouxii. J Biol Chem. 252, 3338-3343

Ruiz-Herrera, J., Sing, V. O., Van der Woude, W. J. y Bartnicki-García, S. (1975) Microfibril assembly by granules of chitin synthetase. Proc Natl Acad Sci USA. 72, 2706-2710

Sburlati, A. y Cabib, E. (1986) Chitin synthetase 2, a presumptive participant in septum formation in Saccharomyces cerevisiae. J Biol Chem. 261, 15147-15152

Selitrenikoff, C. P. y Bloomfield, E. C. (1984) Formation and regeneration of protoplasts of wild-type Neurospora crassa. Curr Microbiol. 11, 113-118

Selitrenikoff, C. P. (1985) Chitin synthetase activity in Neurospora crassa: effect of primulin and Congo red. *Exp Mycol.* 9, 179-182

Sentandreu, R, Martinez-Ramón, A y Ruiz-Herrera, J. (1984) Localization of chitin synthase in Mucor rouxii by autoradiographic method. *J Gen Microbiol.* 1193-1199

Silverman, S. J., Sburlati, A., Slater, M. A. y Cabib, E. (1988) Chitin synthase 2 is essential for septum formation and cell division in Saccharomyces cerevisiae. *Proc Natl Acad Sci USA.* 85, 4735-4739

Smith, H. A., Shenbagamurthi, P., Naider, F., Kundu, B. y Becker, J. M. (1986) Hydrophobic polyoxins are resistant to intracellular degradation in Candida albicans. *Antimicrob Agents Chemother.* 29, 33-39

Sonnenberg A.S.M., Sietsma, J. H. y Wessels, J. G. H. (1985). Spatial and temporal differences in the synthesis of (1-3) and (1-6) linkages in wall glucan of schizophyllum commum. *Exp. Mycol.* 9, 141-148.

Suárez, T., Orejas, M., Arnau, J. y Torres-Martínez, S (1987) Protoplasts formation and fusion. En "Phycomyces", E. Cerdá-Olmedo y E. D. Lipson, eds. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., 351-353

Sullivan, P. A. y Shepherd, M. G. (1982) Gratuitous induction by N-Acetylmannosamine of germ tube formation and enzymes for N-Acetylglucosamine utilization in Candida albicans. *J Bacteriol.* 1118-1122.

Surarit, R., Gopal, P. K. y Shepherd, M. G. (1988) Evidence for a glycosidic linkage between chitin and glucan in the cell wall of Candida albicans. *J Gen Microbiol.* 134, 1723-1730

Sutter, R. P. (1975) Mutations affecting sexual development in Phycomyces blakesleeanus. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 72, 127-130

Tovar, J. y Ruiz-Herrera, J. (1987) Purification and properties of glucose-1-phosphate uridylyltransferase from Neurospora crassa. Exp Mycol. 11, 36-48

Traub, P. y Nomura, M. (1968) Streptomycin resistance mutation in E. coli: altered ribosomal protein. Science. 160, 198-199

Van Heeswijck, R. (1984) The formation of protoplasts from Mucor species. Carlsberg Res. Commun. 49, 691-702

Van Laere, A. J. (1976) Effect of 5-fluorouracil and cycloheximide on the early development of Phycomyces blakesleeanus spores and activity of N-acetylglucosamine synthesizing enzymes. Arch Microbiol. 108, 113-116

Van Laere, A. y Carlier, A. R. (1978) Synthesis and proteolytic activation of chitin synthetase in Phycomyces blakesleeanus. Arch Microbiol. 116, 181-184

Vermeulen, C. A. y Wessels, J. G. H. (1986) Chitin biosynthesis by a fungal membrane preparation. Eur J Biochem. 158, 411-416

Vermeulen, C. A. y Wessels, J. G. H. (1986) Chitin biosynthesis by a fungal membrane preparation: evidence for a transient non-crystalline state of chitin. Eur J Biochem. 158, 411-416

Weete, J., Furter, R., Hanseler, E. y Rast, D. (1985) Cellular and chitosomal lipids of Agaricus bisporus and Mucor rouxii. Can J Microbiol. 31, 1120-1126

Whelan, W. L. y Ballou, C. E. (1975) Sporulation in D-glucosamine auxotrophs of Saccharomyces cerevisiae: meiosis with defective ascospore wall formation. J Bacteriol. 124, 1545-1557

Yadan, J-C., Gonneau, M., Sarthou, P. y Le Goffic, F. (1984) Sensitivity of nikkomycin Z in Candida albicans: role of peptide permeases. J Bacteriol. 160, 884-888

AGRADECIMIENTOS

Al Profesor Enrique Cerdá Olmedo, director de este trabajo, por sus ideas, sugerencias y comentarios, y aún más por su tiempo y su paciencia. Gracias a él he aprendido mucho a lo largo de estos años.

Al Profesor José Ruiz Herrera, de la Universidad de Guanajuato. Sus conocimientos, y sobre todo su estímulo y apoyo constantes han sido decisivos en muchos momentos.

A mis compañeros de Sevilla y Guanajuato por su generosa cooperación siempre que la he necesitado, y por haber hecho de laboratorio un lugar muy agradable.

Al Fondo de Investigaciones Sanitarias de la Seguridad Social del Ministerio de Sanidad y Consumo y al programa BAP del Ministerio de Educación las becas que he disfrutado como estudiante de doctorado.

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

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

D. *Beatriz Pérez Peña*
titula *Teriología y Fisiología de la reproducción*
a *Neomunera en Phycomyces.*

acordó otorgarle la calificación de APTO "CUM LAUDE"
POR UNANIMIDAD

Sevilla, 15 de Diciembre 1989

El Vocal,

A. Gómez San

El Presidente

El Vocal,

A. Durán

El Secretario,

A. S. Alvarez

El Vocal,

Tatiana Segura

El Doctorado,

B. Lubeiro

J. M. Ujea



UNIVERSIDAD DE SEVILLA



600672520