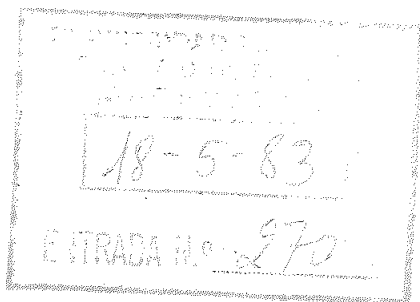
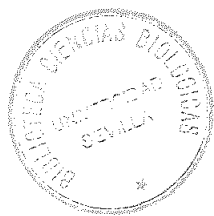


R.4354



TA 656

BIOSÍNTESIS DE CAROTENOS Y CAROTENOPROTEINA
EN PHYCOMYCES BLAKESLEEANUS

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

AMADOR DE LA CONCHA CONEJERO

Sevilla, mayo de 1983

Director

Francisco J. Murillo Araujo
Catedrático de Genética

Ponente

Enrique Cerdá Olmedo
Director Dpto. Genética

RESUMEN

En esta Tesis se ha estudiado la actividad carotenogénica de los extractos celulares de la estirpe silvestre y distintos mutantes de Phycomyces, así como el efecto sobre dicha actividad de ciertos factores. También se ha aislado y caracterizado un nuevo mutante en la carotenogénesis de dicho organismo. Se concluye que:

- La carotenogénesis in vitro se ve afectada por el nivel del oxígeno en el ensayo. La síntesis de fitoeno es independiente de la presencia de oxígeno, siendo este requerido para la desaturación de fitoeno hasta licopeno.

- Las mutaciones en los genes carB y carR provocan la inactividad de las enzimas deshidrogenasa del fitoeno y ciclasa del licopeno, respectivamente.

- La estirpe C2, que tiene una mutación en el gen carA, presenta una actividad carotenogénica in vitro significativamente menor que la estirpe silvestre.

- Se ha encontrado que el fitoeno trans participa en la ruta biosintética de carotenos en Phycomyces.

- El retinol estimula la actividad de las enzimas carotenogénicas.

- La difenilamina inhibe la actividad de la enzima deshidrogenasa del fitoeno y, a la vez, provoca una variación en la acumulación de isómeros de ese caroteno.

- Se ha aislado una estirpe mutante de Phycomyces (S303) que acumula β -caroteno en forma de carotenoproteína.

- La producción de carotenoproteína está determinada por un factor genético extranuclear y puede requerir también la presencia de una mutación en el gen nuclear carS presente, originalmente, en la estirpe S303.

- La iluminación o la presencia de retinol en los medios de cultivo inhiben la producción del complejo carotenoproteínico de la estirpe S303.

- En la inhibición de la producción de carotenoproteína por el retinol juega un papel importante el anillo de esta molécula, siendo poco relevante la naturaleza del grupo funcional presente en el extremo de la cadena lateral.

ÍNDICE DE MATERIAS

RESUMEN	2
ÍNDICE DE MATERIAS	4
ÍNDICE DE FIGURAS	7
ÍNDICE DE TABLAS	9
INTRODUCCIÓN	11
Biosíntesis de carotenoides	12
Estructura química y función	12
Ruta Metabólica	17
Factores que afectan a la carotenogé- nesis	27
Carotenogénesis en <u>Phycomyces</u>	36
<u>Phycomyces</u> : Descripción del organismo de estudio	36
Genética de la Carotenogénesis en <u>Phycomyces</u>	41
Estudios <u>in vitro</u> en <u>Phycomyces</u>	54
Carotenoproteínas	56
Generalidades	56
Funciones de las carotenoproteínas ..	66
MATERIALES Y MÉTODOS	71
Estirpes	72
Métodos de cultivo	74
Obtención de heterocariontos	78
Análisis genéticos	79

Ensayos enzimáticos	81
Marcado radiactivo	81
Preparación del extracto celular	81
Condiciones de incubación	82
Extracción de compuestos radiactivos	83
Determinación de proteínas	84
Análisis químico de carotenos y estero-	
les	85
Extracción	85
Separación cromatográfica	87
Identificación y cuantificación	89
Radioensayos y detección de bandas en	
cromatografía de capa fina	90

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

I- Carotenogénesis en <u>Phycomyces</u> : Análi-	
sis <u>in vitro</u>	93
Efecto del O ₂ en la síntesis de caro-	
tenos por extractos de C9	93
Biosíntesis de carotenos por extrac-	
tos libres de células de mutantes es-	
tructurales	96
Biosíntesis <u>in vitro</u> de carotenos por	
mutantes reguladores	102
Implicación del fitoenco trans en la	
carotenogénesis de <u>Phycomyces</u>	108
Efecto del retinol en la biosíntesis	
<u>in vitro</u> de carotenos	111

Efecto de la difenilamina en carotenogénesis <u>in vitro</u>	114
Comentario general sobre los ensayos <u>in vitro</u>	117
II- Un complejo de caroteno y proteína en <u>Phycomyces</u>	123
Aislamiento de mutantes de <u>Phycomyces</u> que acumulan β -caroteno de forma inusual	123
Caracterización genética de la forma amarilla de la estirpe S303	127
Caracterización genética de la forma roja de la estirpe S303	131
Caracterización del complejo de β -caroteno presente en la estirpe S303FR	138
Hidrólisis enzimática del complejo de β -caroteno	152
Efecto de la luz sobre la caroteno-proteína	155
Efecto del retinol sobre la caroteno-proteína	161
Posibles complejos con otros carotenos	169
Comentario general sobre la caroteno-proteína de <u>Phycomyces</u>	173
BIBLIOGRAFÍA	175
AGRADECIMIENTOS	188

ÍNDICE DE FIGURAS

1. Ruta de síntesis del fitoeno a partir del mevalonato	20
2. Ruta de biosíntesis de β -caroteno a partir de fitoeno	25
3. Ciclo de vida asexual de <u>Phycomyces</u>	38
4. Ciclo de vida sexual de <u>Phycomyces</u>	40
5. Esquema del complejo multienzimático que lleva a cabo la conversión de fitoeno en licopeno	45
6. Esquema del complejo multienzimático de <u>Phycomyces</u> que convierte el licopeno en β -caroteno	46
7. Comparación de micelios de S303FA y S303FR ...	125
8. Espectros <u>in vivo</u> de S303FR y C115	140
9. Efecto de distintos detergentes y del pH sobre la carotenoproteína	143
10. Espectro de la carotenoproteína purificada y del β -caroteno extraído de esta	145
11. Espectro de la carotenoproteína reconstruida a partir de un extracto de cloroformo/metanol (2:1)	148
12. Efecto de la temperatura y el deoxicolato de sodio sobre una solución de carotenoproteína .	151
13. Efecto de la temperatura <u>in vivo</u> sobre S303FR	153

14. Efecto de las proteasas en una solución de carotenoproteína	154
15. Espectros <u>in vivo</u> de S303FR incubado en luz y oscuridad	158
16. Espectros de β -caroteno extraído de S303FR incubado en la luz y en la oscuridad	160
17. Efecto del retinol sobre S303FR	163
18. Espectros <u>in vivo</u> de S303FR en presencia y ausencia de retinol	164
19. Curva dosis-respuesta del efecto del retinol sobre la carotenoproteína	165
20. Espectros <u>in vivo</u> de C9 y S136.	170

INDICE DE TABLAS

1. Estirpes y heterocariontes de <u>Phycomyces</u> utilizados en esta tesis	73
2. Síntesis <u>in vitro</u> de carotenos por extractos de la estirpe C9, en presencia y ausencia de O ₂	94
3. Biosíntesis <u>in vitro</u> de carotenos por las estirpes silvestres, C5 y C9	98
4. Biosíntesis <u>in vitro</u> de carotenos por extractos de las estirpes silvestres, C2 y C115 ...	104
5. Incorporación de mevalonato radiactivo en isómeros de fitoeno por extractos de distintos mutantes de la carotenogénesis	109
6. Efecto del retinol en la carotenogénesis <u>in vitro</u> por extractos de la estirpe silvestre y C2	112
7. Efecto de la difenilamina en la biosíntesis <u>in vitro</u> de terpenoides por algunas estirpes de <u>Phycomyces</u>	115
8. Efecto de la difenilamina en la incorporación <u>in vitro</u> de mevalonato radiactivo en los isómeros <u>cis</u> y <u>trans</u> del fitoeno por la estirpe C5	118
9. Análisis del heterocarionte S303*S102	129

10. Análisis del heterocarionte S303*S102	130
11. Comparación de proteínas solubles en cloro- formo/metanol (2:1) de la estirpe silvestre y de S303FR	149
12. Comparación del efecto de fosfolipasas y proteasas sobre la carotenoproteína	156
13. Efecto de la luz y del retinol sobre el β -ca- roteno y la carotenoproteína de S303	159
14. Análogos del retinol utilizados en esta te- sis	167
15. Efecto de los análogos del retinol sobre la carotenoproteína	168
16. Efecto de la luz y el retinol sobre la ab- sorción a 560 nm de C9	172

INTRODUCCIÓN

BIOSÍNTESIS DE CAROTENOIDES

Estructura química y función

Los carotenoides son terpenoides formados a partir de unidades de isopreno de cinco carbonos. En su mayoría son compuestos coloreados debido a la presencia de un grupo cromóforo, constituido por una serie de dobles enlaces conjugados. Los carotenoides son la clase de pigmentos más extendida en la naturaleza. Se encuentran como carotenoides libres, unidos a otros compuestos químicos en forma glicosidada, esterificados con una o más cadenas de ácidos grasos o asociados a proteínas en forma de carotenoproteínas.

Los carotenoides incluyen dos grupos de compuestos: los carotenos, elementos hidrocarbonados, y las xantófilas, que contienen oxígeno en distintas formas funcionales. Sólo las plantas, algas y ciertos hongos y bacterias son capaces de sintetizar carotenoides. Los animales tienen que tomarlo en su dieta, ya que son incapaces de sintetizarlo ellos mismos. Estos carotenos digeridos por los animales son transformados en pigmentos característicos que no se encuentran normalmente en los organismos carotenogénicos.

La existencia de los carotenoides se conoce desde hace más de un siglo, siendo Wackenroder (1831) el primer autor que descubrió un pigmento de la zanahoria (Daucus carota) que denominó caroteno. Desde entonces, se han descrito del orden de 400 carotenoides distintos y se han realizado intensos estudios sobre síntesis y biosíntesis de estos compuestos. Son ya varios los textos y revisiones publicadas sobre estos aspectos, entre los que se pueden destacar los de Isler (1971), Britton (1971) y Goodwin (1965-1980).

Las propiedades físicas y químicas de los carotenoides han sido ampliamente descritas (Goodwin, 1980; Isler, 1971) y, entre ellas, cabe destacar las referentes a su absorción espectroscópica. Debido a sus dobles enlaces conjugados, los carotenoides absorben luz con un espectro de absorción característico de cada uno; esta propiedad es muy útil para la identificación y cuantificación de los pigmentos, siendo una de las técnicas más extensamente utilizadas para este fin desde hace aproximadamente 50 años.

Aún queda mucho por conocer acerca de las funciones de los carotenoides en la naturaleza. Sin embargo, ya se han encontrado algunas implicaciones de estos compuestos en procesos llevados a cabo por seres vivos. En general, se pueden dividir dichos procesos en aque-

llos en que participa la luz y en los que la luz no interviene.

En el caso de los tejidos fotosintéticos parece ser que los carotenoides tienen una doble función: participar directamente en el proceso de la fotosíntesis y proteger al aparato fotosintético de la fotooxidación (Mathis y Schencil, 1982). Respecto a las implicaciones de los carotenoides en la fotosíntesis se ha descrito que éstos pueden participar como pigmentos antena, actuando en el sistema de transferencia de energía. El espectro de acción de la fotosíntesis indica que la radiación de determinada longitud de onda, no absorbida por la clorofila, es activa para la fotosíntesis. La eficacia de este fenómeno depende del tejido fotosintético y del caroteno que participe (Goodwin, 1980). También se ha encontrado la participación de los carotenoides en el funcionamiento de los fotosistemas de plantas superiores (Conjeau et al., 1976).

Otra de las funciones de los carotenos es la protección contra los efectos fotooxidativos. Con el uso de aparatos fotosintéticos carentes de carotenos, principalmente de estirpes mutantes incapaces de sintetizar el pigmento, se ha descubierto que los carotenoides ejercen un papel fotoprotector de la maqui-

naria fotosintética (Krinsky, 1979). También se ha mostrado la participación de los carotenoides en la fotoprotección de algas estudiando el efecto de herbicidas que inhiben la carotenogénesis; en presencia de estos compuestos, las células cultivadas a la luz mueren al no existir fotoprotección (Vaisberg y Schiff, 1976).

El efecto de fotoprotección ha sido descrito también en organismos no fotosintéticos, tanto en bacterias como en hongos, y existen algunas referencias que sugieren que los carotenoides pueden tener un papel protector también contra los daños producidos por la luz ultravioleta (Morris y Subden, 1974; Blanc et al., 1976).

Durante mucho tiempo ha existido una gran discrepancia sobre el papel desempeñado por los carotenos en la fotorrecepción. Algunos organismos, entre los que el más estudiado en este sentido ha sido Phycomyces blakesleeanus, presentan respuestas fototrópicas. El espectro de acción de estas respuestas es muy similar al espectro de absorción del β -caroteno, por lo que, en un principio, se pensó que éste podría ser el fotorreceptor. Sin embargo, estudios posteriores han indicado que una flavoproteína podría ejercer el mismo papel. Ultimamente Otto et al. (1981) han de-

mostrado que, al menos para el fototropismo de Phycomyces, el candidato más idóneo para fotorreceptor es una flavoproteína. No obstante, parece que en Phycomyces existen más de un sistema fotorreceptor y hay pruebas experimentales de que el β -caroteno participa en algunos de ellos, como la fotoinducción de la carotenogénesis o la fotoforogénesis (Galland y Russo, 1979; Whitaker y Shropshire, 1981).

Entre las funciones no relacionadas con la luz, la principal es servir de precursor para otras moléculas con distintas funciones fisiológicas. Así, los carotenoides están implicados en la sexualidad de algunos organismos, actuando de precursores de las hormonas sexuales. En los hongos y, especialmente, en los Mucorales, el β -caroteno es el precursor de los ácidos trispóricos (Bullock, 1973).

También están relacionados los carotenos con la síntesis de esporopolenina, un polímero presente en las cubiertas de esporas de hongos (Gooday et al., 1974).

En cuanto a las aplicaciones de los carotenoides, recientemente han aparecido revisiones en las que se destaca su utilización a nivel médico y farmacéutico (Mathew-Roth, 1982) y a nivel industrial, principal-

mente en la industria alimenticia y ganadera (Klaui, 1982). Ultimamente se ha encontrado que el retinol puede afectar al desarrollo de algunos tumores y se especula con la posibilidad de utilización de estos compuestos en el tratamiento de algunos cánceres. El β -caroteno y otros carotenoides, como precursores del retinol en el hombre y otros animales, son muy interesantes a este respecto.

Ruta metabólica

El estudio de la biosíntesis de los carotenoides ha representado uno de los campos más difíciles, tanto desde el punto de vista bioquímico como en su abordaje genético. Los problemas para el estudio bioquímico de la carotenogénesis parten de la propia naturaleza de los pigmentos; su inestabilidad en solución y en cromatografía y su sensibilidad al calor, a la luz, oxígeno, ácidos y, en algunos casos, al alcali, determinan ciertas dificultades para su manejo en el laboratorio.

Otro obstáculo importante en los estudios de biosíntesis ha sido la naturaleza hidrófoba de los carotenoides, que ha impedido su uso fácil como sustrato en preparaciones enzimáticas acuosas. Esto ha llevado

a la necesidad de tener que usar como sustratos a precursores muy tempranos de la ruta marcados radioactivamente. Dado que estos precursores también lo son de otros compuestos, como esteroides y otros terpenoides, las muestras han de ser sometidas a purificación posterior y la eficacia de los ensayos es baja. Pese a estas dificultades prácticas, se han conseguido considerables avances en el establecimiento de la ruta general de formación de los carotenoides y se está comprendiendo el mecanismo y la estereoquímica de varios de los pasos individuales de esta ruta. Esto se ha debido, principalmente, a la aplicación de sustratos marcados estereoespecíficamente y al reciente desarrollo de preparaciones celulares particularmente activas.

Hay que señalar que, paralelamente a los estudios bioquímicos, se han desarrollado una serie de técnicas genéticas en determinados organismos, que han hecho avanzar enormemente la comprensión de la biosíntesis de carotenoides y su regulación. Estos estudios genéticos se han desarrollado principalmente en microorganismos (Cerdá-Olmedo y Torres-Martínez, 1979; Marrs, 1982). Este aspecto de la biosíntesis de carotenos se tratará detalladamente en el siguiente apartado de esta Introducción, ya que Phycomyces es uno de los organismos en el que se ha realizado este tipo de enfoque.

Los carotenoides se sintetizan a partir del precursor básico de cinco carbonos, isopentenil pirofosfato (IPP). Es conveniente considerar la biosíntesis de carotenoides comprendida en varias fases: a) formación del primer compuesto hidrocarbonado de 40 átomos de carbonos a partir de las unidades básicas de IPP, b) sucesivas deshidrogenaciones que determinan la formación de carotenos acíclicos insaturados, c) ciclación de estos carotenos para formar carotenos alicíclicos y aromáticos, y d) oxigenación de los carotenos para formar xantófilas.

Como hemos dicho, el bloque fundamental con el que son formados los carotenoides es el compuesto de cinco carbonos IPP, pero el primer precursor específico de la ruta biosintética de los terpenoides es el ácido mevalónico (AMV), compuesto de seis carbonos que es sintetizado vía acetil CoA.

El AMV se convierte en IPP mediante una serie de reacciones indicadas en la Figura 1, en las que intervienen dos enzimas cinasas y una decarboxilasa, habiendo sido demostrada la participación de estas enzimas y sus productos en la síntesis de carotenos de varios organismos (Goodwin, 1980). El IPP está presente en varios sistemas que son capaces de sintetizar

carotenos (Varma y Chichester, 1962) y es convertido en carotenoides en varias preparaciones (Goodwin, 1980).

El primer paso en el proceso de elongación de la cadena es la isomerización del IPP, formándose dime-tilalilpirofosfato (DMAPP). A esta molécula se van condensando otras de IPP hasta llegar al geranil geraniol pirofosfato (GGPP). Dos moléculas de GGPP se condensan luego para formar el prefitoeno pirofosfato (PPPP) que es convertido directamente en fitoeno (Figura 1).

La síntesis de esteroides tiene varios pasos en común con esta ruta, desde IPP hasta farnesilpirofosfato (FPP). En este caso el FPP es transformado en preescualeno pirofosfato y escualeno mediante una serie de reacciones parecidas a las llevadas a cabo en la conversión del GGPP en fitoeno, y que requieren NADPH como cofactor (Muscio et al., 1974), pero realizadas por enzimas diferentes. El producto resultante de la conversión del GGPP por la enzima sintetasa del escualeno sería licoperseno y existen bastantes datos que demuestran la participación del fitoeno y no del licoperseno en la síntesis de carotenoides en los organismos estudiados (Goodwin, 1980).

En el tomate se ha demostrado que la conversión de IPP en fitoeno se lleva a cabo por un complejo enzimático, que se encuentra en la fracción soluble, con un peso molecular de 200.000 y que requiere Mn^{2+} como cofactor (Maudinas et al., 1975). Este complejo enzimático tiene que llevar a cabo varias reacciones: 1) la isomerización del IPP en DMAPP, 2) las reacciones de condensación de IPP, 3) la reacción de condensación de las dos moléculas de GGPP, y 4) la reacción que convierte el PPPP en fitoeno.

Se puede separar del complejo una enzima, con peso molecular de 40.000, que es capaz de sintetizar prefitoenopirofosfato pero no convierte éste en fitoeno (Porter y Spurgeon, 1979). Esta enzima ha sido purificada a homogeneidad y es capaz de llevar a cabo todas las reacciones mencionadas anteriormente, excepto la de formación de fitoeno.

La síntesis de fitoeno también ha sido estudiada en otros sistemas pero no tan extensamente como en las preparaciones de tomates. En varios organismos se ha encontrado que el sistema sintetizador de fitoeno es soluble. En Neurospora se ha descrito que existe un sistema soluble para la formación de GGPP y uno particulado que convierte este compuesto en fitoeno (Mitzka-Schnabel y Rau, 1981), lo que sugiere que los

sistemas enzimáticos para la formación de fitoeno existen en diferentes formas en distintos organismos.

El isómero producido por la sintetasa del fitoeno no es el mismo en todos los organismos. En el tomate y en otros organismos, entre ellos Phycomyces, el producto es fitoeno cis (Porter y Spurgeon, 1979), mientras que Mycobacterium y Halobacterium sintetizan fitoeno trans (Gregornis y Rilling, 1974; Kushawa et al., 1976).

Actualmente existen ciertas dificultades en este punto de la ruta biosintética, debido a que en organismos como Phycomyces, cuyo producto final es el β -caroteno trans, el producto de la sintetasa del fitoeno es la forma cis; por tanto, debe existir una reacción, de isomerización entre el fitoeno y el β -caroteno. Gregornis y Rilling (1974) demostraron que ambas formas del fitoeno se sintetizan como productos primarios a partir de un precursor común en preparaciones de Phycomyces y Mycobacterium.

No existen pruebas suficientes para determinar a qué nivel se realiza la isomerización. Algunos autores se inclinan a pensar que se realiza a nivel de fitoeno (Davies, 1972) y otros a nivel de fitoflueno (Porter y Spurgeon, 1979). En esta tesis se demuestra

la participación del fitoeno trans en la ruta de síntesis de β -caroteno en Phycomyces.

Las siguientes fases de la ruta de biosíntesis de carotenoides las vamos a analizar estudiando la síntesis del β -caroteno como modelo, ya que éste es el caroteno acumulado principalmente en Phycomyces. En la Figura 2 se esquematiza la secuencia de reacciones que convierten el fitoeno en β -caroteno según el modelo propuesto por Porter y Lincoln (1950). Las principales pruebas que apoyan este modelo provienen del estudio de mutantes en varios organismos, la utilización de inhibidores que causan la acumulación de intermediarios y los estudios de biosíntesis in vitro utilizando como precursores distintos compuestos marcados radiactivamente. Sin embargo, los experimentos in vitro son difíciles de interpretar inequívocamente y aún no se han conseguido preparaciones enzimáticas suficientemente purificadas para determinar claramente cada uno de los pasos de biosíntesis.

En la conversión de fitoeno en licopeno se requieren cuatro pasos sucesivos de deshidrogenación. Estas deshidrogenaciones introducen dobles enlaces alternativos en las moléculas dando lugar a los intermediarios indicados en la Fig. 2. Los sistemas enzimáticos responsables de estos pasos de la ruta biosintética

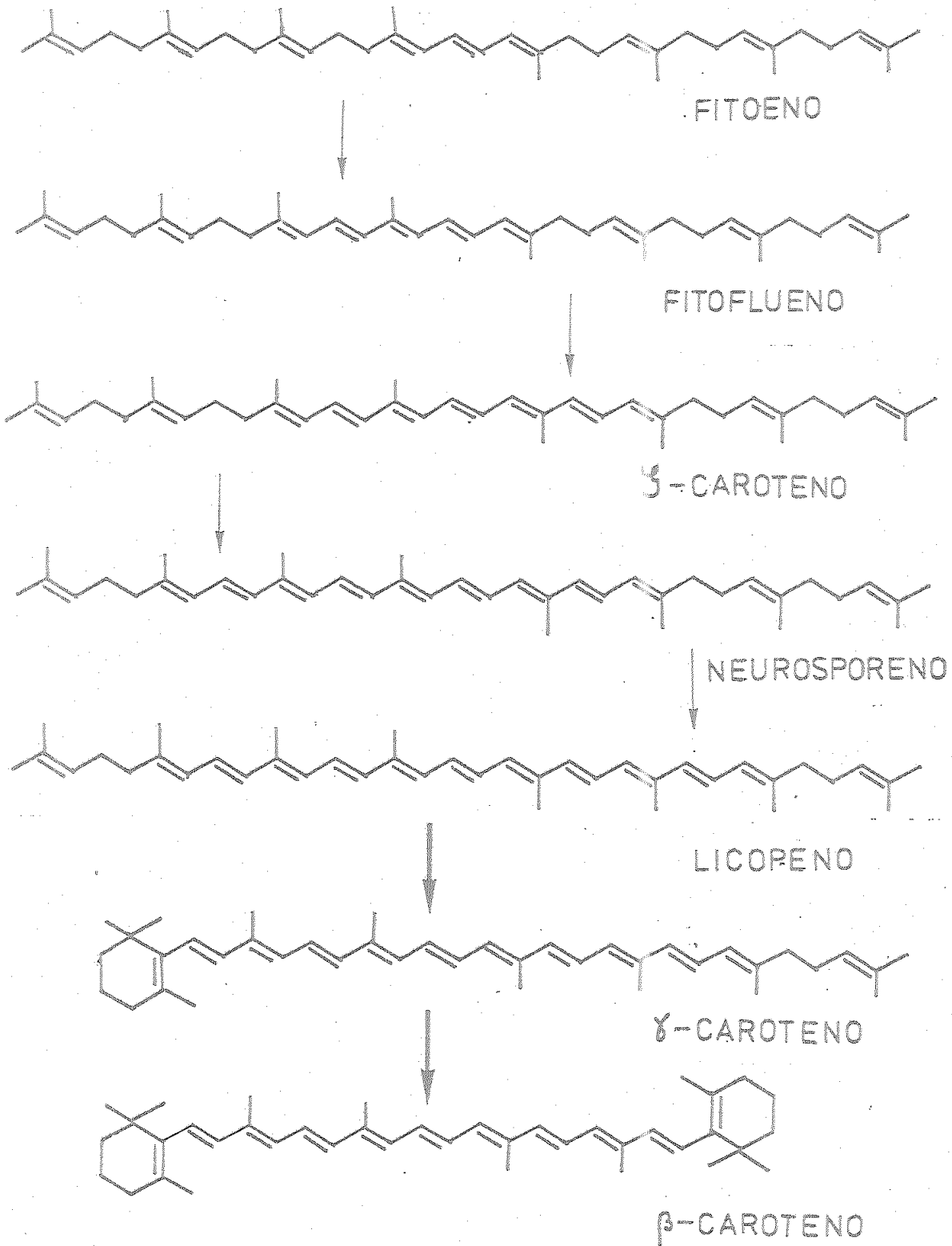


Figura 2. Conversión de fitoeno en β-caroteno.

parecen ser diferentes en distintos organismos. En la mayoría de los casos el producto final formado es el licopeno trans, pero hay diferencias en el paso en que se produce la isomerización del caroteno cis a caroteno trans, en el estado en que se encuentran las enzimas (algunas son solubles mientras que otras son particuladas) y en los cofactores requeridos (Porter y Spurgeon, 1979).

Mediante la utilización de ensayos in vitro se ha estudiado la incorporación de diferentes sustratos radiactivos en licopeno. Es en plantas superiores donde se ha conseguido acumular mayor número de datos (Porter y Spurgeon, 1979), aunque también en otros organismos como Phycomyces (Bramley y Davies, 1975), Halobacterium cuticubrum (Kushawa et al., 1976), Flavobacterium sp. (McDermott, 1975), se han realizado este tipo de estudios. En Phycomyces, sin embargo, la mayor parte de los datos sobre la ruta biosintética de β -caroteno provienen de estudios genéticos de los que se tratará en detalle más adelante.

El licopeno puede sufrir en distintos organismos diferentes reacciones que incluyen ciclación, hidratación, hidrogenación y adición de una nueva unidad isoprenoide, con o sin ciclación. De nuevo, dado que el organismo utilizado en esta tesis sólo lleva a cabo

el primer tipo de reacción, analizaremos únicamente los pasos enzimáticos con los que el licopeno pasa a β -caroteno. En la Figura 2 se esquematizan las reacciones por las que se realiza esta conversión. Dos ciclaciones sucesivas dan lugar a γ -caroteno y al producto final, β -caroteno. También en este caso será necesaria la purificación de las enzimas implicadas para un mejor conocimiento de los mecanismos de síntesis.

Factores que afectan a la carotenogénesis

Una serie de factores ambientales afectan a la síntesis de caroteno en diversos organismos, entre los que se pueden destacar:

a) Factores nutritivos. La glucosa es la mejor fuente de carbono para la carotenogénesis en Blakeslea trispora, Phycomyces blakesleeanus y Neurospora crassa. Se ha observado que en Phycomyces la maltosa y la glucosa son fuentes de carbono mucho mejores que la xilosa y la fructosa (Garton et al., 1951). La dextrina y la sacarosa estimulan la carotenogénesis cuando se utiliza caseína como fuente de nitrógeno (Ciegler et al., 1964).

La asparagina y la glicina son igualmente efectivas con respecto a la carotenogénesis en Blakeslea trispora (Goodwin, 1959) mientras que leucina y valina estimulan la carotenogénesis. La leucina es un precursor primario de la carotenogénesis en los cloroplastos de plantas superiores (Ehremburg y Daniel, 1962). La sustitución de la asparagina por nitrato de amonio inhibe el crecimiento y la carotenogénesis en Blakeslea trispora. Esta inhibición es revertida por los intermediarios del ciclo de Krebs, dependiendo el grado de restauración del pH del medio (Goodwin et al., 1956).

En Neurospora sitophila la presencia de Co, Cu, Mn o Zn incrementa la producción de β -caroteno pero sólo el Mn aumenta la síntesis de licopeno, neurosporeno, γ -caroteno y fitoflueno (Ishii, 1954). El fluoruro añadido al medio incrementa la carotenogénesis de Phycomyces del orden de cinco veces. El efecto es debido, probablemente, a la inhibición de fosfatasas que pueden defosforilar intermediarios claves tales como el isopentenilpirofosfato (Desai et al., 1973).

También se ha estudiado el efecto de distintos factores del crecimiento y vitaminas en la carotenogénesis de ciertos organismos (Goodwin, 1980) y, entre

ellos, cabe destacar el efecto del retinol, que se estudiará mas adelante.

b) Temperatura y oxígeno. En los organismos fotosintéticos las condiciones fuertemente anaeróbicas inhiben la carotenogénesis (Cohen et al., 1957) mientras que las condiciones semianaeróbicas reducen el contenido en carotenos (Goodwin y Osman, 1953).

En los hongos, en general, la carotenogénesis decrece cuando desciende la temperatura; sin embargo, en Phycomyces la carotenogénesis permanece invariable en un amplio rango de temperatura (5-25°C). En algunos organismos se han descrito cambios cualitativos en la síntesis de caroteno al variar la temperatura de los cultivos (Nakayama et al., 1954; Skoda, 1951).

c) Luz. La inducción de carotenoides por la luz ha sido comprobada en una gran variedad de organismos. En algunos de ellos este tipo de radiación es absolutamente necesario para la aparición de los carotenoides, mientras que en otros la luz induce un incremento adicional sobre un nivel basal producido en la oscuridad.

La fotoinducción de carotenoides ocurre también en tejidos fotosintéticos de algas y plantas superior-

res, acompañando la acumulación de cloroplastos funcionales inducida por la luz. Los carotenoides parecen formarse a partir de precursores en el propio cloroplasto, ya que la membrana del mismo es relativamente impermeable para el mevalonato. Los carotenoides resultan marcados radiactivamente si se suministra a los tejidos CO_2 radiactivo, pero no cuando se le suministra mevalonato marcado (Goodwin, 1971).

En algunos organismos se ha observado un efecto de inhibición de la biosíntesis de caroteno dependiente de la luz (Cantino y Horenstein, 1956; Chu y Lilly, 1969; Sutter, 1970).

El espectro de acción para la fotoinducción en Neurospora crassa y Fusarium aquaeductum se asemeja al espectro de absorción de una flavoproteína (DeFabo et al., 1976) y es similar al espectro de acción para el fototropismo en coleóptilos de avena y esporangióforos de Phycomyces. La posibilidad de que la flavoproteína sea el fotorreceptor ha sido extensamente discutida (Song et al., 1972). Sin embargo, medidas cuidadosas de la efectividad fotoinductora de diversas longitudes de onda en Neurospora crassa sugieren que el fotorreceptor es el β -caroteno y se ha propuesto que este pigmento puede servir, a la vez, como fotorreceptor y regulador (DeFabo et al., 1976).

La luz roja puede inducir la carotenogénesis en presencia de compuestos redox, tales como el azul de metileno y el azul de tolouidina, que absorben en la región activa del espectro y, presumiblemente, actúan como fotorreceptores artificiales (Harding, 1974).

En la mayoría de los organismos existe un período de latencia entre el pulso de luz y la inducción, por lo que se ha sugerido que la síntesis de nueva proteína(s) está asociada con la fotoinducción. Esta síntesis fotoestimulada se ha demostrado en Verticillium agaricinum (Valadon et al., 1975). La actinomicina D, un inhibidor de la transcripción, inhibe parcialmente la fotoinducción de la carotenogénesis en Verticillium (Valadon y Mummery, 1969) y Neurospora crassa (Valadon y Mummery, 1973).

La síntesis de carotenoides se induce a través de una reacción fotoquímica irreversible, independiente de la temperatura y que requiere la presencia de oxígeno molecular (Batra, 1971).

En Phycomyces, la exposición a la luz incrementa la producción de β -caroteno sobre un nivel basal acumulado en completa oscuridad (Bergman et al., 1973). La curva dosis-respuesta es bifásica, con un componente de dosis baja que se satura alrededor de los 40

J/m^2 y otro de dosis alta que se satura alrededor de los $1000 J/m^2$. Sólo este segundo componente es sensible a los inhibidores de la transcripción y la traducción, actinomicina D y cicloheximida (Jayaram et al., 1979). En Neurospora, que también presenta una curva dosis-respuesta de tipo bifásico, ambos componentes son dependientes de nueva síntesis de proteína (Schrott, 1980).

d) Inhibidores y activadores químicos. Una variedad de compuestos actúan como inhibidores de la ruta metabólica de los carotenos en distintos organismos. Los más intensamente estudiados han sido la difenilamina (DFA), la nicotina y la 2-(4-clorofeniltio)tri-
etilamina-ClH (CFTA) (Howes y Bratra, 1970; Coggins et al., 1970; Yokoyama et al., 1971; Hsu et al., 1972; Elahi et al., 1973; Hsu et al., 1974; Kleining, 1974).

La DFA ha sido muy estudiada, sobre todo en hongos, y su efecto se manifiesta en una disminución del nivel de carotenos insaturados normalmente presentes, acompañado de una acumulación masiva de fitoeno y pequeñas cantidades de los carotenos parcialmente saturados. Es también un inhibidor efectivo en bacterias, tanto fotosintéticas como no fotosintéticas, pero no en algas (Goodwin, 1980). Cuando se lava el cultivo sometido a DFA, eliminando ésta, se sintetizan los

carotenos más insaturados a expensas de los intermediarios acumulados (Villoutreix, 1960).

No se conoce bien el mecanismo de acción de la DFA, aunque la mayoría de los autores piensan que inhibe específicamente la enzima deshidrogenasa del fitoeno (Rilling, 1965). Una inhibición de los pasos de deshidrogenación se ha observado también con otros compuestos, como la benzofenona, en Mucor hiemalis (Herbert et al., 1972).

Otra serie de inhibidores ha sido descrita como compuestos que impiden la síntesis de β -caroteno y compuestos relacionados, provocando la acumulación alternativa de licopeno. Afectan, pues, específicamente a las ciclasas. La nicotina es inhibidora en Phycomyces (Goodwin, 1972; McDermott et al., 1975) y en Verticillium agaricinum su efecto ha sido estudiado en detalle (Valadon y Mummery, 1973). El herbicida CFTA también tiene un efecto similar al de la nicotina en Phycomyces blakesleeanus (Murillo et al., 1981) y Blakeslea trispora (Hsu et al., 1974).

La utilización de inhibidores de este tipo ha sido muy útil no sólo para la elucidación de la ruta enzimática, sino también para estudiar su regulación. La inhibición de las distintas enzimas conlleva la acumu-

lación del intermediario correspondiente en una concentración mayor que la del producto final en ausencia del inhibidor. Aunque algunos autores se han inclinado a pensar en un doble efecto inductor e inhibidor independientes, otros piensan que el efecto inductor es una consecuencia secundaria causada por la descompensación de la retroinhibición por producto final (Murillo, 1980).

Entre los bioinductores se han estudiado toda una serie de compuestos relacionados que tienen la capacidad de incrementar la síntesis de carotenos en algunos microorganismos.

Cuando dos cepas de Blakeslea trispora de distinto sexo se cultivan juntas, se observa un incremento en la síntesis de β -caroteno del orden de quince veces respecto al sintetizado por cualquiera de los dos sexos por separado (Cagliotti et al., 1964). El mismo fenómeno se ha observado en Phycomyces blakesleeanus (Murillo y Cerdá-Olmedo, 1976).

Se ha demostrado en Blakeslea trispora que los responsables directos de la estimulación de la carotenogénesis por el sexo son los ácidos trispóricos, derivados del propio β -caroteno (Thomas et al., 1967). Los ácidos trispóricos no estimulan la carotenogénesis

de otros mucorales distintos de Blakeslea trispora. Experimentos con marcaje radiactivo demuestran que ellos mismos no se transforman en β -caroteno. Su efecto es inhibido por la cicloheximida, pero sólo parcialmente por la actinomicina D (Feofilova et al., 1976b). En presencia de DFA, los ácidos trispóricos inducen la síntesis de fitoeno, por lo que se piensa que estos bioestimuladores funcionan, probablemente, desreprimiendo a nivel de traducción, la producción de una enzima implicada en un paso anterior a la síntesis de fitoeno. Recientemente se ha propuesto un modelo detallado de la regulación de la carotenogénesis por ácidos trispóricos en Blakeslea trispora (Govind et al., 1981).

La β -ionona tiene un efecto estimulador en estirpes de ambos sexos de Phycomyces blakesleeanus y en cultivos heterotálicos de Blakeslea trispora (Mackinney et al., 1952; Engel et al., 1953). Un compuesto químicamente relacionado, el retinol, es particularmente activo en la estirpe silvestre y algunos mutantes de Phycomyces (Eslava et al., 1974) y Blakeslea trispora (Feofilova y Bekhtereva, 1976a) y se ha descrito que su efecto es inhibido por la presencia de cicloheximida (Eslava et al., 1974). La β -ionona estimula también la síntesis de ARN y proteínas en Blakeslea trispora lo que sugiere que funciona estimulando

la síntesis de novo de enzimas carotenogénicas (Feofilova y Arbuzov, 1975).

CAROTENOGENESIS EN PHYCOMYCES

Phycomyces: Descripción del organismo de estudio

En el abordaje de cualquier problema biológico es de esencial importancia la elección del organismo de estudio. Phycomyces, que ha sido extensamente utilizado en el estudio de diversos problemas de biología molecular, es particularmente interesante para estudiar la carotenogénesis y su regulación. Presenta una ruta de biosíntesis de carotenos muy simple, con β -caroteno como único producto final, sometida, sin embargo, a importantes y sugestivos procesos de regulación. Como principal ventaja está la de ser un microorganismo que puede ser manejado genética y bioquímicamente con relativa facilidad.

Phycomyces blakesleeanus es un hongo perteneciente a la clase Zigomicetos, del orden Mucorales y de la familia Mucoráceas. Durante una parte de su ciclo de vida presenta un estado micelial multinucleado, de hifas ramificadas. Su ciclo de vida se puede estudiar dividiéndolo en dos partes, una correspondiente al ciclo asexual y otra al ciclo sexual.

Ciclo asexual: En la Figura 3 se muestra un esquema del ciclo de vida asexual. Phycomyces presenta una forma de resistencia que son las esporas de las que, aproximadamente, el 99% son multinucleadas y el 83% contienen de 3 a 4 núcleos (Heisenberg y Cerdá-Olmedo, 1968).

Sólo el 3% de las esporas inculadas en medio mínimo germinan espontáneamente, conociéndose una serie de métodos físicos y químicos que inducen la germinación de la mayoría de las esporas sembradas. El método más comúnmente utilizado en el laboratorio es el calentamiento a 48°C durante 15 min (Halbsguth y Rudolph, 1959; Rudolph, 1960). Tras la germinación, las esporas producen un micelio ramificado de hifas multinucleadas y sin tabicación. Los núcleos se van dividiendo por elongación y constricción, sin pérdida aparente de membrana nuclear (Franke y Reau, 1973).

Cuando se cultiva en medio sólido, el micelio comienza a emitir hifas aéreas (esporangióforos) a los tres o cuatro días de crecimiento. Los esporangióforos atraviesan por varios estadios de desarrollo (Gruen, 1959). En uno de estos estadios se forma un esporangio apical, dentro del cual se forman las esporas por una tabicación de porciones del citoplasma. Cada esporangio contiene del orden de 10^5 esporas.

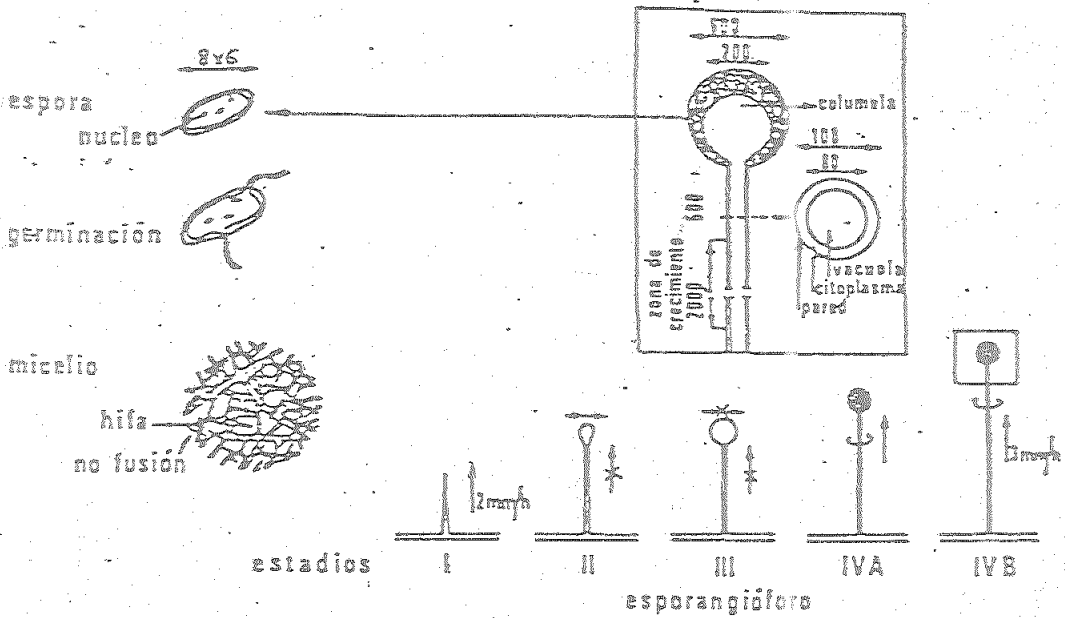


Figura 3. Ciclo de vida asexual de Phycomyces blakesleeanus. Las dimensiones típicas de las principales estructuras están dadas en μm .

Ciclo sexual: En Phycomyces existen dos tipos sexuales, (+) y (-), que son indistinguibles morfológicamente. Dos micelios de distinto sexo pueden reaccionar entre sí dando lugar al ciclo esquematizado en la Figura 4 y que determina la formación de una estructura, la cigospora, donde se alojan numerosos núcleos de cada parental.

La germinación de la cigospora, después de algunos meses, produce un esporangio que contiene varios miles de germo esporas. La mayoría de éstas contienen entre dos y cuatro núcleos, pero rara vez son heterocarióticas. Ello se debe a que derivan de protoesporas con un solo núcleo que sufre mitosis durante la maduración de las esporas.

Algunas investigaciones recientes han permitido averiguar el comportamiento de los núcleos durante el ciclo sexual, parcialmente conocido ya tras las investigaciones de Burgeff de hace sesenta años. Normalmente se forma un solo núcleo diploide en la cigospora, por la fusión de un núcleo parental de cada sexo, que sufre meiosis y da cuatro productos haploides. Estos, tras muchas divisiones mitóticas, dan lugar a los núcleos de las germo esporas. No hay incorporación apogámica de los núcleos parentales en la descendencia (Cerdá-Olmedo, 1975; Eslava et al., 1975a; Eslava et al., 1975b).

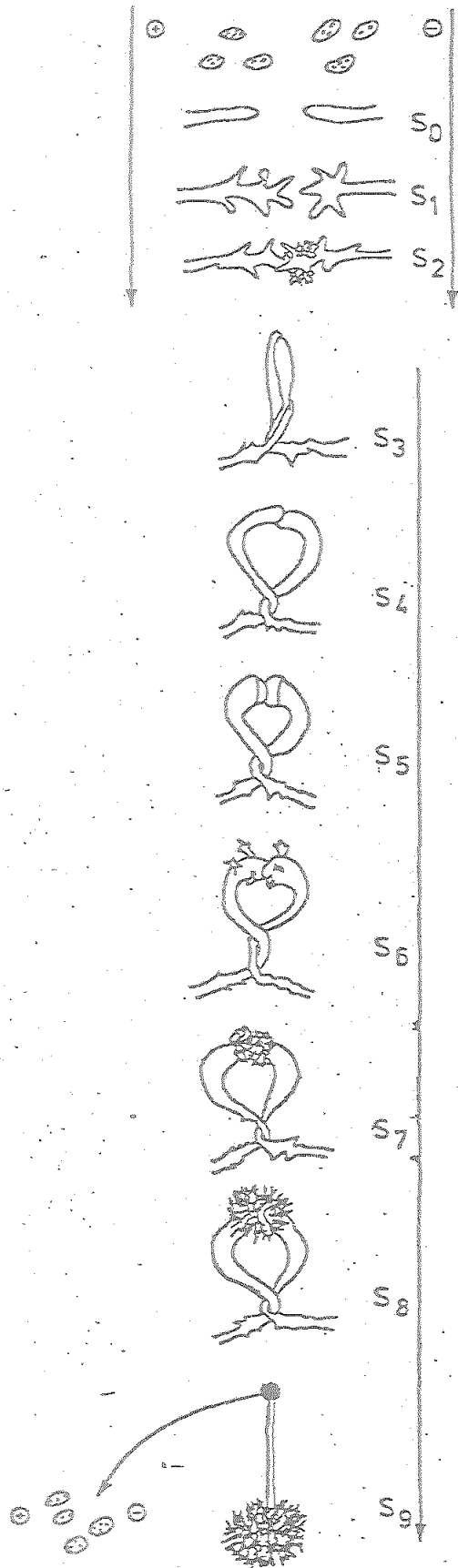


Figura 4. Ciclo de vida sexual de *Phycomyces blakesleeanus*. Las distintas etapas del ciclo sexual se denominan de S₀ a S₉ (Sutter, 1975).

S₀ = hifas asexuales

S₁ = cigóforos separados

S₂ = cigóforos apareados

S₃ = cigóforos alargados y aéreos

S₄ = progametangios

S₅ = tabicación y delimitación de gametangios y suspensores

S₆ = desarrollo de espinas sobre los suspensores

S₇ = fusión de los gametangios

S₈ = desarrollo de la pared negra de la cigospora

S₉ = germinación

Algunos mutantes con alteración en la ruta de biosíntesis del β -caroteno presentan anomalías en su reacción sexual. Una posible explicación se encuentra en el papel del β -caroteno como precursor de los ácidos trispóricos, que son mensajeros químicos en esta reacción, y de las esporopoleninas de la pared de la cigospora (Sutter, 1975 y 1976; Gooday et al., 1973). Esto no explica, sin embargo, la incapacidad sexual completa de los mutantes superproductores de β -caroteno ni de otros mutantes afectados en aspectos reguladores de la carotenogénesis, pero con un nivel basal normal de pigmento (Roncero y Cerdá-Olmedo, 1982)

Genética de la carotenogénesis en Phycomyces

Como hemos dicho anteriormente, el estudio desde el punto de vista genético de la carotenogénesis ha proporcionado gran cantidad de datos acerca de la ruta biosintética y la regulación de ésta, así como del modo de acción de los agentes inhibidores y activadores de la carotenogénesis. Básicamente, este enfoque consiste en la obtención y caracterización de mutantes afectados en los genes responsables de las enzimas carotenogénicas, o en las que participan en alguno de los procesos regulatorios.

Phycomyces es el organismo donde se han explorado más intensamente las técnicas genéticas, aunque, por otro lado, ha sido relativamente poco utilizado en los estudios de tipo bioquímico. Parte de esta tesis está encaminada a estudiar, desde el punto de vista bioquímico, los principales tipos de mutantes de Phycomyces ya caracterizados genéticamente.

Los primeros mutantes afectados en la biosíntesis de carotenos fueron aislados por Heisenberg en 1967, tras tratamiento mutagénico de esporas. Actualmente existe una extensa colección de mutantes de la carotenogénesis que han sido utilizados tanto para su estudio fenotípico como para la asignación de mutaciones a genes determinados, estableciendo distintos grupos de complementación, y la localización cromosómica de los correspondientes loci.

Los mutantes obtenidos hasta la fecha se pueden clasificar en mutantes afectados en funciones estructurales y mutantes afectados en funciones reguladoras. El estudio de los primeros ha apoyado fuertemente la hipótesis de que los carotenos en Phycomyces se sintetizan a través de la misma ruta que fue propuesta por Porter y Lincoln (1950) para el tomate (Figuras 1 y 2).

Entre los mutantes estructurales se han encontrado mutantes blancos que acumulan fitoeno como caroteno principal y pertenecen a un mismo grupo de complementación, que define al gen carB (Meissner y Delbrück, 1968; Ootaki et al., 1973). Se han encontrado otra serie de mutantes de color rojo que acumulan licopeno como pigmento principal (Meissner y Delbrück, 1968) y pertenecen al mismo grupo de complementación. Las mutaciones responsables de este fenotipo están en el gen carR (De la Guardia et al., 1971; Ootaki et al., 1973; Torres-Martínez et al., 1980).

No se han encontrado mutantes que acumulen ningún otro intermediario de la ruta carotenogénica. La ausencia de mutantes en pasos anteriores al fitoeno puede ser explicada teniendo en cuenta que los esteroides son necesarios para la vida del organismo, al ser componentes esenciales de las membranas celulares. Gran parte de la ruta de biosíntesis de caroteno tiene pasos en común con la de biosíntesis de esteroides; los mutantes en estos pasos podrían ser inviables. El resto de la ruta hasta fitoeno, aunque no es común, podría llevarse a cabo por el mismo tipo de enzima. La explicación más sencilla sobre la carencia de mutantes que acumulen intermediarios entre fitoeno y β -caroteno es que las cuatro deshidrogenaciones que convierten el fitoeno en licopeno son llevadas

a cabo por la deshidrogenasa codificada por el gen carB y las dos ciclaciones que convierten el licopeno en β -caroteno por la ciclasa codificada por el gen carR. Entre los datos que apoyan esta hipótesis está el comportamiento de ciertos mutantes carB rezumantes (Eslava y Cerdá-Olmedo, 1974) que acumulan fitoeno, fitoflueno, ζ -caroteno y neurosporeno en cantidades decrecientes y la presencia de los mismos intermediarios en células cultivadas en presencia de difenilamina (Olson y Knizley, 1962). Otra prueba a favor de esta hipótesis es la acumulación de licopeno, γ -caroteno y β -caroteno en cultivo incubado en presencia de CFTA o nicotina (Batra et al., 1973).

De los análisis de complementación cuantitativa no sólo se obtiene el mejor apoyo a la idea de que una enzima esté implicada en varias reacciones, sino que nos ofrece un modelo concreto de organización de las enzimas implicadas en la ruta (Figuras 5 y 6).

Los heterocariontes formados por núcleos mutantes en el gen carB y núcleos portadores del alelo silvestre acumulan fitoeno, fitoflueno, ζ -caroteno, neurosporeno y productos totalmente deshidrogenados (Aragón et al., 1976). Los heterocariontes formados por un mutante en el gen carR y por el tipo silvestre para ese gen, acumulan licopeno, γ -caroteno y β -caroteno

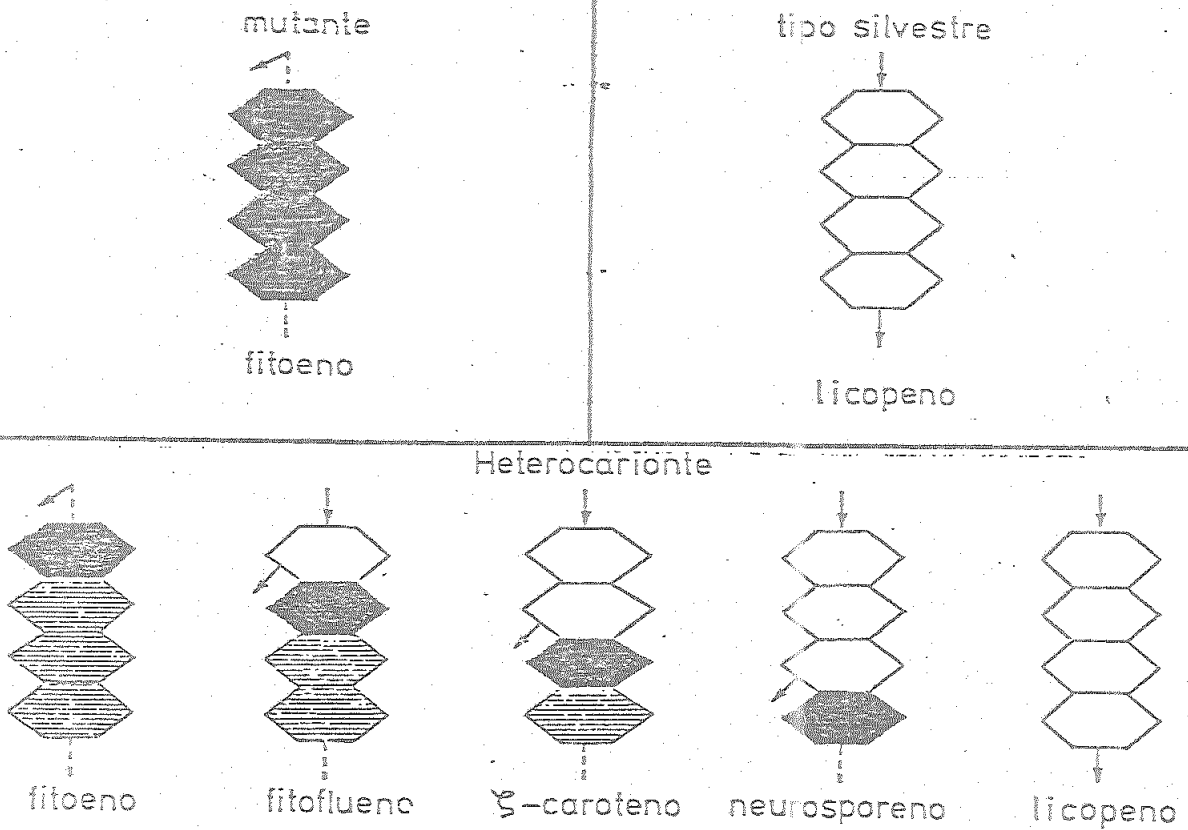


Figura 5. Las reacciones desde fitoeno hasta licopeno son llevadas a cabo, sucesivamente, por cuatro moléculas de la deshidrogenasa del fitoeno. Los símbolos blancos representan enzimas activas, producto del alelo del tipo silvestre. Los símbolos negros, el producto de un mutante carB, enzimáticamente inactivo, pero capaz de integrarse en el complejo. Los símbolos rayados, indistintamente uno u otro. Arriba a la izquierda, agregado enzimático de un mutante carB. Arriba a la derecha, el del silvestre. La parte inferior de la figura representa los complejos enzimáticos posibles en los heterocariotes entre alelos silvestre y carB, y los productos que se esperan (Aragón et al., 1976).

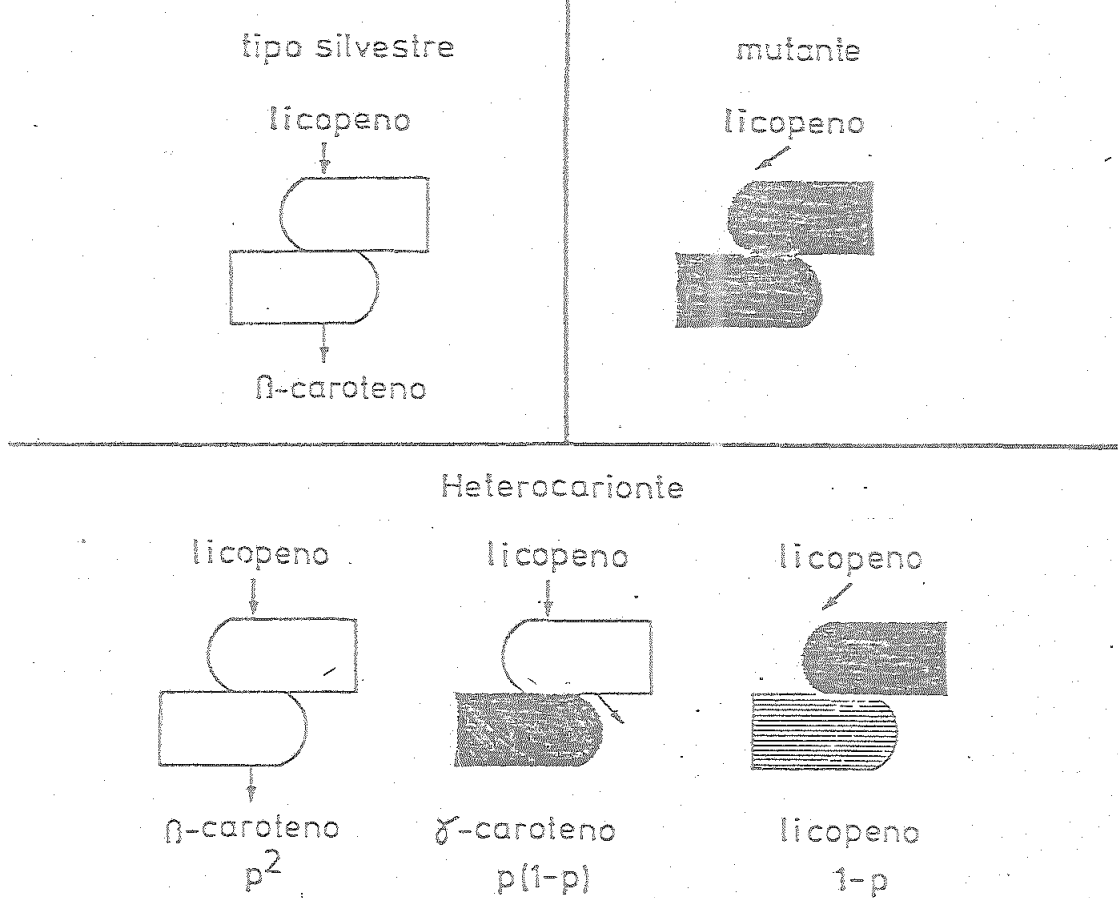


Figura 6. Las reacciones desde licopeno hasta β-caroteno son llevadas a cabo, sucesivamente, por dos moléculas de la ciclasa del licopeno. Los símbolos blancos representan enzimas activas, producto del tipo silvestre. Los símbolos negros, el producto de un mutante carR, enzimáticamente inactivo pero capaz de integrarse en el complejo. Los símbolos rayados, indistintamente uno u otro. Arriba a la derecha, agregado enzimático de un mutante carR. Arriba a la izquierda, el del silvestre. La parte inferior de la figura representa los complejos enzimáticos posibles en los heterocariontes entre alelos silvestres y carR, sus productos, y las frecuencias esperadas en el supuesto de que no haya discriminación a nivel de transcripción, traducción y agregación (De la Guardia et al., 1971).

(De la Guardia et al., 1971). La relación matemática entre los análisis cuantitativos de los carotenos acumulados y las proporciones nucleares en los heterocariontes ha llevado a los autores citados a proponer un modelo sobre la organización de las enzimas en la ruta (Figuras 5 y 6).

En el modelo, el gen carB codifica una deshidrogenasa que actúa en forma de complejo multienzimático de cuatro unidades; este complejo es el encargado de convertir el fitoeno en licopeno mediante cuatro deshidrogenaciones sucesivas. Por otra parte, el gen carR determina un polipéptido que actuaría en forma de dímero para convertir, mediante dos ciclaciones, el licopeno en β -caroteno.

Para explicar la presencia de intermediarios entre fitoeno y licopeno o entre éste y β -caroteno, según el caso, y sus proporciones relativas, el modelo postula las propiedades siguientes: cuando coexisten en el heterocarionte los alelos mutantes y silvestre, del gen carB o carR, según el caso, los polipéptidos inactivos pueden ser incorporados en el complejo. Cuando un intermediario llega a una de estas copias inactivas no es procesado y se expulsa del complejo. El intermediario expulsado no puede ser tomado por otro complejo ni procesado de otra manera, acumulándose en la misma proporción en que es producido.

La incorporación de los polipéptidos inactivos al complejo supone que los alelos mutantes empleados determinan polipéptidos estructuralmente parecidos al normal y es de esperar, por tanto, que esta condición no se cumpla para otros alelos distintos. En relación con la no incorporación de sustratos en el caso de las ciclasas, sólo se produce cuando en los heterocariontes está presente una mutación en el gen carA (Murillo et al., 1981).

En la regulación de la carotenogénesis de Phycomyces, intervienen varios factores, la mayoría de los cuales han sido mencionados anteriormente. Se han descrito una serie de rutas reguladoras independientes, entre las que se pueden destacar la retroinhibición por producto final, la estimulación por retinol y otros agentes químicos y la interacción sexual. Las diferentes estimulaciones se han combinado genéticamente en una sola estirpe que produce del orden de 500 veces más β -caroteno que la estirpe silvestre (Murillo et al., 1978). Se desconoce si el efecto estimulador de la luz (Bergman et al., 1973) se produce o no mediante otro mecanismo independiente.

La existencia de un mecanismo de retroinhibición se pone de manifiesto por la acumulación de precursores en cantidades muy superiores a las de β -caroteno

cuando se inhibe la ruta de biosíntesis por procedimientos químicos o genéticos (Eslava et al., 1974). En este mecanismo de control probablemente está implicado el gen carS, cuyas mutaciones, muy recesivas, provocan un fenotipo superamarillo. Esto se debe a la acumulación del orden de cincuenta a cien veces más β -caroteno en los mutantes carS que en el silvestre. La participación del gen carS en el control por el producto final explicaría que los dobles mutantes carB carS acumulen la misma cantidad de fitoeno que los mutantes carB (Murillo y Cerdá-Olmedo, 1976).

El producto del gen carS podría actuar como regulador negativo que requiere de la participación específica del β -caroteno. De esta manera la ausencia del regulador o del producto final de la ruta provocaría un incremento en la síntesis de carotenos totales (Murillo y Cerdá-Olmedo, 1976).

Entre los agentes químicos que estimulan la carotenogénesis en Phycomyces, el retinol es de particular interés por su efectividad. Mutaciones en al menos dos genes distintos provocan insensibilidad a la estimulación por retinol. Uno de ellos puede ser el mismo gen carA y el otro ha sido denominado carI (Murillo, 1975; Roncero y Cerdá-Olmedo, 1982). Por razones no bien entendidas, los mutantes insensibles al efecto del retinol también lo son al CFTA, inhibidor de la

ciclación del licopeno. También, los mutantes aislados originalmente como insensibles al CFTA son insensibles para el retinol (Murillo, 1975; Torres-Martínez, 1978). Ello sugiere, evidentemente, la existencia de un elemento común entre ambos fenómenos, pero su identidad es desconocida por ahora.

Ha sido aislado un mutante constitutivo para el efecto del retinol. El mutante presenta un fenotipo superamarillo y su síntesis de β -caroteno no se ve incrementada por la presencia del retinol en el medio de cultivo (Murillo y Cerdá-Olmedo, 1976). En este trabajo se estudian también algunos mutantes de fenotipo similar.

Del análisis del efecto sobre la carotenogénesis de varios compuestos análogos estructurales del retinol (incluyendo la α - y β -ionona) se deduce que el anillo de 6 átomos de carbono es la parte crítica de la molécula en el mecanismo de estimulación, siendo mucho menos relevante la cadena lateral (Parra y Murillo, 1982).

Otro de los agentes estimuladores de la carotenogénesis en Phycomyces es la luz. Varios mutantes defectivos en esta fotoinducción, y normales para otras respuestas a la luz han sido aislados. Un grupo

de ellos han sido asignados a un nuevo gen, carC (Revuelta, 1981), y otros han sido denominados pic (López Díaz y Cerdá-Olmedo, 1980). Se desconoce si, al menos en algunos casos, se trata de mutantes en el mismo gen.

Algunos mutantes defectuosos en el fototropismo (genes madA y madB) son también parcialmente defectivos en la fotoinducción de la carotenogénesis. Ello prueba la existencia de elementos comunes para estos dos fenómenos y plantea algunas dificultades a la hipótesis de que los fotorreceptores que participan en ambos procesos son distintos. En el fototropismo, una flavina es el cromóforo más probable para el fotorreceptor, mientras que en el caso de la fotoinducción de la carotenogénesis se han aportado pruebas importantes de que el fotorreceptor utiliza al propio β -caroteno como cromóforo (Whitaker y Shropshire, 1981).

Un tipo particularmente interesante de mutantes albinos de Phycomyces son los que definen el grupo de complementación carA. No producen apenas carotenoides o acumulan β -caroteno en cantidades diez o veinte veces menores que el tipo silvestre (De la Guardia et al., 1971; Ootaki et al., 1973). Los mutantes carA responden al retinol, aunque no alcanzan en su presencia el nivel de carotenogénesis del

tipo silvestre (Eslava et al., 1974). También responden al CFTA, inhibidor de la ciclasa, en cuya presencia acumulan cantidades significativas de γ -caroteno y licopeno, mientras permanece constante el nivel de β -caroteno. Ello ha dado pie para explicar el fenotipo albino de los mutantes carA como resultado de una hipersensibilidad del mecanismo de control por producto final (Murillo, 1980).

Por otra parte, ha sido demostrado que la alteración genética del producto del gen carA impide que tenga lugar el intercambio de sustratos entre distintos complejos de la ciclasa del licopeno, y cabría esperar que también lo hiciera con el trasiego de sustratos a través de cada complejo (Murillo et al., 1981). Por ahora, los dos posibles efectos asignados a las mutaciones del gen carA, hipersensibilidad reguladora y alteración en la transferencia de sustratos, no han podido ser relacionados con un mecanismo específico común.

Una serie de pruebas experimentales demuestran que los que hemos denominado hasta ahora como genes carA y carR son, en realidad, dos segmentos de un mismo gen, aunque sus productos sean funcionalmente independientes. Esto último puede explicarse por la fragmentación en dos polipéptidos distintos de

un precursor común y las pruebas obtenidas descartan la posibilidad de que la separación tenga lugar a nivel de ARN mensajero (Torres-Martínez et al., 1980). Los autores de referencia propusieron la denominación de carRA para este gen bifuncional. No obstante, nosotros seguiremos utilizando las denominaciones simples de gen carR o gen carA cuando nos estemos refiriendo a fenómenos que se relacionan sólo con la función correspondiente a uno u otro gen. Con ello se sigue, además, la recomendación de los autores de la propuesta del gen bifuncional.

La mayoría de los genes car han sido utilizados en experimentos de recombinación genética para determinar su localización cromosómica. El gen carB está estrechamente ligado al gen carRA y en el mismo cromosoma, pero no ligado estrechamente, se encuentra el gen carS. Esta disposición recuerda pues el modelo del operón bacteriano, no muy frecuente, por otra parte, en eucariontes (Roncero y Cerdá-Olmedo, 1982). Los genes carI y carC se encuentran cada uno en un grupo de ligamiento independiente (Roncero y Cerdá-Olmedo, 1982; Revuelta, 1981).

Estudios in vitro en Phycomyces

Como se mencionó anteriormente, no han sido muy numerosos los estudios sobre carotenogénesis in vitro en Phycomyces y los sistemas correspondientes no han sido desarrollados hasta un punto en que se permita la purificación y caracterización de las enzimas.

Chichester y sus colaboradores, usando un sistema crudo, libre de células, de Phycomyces blakesleeanus estudiaron la incorporación de acetato, hidroximetilglutarato y ácido mevalónico, marcados radiactivamente, en β -caroteno y obtuvieron pruebas indirectas de la participación de IPP y DMAPP en la formación de carotenos (Yokoyama et al., 1962). En este primer trabajo se determinaron las condiciones más adecuadas de incubación y el requerimiento de cofactores del sistema.

Se ha estudiado la incorporación de mevalonato en licopeno y otros carotenos con extractos crudos del mutante C115 (carS42) (Bramley y Davies, 1975) y se han usado también estos extractos para comprobar la conversión de fitoeno en licopeno (Davies, 1972) así como el requerimiento de cofactores del sistema (Clarke y Bramley, 1981).

Se han investigado las reacciones de ciclación usando extractos de Phycomyces y se ha encontrado incorporación de licopeno, γ -caroteno y neurosporeno en β -caroteno. Tras la adición de β -zeacaroteno o licopeno no radiactivos, se reduce la cantidad de neurosporeno marcado que se incorpora en β -caroteno. Este resultado se interpreta como prueba de que las dos rutas de ciclación pueden ser operativas: una que implica la ciclación del neurosporeno a β -zeacaroteno y la de éste a β -caroteno después de la última deshidrogenación y una segunda en que el licopeno se convierte en γ -caroteno y éste en β -caroteno; aunque no se puede descartar una baja especificidad de sustratos de las enzimas implicadas (Bramley et al., 1977).

Ultimamente, se ha estudiado la biosíntesis de carotenos en distintos orgánulos celulares de Phycomyces utilizando la estirpe C115. El β -caroteno se acumula en glóbulos de lípidos y quizás estos orgánulos también están implicados en su biosíntesis (Riley y Bramley, 1982).

El sistema enzimático de Phycomyces es de particular interés ya que, como hemos visto anteriormente, existen muchos datos fisiológicos y genéticos y una gran colección de mutantes cuyo estudio in vitro puede

ofrecer pruebas adicionales sobre los modelos establecidos hasta ahora.

Parte de esta tesis se ha ocupado de este tipo de enfoque, estudiándose el comportamiento in vitro de una serie de mutantes de la carotenogénesis, así como el efecto en los extractos libres de células de compuestos activadores e inhibidores de la misma.

CAROTENOPROTEINAS

Generalidades

En los seres vivos, los carotenoides se presentan asociados frecuentemente con proteínas. La primera mención de carotenoproteínas fue probablemente la realizada por G. Pouchet en 1872. A partir de esta fecha el estudio de las carotenoproteínas ha ocupado el esfuerzo de algunos investigadores, aunque generalmente desconectados de los bioquímicos y genéticos interesados en la biosíntesis y función de los carotenoides. Esto ha tenido como consecuencia la carencia de hipótesis suficientemente probadas sobre la función de estos complejos. Se dispone ya de varias revisiones sobre las carotenoproteínas entre las que

se pueden destacar las de Cheesman et al. (1967), Zagalsky (1976), Britton et al. (1982) y una recopilación de trabajos editados por Lee (1977).

La definición más estricta del término carotenoproteína alude a una proteína en la que los carotenoides están presentes como grupos prostéticos en proporciones estequiométricas. Sin embargo, existen muchos complejos carotenoproteínicos de estequiometría poco definida. También se han descrito complejos carotenolipoproteínicos en los que los carotenoides pueden no estar asociados directamente con las proteínas. En todas estas situaciones se habla, no obstante, de carotenoproteína.

Si bien los complejos carotenoproteínicos están presentes en una extensa gama de organismos, los mejores estudiados son los de invertebrados. Los estudios que se revisan en este apartado corresponden a estos organismos, aunque se mencionarán también los de plantas y bacterias.

Muchas proteínas se encuentran en asociación con carotenos y forman parte de un grupo prostético lipídico y no tienen interacción específica con dichas proteínas. En este tipo de complejo el caroteno se puede encontrar "disuelto", más o menos indiscrimina-

damente, en el componente lipídico, siendo, la asociación poco específica (Herring, 1975).

La forma de unión de los carotenos en estos complejos aún no está bien entendida, aunque la selectividad en la asociación a algunas proteínas y el efecto de disgregación y reconstrucción de las uniones carotenolipoproteína sugieren que la interacción implica algo más que una disolución pasiva del carotenoide en la lipoproteína (Zagalsky, 1976).

Es bien conocida la inestabilidad de la unión caroteno-lipoproteína (Cheesman et al., 1967). La exposición de los complejos a luz intensa, calor e iones metálicos o incluso el almacenamiento, pueden causar alteraciones en el espectro de absorción. Se ha encontrado que las condiciones iónicas son, a veces, importantes en la estabilidad del complejo (Zagalsky, 1976). Ligeras alteraciones en el pH pueden afectar también a las características del espectro (Wallace et al., 1967).

En otros complejos, el carotenoide está unido estequiométricamente a una proteína simple específica que, en algunos casos, está glicosilada (Cheesman

et al., 1967). En estos casos se dan sitios específicos de unión del carotenoide y se produce, normalmente, un cambio drástico en el espectro de absorción de éste.

Tres carotenoproteínas de este tipo han sido estudiadas con cierto detalle. La crustacianina, proteína azul del caparazón de la langosta (Cheesman et al., 1966) es una proteína simple, sin otros componentes que los restos de aminoácidos. La ovo-verdina, proteína verde de los huevos de langosta, es una lipoproteína con un gran grupo prostético particularmente rico en fosfolípidos y con un componente de carbohidrato (Ceccaldi et al., 1966). La ovorubina, proteína roja de los huevos de Pomacea canaliculata, es una glico-proteína con un grupo prostético que contiene residuos de manosa, galactosa, fucosa y glucosamina (Cheesman, 1958).

En todas las carotenoproteínas examinadas se separan fácilmente sus dos componentes mediante tratamiento con acetona o etanol, lo que sugiere que en su unión no están implicados enlaces covalentes. Mediante esos tratamientos se puede obtener por precipitación la apoproteína incolora (Cheesman et al., 1967). En el caso de la crustacianina y

la ovorubina, la carotenoproteína puede ser reconstruida mezclando la solución en acetona del carotenoide con una solución acuosa de la proteína, diluyendo con agua y eliminando la acetona por diálisis. La ovoverdina no se puede reconstruir por este método después de separados sus componentes (Cheesman y Prebble, 1966; Cheesman, 1958).

Una propiedad importante de las carotenoproteínas es la de estabilización mutua del carotenoide y la proteína, lo que sugiere una posible función biológica de estos complejos que será discutida más adelante.

El carotenoide parece que actúa fijando la estructura terciaria o cuaternaria de la proteína. Las soluciones de ovorubina pueden ser calentadas durante un corto periodo de tiempo a 100°C sin que se desnaturalicen mientras que la apoproteína coagula inmediatamente en estas condiciones (Cheesman et al., 1967).

Una característica notable que muestran casi todos los espectros de las carotenoproteínas es el desplazamiento más o menos pronunciado de la banda

principal de absorción hacia longitudes de ondas mayores. Este efecto no es totalmente universal, existiendo ciertas carotenoproteínas cuyo espectro difiere muy poco del espectro del carotenoide libre (Jencks y Buten, 1964).

Los principales carotenoides identificados en las carotenoproteínas de los invertebrados no son de una gran variedad. La astaxantina es el carotenoide más común, y también se encuentran cantaxantina y esteres de astaxantina. Es interesante señalar que estos tres carotenoides tienen en común la presencia de grupos carbonilos en las posiciones 4 y 4' de los anillos terminales.

Experimentos de reasociación de la apocrustacina con distintos tipos de carotenoides han demostrado que la presencia de estos grupos carbonilos, al menos en una de las posiciones, es fundamental para que exista la asociación (Lee y Zagalsky, 1966; Zagalsky, 1976). Estos datos, considerados en relación con la presencia de un grupo aldehído en los retineno (Morton, 1944), hace suponer que la interacción del grupo carbonilo del carotenoide y los residuos de aminoácidos es un prerrequisito para la formación de carotenoproteínas de este tipo.

Como ya se ha mencionado, la facilidad con que son separados los carotenoides de las carotenoproteínas hace altamente improbable una unión de tipo covalente entre ambos. El mecanismo de unión de los dos componentes aún no ha sido perfectamente esclarecido, aunque se han manejado diferentes hipótesis que intentan, además, explicar el desplazamiento en el espectro de absorción.

Se ha sugerido una unión electrostática entre el carotenoide y la apoproteína en la que la astaxantina, con aniones en sus anillos, se uniría a componentes básicos de la proteína. Esta hipótesis ha sido rechazada a partir de datos espectroscópicos (Bushwald y Jencks, 1968) y por la capacidad de la cantaxantina y violoeritrina de formar productos coloreados en unión con la apoproteína.

También se ha barajado una unión de tipo hidrofóbico semejante a la sugerida para la proteína transportadora de retinol (Petersons y Beggar, 1971; Futterman y Heller, 1972). Esta idea es difícil de aceptar dado el bajo contenido de aminoácidos hidrófobos presentes en las carotenoproteínas.

Para explicar el desplazamiento del espectro

y basándose en analogías químicas, Buchwald y Jencks (1968) han propuesto un modelo en el que las características del espectro de la carotenoproteína se deberian a una distorsión del carotenoide por sus dobles enlaces. Para que este mecanismo sea válido los grupos metilo del carotenoide serían inmovilizados y los anillos β -ionona unidos a la proteína de manera que queden retorcidos respecto al plano del polieno conjugado y la tensión se localice en los dobles enlaces. El grado de desplazamiento en el espectro dependería del grado de torcimiento de la molécula.

Recientemente Salares et al. (1979), basándose en análisis de resonancia Raman de crustacianina y ovoverdina, han rechazado la hipótesis de la distorsión. Consideran que, si bien no se puede descartar un ligero cambio en la conformación de la astaxantina tras la unión a la proteína, la disposición de la mayor parte de la nube de electrones π permanece inalterada. Ellos concluyen que el desplazamiento del espectro debe ser explicado por un mecanismo de polarización en el que los grupos cargados cerca de la cadena de astaxantina causan una reorganización de los electrones π . Ello tiene como resultado la aparición de un dipolo permanentemente inducido y un incremento de la deslocalización de los electrones π en el estado basal. Se desconoce la naturaleza de los

grupos cargados responsables de la polarización.

También se han descrito complejos de carotenoides y proteínas aislados de membranas de cloroplastos de plantas superiores (Ke, 1971) y de algas (Berkaloff, 1977). Este tipo de complejos están mucho menos estudiados y, por tanto, menos comprendidos que los de invertebrados, y no se sabe prácticamente nada acerca del modo de unión entre el caroteno, β -caroteno en este caso, y la proteína.

Este tipo de complejos fueron descritos por vez primera por Nishimura y Takamatsu (1957) y, posteriormente, por varios autores que utilizaron diferentes métodos de extracción y plantas distintas (Bishop, 1962; Ji et al., 1968; Vernon et al., 1969; Nishimura y Takamatsu, 1960). Sus propiedades están extensamente descritas por Ke (1971). Cabe destacar la naturaleza lipoproteica de la apoproteína y el desplazamiento del espectro respecto al de β -caroteno libre, presentando el complejo picos de absorción alrededor de 538 nm, 498 nm y 460 nm, con ligeras variaciones según los autores.

Algunos investigadores han sugerido que estos complejos son, en realidad, distintos tipos de agregados del β -caroteno en suspensión (McEvoy y Lynn, 1973)

o bien asociaciones inespecíficas de carotenos con proteínas hidrofóbicas producidas durante los procesos de aislamiento (Zagalsky, 1976). Sin embargo, los datos acumulados por autores mencionados en el párrafo anterior parecen indicar que se trata de la asociación del β -caroteno con una proteína o proteínas específicas. En esta tesis se identifica y se describen las propiedades de un complejo β -caroteno-proteína similar al de cloroplasto de plantas que se encuentra en un nuevo tipo de mutantes de Phycomyces.

Se ha aislado, también, un tipo de complejo carotenoproteínico a partir de cromatóforos de la bacteria fotosintética Rhodospirillum rubrum cuyo espectro de absorción está curiosamente desplazado hacia el azul respecto al carotenoide en estado libre (Schwenker y Gingras, 1973). Se desconoce la relación entre este tipo de complejo y el estado in vivo del carotenoide, no pudiéndose descartar, tampoco en este caso, una combinación inespecífica.

A partir de membranas de bacterias no fotosintéticas, se han aislado complejos en los que un carotenoide glicosidado se une covalentemente a una lipoproteína, siendo el complejo soluble con detergentes; también se han aislado carotenos glicosidados unidos

a péptidos que son solubles en éter (Thirkell y Hunter, 1969).

Funciones de las carotenoproteínas

Sobre el papel que juegan los complejos caroteno-proteínicos en la naturaleza existe mucha especulación y muy pocas pruebas experimentales que verifiquen el significado funcional de estos complejos.

En principio, todo lo dicho en un apartado anterior de esta Introducción respecto a las funciones de los carotenos es válido para las carotenoproteínas. En el caso de las carotenoproteínas de organismos fotosintéticos, por ejemplo, prácticamente todos los carotenoides localizados en las membranas fotosintéticas están presentes en forma de complejos clorofila-caroteno-proteína. Todas las implicaciones de los carotenoides en las funciones fotosintéticas hay que entenderlas, por tanto, como las funciones de este tipo de complejos.

Una de las propiedades más características de las carotenoproteínas y, por lo tanto, con mayor implicación funcional, es la de la estabilización de ambos componentes del complejo al asociarse. Una de las

funciones con las que se ha especulado es precisamente la del control de la conformación de la proteína asociada. Existen dos hechos de partida, uno es el conocimiento desde hace varias décadas del fenómeno de regulación alostérica (Monod et al., 1963) y, por otro lado, el precedente de que ciertos polienos pueden alterar la conformación de proteínas, como en el caso de la rodopsina (Wald y Hubbard, 1960).

En el caso de las carotenoproteínas mejor estudiadas, como son la ovorubina y la crustacianina, el carotenoide es estabilizado contra la foto-oxidación y la configuración de la proteína varía enormemente (Cheesman et al., 1967). Cuando se separa la astaxantina de la apocrustacianina no sólo se incrementa la labilidad de la estructura terciaria de la proteína, sino que cambia su movilidad electroforética y se observa un decrecimiento en su peso molecular. Actualmente se sabe que la β -apocrustacianina está compuesta de dos subunidades del mismo peso molecular, cuya unión para formar el dímero se ve estabilizada por la presencia del carotenoide (Britton et al., 1982). Se piensa que la astaxantina afecta la dimerización alterando la estructura terciaria de la proteína y no actuando directamente como agente enlazante.

Esta función de control conformacional de ciertas proteínas es de especial importancia en relación con los fenómenos de regulación de la propia síntesis de los carotenos. En Phycomyces, por ejemplo, ya se ha apuntado la existencia de un mecanismo de control por el β -caroteno de su propia biosíntesis. Es fácil imaginar que para ejercer esa función el β -caroteno interaccione con una proteína reguladora, quizás el producto del gen carS modificándola estructuralmente.

El cambio en el espectro de absorción del carotenoides cuando éste se une a la proteína sugiere una serie de funciones protectoras dependientes de la coloración. Estas funciones pueden ser, sobre todo, de adaptación ecológica de los organismos y de utilización de los pigmentos como protección de los efectos deletéreos de las radiaciones.

Un ejemplo significativo sobre la posible función protectora de los complejos carotenoproteínicos lo tenemos en los estudios llevados a cabo con crustáceos del género Idothea (Lee, 1967). Se ha visto que en cada una de las especies (Idothea montereyensis e I. granulosa) existen tres variedades definidas de distinta coloración (verde, roja y marrón) que imitan el color típico del alga particular sobre la que están viviendo. Las variedades verde y marrón presentan

ambas un complejo carotenoproteínico verde conteniendo la variedad marrón, además, cantaxantina libre. No parece que el cambio de color se produzca por cambios en la alimentación, sino que depende directamente de la coloración del sustrato donde vive. Cuando se establece en un sustrato de color verde, el animal moviliza la cantaxantina, responsable del color rojo, y la une a una proteína para formar un complejo de color azul. La asociación de este complejo con ciertas xantófilas (principalmente luteína) da como resultado el complejo de color verde.

Otra función de las carotenoproteínas es, lógicamente, la de servir de transportador en medios acuosos de los carotenoides, que no son solubles en agua cuando están en forma libre. También pueden servir estos complejos para preservar tanto al carotenoide como a la proteína durante determinadas etapas de vida o del desarrollo del organismo, y hacerlos accesibles en otras. En relación con este fenómeno se ha apuntado la posibilidad de que estos complejos tengan determinadas funciones en el desarrollo de algunos invertebrados, habiéndose observado cambios en el estado de las carotenoproteínas que correlacionan con cambios en el desarrollo de estos organismos (Cheesman et al., 1967).

También se ha apuntado la posibilidad de que las carotenoproteínas actúen como fotorreceptores de determinados sistemas fotosensibles. En el estudio de tejidos fotosensibles de ciertos invertebrados se han aislado carotenoides y no derivados del retinol, y el espectro de acción de ciertas fotorrespuestas son explicables en base a la existencia de una carotenoproteína fotosensible (Vevers y Millot, 1957).

MATERIALES Y MÉTODOS

Estirpes

Las estirpes de Phycomyces blakesleeanus utilizadas en esta Tesis se indican en la Tabla 1. Su designación se ajusta a las reglas propuestas por Demerec et al. (1966). En la designación de cada estirpe, la letra mayúscula indica el laboratorio donde fueron obtenidas: "C", California Institute of Technology, Pasadena; "S", Universidad de Sevilla; "A", Universidad de Salamanca; "M", University of West Virginia, Morgantown. En la designación del genotipo, se representa con un signo entre paréntesis (+) o (-), el sexo al que pertenece la estirpe y se usan tres letras minúsculas para indicar, en su caso, el tipo de mutación presente. Las mutaciones que afectan a las respuestas fototrópicas se designan mad, las que afectan a la síntesis de ácido nicotínico, nic, y las que afectan a la carotenogénesis, car. Cada una de estas siglas va seguida de una letra mayúscula, indicativa del grupo de complementación, y un número específico para cada mutación independiente. Un guión sustituye a la letra mayúscula cuando se desconoce el grupo de complementación. En una tercera columna de la Tabla 1 se indica el origen de cada estirpe y el tratamiento mutagénico (NG = mutagénesis con nitrosoguanidina) o cruzamiento utilizado en su obtención. En la última columna se indican

TABLA 1

ESTIRPES DE PHYCOMYCES UTILIZADAS EN ESTA TESIS

Estirpe	Genotipo	Origen	Fenotipo
NRRL1555	(-)	Colección de Northern Silvestre Regional Res. Lab.; Peoria, IL, USA	
C2	carA 5 (-)	NRRL1555, NG	Blanco
C5	carB 10 geo-10 (-)	"	Blanco. Acumula fitoeno
C9	carR 21 (-)	"	Rojo. Acumula licopeno
C11	carR 23 (-)	"	"
C12	carR 24 (-)	"	"
C13	car-25 (-)	"	"
C115	carS 42 mad-107 (-)	"	Superamarillo
S13	carR 95 (-)	UBC24, NG	Rojo
S102	nicA 101 (-)	NRRL1555, NG	Auxótrofo para el ácido nicotínico
S136	car-127 (+)	NRRL1554, NG	Anaranjado
S239	car-176 (-)	NRRL1555, NG	Rojo
S274	carS 42 nicA 101 (-)	C242 x (C115*S102)	Superamarillo
S303	carS-179 (+)	C2*S213, NG	"
S323	car-180 (-)	"	"
S324	car-181 (-)	"	"
A32	(+)	A16 x NRRL1555	
M1	carS 43 tri-751 (+)	NRRL1554, NG	"
S106*M1	carS 42 car-102 mad-107	*carS 43 tri-751	
S102*S303	nicA 101*carS-179		
S274*S303	carS 42 nicA 101*carS-179		

Para los heterocariontes sólo se indica el genotipo.

los fenotipos mutantes de interés para este trabajo.

Los heterocariotes utilizados en este trabajo también aparecen en la Tabla 1. Los componentes de cada micelio heterocariótico se indican separados por un asterisco. Los heterocariotes se obtuvieron utilizando el método descrito por Ootaki (1973).

Métodos de cultivo

Medios de crecimiento

El medio mínimo normalmente empleado para los cultivos fue el medio de Sutter IV (SIV) (Sutter, 1977a). Este medio contiene por cada litro: 20 g glucosa, 5 g KH_2PO_4 , 0,5 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 10 mg Ca^{++} , 2 mg ácido cítrico H_2O , 2 mg tiamina HCl, 0,2 mg Fe^{+++} , 0,2 mg Zn^{++} , 0,1 mg Mn^{++} , 0,02 mg Mo^{6+} , 0,01 mg Cu^{++} . Como fuente de nitrógeno se utiliza 2 g/l de L-asparagina. Para cultivos sólidos se añaden 15 g/l de agar.

En algunos casos este medio mínimo básico se utilizó con ciertas variantes. Añadiendo al medio 1 g/l de extracto de levadura (Difco) se obtiene un medio enriquecido (SIVEL) y tanto SIV como SIVEL se pueden acidificar hasta pH 3,3 añadiendo HCl 1 N después de la esterilización en autoclave y obteniéndose así los medios SIVA y SIVELA, respectivamente. Estos

medios acidificados provocan crecimiento colonial en Phycomyces.

Un tipo peculiar de medio se utilizó en la obtención de esporangióforos muy robustos para la formación de heterocariontes y para estudiar la reacción sexual, es el agar patata. Este medio se prepara troceando 200 g de patatas peladas, que se hierven durante 1 hora en 1 litro de agua; se filtra, se añaden 20 g de sacarosa y 15 g de agar al líquido filtrado y se completa hasta 1 l si fuera necesario. Después de esterilizado en autoclave, se le añaden 10 ml de una solución, esterilizada por filtración, de 25 µg/ml de tiamina.

En algunos casos el medio de cultivo se suplementó con acetato de retinol (Sigma Chemical Company, St. Louis, Missouri, USA). Este compuesto se disolvió en etanol, se emulsificó con polioxietilensorbitano (Tween-80) y se añadió al medio antes de verterlo en las cajas de Petri. La concentración final de retinol en el medio varió según los casos, pero la de etanol siempre fue de 0,1% y la Tween-80 de 0,5%. En ningún caso se guardaron los medios con retinol más de 1-2 días, con objeto de evitar los efectos de la descomposición de este compuesto por la luz.

Inoculación

Se han utilizado dos formas diferentes de inoculación. En unos casos los cultivos se inocularon con esporas vegetativas, previamente activadas a 48°C durante 15 minutos (Rudolph, 1960). La determinación del número de esporas viables en una suspensión se realizó haciendo distintas diluciones de la misma, sembrando muestras en medio ácido y contando el número de colonias aparecidas.

En otros casos la inoculación de los cultivos se realizó trasplantando un pequeño trozo de micelio, de aproximadamente 2 mm². El trozo de micelio se deposita en el centro de la caja o se introduce, con ayuda de unas pinzas, en un matraz con medio líquido.

Condiciones de cultivo

Los cultivos se incubaron a temperatura constante de 22°C. Dependiendo del tipo de estudio los cultivos se mantuvieron en total oscuridad o bajo una batería de luces a una intensidad luminosa constante (0,5 w/m²). Los cultivos destinados a recolectar esporas se incubaron durante 5 días en condiciones de luz difusa. A partir de ese momento se colocaron, destapados, en cajas de plástico herméticamente cerradas

y se mantuvieron bajo la batería de luces hasta que se produjeron gran cantidad de esporangios.

Los cultivos destinados al estudio de la reacción sexual se incubaron a 15°C.

Recolección de esporas

Se cultivó el tipo deseado durante 6-7 días en cajas de Petri con medio SIVEL. Cuando se han producido suficientes esporangios maduros se recogen las esporas restregando los esporangios sobre la tapa invertida de la caja de Petri, a la que se le han añadido previamente 5 ml de agua estéril. Esta operación se realiza dos o tres veces con cada caja, quedando las esporas suspendidas en el agua. Las esporas se lavaron tres veces mediante centrifugación a 2000 x g durante 15 minutos. Las esporas se conservan suspendidas en agua estéril en un refrigerador, donde sobreviven durante varios meses.

Otra forma que se ha utilizado para recolectar esporas es inocular la estirpe deseada en matraces de 250 ml con unos 50 ml de medio SIVEL sólido, e incubando durante 6-7 días. Cuando se han formado los esporangios maduros se añade agua estéril sobre el cultivo y después de agitarlo se recoge el agua

con las esporas en suspensión. Este segundo método presenta más inconvenientes debido a que se contamina con pequeñas partículas de micelios y esporangióforos, difíciles de eliminar.

Obtención de heterocariontes

Para la obtención de heterocariontes se siguió el método descrito por Ootaki (1973): dos pequeños bloques de agar, de aproximadamente 2 cm de largo, se colocaron enfrentados sobre un portaobjeto. Sobre cada uno de estos bloques se colocó un esporangióforo joven, sin esporangio, de las estirpes que deben formar el heterocarionte. Con la ayuda de unas tijeras especiales (Micro Dissecting Scissors, Clay Adams, Parsippany) se cortaron las puntas de cada uno de los esporangióforos, procurando que la sección de uno de ellos resultara mayor que la del otro. Se manipularon los dos bloques de agar hasta lograr introducir uno de los esporangióforos en el otro, haciendo que penetrara aproximadamente 1 mm. Esta operación final se realizó bajo binocular.

Alrededor de 24 h después, surgen uno o varios esporangióforos en el lugar del injerto. En ese momento se comprobó si había o no fusión entre los dos esporangióforos intentándolos separar suavemente. En caso

de fusión, las esporas procedentes de los esporangios regenerados se sembraron en agar SIVELA, comprobándose la formación del heterocarionte por la heterogeneidad de las colonias aparecidas.

Análisis genéticos

Cuando se pretende llevar a cabo un estudio de complementación cuantitativa entre diferentes mutantes de la carotenogénesis es necesario determinar la proporción de núcleos de uno u otro tipo en distintos micelios heterocariontes. El cálculo de esta proporción nuclear se realizó a partir de la frecuencia de esporas homocarióticas y heterocarióticas producidas por el micelio analizado. El fundamento del método ha sido descrito por Heisenberg y Cerdá-Olmedo (1968). En este método de determinación de la proporción nuclear es imprescindible la distinción entre los tres tipos de micelios originados por las esporas del heterocarionte analizado.

Un estudio de complementación cuantitativa se ha llevado a cabo en este trabajo con el heterocarionte S303*S102. Este heterocarionte produce esporas de tres tipos genéticos: homocariontes S303 y S102 y heterocariontes. Si se cultivan durante 4 días en oscuridad, los micelios homocarióticos S303 se identifican fácilmente por su coloración amarilla muy intensa.

Esta coloración los diferencia de los micelios homocarióticos S102, de color amarillo pálido, y de los heterocarióticos, que presentan una gama de intensidad desde ser indistinguibles de los homocariotes S102 hasta un amarillo intenso pero fácilmente diferenciable de los homocariotes S303.

Por lo tanto, el análisis genético se hizo observando los cultivos en la oscuridad. En el caso de heterocariotes que dieron lugar a una frecuencia de esporas homocarióticas S303 mayor de 0,2, todos los micelios claros se consideraron como heterocarióticos; en estos casos, la frecuencia esperada de esporas homocarióticas S102 es despreciable, menor de 0,05. Caso de que la frecuencia de esporas homocarióticas S303 fuese menor de 0,2, la distinción entre micelios homocarióticos S102 y heterocarióticos se hizo trasplantando trozos de las colonias claras a medios SIV y SIV suplementado con ácido nicotínico. Se identificaron como colonias homocarióticas S102 aquellas que dieron lugar a crecimiento sólo en el medio suplementado y como colonias heterocarióticas las que dieron lugar a crecimiento en ambos medios. El requerimiento de ácido nicotínico de la estirpe S102 se debe a una mutación, nicA101, muy recesiva (Medina, 1977).

Ensayos enzimáticos

Marcado radioactivo

La lactona del ácido DL(2C¹⁴) mevalónico se obtuvo del Radiochemical Centre, Amersham, Bucks, Inglaterra (10,3 mCi/mmol).

Se utilizó en forma de sal sódica, para lo que antes de su uso tuvo que ser desecado bajo atmósfera de N₂ y añadida una solución acuosa equimolar de NaOH. Una vez preparado el mevalonato (C¹⁴) se puede guardar en el refrigerador por largos periodos de tiempo.

Preparación del extracto celular

Las distintas cepas de Phycomyces se incubaron en medio líquido a 22°C y a la luz. Se recogieron los micelios y después de lavarlos con agua desionizada se secaron manualmente, se congelaron a -20°C y se liofilizaron.

Los micelios deshidratados se pulverizaron mediante un cernidor de 35,5 µm de diámetro de poro, a temperatura ambiente.

El extracto enzimático se preparó a partir de 2 g de materia seca añadiendo 7 ml de una solución que contenía 30% (v/v) de glicerol y 2 mM de β-mercap-

toetanol en tampón Tris-HCl (N-tris(hydroximetil-amino-metano) 0,2-M, pH 8,0. La mezcla se dejó durante 20 minutos en hielo, agitándola ocasionalmente.

La pasta resultante se centrifugó a 10.000 x g durante 30 minutos a 4°C y el sobrenadante se utilizó inmediatamente para la incubación, ya que si se guarda, tanto a 4°C como a -20°C, existe una gran pérdida de actividad enzimática (Bramley, 1973).

Condiciones de incubación

La mezcla básica de incubación contenía: ácido D-L-Mevalónico (2-C^{14}), 1 μCi (97 nmol); ATP, 10 μmol ; GSH, 20 μmol ; $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 4 μmol ; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 6 μmol ; NAD, NADP y FAD 1 μmol cada uno, extracto celular, 0,4 ml y se añade tampón Tris-HCl 0,2 M pH 8,0 hasta 1 ml. Cualquier variación en estas condiciones se da en Resultados y Discusión.

El FAD se obtuvo de Sigma London Chemical Co. Ltd., mientras que todos los demás compuestos se obtuvieron de Boehringer Corporation Ltd.

Cuando se requirieron condiciones anaeróbicas en la incubación, ésta se llevó a cabo en tubos Thunberg de 15 ml sometidos a tres ciclos sucesivos de evacuación

y bombeo de N_2 . Para comprobar las condiciones anaeróbicas conseguidas, se analizó la ausencia de color del metil viológeno reducido.

El retinol (0,87 μmol) se añadió a las incubaciones antes que el extracto celular, disuelto en etanol y emulsificado con Tween-80 (5 mg). Idénticas cantidades de Tween-80 y etanol se añadieron a las incubaciones de control. La difenilamina se añadió disuelta en metanol. Las concentraciones finales de metanol y etanol fueron menores del 1% en todos los casos.

Todas las incubaciones se llevaron a cabo, como se ha descrito previamente (Yokoyama et al., 1962; Bramley y Davies, 1975; Than et al., 1972), durante 3 h, en la oscuridad, a 24°C y con agitación constante. La reacción se paró añadiendo a 8 ml de etanol a la mezcla de incubación.

Los datos de ensayos in vitro que se presentan en esta Tesis se obtuvieron como media de, al menos, dos ensayos. La desviación típica no fue nunca mayor del 10%.

Extracción de compuestos radioactivos

Al finalizar la reacción, antes de añadir el

metanol, se tomó una alícuota de 5 μ l que se depositó en un disco de papel Whatman DE-52. Después de sucesivos lavados con éter dietílico, etanol y agua, sólo quedan trazas de ácido mevalónico en el papel. Así, después de los sucesivos lavados del disco, éste se utilizó directamente para determinar la radioactividad incorporada en forma de fosfatos de prenilo.

Para extraer los terpenoides radioactivos de la mezcla de reacción se siguieron los siguientes pasos: después de añadir los 8 ml de etanol a la mezcla, se añadió también 1 ml de una solución con carotenos y esteroides no marcados (100 μ g de cada uno). El ergosterol, escualeno y β -caroteno se obtuvieron de Sigma Chemical Co. y el resto de los carotenos no marcados se aislaron de diferentes cepas de Phycomyces (Williams et al., 1965). Esta solución se sometió a una partición con éter etílico tres veces consecutivas. La fracción de éter se lavó con agua destilada, se desecó con Na_2SO_4 anhidrido y se evaporó bajo atmósfera de N_2 . El residuo se disolvió en éter de petróleo (p.e. 40-60°C), se tomó una alícuota para determinar la incorporación de radioactividad en lípidos totales y el resto se utilizó para separar y analizar los carotenos y esteroides.

Determinación de proteínas

Para la determinación de proteínas se tomó una

alícuota del extracto crudo y se le añadió el mismo volumen de una solución etanólica de ácido tricloroacético al 10%. Después de centrifugar durante 5 minutos a 10.000 x g, el precipitado se ensayó por el método de Lowry et al., (1951), utilizando albúmina de suero como patrón.

Las proteínas insolubles en medio acuoso se ensayaron por el método de Markwell et al. (1978), una variación del anterior que permite realizar el ensayo en presencia de sulfato de dodecil sódico (SDS).

Análisis químico de carotenos y esteroides

Extracción

Los micelios se separaron primero del medio de cultivo al término de la incubación; en el caso de medio sólido se limpió cuidadosamente el agar con una espátula y se secaron repetidamente con papel absorbente.

Para extraer los carotenos y esteroides de estos micelios se siguieron dos técnicas diferentes:

a) En uno de los procedimientos se empleó una fracción de micelio, aproximadamente la cuarta parte, para determinar la proporción de materia seca por desecación a 105°C durante una hora. El resto se mezcló

con 20 ml de éter de petróleo (p.e. 50-70°C) y 20 ml de metanol. Se trituroó durante tres minutos en una batidora Sorvall Omni-Mixer, a la máxima velocidad, y se recogió la capa de éter de petróleo donde se encuentran disueltos los carotenoides. Al resto se le añadieron otros 20 ml de éter de petróleo, repitiendo la operación hasta tres veces. La fracción de metanol, más densa que la de éter de petróleo, queda en el fondo y contiene los restos de micelio y la mayoría de fosfolípidos y ergosterol. Todas las operaciones de extracción se realizaron en ausencia de luz y a baja temperatura para evitar en lo posible la oxidación de los carotenos.

Las distintas fracciones de éter se mezclaron finalmente y se evaporaron empleando un rotoevaporador (Buschler Instruments, Fort Lee, N.J., USA) conectado a una bomba de vacío (Millipore Corporation, Bedford, Mass., USA).

b) En el otro procedimiento de extracción el micelio se liofilizó después de ser congelado a -20°C.

Después de pesar directamente la cantidad de micelio a extraer, éste se trituroó en un mortero utilizando arena de mar lavada hasta conseguir un polvo fino. Se añadieron 10 ml de éter de petróleo, se agitó

y se dejó decantar para recoger luego, con una pipeta, la fracción de éter donde se haya disuelto los carotenos. Se añadieron luego otros 10 ml de éter de petróleo y se volvió a repetir la operación hasta que el éter y los restos celulares quedaron totalmente decolorados.

Tras mezclar las distintas fracciones de éter, se centrifugó la mezcla a 2000 x g y se recogió el sobrenadante. En el caso de que el precipitado fuera coloreado, se le volvió a añadir éter de petróleo y se repitió la centrifugación. El éter con los carotenos se evaporó igual que en el método a).

Este segundo método de extracción tiene la ventaja de disminuir el error de la determinación del peso seco, pero no es aconsejable utilizarlo cuando los carotenos a extraer absorben en la zona ultravioleta del espectro ya que el método no elimina, como hace el primero, los fosfolípidos y gran parte del ergosterol, pudiendo estos compuestos interferir en la identificación y cuantificación del caroteno estudiado.

Separación cromatográfica

Para la manipulación de los carotenos en su extracción, separación e identificación, se siguieron las recomendaciones de Davies (1965). Las técnicas de

separación aquí descritas se utilizaron tanto para los compuestos radioactivos como para los carotenos y esteroides extraídos de micelios.

La separación previa se hizo en una columna de óxido de aluminio (Woelm neutra) desactivada hasta el grado III, según Brockman (Davies, 1965). La columna se eluyó con éter de petróleo (p.e. 40-60°C) (P) con concentraciones crecientes de éter dietílico (E). La fracción eluida sólo con éter de petróleo contenía escualeno y fitoeno, mientras que los otros polienos se eluyeron con concentraciones crecientes de E/P; el β -caroteno se eluye con 0,25% E/P; el licopeno con 5% E/P y el ergosterol con 15% E/P.

El siguiente paso de purificación se realizó mediante cromatografía en capa fina. El escualeno y fitoeno se separaron y purificaron en placas de Silica Gel (Merck, Darmstadt, Alemania), con éter de petróleo (p.e. 60-80°C) como eluyente, en tanques de saturación y en la oscuridad; sus R_fs fueron 0,38 y 0,20 respectivamente.

Para separar los dos isómeros del fitoeno se utilizó una placa de Silica Gel impregnada con AgNO₃ (10% p/p) utilizando una mezcla de éter de petróleo/éter diisopropílico/acetato de etilo en proporción 2/1/1

(Davies, 1965).

El β -caroteno y el licopeno se purificaron en placas activadas de Al_2O_3 (Merck) desarrolladas con 0,5% E/P. También se utilizaron en algunos casos placas de MgO-Silica Gel G (1:1 p/p) desarrolladas con éter de petróleo (p.e. 60-80°C) y benceno (1:1). El ergosterol se separó y purificó en placas activadas de Silica Gel y desarrolladas con cloroformo.

Identificación y cuantificación

Tanto los espectros de absorción de las distintas fracciones procedentes de la separación cromatográfica como los restantes espectros de absorción descritos en esta Tesis, se registraron en espectrofotómetros Beckman modelo Acta III o Bausch & Lomb, modelo Spectronic 2000.

El criterio seguido para la identificación de los carotenoides fue el de la comparación de sus espectros de absorción y comportamiento cromatográfico con los ya publicados (Davies, 1965; Goodwin, 1952).

Las concentraciones de los carotenoides se calcularon a partir de sus coeficientes de absorción (Davies, 1965) y se refirieron al peso seco de los micelios de los que fueron extraídos.

Para registrar el espectro de absorción in vivo, los micelios se limpiaron, eliminando todo el agar, y se secaron con papel absorbente; se cortó un fragmento de 2 x 4 cm, aproximadamente, y se colocó sobre un portaobjetos, al que queda totalmente adherido. Estos portaobjetos, con el micelio, se colocaron sobre la ventanilla de salida del haz de muestra del espectrofotómetro, situando en el de referencia un portaobjeto con un fragmento de micelio del mutante albino C2.

Radioensayos y detección de bandas en cromatografías de capa fina

Los compuestos que no dan lugar a bandas coloreadas se visualizaron en las placas de capa fina rociando éstas con una solución de Rodamina 6G en acetona (1% p/v) y observando la placa bajo luz ultravioleta. Otros compuestos radioactivos se detectaron en las placas de capa fina con ayuda de una cámara radiocromatográfica de centelleo (Birchover Instruments Ltd., Letchworth, Inglaterra).

Los distintos terpenoides se eluyeron de las placas de capa fina con éter dietílico y tanto éstas como otras alícuotas se ensayaron en un contador de centelleo líquido modelo LS7500 de Beckman con compensación automática de "quenching". Se añadieron previamente

10 ml de líquido de centelleo que contenía, por litro de tolueno, 3 g de 2-5 diferiloxazol y 0,5 g de 1-4-di [2-(4-metil-5-fenil-oxazonil)] (Bramley et al., 1974).

I. CAROTENOGÉNESIS EN PHYCOMYCES. ANÁLISIS IN VITRO

Efecto del O_2 en la síntesis de carotenos por extractos de C9

Otros autores han estudiado ya el efecto de distintos factores en la actividad carotenogénica in vitro de Phycomyces, estableciendo las condiciones adecuadas para la incorporación de mevalonato marcado radioactivamente en carotenos y otros terpenoides (Bramley y Davies, 1975; Yokoyama et al., 1962; Clarke et al., 1981). Estas condiciones han sido las utilizadas en este trabajo y se indican en la sección correspondiente de Materiales y Métodos.

Algunos de los estudios anteriores, (Bramley y Davies, 1975), indican que el nivel de oxígeno puede influir en la síntesis de carotenos por extractos celulares. Para comprobar esta hipótesis se ha estudiado en este trabajo la influencia del oxígeno en la actividad carotenogénica de la estirpe C9 que, in vivo, acumula cantidades importantes de licopeno y otros carotenos en menor proporción (Aragón et al., 1976). Los datos correspondientes aparecen en la Tabla 2. Tanto en esta Tabla como en las restantes relacionadas con ensayos in vitro se indican, además de los valores de incorporación de mevalonato

TABLA 2

SÍNTESIS IN VITRO DE CAROTENOS POR EXTRACTOS DE LA ES-
TIRPE C9, EN PRESENCIA Y AUSENCIA DE OXÍGENO

FRACCIÓN	AEROBIOSIS	ANAEROBIOSIS
Lípidos totales	25900	22200
Fosfatos de prenilo	21400	19769
Fitoeno	1100	3684
Licopeno	6600	1090
β -caroteno	420	70
Escualeno	1252	1091

FRACCIÓN/L. TOTALES (x 100)		
Escualeno	4.8	4.9
Fitoeno	4.3	16.6
Licopeno	25.6	4.9
β -caroteno	1.7	0.3
Carotenos totales	31.6	21.8

Todos los valores están dados en dpm/mg proteína y son las medias de duplicados. La concentración de proteínas en el ensayo fue de 1,6 mg/ml.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

en distintos terpenoides, la relación de cada uno de estos valores con el de incorporación en lípidos totales. Consideramos que estos últimos datos normalizados son los más significativos para establecer comparaciones, dada la variación, a veces muy acusada, en la eficiencia de incorporación de mevalonato en diferentes ensayos.

En la Tabla 2 puede comprobarse que las condiciones de anaerobiosis provocan un descenso de 5 veces en la incorporación de mevalonato en licopeno y, simultáneamente, un incremento de orden similar, en la incorporación del mismo precursor en fitoeno. De este resultado puede concluirse que la síntesis de fitoeno es independiente de la presencia de oxígeno, siendo éste requerido para la desaturación del fitoeno hasta licopeno.

La deshidrogenación del fitoeno en Phycomyces requiere NADP y FAD y se inhibe en presencia de NADPH y FADH (Sandmann et al., 1980). El efecto de la anaerobiosis podría explicarse por la formación irreversible de estos últimos compuestos en ausencia de oxígeno.

La síntesis de escualeno no se ve afectada por la ausencia de oxígeno. Posiblemente ello se

deba a que los cofactores del tipo NADPH afectan sólo a pasos posteriores en la biosíntesis de los esteroides (Davies, 1972).

Tanto en presencia como en ausencia de oxígeno hemos sido incapaces de detectar una incorporación significativa de mevalonato en ergosterol. Tampoco se detecta radioactividad, mediante la cámara de radiocromatografía de centelleo, en otros carotenos.

Biosíntesis de carotenos por extractos libres de células de mutantes estructurales

Como se indica en la Introducción de este trabajo, durante los últimos años la carotenogénesis en Phycomyces ha sido estudiada extensamente desde un punto de vista fisiológico y genético. Las conclusiones sobre la organización y regulación de la ruta derivadas de estos estudios estaban basadas exclusivamente en datos de acumulación in vivo de diversos carotenoides. En este trabajo nos propusimos comprobar y profundizar en dichas conclusiones a través de los correspondientes estudios de actividad carotenogénica in vitro.

En primer lugar, se estudió la incorporación de mevalonato radiactivo en carotenos, escualeno

y fosfatos de prenilo por extractos celulares de la estirpe silvestre NRRL1555 y de los mutantes C5 y C9. De acuerdo con los estudios genéticos, la estirpe C5 lleva una mutación en el gen (carB) que determina la enzima deshidrogenasa del fitoeno, y la estirpe C9 está mutada en el gen (carR) que determina la enzima ciclasa del licopeno (ver Introducción). Los datos correspondientes aparecen en la Tabla 3.

Puede observarse en la Tabla 3 que, en relación con la estirpe silvestre, el extracto celular de C5 da lugar a un notable incremento de incorporación de mevalonato en fitoeno y un descenso en la incorporación del precursor radioactivo en los carotenos saturados, licopeno y β -caroteno. El extracto celular C5 es, pues, menos efectivo que el del silvestre en la transformación de fitoeno. Esto corrobora la propuesta, basada en datos de análisis in vivo, de que el gen carB determina la enzima deshidrogenasa del fitoeno.

No obstante, la síntesis in vitro de licopeno por C5 parece bastante significativa, aunque la relación fitoeno/licopeno es cinco veces mayor en C5 que en el silvestre. Hay que señalar que en la

TABLA 3

BIOSÍNTESIS IN VITRO DE CAROTENOS POR LAS ESTIRPES
SILVESTRES, C5 Y C9

FRACCIÓN	NRRL1555	C5	C9*
Lípidos totales	135600	112100	125900
Fosfatos de prenilo	193000	82800	21400
Fitoeno	6600	17300	1100
Licopeno	1800	1000	6600
β -caroteno	1600	17	420
Escualeno	74500	48900	1252
<hr/>			
FRACCIÓN/L. TOTALES			
(x 100)			
Escualeno	54,5	43,6	4,8
Fitoeno	4,8	15,5	4,3
Licopeno	1,3	0,9	25,6
β -caroteno	1,2	0,0	1,7
Carotenos totales	7,3	16,4	31,6

Datos como en Tabla 2. Concentración de proteínas: NRRL1555, 3,6 mg/ml; C5, 2,4 mg/ml.

*Datos recogidos de la Tabla 2.

cromatografía en capa fina el licopeno se extiende siempre por una superficie mayor que los demás carotenos. Esto ha podido provocar una cierta contaminación de esta fracción en el momento de su recogida y explicaría el dato que comentamos. Una explicación alternativa sería que la deshidrogenasa del fitoeno presente en C5 no fuera totalmente inactiva (mutación rezumante). Creemos, sin embargo, que esta segunda explicación es poco probable. Estaría en contra de los datos de acumulación in vivo de carotenos por C5 (Aragón et al., 1976) y haría necesaria la suposición de que la mutación carB10, presente en C5, ha afectado también a la ciclasa del licopeno, dada la baja transformación de licopeno en β -caroteno. Otros autores han aportado pruebas de complementación y recombinación genéticas (Aragón et al., 1976; Roncero y Cerdá Olmedo, 1982) que hacen inverosímil esta última suposición. Un ensayo posterior con un extracto independiente de C5 dio lugar a una incorporación mucho menor de mevalonato en licopeno (ver Tabla 7).

En la Tabla 3 puede verse también que el extracto de la estirpe C9 da lugar a una incorporación de mevalonato en licopeno sensiblemente mayor que la del tipo silvestre. El extracto celular de C9 también

produce incorporación de mevalonato en β -caroteno. Pero la relación de incorporación en licopeno versus la de β -caroteno es del orden de 15 veces mayor en C9 que en el silvestre.

La interpretación más simple de los datos indicados en el párrafo anterior es que la mutación carR21, presente en la estirpe C9, determina la síntesis de una enzima ciclasa del licopeno defectuosa y con actividad sensiblemente menor a la del tipo silvestre. Ello confirma la hipótesis, establecida por otros autores en base a datos in vivo, de que el gen carR es el gen estructural para la enzima mencionada, la ciclasa del licopeno (De la Guardia et al., 1971; Ootaki et al., 1973).

La síntesis de cantidades significativas de β -caroteno en los ensayos in vitro de C9 sugiere que el defecto en la ciclasa de esta estirpe es sólo parcial y le permite cierta actividad enzimática. In vivo, la estirpe C9 también acumula una pequeña cantidad de β -caroteno (Murillo, 1975) pero en este caso la relación entre la concentración de este caroteno y la de licopeno (del orden de 1:1000) es sensiblemente menor a la que aparece en los ensayos in vitro. La presencia en nuestro ensayo de condicio-

nes peculiares de acceso de los sustratos o, alternativamente, la existencia in vivo de un mecanismo que sustrajera de la acción de las ciclasas aquellas moléculas de licopeno no procesadas inmediatamente, podrían explicar esta discrepancia. Otras razones no pueden descartarse.

La acumulación in vivo de fitoeno o licopeno en las estirpes mutantes de C5 o C9, respectivamente, es del orden de 40 veces mayor que la de β -caroteno en el tipo silvestre. Este dato ha servido como prueba para postular un mecanismo de control negativo de la ruta por el producto final (Murillo y Cerdá-Olmedo, 1976). En la tabla 3 puede observarse que tanto los extractos de C5 como los de C9 son más eficaces que el extracto del tipo silvestre en la incorporación de mevalonato en carotenos. Mientras que en el tipo silvestre sólo el 7,3% de los lípidos marcados corresponden a carotenos, en C5 y C9 los valores correspondientes son del 16,4% y del 31,6%, respectivamente. La interpretación más simple de de estos resultados es que el nivel de enzimas carotenogénicas en C5 y C9 es mayor que en el tipo silvestre. Ello supondría que el mecanismo de control de la ruta carotenogénica, mediado por su producto final, opera a nivel de síntesis de proteínas. Otras

explicaciones alternativas no pueden descartarse. Particularmente improbable es la inhibición directa de la actividad de alguna enzima por el propio β -caroteno. La concentración de éste y su solubilidad en los extractos acuosos utilizados son mínimas.

El control, mencionado de la síntesis de proteínas carotenogénicas afectaría, probablemente, tanto a la enzima sintetasa del fitoeno como a la deshidrogenasa del mismo. Así, se explicaría el incremento en C5 de la síntesis de fitoeno y, la mayor eficacia del extracto celular de C9, respecto del silvestre, en la transformación del mismo. Esto se deduce de la baja relación entre la acumulación de fitoeno y la de los carotenos más insaturados en C9 (Tabla 3).

Biosíntesis in vitro de carotenos en mutantes reguladores

Dos tipos distintos de mutaciones en la regulación de la carotenogénesis de Phycomyces se han estudiado con alguna extensión desde un punto de vista fisiológico y genético. Un tipo corresponde a los mutantes en el gen carA, que apenas acumulan carotenoides y, el otro, a los mutantes en el gen carS, que acumulan normalmente 40 veces más β -caroteno que el tipo silvestre (ver Introducción de este trabajo).

En la Tabla 4 se muestran los datos de incorporación de mevalonato por extractos celulares de un mutante de cada uno de los tipos implicados. Puede comprobarse en dicha Tabla que la actividad carotenogénica del extracto celular de la estirpe C2, portadora de la mutación carA5, es significativamente menor que la del tipo silvestre. Ello es particularmente notable para el β -caroteno, cuya síntesis in vitro es del orden de 20 veces menor en C2 que en el silvestre, pero también resulta ostensible para el fitoeno y el licopeno.

Los datos comentados se corresponden con el comportamiento in vivo de C2, que produce del orden de 20 veces menos β -caroteno que el tipo silvestre (Eslava et al., 1974). No obstante, los datos discrepan en lo que se refiere al fitoeno y al licopeno que, in vivo, son indetectables en C2. Comentaremos esta discrepancia en un apartado posterior.

Según los datos de la Tabla 4, no hay diferencias significativas entre C2 y la estirpe silvestre para la síntesis de escualeno o la de fosfatos de prenilo. Esto está de acuerdo con los estudios in vivo que, hasta ahora, no han podido detectar bloqueo enzimático alguno de la ruta de síntesis de los terpenoides en los mutantes carA.

TABLA 4

BIOSÍNTESIS IN VITRO DE CAROTENOS POR EXTRACTOS
DE LAS ESTIRPES SILVESTRE, C2 Y C115

FRACCIÓN	SILVESTRE*	C2	C115
Lípidos totales	136000	129300	114400
Fosfatos de prenilo	193000	167600	176000
Fitoeno	6600	800	7400
Licopeno	1800	400	2000
β -caroteno	1600	80	1200
Escualeno	74500	67479	54200

FRACCIÓN/LÍPIDOS TOTALES (x100)	SILVESTRE*	C2	C115
Escualeno	54,5	52,2	47,8
Fitoeno	4,8	0,6	6,5
Licopeno	1,3	0,3	1,8
β -caroteno	1,2	0,1	1,1
Carotenos totales	7,3	0,9	9,4

Datos como en Tabla 2. Concentración de proteínas:
NRRL1555, 3,6 mg/ml; C2, 2,4 mg/ml; C115, 2,8 mg/ml.

*Datos recogidos de la Tabla 3.

Una hipótesis sencilla sobre el comportamiento de los extractos de C2 es que esta estirpe está afectada en la regulación de la síntesis de las proteínas carotenogénicas, de manera que el nivel de éstas se ve drásticamente reducido respecto del tipo silvestre. Alternativamente podría establecerse que el producto del gen carA participa de alguna manera en el catabolismo del β -caroteno. Éste se mantendría a nivel bajo en presencia del producto normal del gen y sería acelerado en ausencia de dicho producto. Es conocido que, en condiciones normales, el β -caroteno no es degradado de forma significativa (Murillo et al., 1981) y que su catabolismo es, sin embargo, muy acusado en situación de ayuno (Raugei et al., 1982). Las mutaciones en el gen carA podrían activar este mecanismo de degradación haciéndolo independiente de las condiciones ambientales. Esta hipótesis podría comprobarse mediante experimentos de "pulso y caza" que no hemos tenido la oportunidad de realizar y que resultaría difíciles de llevar a cabo por el bajo nivel de síntesis en los mutantes carA.

Datos bastante significativos sobre la acumulación in vivo de carotenos en estirpes heterocarióticas que contienen núcleos mutantes carR, en combinación

bien con núcleos silvestres o bien con núcleos mutantes C2, parecen demostrar que el producto del gen carA es necesario para la transferencia de sustratos entre distintos complejos carotenogénicos, en particular para la transferencia de licopeno y γ -caroteno (Murillo et al., 1981). Aunque sin pruebas directas, por razones de simplicidad en la hipótesis, los autores de referencia sugieren que el producto del gen carA también se requiere para la transferencia de sustratos a lo largo de cada complejo enzimático. De esta manera la alteración de este producto en los mutantes carA produciría un estancamiento en el flujo de sustratos que explicaría la baja producción de β -caroteno en los mutantes carA. Nuestros datos sobre la actividad carotenogénica in vitro de la estirpe C2 no contradicen esta hipótesis, aunque tampoco constituyen prueba directa a su favor.

En la Tabla 4 puede observarse que el extracto celular de la estirpe C115, portadora de la mutación carS42, apenas se distingue del tipo silvestre en su actividad carotenogénica, siendo las únicas diferencias un incremento no muy significativo en la síntesis de fitoeno y licopeno. Este comportamiento del extracto de C115 no se corresponde con la situación in vivo, en la que, como

ya se ha comentado, los mutantes carS son super-productores de β -caroteno.

Basándose en datos genéticos, Murillo y Cerdá Olmedo (1976) han propuesto que las mutaciones en el gen carS provocan un trastorno en la inhibición por el producto final de la ruta carotenogénica. Los datos de la Tabla 4 sugieren que el mecanismo de control dependiente del gen carS opera a nivel de actividad enzimática. En nuestro ensayo in vitro no se llegaría a una concentración de producto final suficiente para causar diferencias entre el tipo silvestre y el mutante carS.

La explicación del párrafo anterior contradice, sin embargo, la hipótesis mencionada previamente y basada en el comportamiento de los mutantes C5 y C9 (ver apartado anterior). Efectivamente la explicación dada en esa hipótesis a la mayor actividad carotenogénica de los extractos de C5 y C9 obligaría a predecir un incremento similar en los mutantes carS. El efecto estimulador provocado por la ausencia de producto final en C5 y C9 debería producirse también por la alteración del producto del gen carS en C115 (Murillo y Cerdá Olmedo, 1976). No encontramos una explicación sencilla a esta contradicción.

Implicación del fitoeno trans en la carotenogénesis de Phycomyces

En la ruta de síntesis de carotenos en Phycomyces, así como en plantas superiores, los carotenos más insaturados y los carotenos cíclicos se presentan en su forma isomérica trans, mientras que el fitoeno es predominantemente cis (Porter y Spurgeon, 1979).

En plantas superiores parece ser que la isomerización se realiza a nivel de fitoflueno (Porter y Spurgeon, 1979); sin embargo, algunos autores (Davies, 1972) han apuntado la posibilidad de que el fitoeno-cis se convierta en fitoeno-trans antes de deshidrogenarse.

En la Tabla 5 se presenta la incorporación de mevalonato tanto en la forma cis como en la forma trans del fitoeno, en distintos mutantes de Phycomyces. En todos los casos se detecta cierta incorporación en ambas formas. Hay que notar que la forma cis del fitoeno es prácticamente la única encontrada in vivo, constituyendo del orden del 98% (Than et al., 1972). En nuestro caso la proporción relativa de las dos formas isoméricas depende del tipo de mutante. En las estirpes C2 y S106*M1, esta última super-productora de β -caroteno, predomina la forma cis pero en C5 predomina la forma trans.

TABLA 5

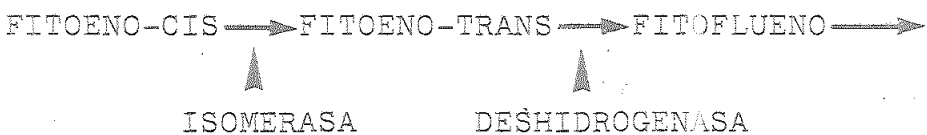
INCORPORACIÓN DE MEVALONATO RADIATIVO EN ISOMÉROS DE
FITOENO POR EXTRACTOS DE DISTINTOS MUTANTES DE LA
CAROTENOGÉNESIS

FRACCION	ESTIRPE		
	C5	C2	S106*M1
Fitoeno-cis	1188	272	3012
Fitoeno-trans	3163	93	220
Relación cis/trans	0,38	2,92	13,7

Datos como en Tablas 2-4.

Estos datos indican claramente que, in vitro, se sintetiza fitoeno-trans a partir de mevalonato radioactivo en extractos de distintos mutantes de Phycomyces. Es decir, que el fitoeno-trans probablemente forma parte de la ruta de biosíntesis de β -caroteno en Phycomyces y, por tanto, que la isomerización cis-trans tiene lugar a nivel de fitoeno en este organismo.

Las cepas capaces de metabolizar el fitoeno, C2 y M1*S106, acumulan mayor cantidad del isómero cis respecto al trans, mientras que C5, que carece de deshidrogenasa del fitoeno, produce mayor cantidad del isómero trans. Esto podría explicarse si sólo el fitoeno trans es utilizado para las deshidrogenaciones sucesivas, según el esquema siguiente:



Hay que destacar la discrepancia entre la situación in vivo e in vitro en la estirpe C5. In vitro ambas formas isoméricas son casi igualmente predominantes, mientras que in vivo la forma cis es muy mayoritaria respecto de la forma trans. Entre otras posibles explicaciones, podría ocurrir que en la

célula existiera una asociación íntima, parcialmente alterada por el procedimiento de obtención del extracto, entre la reacción de isomerización y la primera deshidrogenación; de forma que la primera de las reacciones indicadas no tendría lugar in vivo sin la realización simultánea de la segunda.

Efecto del retinol en la biosíntesis in vitro de carotenos

Como se ha señalado en la Introducción, la presencia de retinol en cultivos de la estirpe silvestre o de algunos de los mutantes car de Phycomyces estimula la síntesis de carotenos, sin que el propio retinol sea transformado en los pigmentos correspondientes.

Para investigar sobre el mecanismo de acción del retinol, hemos estudiado su efecto sobre la actividad carotenogénica de extractos libres de células de las estirpes silvestre y C2. Los datos correspondientes aparecen en la Tabla 6, en la que se ha suprimido la referencia a lípidos totales dada la identidad en la eficacia de las muestras con retinol respecto de los controles correspondientes.

TABLA 6

EFFECTO DEL RETINOL EN LA CAROTENOGÉNESIS IN VITRO
POR EXTRACTOS DE C2 Y LA ESTIRPE SILVESTRE

FRACCIÓN	NRRL1555		C2	
	control	+vit. A	control	vit. A
Lípidos totales	52,0	50,0	252,0	250,0
Prenil fosfatos	152,0	198,0	270,0	285,0
Fitoeno	1,2	1,4	0,3	0,3
Licopeno	0,8	0,3	0,1	0,1
β -caroteno	1,8	5,3	0,13	0,24
Escualeno	14,0	9,4	59	70

Los valores están dados en dpm/ μ g proteína. Las incubaciones contenían 1 μ Ci de D-L-mevalonato (2-C^{14}) y retinol (87 μ mol) emulsificado con Tween-80 (5 mg); los controles contenían Tween-80.

Concentración de proteínas en los ensayos: silvestre, 3,6 mg/ml; C2, 1,4 mg/ml.

Puede observarse en la Tabla 6 que la adición de retinol, que no afecta significativamente la síntesis de escualeno, estimula la carotenogénesis. El retinol da lugar a un incremento de unas cuatro veces en la incorporación de mevalonato en β -caroteno por el extracto celular de la estirpe silvestre y un incremento menos acusado, aunque también significativo, sobre el extracto celular de la estirpe C2.

Los datos anteriores llevan a la conclusión de que el efecto del retinol en la biosíntesis de carotenos se ejerce a nivel de actividad enzimática y no a nivel de síntesis de las enzimas implicadas en la carotenogénesis. Esta segunda posibilidad, sin embargo, se ha sugerido a partir de otras aproximaciones experimentales. Estas implicaban, no obstante, el uso de drogas con posibles efectos secundarios y las conclusiones correspondientes deben tomarse con precaución (Eslava et al., 1974). Así se ha señalado, además, en un estudio reciente que apuntaba la posibilidad de que el retinol y otros compuestos que afectan la carotenogénesis ejerzan su efecto a través de modificaciones en las estructuras membranas, en las que probablemente se insertan los complejos carotenogénicos (Murillo et al., 1981).

Esta posibilidad estaría de acuerdo con los datos que se presentan aquí sobre la acción del retinol.

Efecto de la difenilamina en la carotenogénesis in vitro

La difenilamina es un compuesto químico que cuando se añade al medio de cultivo provoca la acumulación de fitoeno, a costa de otros carotenos más insaturados, tanto en Phycomyces como en otros organismos carotenogénicos (Garton et al., 1951; Lee et al., 1975).

Hemos estudiado el efecto de este compuesto sobre la actividad carotenogénica de extractos libres de células de diversas estirpes de Phycomyces. Los resultados se presentan en la Tabla 7. Puede observarse, en primer lugar, que la presencia de la difenilamina en el ensayo con la estirpe C115 inhibe fuertemente la formación de los carotenos más saturados, licopeno y β -caroteno. Este efecto demuestra que la difenilamina es un inhibidor de la actividad enzimática de la deshidrogenasa del fitoeno y, por tanto, su actuación in vivo debe explicarse por este mecanismo y no por una posible inhibición de la síntesis de la proteína correspondiente. Ello confirma las sugerencias de otros autores (Goodwin, 1980).

TABLA 7

EFFECTO DE LA DIFENILAMINA EN LA BIOSÍNTESIS
IN VITRO DE TERPENOIDES POR ALGUNAS ESTIRPES DE
PHYCOMYCES

FRACCIÓN	C115		C5		C2	
	-DFA	+DFA	-DFA	+DFA	-DFA	+DFA
Lípidos totales	101	123	62	56	70	49
Fitoeno	6,8	12	5,7	11	1,5	6,9
Licopeno	0,6	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
β -caroteno	1,5	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Escualeno	51	40	16	19	14	14
FRACCIÓN/LÍPIDOS TOTALES (x100)						
Escualeno	50,5	32,5	25,8	33,9	20,0	28,6
Fitoeno	6,7	9,7	9,2	19,6	2,1	14,1
Licopeno	0,5	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
β -caroteno	1,5	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Carotenos totales	8,7	9,8	9,2	19,6	2,1	14,1

Valores absolutos como en la Tabla 6, Concentración de DFA: 100 M. Concentración de proteínas: C115, 2,9 mg/ml; C5, 4,3 mg/ml; C2, 1,4 mg/ml.

La difenilamina parece tener un segundo efecto sobre la actividad carotenogénica in vitro. Se trata de un efecto estimulador de la acumulación de fitoeno. Ello es observable en cierto grado en el extracto de C115 y, particularmente, en los extractos de las estirpes C2 y C5 ya que en estos dos casos el incremento en la acumulación de fitoeno no se puede explicar a expensas de la inhibición de su transformación en otros carotenos.

La aparente estimulación por la difenilamina de la(s) enzima(s) que participa(n) en la síntesis de fitoeno no tiene una correspondencia clara con lo que ocurre in vivo. Efectivamente, cuando se añade a los medios de cultivo, la difenilamina provoca, simultáneamente a la inhibición de la transformación del fitoeno, un incremento en la cantidad total de carotenos. Pero ello ocurre sólo en las estirpes de Phycomyces en las que el control por el producto final de la ruta carotenogénica es operativo y no ocurre, por ejemplo, en la estirpe C5 (Clarke et al., 1983).

Hemos estudiado también el efecto de la difenilamina en la incorporación de AMV(C14) en los isómeros cis y trans del fitoeno en la estirpe C5. Como se

muestra en la Tabla 8, la presencia del inhibidor hace cambiar drásticamente la relación cis/trans que se produce en el ensayo control. La interpretación de este fenómeno podría ser objeto sólo de algunas especulaciones, al carecer de otro tipo de datos. Siguiendo la posibilidad de una asociación entre la reacción de isomerización y la primera deshidrogenación del fitoeno (ver un apartado anterior) podría apuntarse que la presencia de difenilamina desacopla dicha asociación y libera a la isomerasa, dejándola en condiciones de actuar sobre el fitoeno sin que se precise de la posterior transformación del mismo. Hay que decir, no obstante, que la difenilamina no causa in vivo esta variación en la relación cis/trans, ni en C5 ni en otras estirpes capaces de transformar normalmente al fitoeno (Clarke et al., 1983).

Comentario general sobre los ensayos in vitro

Hemos indicado repetidamente que la carotenogénesis en Phycomyces ha sido objeto de estudios en los que, hasta ahora, han predominado los enfoques fisiológicos o genéticos. Estos tienen, en general, una extraordinaria capacidad de penetración y de predicción sobre los elementos y propiedades de

TABLA 8

EFECTO DE LA DIFENILAMINA EN LA INCORPORACIÓN IN VITRO DE
MEVALONATO RADIATIVO EN LOS ISÓMEROS CIS Y TRANS
DEL FITOENO POR LA ESTIRPE C5

FRACCIÓN	CONTROL	+DFA
Fitoeno-cis	1,20	0,44
Fitoeno-trans	3,20	6,60
Relación cis/trans	0,37	0,07

Condiciones igual que en Tabla 7.

un sistema, algunas de las cuales se manifiestan difícilmente sin estos enfoques. Sin embargo, la confirmación definitiva de algunas conclusiones importantes sobre un proceso dependen de la capacidad de purificar sus diversos componentes y/o de reproducir su función y propiedades fuera de la célula.

Los experimentos comentados en las páginas precedentes suponen el primer intento sistemático de confirmar y precisar en el tubo de ensayo varias de las predicciones sobre la carotenogénesis en Phycomyces establecidas mediante estudios fisiológicos y genéticos. Este intento se ve limitado por el estado actual; poco refinado, de las posibilidades de manipulación in vitro del sistema. Entre otras dificultades, la insolubilidad de los precursores más directos de la carotenogénesis obliga a utilizar sustratos poco específicos, lo que resta eficacia al sistema e impide la posibilidad de ensayar eficazmente reacciones individuales y, por tanto, la de purificar los elementos implicados específicamente en cada una de dichas reacciones.

A pesar de las limitaciones indicadas, algunas conclusiones previas importantes sobre la carotenogénesis en Phycomyces han podido ser confirmadas y,

a veces, precisadas por nuestro estudio. Entre ellas estarían el papel estructural de los genes carB y carR y el mecanismo de acción del retinol y de la difenilamina.

Hay que notar, no obstante, algunas dificultades importantes del ensayo empleado. Entre ellas, la irregular eficacia de los extractos, debida probablemente a que la poca purificación de los mismos introduce variables no controlables fácilmente. P. Bramley (comunicación personal) ha observado, por ejemplo, que la concentración final de proteína en el extracto es uno de los factores que influye en la eficacia de la incorporación de mevalonato en carotenos. Aunque esto no se refleja invariablemente en nuestros ensayos, este u otros factores no identificados pueden ser responsables de algunas dificultades en nuestras conclusiones, como la que se refiere al efecto de la mutación carS presente en la estirpe C115 en relación con el control por el producto final.

Particularmente enojosa es la presencia en los ensayos, en proporciones importantes, de carotenos que no se presentan in vivo, o lo hacen en cantidades poco significativas. Tal es el caso del fitoeno o el licopeno en las estirpes silvestre, C2 y C115

(Eslava et al., 1974; Murillo, 1975; Aragón et al., 1976; Murillo, 1980). Es posible que ello se deba a una alteración en la organización de las enzimas, probablemente unidas a membranas, durante la preparación de los extractos celulares. Es conocido que la técnica utilizada para dicha preparación desorganiza los orgánulos celulares (Riley y Bramley, 1976). En esos mismos ensayos no se detectan otros metabolitos intermediarios de la ruta, como los que se sitúan entre fitoeno y licopeno o entre este último y el β -caroteno. Esto podría explicarse por la presencia del complejo de cuatro unidades de la deshidrogenasa del fitoeno y del complejo, de dos unidades, de la ciclasa del licopeno, propuestos ambos a partir de datos genéticos (ver Introducción). Una vez que el primer precursor comienza a ser procesado continuaría fácilmente hasta el producto final del complejo. La alteración durante la extracción habría afectado a la interacción entre diferentes complejos, dificultando la transferencia entre ellos de sustratos y no a la interacción entre las distintas unidades de cada complejo, presumiblemente asociadas más íntimamente entre sí. Otras alteraciones o desequilibrios causados por el procedimiento de extracción podrían explicar otras discrepancias señaladas entre situaciones in vivo e in vitro, como las relacionadas

con los isómeros del fitoeno.

En definitiva, el estado actual de los ensayos sobre la carotenogénesis podría ser suficiente para una profundización en algunos de los aspectos de este proceso, ya tratados o no en nuestro estudio, sobre los que se han acumulado interesantes datos, sobre todo de carácter genético. Pero no cabe duda de la necesidad de dedicar intensos esfuerzos al perfeccionamiento del propio ensayo, atendiendo especialmente las posibilidades de incorporación eficaz de sustratos más específicos y la purificación de los extractos.

II. UN COMPLEJO DE CAROTENO Y PROTEÍNA EN PHYCOMYCES

Aislamiento de mutantes de Phycomyces que acumulan β -caroteno en una forma inusual

Varias suspensiones de esporas tratadas con el agente mutagénico nitrosoguanidina se utilizaron en la búsqueda de colonias que, en medio mínimo y en la oscuridad, presentaran una coloración amarilla intensa. El objetivo inicial de esta búsqueda era la identificación de mutantes en la regulación de la carotenogénesis. La estirpe parental utilizada, S213, silvestre para la carotenogénesis y portadora de la mutación dar-52, da lugar a colonias de color amarillo pálido cuando se cultiva en esas mismas condiciones.

Tres mutantes independientes, aislados por el criterio indicado, mostraron un comportamiento para la carotenogénesis no descrito previamente. Se indican a continuación las características fenotípicas más sobresalientes de uno de dichos mutantes, denominado S303, haciendo notar que los otros dos mutantes, S323 y S324, se comportan de manera similar.

Micelios de la estirpe S303, cultivados durante 4-5 días en medio mínimo, en la oscuridad y a partir

de esporas, contienen del orden de 4 mg de β -caroteno por gramo de materia seca, es decir, unas ochenta veces más pigmento que la estirpe parental. Con frecuencia fue posible observar en estos micelios pequeños sectores de color rojizo. A partir de estos sectores, mediante trasplantes sucesivos cultivados en la oscuridad, pudieron obtenerse micelios que presentaban color rojizo de forma homogénea (Figura 7).

En Phycomyces se conocen mutantes de color y, en particular, las mutaciones en el gen carR provocan un fenotipo rojo, similar al de los micelios obtenidos a partir de la estirpe S303. Los mutantes carR carecen de la actividad ciclasa del licopeno y deben su coloración a la acumulación de este precursor del β -caroteno (ver Introducción). Sin embargo, cuando se analizaron los micelios de color rojo originados de S303 sólo se detectó en ellos β -caroteno, en concentración similar a la acumulada por los micelios amarillos de esa misma estirpe. Este hecho descarta la presencia de una mutación en el gen carR como explicación del fenotipo rojo de S303.

La forma micelial roja de S303 sólo puede propagarse mediante trasplante de micelios. Si éstos se dejan esporular y las esporas correspondientes se siembran en medio mínimo acidificado y se cultivan

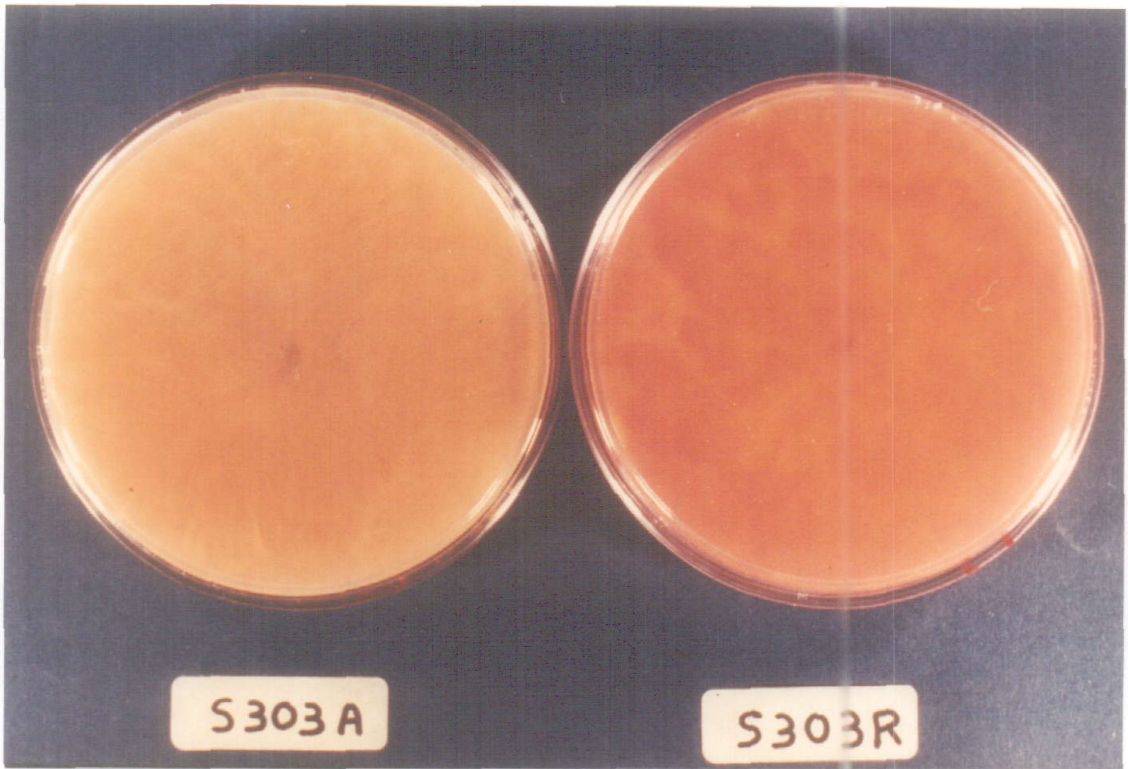


Figura 7. Aspecto de micelios de S303FR y S303FA después de cultivarlos durante 4 días en la oscuridad en medio SIVEL.

en la oscuridad, prácticamente todas las colonias resultantes presentan color amarillo, volviéndose a reproducir con frecuencia la aparición de pequeños sectores rojizos. Trasplantes a partir de estos sectores permiten obtener de nuevo la forma roja homogénea, cuyas esporas vuelven a comportarse como las anteriores. Hay que hacer notar que tampoco ha sido posible reproducir la forma micelial roja de S303 a partir de esporas cultivadas en medio mínimo suplementado con extracto de levadura, incluso si se aumenta hasta 10 g/l la concentración normalmente presente de este suplemento en el medio SILVELA. Sólo eventualmente -con una frecuencia menor al 1%- se observaron colonias ligeramente anaranjadas cuyas esporas, sin embargo, no se diferencian en su comportamiento de las esporas obtenidas de la forma micelial roja.

Dos aspectos novedosos se producen, por tanto, en la estirpe S303: el peculiar comportamiento del fenotipo amarillo-rojo, en lo que se refiere a su propagación asexual y la evidencia de que la forma roja supone la acumulación del mismo pigmento que se encuentra en el tipo silvestre, y en la propia forma mutante amarilla de S303, pero en un estado inusual, no descrito previamente en Phycomyces.

Los resultados obtenidos en el estudio de ambos fenómenos se presentan y discuten a continuación. Para mayor brevedad se aludirá a partir de ahora a las formas roja y amarilla de los micelios S303 usando las siglas FR y FA, respectivamente.

Caracterización genética de la "forma amarilla" de la estirpe S303

Mediante una serie de trasplantes sucesivos de zonas de micelio de color amarillo de S303, intercalados con segregaciones de esporas y selección de una sola colonia, fue posible aislar una estirpe cuyas esporas dan todas lugar a colonias homogéneas amarillas. En cinco trasplantes sucesivos de varias colonias individuales de esta estirpe no aparecieron sectores rojizos. Esta estirpe homogénea amarilla la denominaremos S303FA. La acumulación de β -caroteno en esta estirpe alcanza un nivel idéntico al de la estirpe original S303.

Para determinar el carácter dominante o recesivo de la mutación presente en la estirpe S303FA y responsable de la superproducción de β -caroteno, se construyó un heterocarionte con esta estirpe y la estirpe S102, silvestre para la carotenogénesis y que lleva

un marcador de auxotrofia para el ácido nicotínico. En la Tabla 9 se presentan los resultados de acumulación de β -caroteno de varios micelios heterocarióticos S303FA*S102 y de ambos micelios homocarióticos, cultivados todos ellos en medio mínimo y en la oscuridad. Como puede comprobarse la presencia de una pequeña proporción de núcleos tipo S102 provoca un descenso considerable de la acumulación de β -caroteno en relación con el homocariote S303FA. La mutación correspondiente es, por tanto, muy recesiva.

Como se ha indicado en la Introducción de este trabajo, en Phycomyces ha sido identificado un gen, carS, cuyas mutaciones, muy recesivas, provocan un incremento en la carotenogénesis similar al que se produce en la estirpe S303FA. Para comprobar si la mutación presente en esta estirpe afecta o no al gen carS, se construyó un heterocariote entre S303 y la estirpe S274, portadora de la mutación carS42. La Tabla 10 muestra el contenido en β -caroteno de varios micelios heterocarióticos S303*S274. Las cantidades de pigmento acumuladas son intermedias entre las de ambos homocariotes, reflejando probablemente diferentes proporciones nucleares, y en ningún caso resultan menor de la cantidad producida por S274.

TABLA 9

ANÁLISIS DEL HETEROCARIONTE S303*S102

Micelio	p	µg βcar/g.m.s.
S102	0,00	47
A	0,20	51
B	0,74	621
C	0,85	1754
S303	1,00	4653

Condiciones para calcular la proporción nuclear y extracción y cuantificación de β-caroteno descritos en Materiales y Métodos; p indica la proporción de núcleos S303.

TABLA 10

ANÁLISIS DEL HETEROCARIONTE S303*S274

Micelio	µg βcaroteno/g m s
S303	4800
A	2528
B	4708
C	5004
D	3911
S274	2300

Cultivos de 4 días de incubación en oscuridad en medio SIVEL. Extracción y cuantificación de caroteno descrito en Materiales y Métodos.

En la inspección ocular de más de un centenar de colonias heterocarióticas S303*S274 tampoco se observó colonia alguna cuya intensidad de color fuera aparentemente menor que la de las colonias homocarióticas S274. Dada la recesividad tanto de la mutación carS42 (Murillo y Cerdá-Olmedo, 1976) como de la presente en la estirpe S303 (Tabla 9) hay que concluir que la segunda se ha producido también en el gen carS. Se propone, por tanto, la denominación de carS179 para la nueva mutación.

Caracterización genética de la "forma roja" de la estirpe S303

La aparición en los micelios de la estirpe original S303 de sectores tipo FR y FA podría indicar, en principio, una situación de heterocariosis; es decir, la presencia en el micelio de dos tipos genéticamente distintos de núcleos. La aparición de heterocariontes tras la mutagénesis no es un fenómeno extraño en Phycomyces dada la naturaleza multinucleada de sus esporas (Heisenberg y Cerdá-Olmedo, 1968). Las manipulaciones señaladas en el apartado anterior -que permitieron la purificación del tipo S303FA- habrían significado la consecución de una estirpe homocariótica para uno de los tipos de núcleos originalmente presentes en el heterocarionte.

Sin embargo, algunas observaciones ponen en duda la hipótesis indicada de la heterocariosis. Una de ellas es la similitud en el tipo de colonias que se obtienen a partir de esporas de las dos formas coloreadas de micelio, habiendo sido imposible, como se indicó anteriormente, propagar mediante esporas el tipo FR. La presencia de una mutación de auxotrofia o una mutación letal en los núcleos FR podría explicar este fenómeno, aunque la primera de las posibilidades es poco probable a la vista de que el suplemento de extracto de levadura no tiene efecto en el tipo de segregación de las esporas.

Por otra parte, en los micelios heterocarióticos de Phycomyces es muy rara la segregación de sectores genéticamente distintos y se ha probado experimentalmente la homogeneidad de la proporción nuclear en lugares diferentes de un mismo micelio. Sólo en el caso de algunos heterocariontes intersexuales se producen sectores de micelio con distintas proporciones nucleares y si los núcleos implicados llevan mutaciones de color, aparecen colonias "mosaicos" (Heisenberg y Cerdá-Olmedo, 1968; Murillo et al., 1978).

Finalmente, hay que señalar que las estirpes

S303, S323 y S324 se obtuvieron de esporas sometidas, después de la mutagénesis, a un procedimiento de selección de aquellas que eran funcionalmente uninucleadas. Este procedimiento está basado en la recesividad de la mutación dar-52 -presente en la estirpe parental S213 y que confiere resistencia al compuesto 5-deazarriboflavina- y en el reparto aleatorio de los núcleos del micelio durante la formación de las esporas (Roncero, 1980). Así pues, resulta difícil de explicar que las esporas que dieron lugar a las colonias iniciales de las tres estirpes mutantes señaladas fueran heterocarióticas.

Una hipótesis alternativa para explicar el fenómeno de variación en los micelios de S303 es la existencia de una heterogeneidad genética extra-nuclear, probablemente relacionada con el material genético mitocondrial. Para comprobar esta hipótesis se realizó el experimento que se describe a continuación, basado en el "test del heterocarionte" desarrollado en Aspergillus por Jinks (1963).

Usando esporangióforos de la estirpe S303FR se construyó un heterocarionte con la estirpe S274. Esta última se escogió porque lleva las dos mutaciones nucleares carS42 y nicA101. La segunda de ellas,

que provoca auxotrofia para el ácido nicotínico y es muy recesiva (Medina, 1977), se requiere como marcador nuclear y la primera, que origina una elevada producción de β -caroteno, podría ser necesaria para la expresión del fenotipo rojo, dado que S303 también lleva una mutación carS.

Una vez obtenido el heterocarionte S303FR*S274, reconocido porque sus esporas dan lugar tanto a colonias protótrofas como auxótrofas para el ácido nicotínico, se sembraron con dichas esporas varias cajas de medio SIVA suplementado con ácido nicotínico (1 μ g/ml). La siembra se hizo a baja densidad de esporas por caja para obtener colonias aisladas, y la incubación se hizo en la oscuridad. Entre las colonias aparecidas se escogieron aquellas que daban lugar a sectores rojos para determinar después si alguna era auxótrofa para ácido nicotínico. Esto se hizo colocando de cada colonia un pequeño fragmento de micelio en medio SIV y otro fragmento en medio SIV suplementado con ácido nicotínico. De un total de 120 colonias probadas, 40 crecieron en el segundo tipo de medio, pero no en el primero. Una de estas últimas se utilizó para propagar, por trasplante el micelio rojo y auxótrofo para el ácido nicotínico (S274FR).

La obtención de la estirpe S274FR puede explicarse fácilmente si el carácter FR es debido a un factor genético citoplásmico. Otras hipótesis no se pueden descartar pero, en nuestra opinión, resultan poco verosímiles. Particularmente improbable es que la estirpe S274FR se haya producido como resultado de un fenómeno de recombinación mitótica. No ha sido descrita previamente la existencia de este tipo de recombinación en Phycomyces y, en levaduras y otros hongos bien estudiados, a este respecto, su frecuencia es muy baja -del orden de 10^{-3} , 10^{-4} - y requiere de la formación de núcleos diploides (Fincham et al., 1979). A pesar de una búsqueda intensa en varios laboratorios, no han sido observados núcleos diploides en el ciclo asexual de Phycomyces.

En apoyo indirecto de la hipótesis del factor genético extranuclear hay que mencionar un precedente interesante en el hongo Aspergillus nidulans. Se trata de una variante "roja" de este organismo, aislada tras mutagénesis con luz ultravioleta (Arlett, 1957). Las características de esta variante son particularmente similares a las descritas aquí para el tipo FR de S303: aparece en sectores de micelio vegetativo silvestre, no se obtiene en forma pura

a través de conidiosporas y su factor determinante puede transferirse vía citoplasma (Arlett et al., 1962).

Para estudiar el efecto del factor responsable del fenotipo FR en un fondo genético nuclear silvestre para la carotenogénesis se realizó el siguiente experimento: Se construyó el heterocariote (y heteroplasmonte) S303FR*S102 y esporas del mismo se sembraron en medio SIVA suplementado con ácido nicotínico, a la densidad adecuada para observar colonias individuales. Tras cultivo en la oscuridad se identificaron aquellas colonias auxótrofas para el ácido nicotínico en la forma indicada anteriormente y se observaron cuidadosamente los micelios para tratar de identificar sectores de tonos distintos de color. Veinte colonias individuales auxótrofas fueron observadas y en ningún caso se detectó la aparición de sectores que indicaran la expresión del fenotipo FR. Tampoco se observó este fenotipo en más de doscientas colonias protótrofas y de color poco intenso (recuérdese la recesividad de la mutación carS presente en S303).

Existe la posibilidad de que los sectores tipo FR no sean fácilmente distinguibles en un fondo de color poco intenso, donde podrían manifestarse como sectores de tono pálido anaranjado o rosado. Nuestra experiencia en otras situaciones no apoya

esta posibilidad, como es el caso de los micelios de tono anaranjado muy pálido, fácilmente distinguibles, de heterocariontes $carR*carR^+$ (De la Guardia et al., 1971). Puede sugerirse, por tanto, que el fenotipo FR no depende exclusivamente -al menos en su máxima expresión- del factor genético citoplásmico, sino que requiere además de la presencia de la mutación nuclear carS. Puede ocurrir que no haya un requerimiento específico de la mutación carS para la expresión del fenotipo FR sino que dependa simplemente de la superproducción de pigmento. Esto no es posible comprobarlo experimentalmente, ya que no se conoce otro tipo de mutación que cause un incremento notable en la producción de β -caroteno en Phycomyces.

La suposición más razonable sobre la naturaleza del factor citoplásmico responsable del fenotipo FR es que se trata de una mutación en el material genético mitocondrial. Puede sugerirse, además, que la mutación ha afectado gravemente la función energética de la mitocondria, lo que explicaría la imposibilidad de obtener en forma pura el tipo FR. Los micelios homogéneos FR contendrían una pequeña proporción de mitocondrias normales.

En cualquier caso, resulta difícil de explicar la ausencia de al menos una baja proporción de colonias de tipo homogéneo FR a partir de esporas. Cuando éstas proceden de un micelio homogéneo FR, con una proporción alta de mitocondrias anormales, podría esperarse la formación de algunas esporas con la misma proporción de mitocondrias de uno y otro tipo que el micelio original FR, de forma que resultaran viables y, no obstante, dieran lugar a nuevos micelios homogéneos FR. A falta de un conocimiento adecuado sobre la incorporación de las mitocondrias a las esporas durante el proceso de formación de las mismas, puede pensarse en un requerimiento energético peculiar de la germinación como explicación del fenómeno que comentamos.

Si el fenotipo FR se debe a una alteración genética de las mitocondrias, la distribución de éstas durante el crecimiento vegetativo parece seguir un comportamiento distinto al de los núcleos que, como se ha comentado anteriormente, se distribuyen de forma muy homogénea por todo el micelio.

Caracterización del complejo de β -caroteno presente en la estirpe S303FR

La diferencia en el color de los micelios de las variantes FA y FR de la estirpe S303 debe estar

motivada por diferencias en el estado en que se encuentra el β -caroteno, ya que éste es el único pigmento presente en ambas formas. La búsqueda de un posible compuesto soluble y coloreado en la variante FR resultó infructuosa.

Como primera aproximación a la caracterización del estado peculiar del β -caroteno en la variante FR, se obtuvo el espectro de absorción in vivo del micelio de esta estirpe, que se muestra en la Figura 8. En la misma figura, como comparación, se presenta el espectro de absorción in vivo de la estirpe C115, la cual contiene también niveles altos de pigmento pero un micelio es amarillo. La variante FA de S303 presenta un espectro in vivo idéntico al de C115 (resultado no mostrado).

El espectro de absorción in vivo de C115 se corresponde, aproximadamente, con el del β -caroteno purificado y emulsificado en solventes no orgánicos (ver Figura 10), mientras que el de S303FR presenta notables diferencias con aquél: se ha invertido la relación de altura entre los dos primeros máximos y aparece un nuevo máximo de absorción alrededor de los 538 nm. Sin duda, este máximo está relacionado con el tono rojo de la forma S303FR.

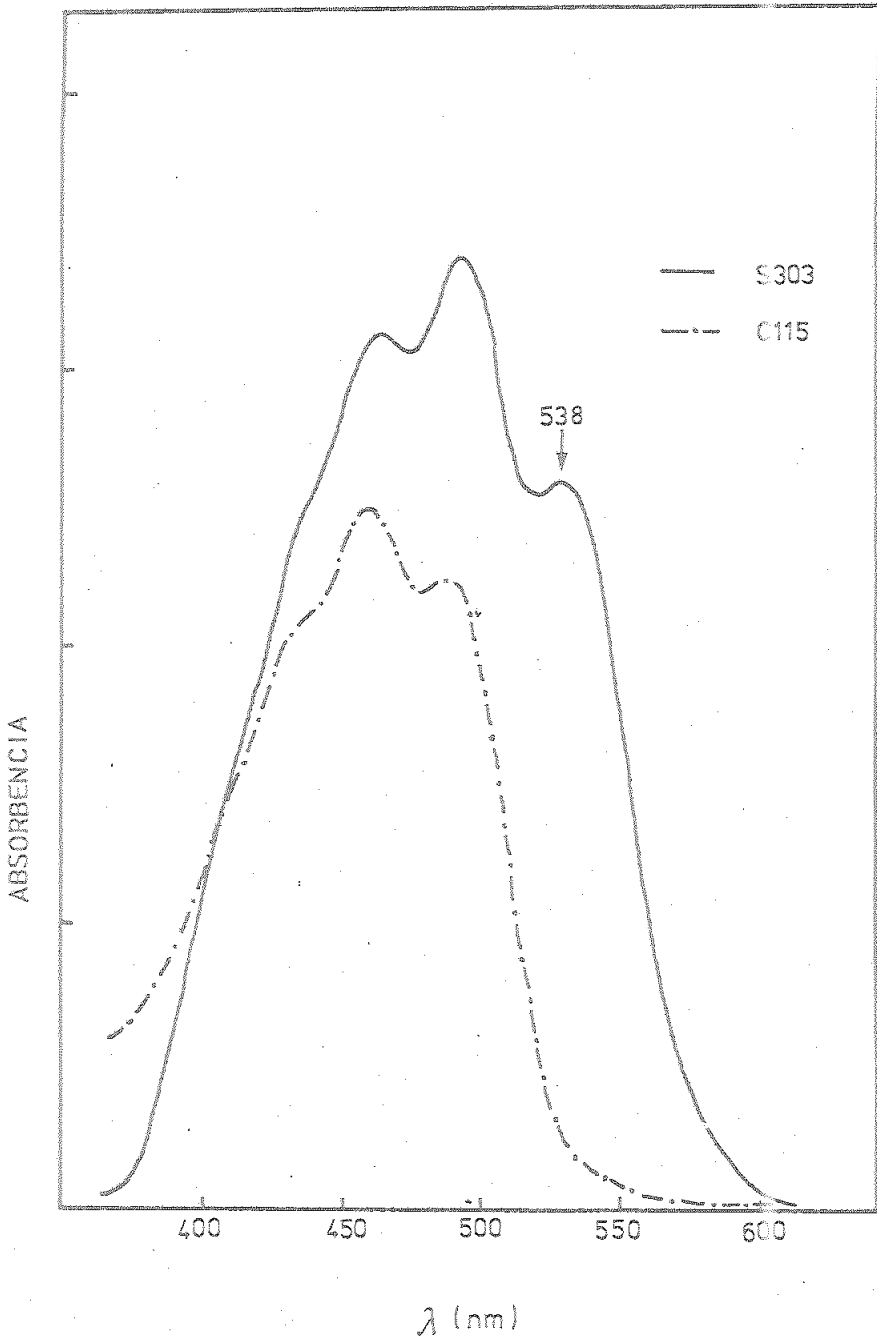


Figura 8. Espectros in vivo de S303FR y C115 después de cultivadas en medio SIVEL, durante 4 días y en la obscuridad. Los espectros se obtuvieron como se indica en Materiales y Métodos.

El desplazamiento aparente hacia el rojo del espectro de absorción del β -caroteno en S303FR podría explicarse por su interacción con proteínas. El mismo efecto se produce en otras asociaciones entre carotenos y proteínas y ha sido explicado por la acción directa de los grupos polares de estas últimas sobre los dobles enlaces conjugados de las cadenas poliénicas (ver Introducción de este trabajo).

El complejo de β -caroteno presente en S303FR es muy insoluble en agua. Las extracciones en medios acuosos de los micelios de esta estirpe dan lugar a una suspensión muy opaca, de color rojizo, que si es centrifugada a velocidad relativamente baja forma un precipitado del mismo color y un sobrenadante transparente y relativamente incoloro. Hay que hacer notar que en las extracciones acuosas del tipo silvestre, o de S303FA, la mayor parte del β -caroteno se deposita en una capa hidrofóbica, de color amarillo, sobre la superficie de la solución. Así pues, el β -caroteno de S303FR parece encontrarse asociado a algún material que le permite dispersarse homogéneamente en una solución acuosa, aunque no llegue a solubilizarse.

Una solubilización parcial del complejo de

β -caroteno se ha conseguido mediante el uso de detergentes y medios salinos de pH relativamente alto. Entre los detergentes usados, el deoxicolato de sodio resultó el más efectivo (Figura 9). A partir de las propiedades señaladas se desarrolló un protocolo "standard" de extracción y purificación parcial del complejo de β -caroteno, que es el siguiente:

Micelios de S303FR, de 3-4 días de crecimiento en medio SIVEL y completa oscuridad, se trituraron en un homogeneizador manual de vidrio con agua destilada y en frío. Después de una centrifugación a baja velocidad (5 min a 2000 x g) para eliminar los restos celulares, el complejo rojizo se precipitó por centrifugación (30 minutos a 30000 x g, 4°C) y se lavó varias veces con agua destilada mediante centrifugaciones sucesivas. Todas las proteínas solubles deben haberse eliminado con esta operación.

El precipitado rojizo ya lavado se resuspendió a continuación en una solución de Tris-HCl 0,1 M, pH 8,8, deoxicolato sódico al 1% y ClNa al 0,1%. Después de agitar fuertemente la suspensión se volvió a centrifugar durante 30 minutos a 30000 x g. Tras esta última centrifugación la mayor parte del complejo rojizo permanece en el sobrenadante. Sin embargo,

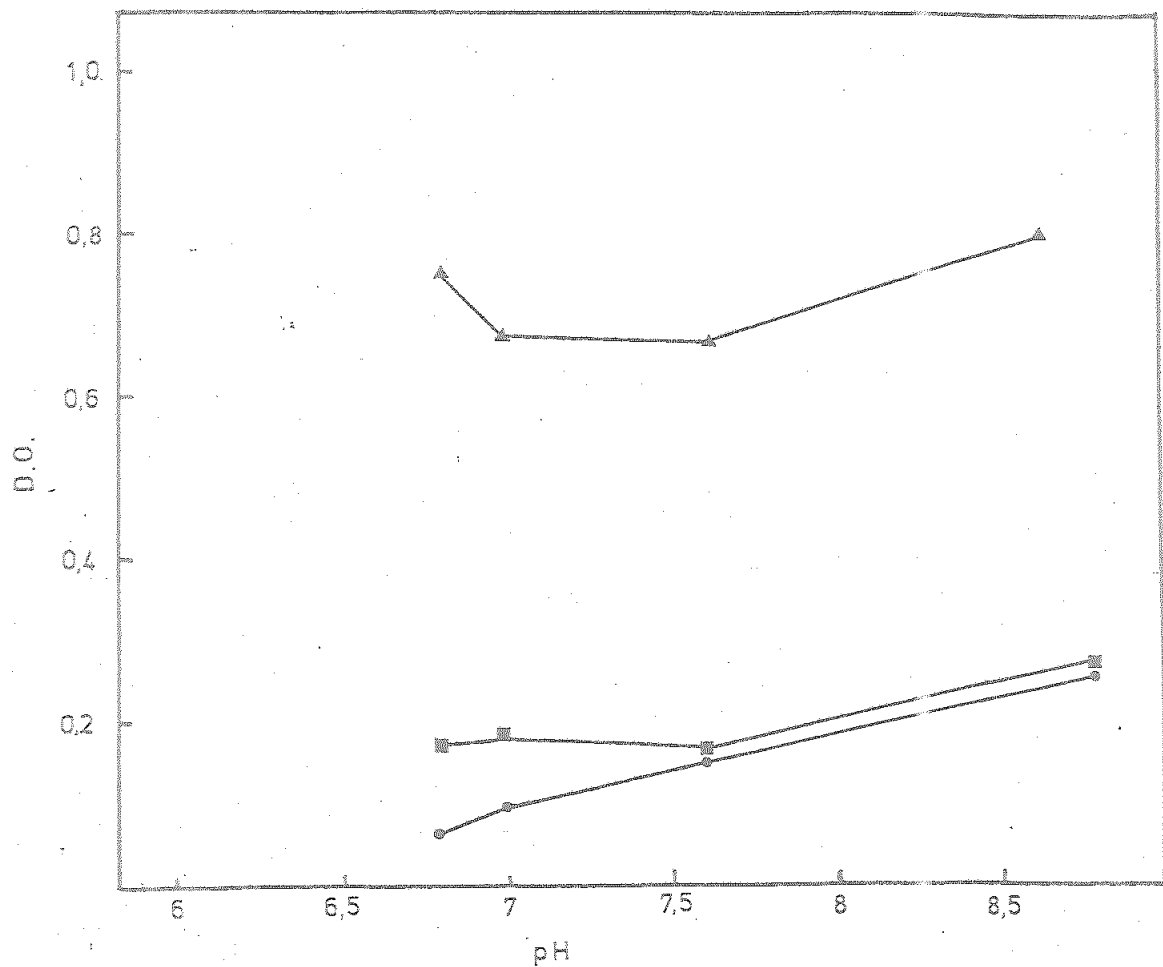


Figura 9. En cada caso 0,2 g de micelio liofilizado de S303FR se homogeneizaron en un mismo volumen de tampón Tris-HCl 0,1 M al pH indicado y que contenía el detergente correspondiente al 1%. Cada extracto se centrifugó durante 30 minutos a 30.000 x g y se determinó la D.O. del sobrenadante a 538 nm, que se indica en el eje de ordenadas. (▲) Deoxicolato de sodio; (■) SDS; (●) Triton X-100.

el complejo no debe considerarse solubilizado, ya que precipita tras centrifugación a 100.000 x g durante 90 min. Como vamos a ver posteriormente la suspensión así obtenida resulta adecuada para algunos experimentos, tales como obtención de espectros de absorción con poca dispersión de luz, tratamientos bioquímicos, determinaciones cuantitativas, etc.

La adición de acetona, en frío, hasta el 70% precipita el complejo rojizo, que puede recogerse por centrifugación (15 min a 30.000 x g) y volver a resuspenderse con facilidad en la solución de deoxicolato tras evaporación de la acetona. Si en vez de ello el precipitado del 70% de acetona se trata con éter de petróleo o acetona al 100% se libera rápidamente el β -caroteno y se forma un precipitado blanco grisáceo que responde positivamente a las pruebas de determinación de proteínas.

En la Figura 10 se presentan los espectros de absorción del complejo precipitado con acetona y resuspendido en deoxicolato y después del tratamiento con éter de petróleo así como el espectro del β -caroteno emulsificado en la solución de deoxicolato. Sorprendentemente, el espectro del complejo resulta

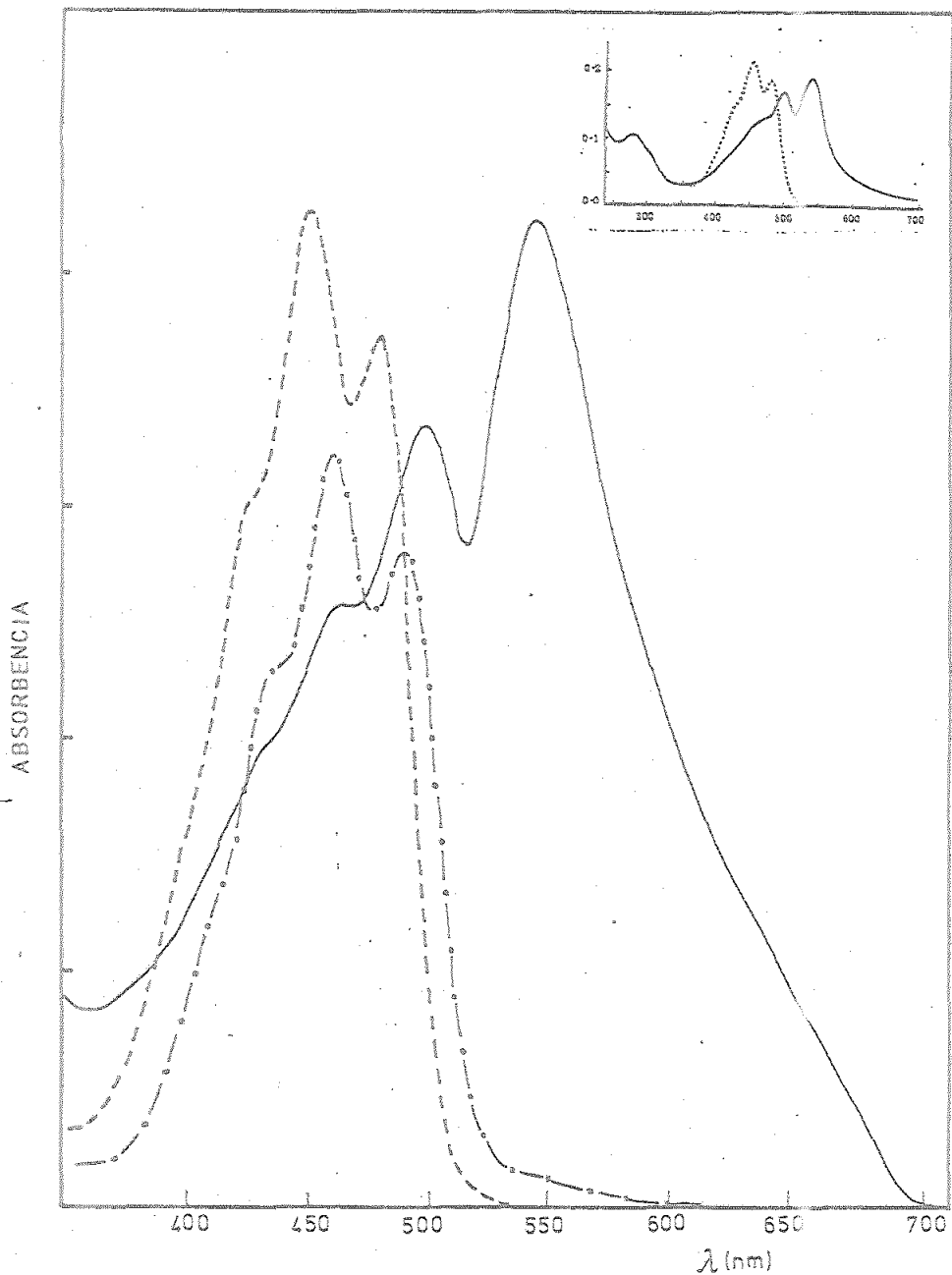


Figura 10. Espectro del complejo β -caroteno-proteína purificado como se describe en el texto (—), del mismo complejo tratado con éter de petróleo puro (----) y del β -caroteno emulsificado en solución acuosa (-.-.-). El recuadro reproduce los espectros de carotenoproteína y β -caroteno de plantas superiores (Nishimura y Takamatsu, 1957).

prácticamente idéntico al de la β -carotenoproteína descrita en cloroplastos de plantas superiores por Nishimura y Takamatsu (1957) y estudiada posteriormente por Ji et al. (1968) Vernon et al. (1969), entre otros (ver recuadro, Figura 10). La similitud alcanza también a las propiedades descritas: insolubilidad en agua, solubilización parcial con detergentes en medio salino y pH alto, concentración de acetona necesaria para su precipitación y liberación rápida del β -caroteno por acetona y otros solventes orgánicos. Esta fácil disociación del β -caroteno ha sido considerada como prueba de que la interacción caroteno-proteína no implica enlaces covalentes.

El máximo de absorción a 538 nm del complejo aislado de S303FR (Figura 10) coincide con el que se aprecia en el espectro in vivo de dicha estirpe (Figura 8). No es verosímil, por tanto, que el complejo obtenido in vitro resulte de algún artefacto de la extracción. Las diferencias entre los espectros de las Figuras 8 y 10 pueden explicarse por la presencia in vivo de una cierta fracción de β -caroteno libre o como resultado de alguna modificación del complejo por el procedimiento de extracción.

El complejo carotenoproteínico de S303FR es enteramente soluble en una mezcla de cloroformo-

metanol (2:1). Si el precipitado del 70% de acetona se trata con esa mezcla se libera el β -caroteno (el espectro de absorción coincide con el del β -caroteno libre) pero sin que aparezca el precipitado proteínico blanco grisáceo. Ello podría ser prueba de la presencia de lipoproteínas como es el caso de la carotenoproteína de plantas superiores (Nishimura y Takamatsu, 1957).

Si a la solución de cloroformo-metanol le añadimos un 10% de la solución de deoxicolato y evaporamos lentamente los solventes orgánicos, se consigue una reconstrucción parcial del complejo, con la aparición del máximo de absorción a 538 nm (Figura 11). Aunque la reconstrucción se produce con eficacia baja, demuestra que el factor que se acompleja con el β -caroteno está presente en forma soluble en la mezcla cloroformo-metanol.

Si evaporamos totalmente la solución en cloroformo-metanol y se elimina el β -caroteno con acetona pura, permanece una fracción insoluble que responde positivamente en el ensayo de determinación de proteínas. En la Tabla 11 puede observarse que la estirpe S303FR contiene un nivel más alto de proteínas solubles en cloroformo-metanol que la estirpe silvestre. Ello sugiere que la formación del complejo de β -

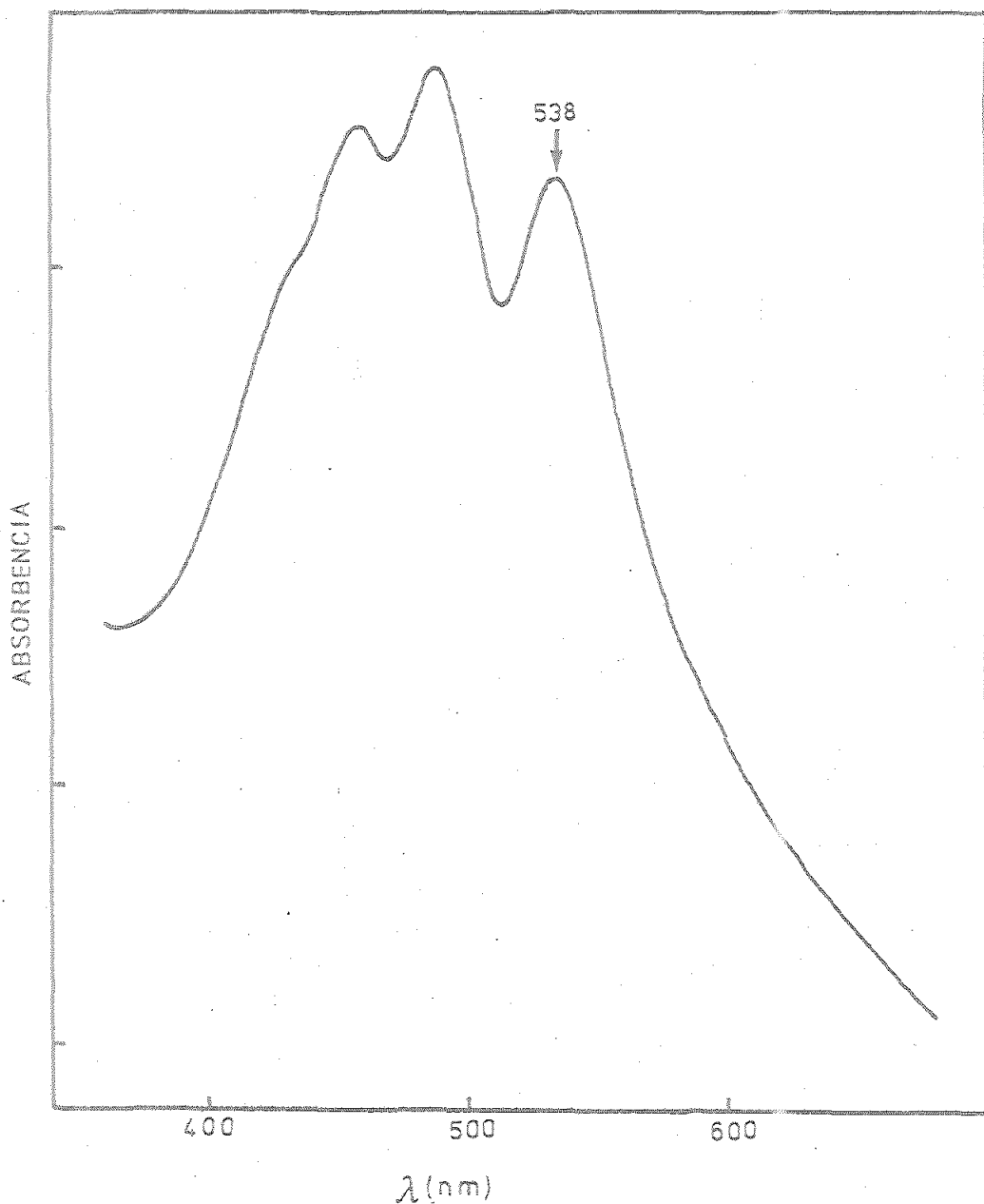


Figura 11. Reconstrucción parcial de la carotenoproteína. Se extrajo un micelio de S303FR con 10 ml de cloroformo/metanol (2:1), se le añadió 1 ml de solución con deoxicolato y se evaporó la solución lentamente a 40°C. La solución libre de solventes orgánicos se precipitó con 70% de acetona y el precipitado se resuspendió de nuevo con deoxicolato para registrar su espectro.

TABLA 11

COMPARACIÓN DE PROTEÍNAS SOLUBLES EN CLOROFORMO
METANOL DE DEL Y S303R

Estirpe	ug prot/ml	ug prot./mg m s
Del	180	2,20
S303R	320	3,34

Micelios liofilizados de ambas estirpes se extrajeron con cloroformo/metanol (2:1). El sobrenadante de la centrifugación del extracto durante 30 min a 30.000 x g se evaporó y el residuo resultante se resuspendió en Tris-HCl 0,1 M, pH 8,8 y deoxicolato (0,1%). La cantidad de proteína presente en esta suspensión se determinó por el método de Markwell et al. (ver Materiales y Métodos).

caroteno en S303FR está relacionado con la superproducción de alguna o algunas proteínas fuertemente hidrofóbicas que se enlazan específicamente con el pigmento.

Se ha intentado, sin resultado positivo, separar las proteínas componentes del complejo mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS o urea. En ambos casos, al revelar los geles mediante tinción específica de proteínas se detectó sólo una intensa banda en el origen. Es posible que la presencia de lípidos unidos a la(s) proteína(s) impida su solubilidad y penetración en el gel.

Un factor que afecta al complejo β -caroteno-proteína de S303FR es la temperatura. En la Figura 12 se muestra la cinética de liberación del β -caroteno de la carotenoproteína, medida por el incremento de la D.O. a 450 nm, con el tratamiento por calor y tanto en presencia como en ausencia de deoxicolato de sodio. Cuando el detergente no está presente, la temperatura no tiene efecto mientras que, si el complejo se encuentra disuelto por el deoxicolato hay una liberación efectiva del β -caroteno en pocos minutos. La ineficacia del calentamiento en ausencia de deoxicolato puede indicar un efecto protector cuando el complejo forma parte de agregados mayores.

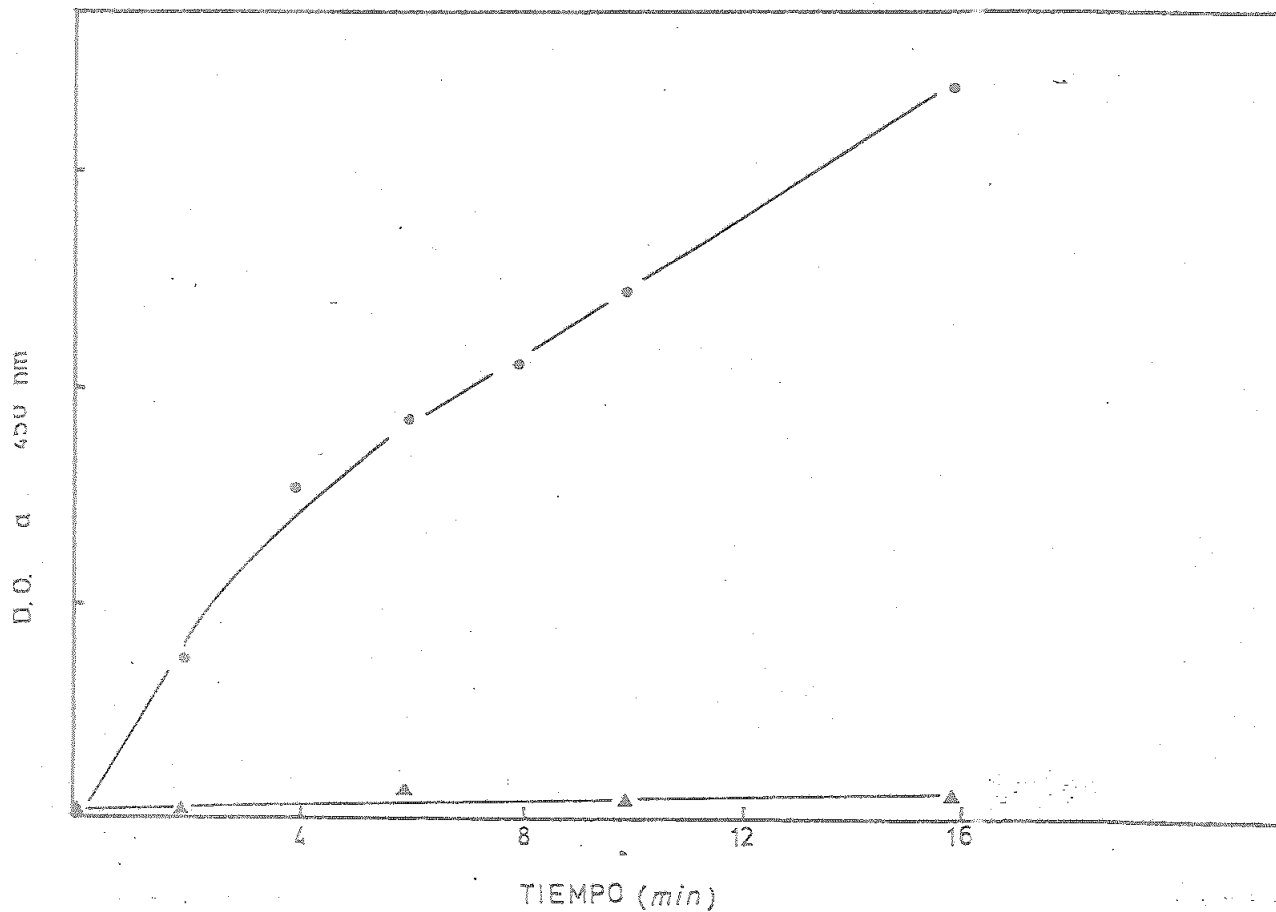


Figura 12. Efecto de la temperatura sobre una suspensión de carotenoproteína en tampón Tris-HCl suplementado (●) o no (▲) con 1% de deoxicolato de sodio. En abscisa se indica el tiempo de tratamiento a 100°C.

El efecto del calentamiento se puede observar también in vivo. Como se aprecia en la Figura 13, tras hervir una muestra de micelio de S303FR durante 15 minutos, hay un decrecimiento de la absorción en la zona del espectro correspondiente a la caroteno-proteína y un aumento en la zona de absorción del β -caroteno libre. Se puede decir, por tanto, que el calor descompone el complejo, aunque hay que hacer notar que la temperatura requerida es relativamente alta.

Hidrólisis enzimática del complejo de β -caroteno

Como caracterización adicional del complejo de β -caroteno presente en la estirpe S303FR, se estudió su sensibilidad a algunas enzimas hidrolíticas. Se utilizó para ello el precipitado de acetona al 70% resuspendido en la solución de deoxicolato que se describe en el apartado anterior. Para el tratamiento con proteasa se utilizó una concentración de proteínasa de Streptomyces griseus de 0.57 mg/ml, a 37°C. En la Figura 14 se muestra el resultado de este tratamiento después de 1 hora y 16 horas de incubación. Puede apreciarse un claro incremento con el tiempo de tratamiento de la densidad óptica a la longitud de onda correspondiente al β -caroteno libre y un decrecimiento paralelo de la densidad óptica correspondiente a los 538 nm. Ello confirma

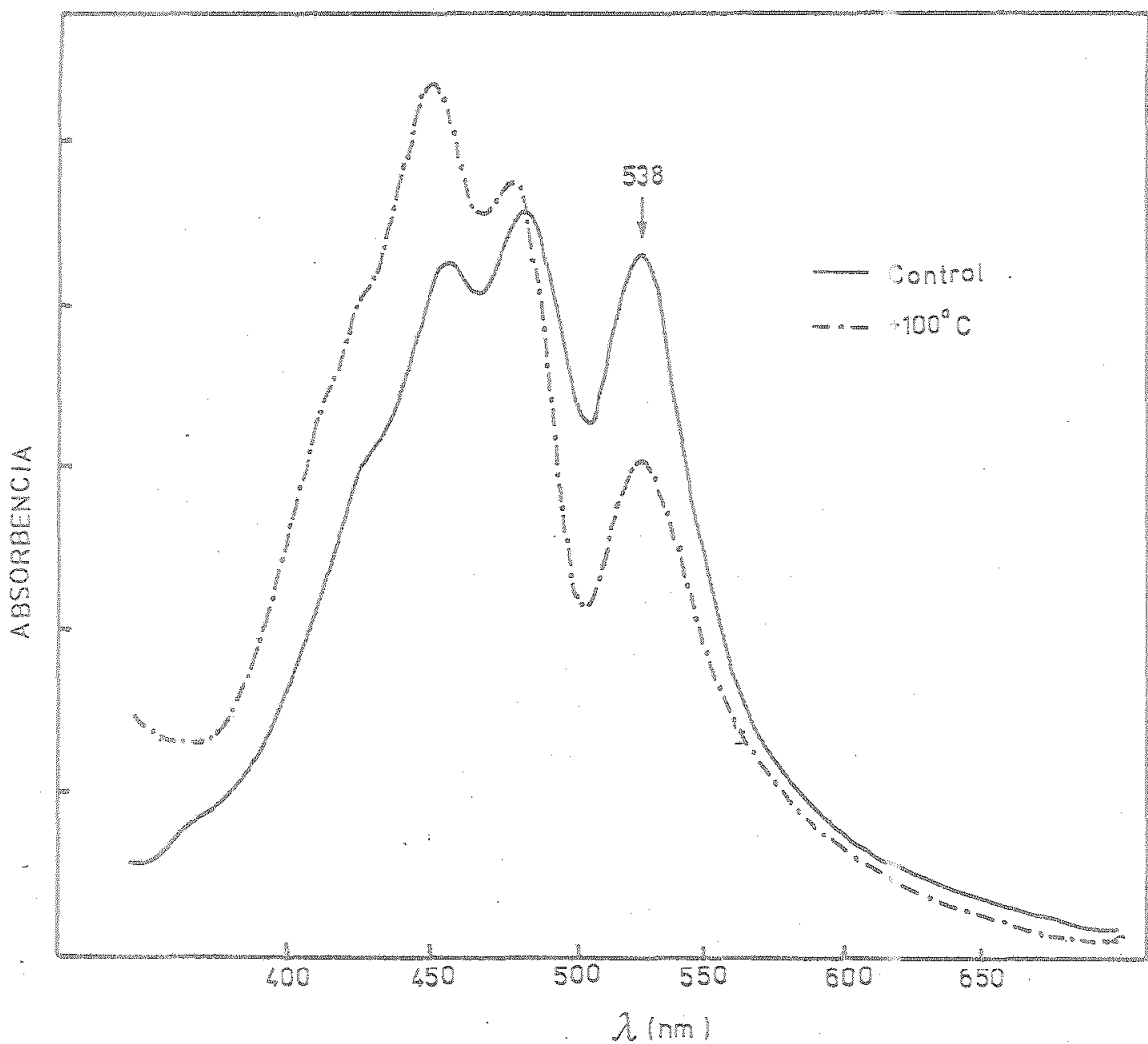


Figura 13. Espectros in vivo de micelios de S303FR hervidos o no durante 15 minutos a 100°C.

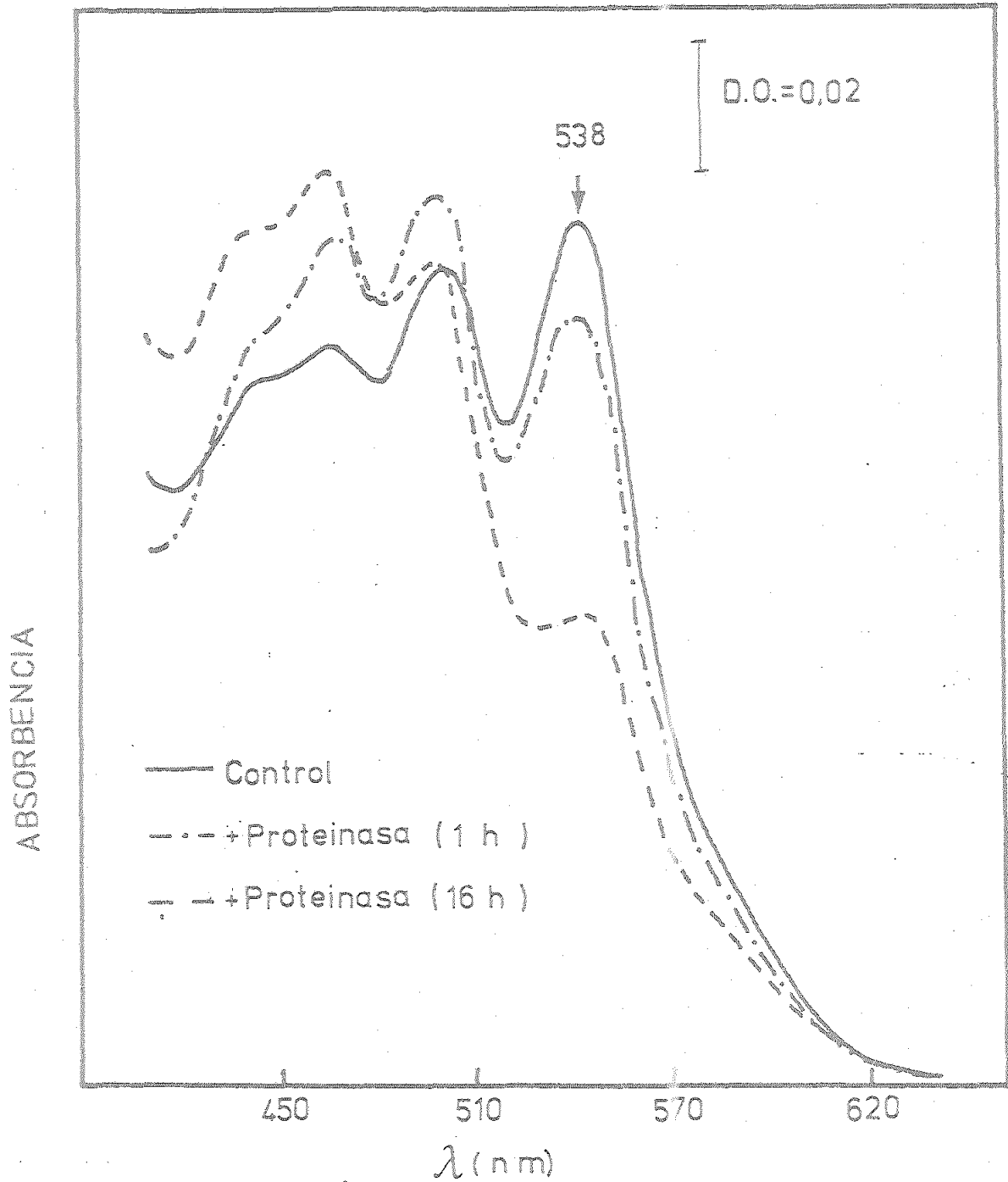


Figura 14. Espectro de una solución de carotenoproteína tras el tratamiento con proteinasa de Streptomyces griseus.

que el β -caroteno se mantiene en el complejo por la presencia en el mismo de una proteína.

En la Tabla 12 se muestra el efecto sobre el complejo de β -caroteno de la fosfolipasa A₂ y, como comparación, el de la proteasa de Streptomyces griseus. Como se puede apreciar, también la acción de la fosfolipasa provoca la liberación de β -caroteno del complejo, aunque con menor eficacia que la proteasa indicada.

Se ha estudiado también el efecto de la lipasa pancreática de cerdo sobre el complejo, sin resultado positivo alguno.

A partir de los datos anteriores se puede concluir que el complejo está formado por la asociación de β -caroteno y proteína y se sugiere que esta asociación está mediada por fosfolípidos, cuyo carácter anfótero podría servir de enlace entre la proteína y el β -caroteno. En la mayoría de las carotenoproteínas de los crustáceos el componente lipídico consiste fundamentalmente en fosfolípidos (Zagalsky, 1976).

Efecto de la luz sobre la carotenoproteína

Los cultivos de la estirpe S303FR realizados

TABLA 12

COMPARACIÓN DEL EFECTO DE FOSFOLIPASA Y PROTEASA
SOBRE LA CAROTENOPROTEÍNA

Tratamiento	DO ₅₃₈ /DO ₄₅₀
CONTROL	1,24
+ FOSFOLIPASA	1,01
+ PROTEASA	0,42

El tratamiento de fosfolipasa de A (200 μ g/ml) se realizó durante 20 horas. Los datos de la proteasa están tomados de la Figura 14.

en presencia de luz dan lugar a micelios de color amarillo indistinguibles de micelios de S303FA crecidos tanto a la luz como en la oscuridad. En la Figura 15 se muestran los espectros de absorción in vivo de la estirpe S303FR cultivada en la luz o en la oscuridad. Se puede apreciar que en el cultivo realizado en la luz el pico de absorción correspondiente a la carotenoproteína ha desaparecido completamente.

Así pues, la luz parece inhibir fuertemente la formación de la carotenoproteína. Como comprobación se extrajeron micelios de S303FR cultivados en la luz y en la oscuridad, usando el procedimiento de purificación parcial de la carotenoproteína. En los micelios iluminados apenas pudo detectarse la presencia del complejo, aun cuando la concentración de β -caroteno fue similar a la de los micelios cultivados en la oscuridad (Tabla 13).

Si se compara el espectro del β -caroteno extraído de la estirpe S303FR incubada en la luz o en la oscuridad (Figura 16) se comprueba que son ligeramente diferentes. Esta diferencia consiste en una pequeña variación en la relación de absorción de los máximos y, sobre todo, en la presencia de un pequeño pico de absorción alrededor de los 340 nm en el caso del cultivo iluminado. Esta absorción

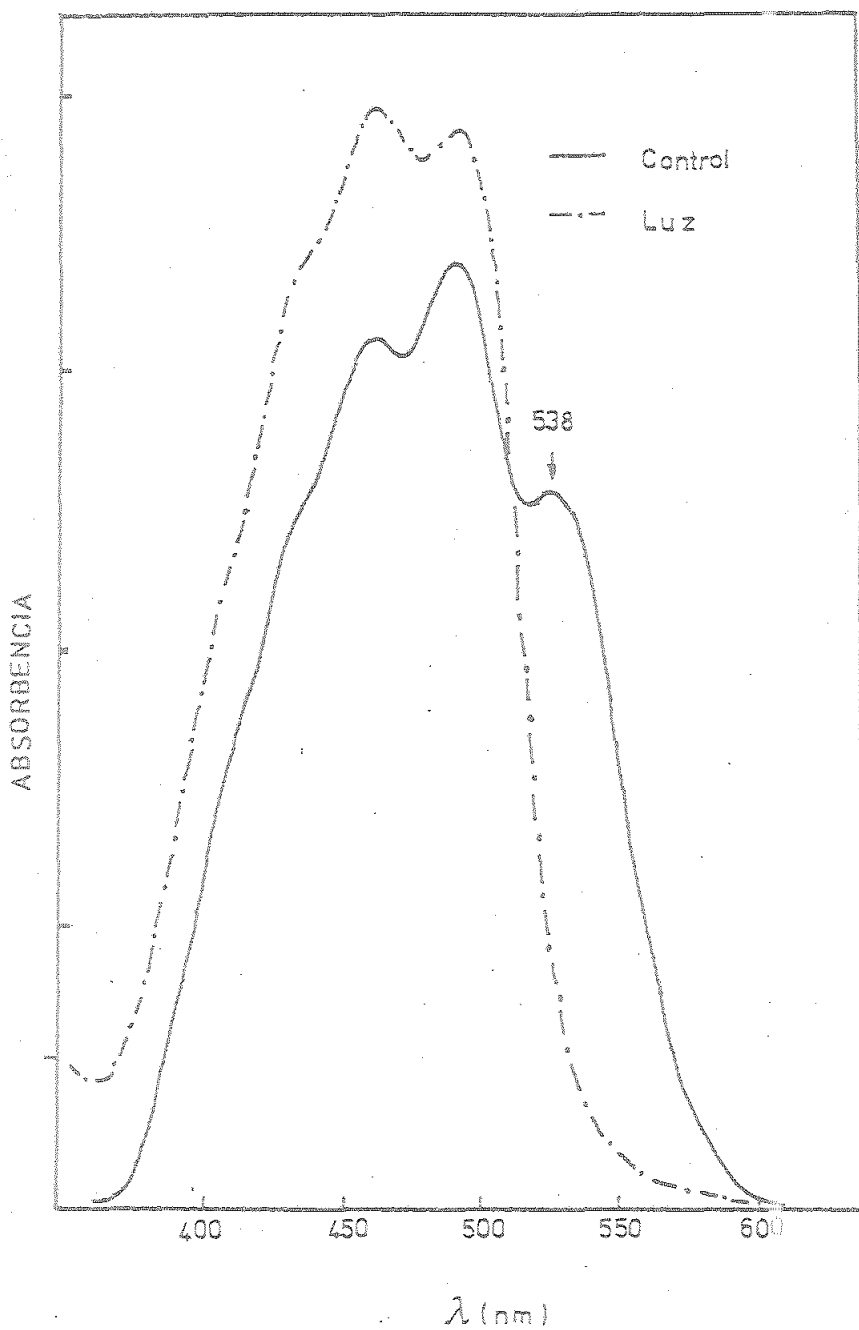


Figura 15. Espectros in vivo de micelios de la estirpe S303FR cultivados a la luz o en oscuridad (ver Materiales y Métodos).

TABLA 13

EFECTO DE LA LUZ Y LA VITAMINA A SOBRE EL CAROTENO
Y LA CAROTENOPROTEÍNA ACUMULADOS POR S303

	Factor DO ₅₃₈ / g m s mg	scar/ g m s	DO ₅₃₈ / μ g scaroteno
OSCURIDAD	34,50	4,9	6,94
LUZ	0,03	4,5	0,01
VITAMINA A	0,18	5,0	0,03

Para la extracción del β -caroteno y de la caroteno-proteína consultar Materiales y Métodos y el texto. La concentración de retinol empleada fue de 250 μ g/ml.

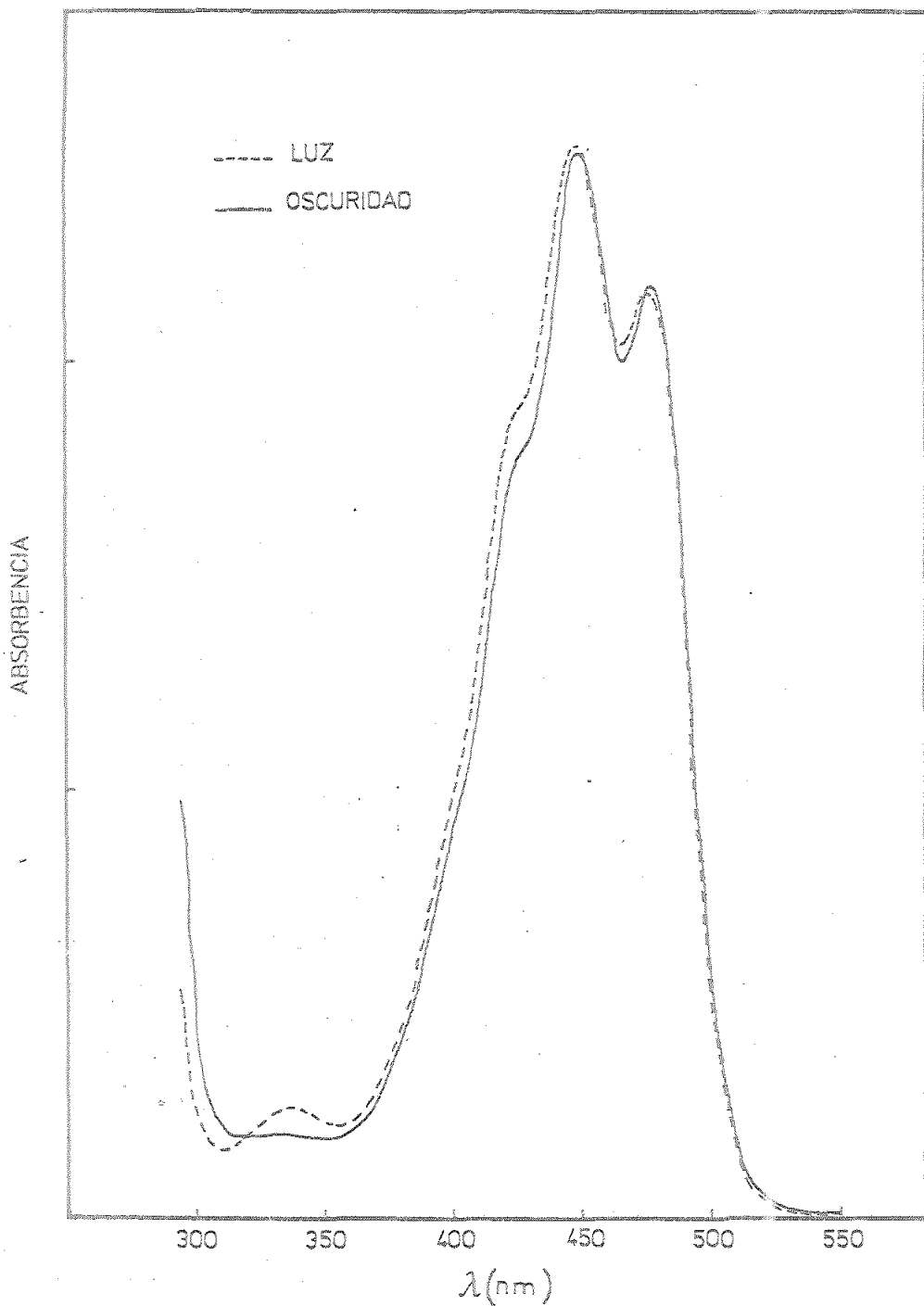


Figura 16. Espectro del β -caroteno extraído de micelios de S303FR cultivados a la luz o en la oscuridad.

en la zona ultravioleta cercana es característica de los isómeros cis del β -caroteno (Goodwin, 1981).

El resultado anterior puede dar pie a una hipótesis para explicar el efecto de la luz en la formación de caroteno-proteína. Sólo la forma isomérica trans del β -caroteno puede unirse a la proteína y su isomerización, mediada por la luz, impide que el pigmento se una al complejo. Un precedente de este tipo de comportamiento es el de los fotorreceptores de la visión. La rodopsina se compone de una proteína, la opsina, que se une sólo a una forma isomérica del retinal; la luz al fotoisomerizar este compuesto, hace que se separe de la proteína determinando así el comienzo de los procesos que desencadenan la fotorrecepción (Wald y Hubbard, 1960). No obstante, hay que señalar que en nuestro caso, la proporción de β -caroteno isomerizado por la luz parece baja, dada la pequeña absorción que se detecta a 340 nm.

Efecto del retinol sobre la carotenoproteína

La presencia de retinol en los medios de cultivo incrementa la síntesis de carotenos en la estirpe silvestre y en varios mutantes de la carotenogénesis de Phycomyces (Eslava et al., 1974). Resultaba, por ello, interesante estudiar su posible efecto

sobre la acumulación de carotenoproteína en la estirpe S303FR. Como puede observarse en la Figura 17, la presencia de acetato de retinol en el medio de cultivo inhibe la aparición del fenotipo rojo en la estirpe S303FR incubada en la oscuridad. El efecto del retinol es, por tanto, similar al de la luz, que se muestra también en la figura indicada, como comparación.

Los espectros in vivo del experimento comentado en el párrafo anterior se muestran en la Figura 18, donde se puede comprobar la desaparición casi total del pico de absorción a 538 nm en el caso del micelio cultivado en presencia de la vitamina. Como puede comprobarse en la Figura 19, el grado de inhibición de la formación del complejo es proporcional a la concentración de retinol utilizada. En la misma figura se representa el efecto del retinol sobre la acumulación de β -caroteno por la estirpe silvestre, comprobándose que ambas curvas de dosis-respuesta son muy similares. En particular la saturación de ambos efectos se alcanza a la misma concentración de retinol.

Una hipótesis para explicar el efecto del acetato del retinol sobre la carotenoproteína sería suponer que el inhibidor compite con el β -caroteno por el



Figura 17. Aspecto de los micelios de la estirpe S303FR cultivados durante 4 días en oscuridad, a la luz o en oscuridad y presencia de 200 $\mu\text{g/ml}$ de retinol.

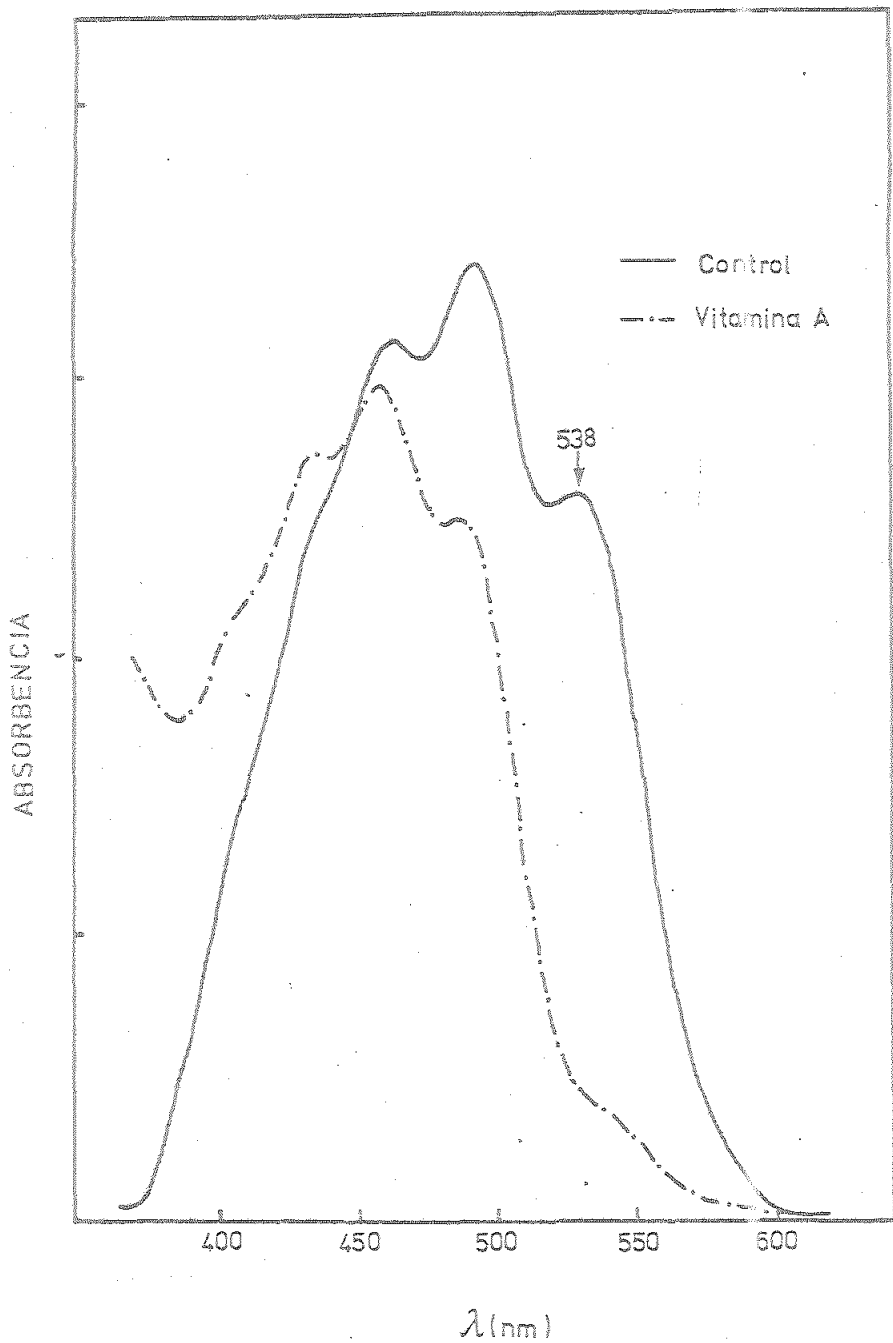


Figura 18. Espectros in vivo de micelios de la estirpe S303FR cultivados durante 4 días en la oscuridad y en ausencia o presencia de retinol (250 ug/ml).

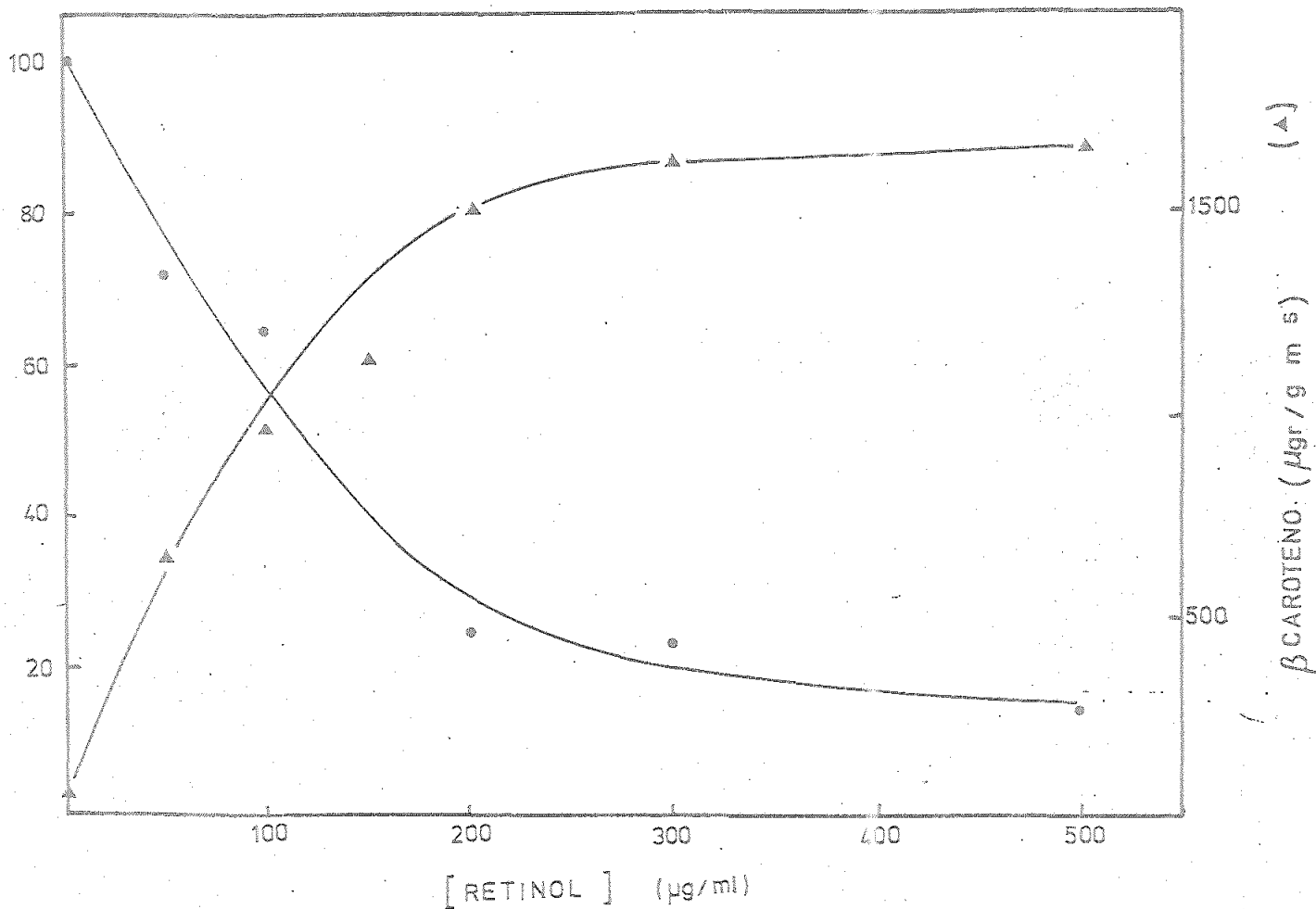


Figura 19. Curva dosis-respuesta del efecto del retinol sobre la acumulación de carotenoproteína en la estirpe S303FR (●) y sobre la acumulación de β -caroteno por la estirpe silvestre (▲). Para el efecto del retinol sobre la carotenoproteína, ésta se extrajo por el procedimiento standard y se utilizó en cada caso el cociente entre la D.O. a 538 y 450, considerando como 100% el valor de ese cociente en el control sin retinol.

lugar de interacción con la proteína, debido a la analogía estructural entre ambos compuestos.

Por otro lado, se ha estudiado la inhibición en la formación de la caroteno-proteína por ciertos análogos del retinol. En la Tabla 14 se muestran las fórmulas de los distintos compuestos utilizados y en la Tabla 15 el efecto de los mismos sobre la producción del complejo. Como se puede apreciar, hay algunos análogos que, de manera similar al acetato del retinol, inhiben drásticamente la formación de carotenoproteína, mientras que otros análogos no presentan efectos significativos. Con la excepción del compuesto indicado con el número 8 en la Tabla 14, todos los análogos que inhiben la formación de la carotenoproteína estimulan la síntesis de β -caroteno en la estirpe silvestre, mientras que los que no inhiben la formación del complejo tampoco estimulan la carotenogénesis (Parra y Murillo, 1982). Hay que señalar que el compuesto número 8 inhibe drásticamente la síntesis de β -caroteno (Parra y Murillo, 1982) y, por tanto, su acción inhibidora sobre la formación de caroteno-proteína puede ser un efecto indirecto.

El conjunto de estos datos sugiere que ambos efectos del retinol, estimulación de la caroteno-

TABLA 14

ESTRUCTURA DEL RETINOL Y SUS ANÁLOGOS

MENCIONADOS EN LA TABLA 15

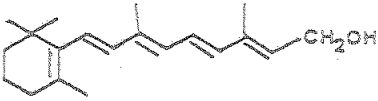
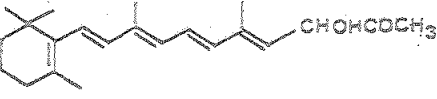
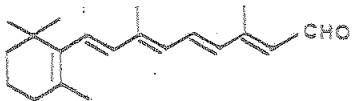
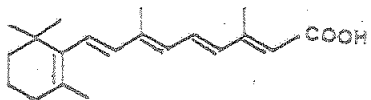
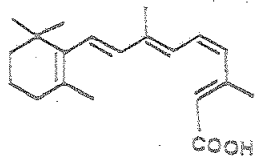
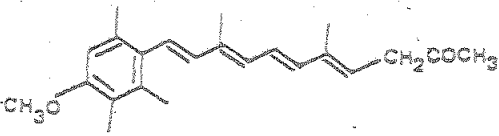
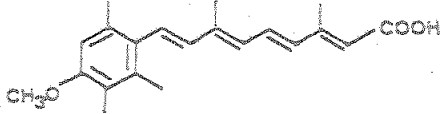
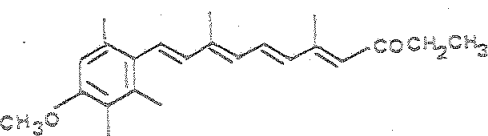
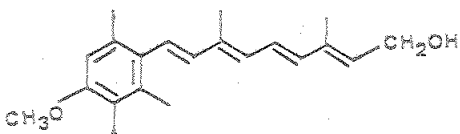
nº Compuesto	Fórmula	Nombre
1		Retinol
2		Acetato de Retinol
3		Retinal
4		Ácido Retinoico (trans)
5		Ácido Retinoico (13-cis)
6		Eter Metílico del 9-(4-metoxi-2,3,6,-trimetilfenil)-3,7-2,4,6,8-nonatetraenol
7		Ácido 9-(4-Metoxi-2,3,6-trimetilfenil)-3,7-dimetil-2,4,6,8-nona-tetraenoico
8		9-(4-Metoxi-2,3,6-trimetilfenil)-3,7-dimetil-2,4,6,8-nonatetraenoato etílico
9		9-(4-metoxi-2,3,6-trimetilfenil)-3,7-dimetil-2,4,6,8-nonatetraenol

TABLA 15

EFFECTO DE LOS ANÁLOGOS DEL RETINOL
SOBRE LA CAROTENOPROTEÍNA

Compuesto añadido	x DO_{538}/DO_{450}	Valor relativo de x(en %)
CONTROL	0.71	100
1	0.02	3.3
2	0.02	3.4
3	0.03	4.8
4	0.70	98.6
5	0.59	84.5
6	0.60	85.5
7	0.69	97.1
8	0.01	1.7
9	0.66	94.0

Todos los análogos se añadieron a una concentración de 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y las placas se incubaron durante 4 días en oscuridad y en SIVEL. Los micelios se extrajeron con deoxicolato antes de hacer el espectro. El número del compuesto se refiere al adjudicado en la Tabla 14.

génesis e inhibición de la formación de caroteno-proteína, implican el mismo mecanismo de acción. El análisis de los análogos que resultan o no activos, sugiere un papel relevante de la parte cíclica de la molécula en la inhibición de la producción de caroteno-proteína.

Hay que hacer notar que ninguno de los compuestos mencionados que estimulan la carotenogénesis en el tipo silvestre tienen efectos significativos sobre la producción de β -caroteno por la estirpe S303. Esta parece, pues, constitutiva para el efecto del retinol y sus análogos. Ello podría estar relacionado con la mutación carS presente en S303, aunque otros mutantes carS descritos hasta ahora son sensibles al efecto estimulador del retinol (Murillo y Cerdá-Olmedo, 1976).

Posibles complejos con otros carotenos

Dada la existencia de mutantes que acumulan otros carotenos distintos del β -caroteno, nos propusimos la identificación de posibles complejos de caroteno-proteína en algunos de ellos, en particular los mutantes afectados en el gen carR.

Se hizo el espectro in vivo de siete mutantes

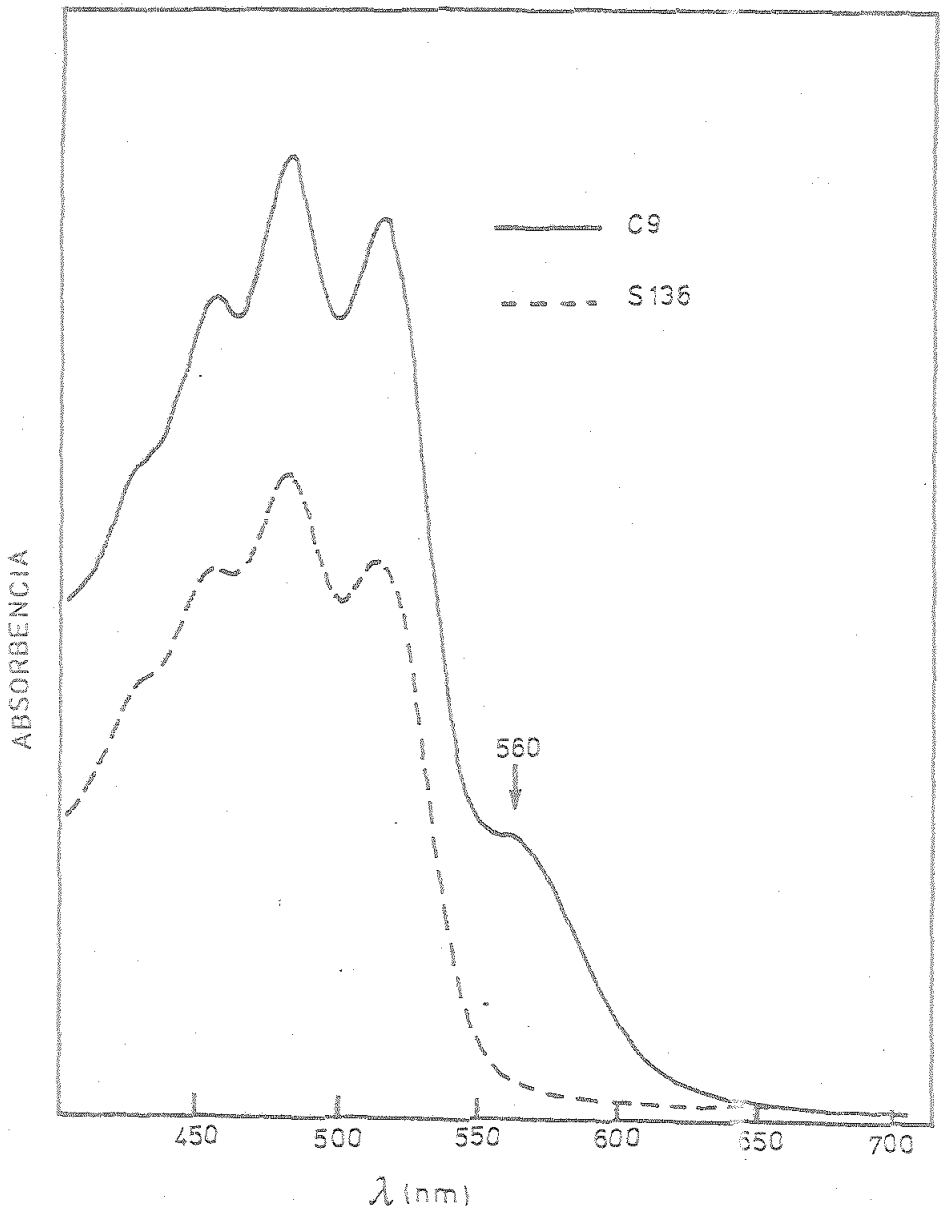


Figura 20. Espectros in vivo de micelios de las estirpes C9 y S136, cultivados durante 4 días en medio SIVEL y en la oscuridad.

Los espectros se realizaron como se indica en Materiales y Métodos.

carR (C9, C11, C12, C13, S13, S136, S239) cultivados en la oscuridad. El resultado fue que la mayoría de ellos presentaban un espectro en el que se identifican los picos típicos del licopeno emulsificado en medio acuoso y un nuevo pico a 560 nm. Como ejemplo, se muestra en la Figura 20 el espectro correspondiente a la estirpe C9. Cuando se extraen los carotenos de C9 la mayor parte es licopeno, existiendo sólo pequeñísimas cantidades de otros carotenos, aunque ninguno con absorbancia a 560 nm. De todas las estirpes carR mencionadas, sólo S136, que presenta una mutación carR rezumante, carece de absorbancia a 560 nm (Figura 20).

Estos datos parecen indicar que en las estirpes que acumulan licopeno, éste no está presente en su totalidad en forma libre, pudiendo encontrarse una cierta fracción en forma de complejo licopeno-proteínico.

Se ha estudiado el efecto de la luz y el retinol en la aparición del máximo de absorción a 560 nm. Como se muestra en la Tabla 16, el efecto de ambos factores es mucho menor que en el caso de la β -caroteno-proteína, aunque el posible complejo del licopeno también se ve afectado, tanto por el acetato del

TABLA 16

EFFECTO DE LA LUZ Y EL RETINOL SOBRE
LA ABSORCIÓN A 560 nm DE LA ESTIRPE C9

Factor	DO ₄₉₀ /DO ₅₆₀
OSCURIDAD	2,46
LUZ	4,68
VITAMINA A	3,28

(Retinol) = 250 g/ml. Los cultivos estuvieron 4 días a 22°C en SIVEL. Al final de la incubación se hizo el espectro in vivo a cada cultivo.

retinol como por la luz, siendo éste último efecto el más pronunciado.

Comentario general sobre la carotenoproteína de Phycomyces

Las propiedades del complejo de β -caroteno descrito en esta Tesis son las mismas que las del complejo aislado previamente en plantas superiores (Ke, 1971). Es probable, por tanto, que ambos complejos sean de la misma naturaleza.

En el caso de las plantas, algunos autores han puesto en duda la naturaleza carotenoproteínica del complejo, aludiendo a la posibilidad de artefactos durante las extracciones o incluso negando la presencia de proteínas en el mismo (McEvoy y Lynn, 1973; Zagalsky, 1976). Nuestros datos demuestran inequívocamente que el complejo de β -caroteno de Phycomyces no es un artefacto producido por el método de extracción y revelan, además, el importante papel de las proteínas en la propiedad más característica del complejo, como es el desplazamiento en el espectro de absorción del β -caroteno.

La carotenoproteína identificada en este trabajo es la primera descrita en un hongo, según nuestras

referencias (Britton et al., 1982). Hay que hacer notar, sin embargo, que ha sido descubierta en estirpes mutantes de Phycomyces, sin que hayamos podido detectar su presencia en el tipo silvestre. Este hecho plantea algunas dudas sobre sus posibles implicaciones funcionales. Cabe, sin embargo, la posibilidad de que la carotenoproteína esté también presente en el tipo silvestre, pero en cantidades indetectables.

Hay que destacar que tanto la luz como el retinol, factores ambos que estimulan la carotenogénesis en el tipo silvestre de Phycomyces, afectan a la producción de carotenoproteína en la estirpe S303FR. Ello podría indicar que la carotenoproteína participa en el mecanismo de regulación de la biosíntesis de β -caroteno. Alternativamente, la inhibición del complejo podría ser otro efecto de la luz y el retinol no relacionado directamente con la acción reguladora de ambos agentes.

BIBLIOGRAFÍA

- ARAGÓN, C.G.; MURILLO, F.J.; DE LA GUARDIA, M.D. y CERDÁ-OLMEDO, E. (1976). *Eur. J. Biochem.*, 63: 71.
- ARLETT, C.F. (1957). *Nature*, 179: 1250.
- ARLETT, C.F.; GRINDLE, M. y JINKS, S.L. (1962). *Heredity*, 17: 197.
- BARKSDALE, A.W. (1969). *Science*, 166: 831.
- BATRA, P.P. (1971). *Photophysiol.*, 6: 47.
- BATRA, P.P.; GLASON, R.M.J. y LOUDN. J.W. (1973) *Phytochemistry*, 12: 1309.
- BERGMAN, K.; ESLAVA, A.P. y CERDÁ-OLMEDO, E. (1973). *Molec. Gen. Genet.*, 123, 1.
- BERKALOFF, C. (1977). *Plant Sci. Lett.*, 10: 45.
- BISHOP, N.I. (1962), Abst. FC-10, *Biophys. Soc. Meeting*, Washington D.C.
- BLANC, P.L.; TUVENSON, R.W. y SARGENT, M.L. (1976). *J. Bacteriol.*, 125: 616.
- BRAMLEY, P.M. (1973) Tesis doctoral, Universidad de Gales.
- BRAMLEY, P.M. y DAVIES, B.H. (1975). *Phytochemistry*, 14: 463.
- BRAMLEY, P.M.; DAVIES, B.H. y REES, A.F. (1974) en *Liquid Scintillation Counting*; Crock, M.A. & Johnson, P. eds; Heiden, London 33: 76.
- BRAMLEY, P.M.; THAN, A. y DAVIES, B.H. (1977). *Phytochemistry*, 16: 235.
- BRITTON, G. (1971) en *Aspects of Terpenoid Chemistry and Biochemistry*; Goodwin, T.W. ed.; Academic Press, London, p. 255.

- BRITTON, G. (1976). *Pure Appl. Chem.* 47: 223.
- BRITTON, G.; ARMITT, G.M.; LAU, S.Y.M.; PATEL, A.K. y SHONE, C.C. (1982) en *Carotenoids Chemistry & Biochemistry*; Britton, G. & Goodwin, T.W. ed.; Perangon Press, p. 237.
- BUCHWALD, M. y JENCKS, W.P. (1968) *Biochemistry*, 7: 844.
- BULOCK, J.D. (1973). *Pure Appl. Chem.*, 34: 435.
- CAGLIOTI, L.; CAIMELLI, G.; CAMERINO, B.; MONDELLI, R., QUILICO, A.; SALVATORI, T. y SELVA, A. (1964) *Chim. Ind. Milano*, 46: 96.
- CANTINO, E.C. y HORENSTEIN, E.A. (1956) *Mycologia*, 48: 777.
- CECCALDI, H.J.; CHEESMAN, D.F. y ZAGALSKI, P. (1966) *C.R. Soc. Biol.* 160: 587.
- CERDÁ-OLMEDO, E. (1975) *Genet. Res. Camb.*, 25, p. 285.
- CERDÁ-OLMEDO, E. y TORRES-MARTÍNEZ, S. (1979). *Pure Appl. Chem.*, 51: 631.
- CHEESMAN, D.F. (1958). *Proc. R. Soc. B.*, 149: 571.
- CHEESMAN, D.F.; LEE, W.L. y ZAGALSKY, P.F. (1967). *Biol. Rev.*, 42: 131.
- CHEESMAN, D.F. y PREBBLE, J. (1966). *Comp. Biochem. Physiol.*, 17: 929.
- CHEESMAN, D.F.; ZAGALSKY, P.F. y CECCALDI, H.J. (1966). *Proc. R. Soc. B.*, 164: 130.
- CHU, F.S. y LILLY, V.G. (1969), *Mycologia*, 52: 80.
- CIEGLER, A.; PAZOLA, Z. y HALL, H.H. (1964) *Appl. Microbiol.*, 12: 150.

- CLARKE, I.E. y BRAMLEY, P.M. (1981). Abstracts del VI International Symposium on Carotenoids, Liverpool.
- CLARKE, I.E.; DE LA CONCHA, A.; MURILLO, F.J.; SANDMANN, G.; SKONE, E.J. y BRAMLEY, P.M. (1983). *Phytochemistry*, 22: 435.
- CLARKE, I.E.; SANDMANN, G. y BRAMLEY, P.M. (1981) Abst. del VI International Symposium on Carotenoids, Liverpool.
- COGGINS, C.W.; HENNING, G.L. y YOKOYAMA, H. (1970). *Science*, 168: 1580.
- COHEN, B.J.; SISTROM, W.R. y STANIER, R.Y. (1957). *Cell Comp. Physiol.*, 49: 25.
- CONJEAUD, H.; MICHEL-VILLAZ, M.; VERMEGLIO, A. y MATHIS, P. (1976), *FEBS Letters*, 71: 138.
- DAVIES, B.H. (1965) en *Chemistry & Biochemistry of Plants Pigments*; Goodwin, T.W. ed. Academic Press. London, p. 489.
- DAVIES, B.H. (1972) *Pure & Appl. Chem.*, 35: 1.
- DEFABO, E.C.; HARDING, R.W. & SHROPSHIRE, W. (1976) *Plant Physiol.*, 57: 440.
- DE LA GUARDIA, M.D.; ARAGÓN, C.G.; MURILLO, F.J. y CERDÁ-OLMEDO, E. (1971) *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, 68: 2012.
- DEMEREK, M.; ADELBERG, E.A.; CLARK, A.J. y HARTMAN, P.E. (1966). *Genetics*, 54: 61.
- DESAI, H.G.; DESAI, J.D. y MODI, V.V. (1973). *Ind. J. Microbiol.*, 13: 57.
- EHREMBURG, L. y DANIEL, A.F. (1962) *Acta Chem. Scand.*, 16: 259.

ELAHI, M.; CHICHESTER, C.O. y SIMPSON, K.L. (1973a). *Phytochemistry*, 12: 1627.

ELAHI, M.; LEE, T.H.; SIMPSON, K.L. y CHICHESTER, C.O., (1973b). *Phytochemistry*, 12: 1633.

ENGEL, B.G.; WURSCH, J. y ZIMMERMAN, H. (1953). *Helv. Chim. Acta*, 36: 1771.

ESLAVA, A.P. (1973). Tesis doctoral, Universidad de Valencia.

ESLAVA, A.P.; ALVAREZ, M.I. y CERDÁ-OLMEDO, E. (1974) *Eur. J. Biochem.*, 48: 617.

ESLAVA, A.P. y CERDÁ-OLMEDO, E. (1974). *Plant. Sci. Letters*, 2: 9.

ESLAVA, A.P.; ALVAREZ, M.I.; BURKE, P.V. y DELBRUCK, M. (1975a). *Genetics*, 80, p. 445.

ESLAVA, A.P.; ALVAREZ, M.I. y DELBRUCK, M. (1975b). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 72, p. 4076.

FEOFILOVA, E.P. y ARBUZOV, V.A. (1975). *Mikrobiol.* 44: 395.

FEOFILOVA, E.P. y BEKHTEREVA, M.N. (1976). *Mikrobiol.* 45: 169.

FEOFILOVA, E.P.; FATEEVA, T.V. y ARBUZOV, V.A. (1976). *Mikrobiol.* 45: 169.

FINCHAM, J.R.S.; DAY, P.R. y RADFORD, A. (1979). *Fungal Genetics*, Blackwell, Oxford.

FRANKE, W.W. y REAU, P. (1973). *Arch. Mikrobiol.* 90: 121.

FUTTERMAN, S. y HELLER, J. (1972). *J. Biol. Chem.*, 247: 5168.

GALLAND, P. y RUSSO, V.E.A. (1979). *Photochem. Photobiol.* 29: 1009.

GARTON, G.A.; GOODWIN, T.W. y LIJINSKI, W. (1951). *Biochem. J.* 48: 154.

- GOODDAY, G.W.; FAWCETT, P.; GREEN, D. Y SHAW, E. (1973). *J. Gen. Microbiol.* 74: 233.
- GOODDAY, G.W.; GREEN, D.; FAWCETT, P. y SHAW, E. (1974). *Arch. Mikrobiol.* 101: 145.
- GOODWIN, T.W. (1952). *Biochem. J.* 50: 550.
- GOODWIN, T.W. (1959). *Advan. Enzymol.* 21: 295.
- GOODWIN, T.W. (1965). *Chemistry & Biochemistry of Plant Pigments*, Goodwin, T.W. ed., Academic Press, New York.
- GOODWIN, T.W. (1971) en *Carotenoids*, Isler, O. ed., Birkhäuser Verlag, Basel & Stuttgart.
- GOODWIN, T.W. (1972). *Progress in Ind. Microbiol.* 11: 31.
- GOODWIN, T.W. (1980). *The Biochemistry of the Carotenoids. Vol. I, Plants*; Chapman & Hall, London & New York.
- GOODWIN, T.W.; GRIFFITHS, L.A. y MODI, V.V. (1956). *Biochem. J.* 60: 659.
- GOODWIN, T.W. y OSMAN, G.C. (1953). *Biochem. J.* 53: 541.
- GOVIND, N.S.; MEHTA, B.; SHARMA, M. Y MODI, V.V. (1981). *Phytochem.*, 20: 2483.
- GREGORNIS, D.E. y RILLING, H.C. (1974). *Biochemistry*, 13: 1538.
- GRUEN, H.E. (1959). *Plant Physiol.* 34: 158.
- HALBSGUTH, W. y RUDOLPH, H. (1959). *Arch. Mikrobiol.* 32: 296.
- HARDING, R.W. (1974). *Plant. Physiol.*, 54: 142.
- HEISENBERG, M. y CERDÁ-OLMEDO, E. (1968). *Molec. Gen. Genet.* 102: 187.

- HERBERT, R.; MAUDINAS, B. y VILLOUTREX, J. (1972). *Phytochemistry*, 11, 3461.
- HERRING, P.J. (1975). *Proc. 9th Europ. Marina Biol. Symp.* p. 299.
- HOWES, C.D. y BATRA, P.P. (1970). *Biochim. Biophys. Acta* 222, p. 174.
- HSU, W.J.; POLING, S.M. y YOKOYAMA, H. (1974). *Phytochemistry*, 13; 415.
- HSU, W.J.; YOKOYAMA, H. y COGGINS, C.W. (1972). *Phytochemistry*, 11, 2985.
- ISHII, R. (1954). *J. Ferment. Tech.*, 32: 297.
- ISLER, O. (1971). *Carotenoids*, Birkhäuser, Basel.
- JAYARAM, M.; PRESTI, D. y DELBRUCK, M. (1979). *Experimental Mycology*, 3: 42.
- JENCKS, N.P. y BUTEN, B. (1964). *Arch. Biochem. Biophys.* 107: 501.
- JI, T.H.; HESS, J.L. y BENSON, A.A. (1968). *Biochim. Biophys. Acta* 150: 676.
- JINKS, J.L. (1963) *En Methodology in Basic Genetics*; Burdette, W.J. ed.; Holden-Day Inc., San Francisco, p. 325.
- KAYMAN, E.P.; CHICHESTER, C.O. y SIMPSON, K.L. (1973). *Phytochemistry*, 13: 1123.
- KE, B. (1971). *Methods in Enzymology*, 23: 624.
- KLAUI, H. (1982) *en Carotenoid Chemistry & Biochemistry*; Britton, C. & Goodwin, T.W. ed.; Peragon Press, p. 309.
- KLEINING, H. (1974). *Arch. Mikrobiol.* 97: 217.
- KRINSKY, N.I. (1979). *Pure Appl. Chem.* 51: 649.

- KUSHWAHA, S.C.; KATES, M. y PORTER, J.W. (1976).
Can. J. Biochem. 54: 816.
- LEE, W.L. (1967). Ecology, 47: 930.
- LEE, W.L. (1977). Carotenoproteins in Animal
Coloration, Dowden, Hutchinson & Ross; Stroudsburg,
Pennsylvania.
- LEE, T.C.; RODRÍGUEZ, D.B.; KARASAWA, I.; LEE,
T.H.; SIMPSON, K.L. y CHICHESTER, C.O. (1975) Appl.
Mikrobiol. 30: 988.
- LEE, W.L. y ZAGALSKY, P.F. (1966) Biochem. J.,
101: 92.
- LÓPEZ-DÍAZ, I. y CERDÁ-OLMEDO, E. (1980). Planta,
150: 134.
- LOWRY, O.J.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L. y
RANDALL, R.J. (1951). J. Biol. Chem. 183: 265.
- MACKINNEY, G.; NAKAYAMA, T.; BUSS, C.D. y CHICHESTER,
C.O. (1952). J. Ann. Chem. Soc. 74: 5428.
- MARKWELL, M.A.K.; HAAS, S.M.; BIEBER, L.L. y
TOLBERT, N.E. (1978). Anal. Biochem. 87: 206.
- MARRS, B. (1982) en Carotenoid Chemistry and Bio-
chemistry, Goodwin, T.W. and Britton, eds.
Perangon Press, p. 273.
- MAUDINAS, B.; BUCHOLTZ, M.L.; PAPASTEPHANOU, C.;
KATIYA, S.S.; BRIEDIS, A.V. y PORTER, J.W. (1975):
Biochem. Biophys. Res. Commun. 66: 430.
- MATHIS, P. y SCHENCIL, C.C. (1982) en Carotenoid
Chemistry and Biochemistry; Goodwin, T.W. &
Britton, G. eds. Perangon Press, p. 339.
- MATHEW-ROTH, M.M. (1982) en Carotenoid Chemistry
and Biochemistry; Goodwin, T.W. & Britton, G. eds.
Perangon Press, p. 297.

- McDERMOTT, J.C.B.; BRITTON, G. y GOODWIN, T.W. (1975). *J. Gen. Microbiol.* 77: 161.
- McEVOY, F.A. y LYNN, W.S. (1973). *J. Biol. Chem.* 248: 4568.
- MEDINA, J.R. (1977). *Genet. Res. Camb.* 30: 211.
- MEISSNER, G. y DELBRUCK, M. (1968). *Plant Physiol.* 43: 1279.
- MITZKA-SCHNABEL, V. y RAU, W. (1981). *Phytochemistry*, 20: 63.
- MONOD, J.; CHANGEUX, J.P. y JACOB, F. (1963). *J. Molec. Biol.* 6: 306.
- MORRIS, S.A.C. y SUBDEN, R.E. (1974). *Mutation Research* 22: 105.
- MORTON, R.A. (1944). *Nature*, 153: 69.
- MURILLO, F.J. (1975). Tesis doctoral, Universidad de Sevilla.
- MURILLO, F.J. (1980). *Plant Sci. Letters* 17: 201.
- MURILLO, F.J. y CERDÁ-OLMEDO, E. (1976). *Mol. Gen. Genet.* 148: 19.
- MURILLO, F.J.; CALDERÓN, I.L.; LÓPEZ-DÍAZ, I. y CERDÁ-OLMEDO, E. (1978). *Appl. Environm. Microbiol.* 36: 639.
- MURILLO, F.J.; TORRES-MARTÍNEZ, S.; ARAGÓN, C.G. y CERDÁ-OLMEDO, E. (1981). *Eur. J. Biochem.* 119: 511.
- MUSCIO, F.; CARLSON, J.P.; KUEHL, I. y RILLING, H.C. (1974). *J. Biol. Chem.* 249: 3746.
- NAKAYAMA, T.; MACKINNEY, G. y PHAFF, H.J. (1954). *J. Microbiol. Serol.* 20: 217.
- NISHIMURA, M. y TAKAMATSU, K. (1957). *Nature* 180: 699.

- NISHIMURA, M. y TAKAMATSU, K. (1960). *Plant Cell Physiol.* 1: 305.
- OLSON, J.A. y KNIZLEY, H. (1962). *Arch. Biochem. Biophys.* 97: 138.
- OOTAKI, T. (1973). *Molec. Gen. Genet.* 121: 49.
- OOTAKI, T.; LIGHTY, A.C.; DELBRUCK, M. y HSU, W.J. (1973). *Molec. Gen. Genet.* 121: 57.
- OTTO, M.K.; JAYARAM, M.; HAMILTON, R.M. y DELBRUCK, M. (1981). *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 78: 266.
- PARRA, F. y MURILLO, F.J. (1982). *Phycomyces*, 5: 68.
- PETERSONS, P.A. y BEGGAR, I. (1971). *J. Biol. Chem.* 246: 25.
- PORTER, J.W. y LINCOLN, R.E. (1950). *Arch. Biochem. Biophys.* 27: 390.
- PORTER, J.W. y SPURGEON, S.L. (1979). *Pure Appl. Chem.* 51: 609.
- RAUGEI, G.; DHORMANN, V.; POHL, V. y RUSSO, V.E.N. (1982). *Planta* 155: 296.
- REVUELTA, J.L. (1981). Tesis doctoral. Universidad de León.
- RILEY, G.J.P. y BRAMLEY, P.M. (1976). *Biochim. Biophys. Acta* 450: 329.
- RILEY, G.I.P. y BRAMLEY, P.M. (1982) *Cytobios*, 34: 97.
- RILLING, H.C. (1965). *Arch. Biochem. Biophys.* 110: 39.
- RONCERO, M.I.G. (1980). Tesis doctoral, Universidad de Sevilla.

RONCERO, M.I.G. y CERDA-OLMEDO, E. (1982). *Current Genetics* 5: 5.

RUDOLPH, H. (1960). *Planta* 55: 424.

SALARES, V.R.; YOUNG, N.M.; BERSTEIN, H.J. y CAREY, P.R. (1979). *Biochim. Biophys. Acta*, 576: 176.

SANDMANN, G.; BRAMLEY, P.M. y BOGER, P. (1980). *Pestic. Biochem. Physiol.* 14: 185.

SCHROTT, E.L. (1980) En "The blue light syndrome", Senger, H., ed.; Springer, Berlin p. 309.

SCHWENKER, V. y GINGRAS, G. (1973), *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 51: 94.

SEVIOUR, R.J. y CODNER, R.C. (1976). *Microbios Letters* 1: 103.

SKODA, J. (1951). *Chem. Listy*, 41: 413.

SONG, P.S.; MOORE, T.A. y SUN, M. (1972). *The Chemistry of Plant Pigments*, Chichester, C.O. ed.; New York, Acad. Press, p. 33.

SUTTER, R.P. (1970). *J. Gen. Microbiol.* 64: 215.

SUTTER, R.P. (1975). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72: 127.

SUTTER, R.P. (1977a). *Phycomyces* 1: 60.

SUTTER, R.P. (1977b) en *Eukaryotic Microbes As Model Developmental Systems*; O'day, D.H. y Horgen, D.A. eds.; Marcell Dekker, New York, 2: 251.

SUTTER, R.P. y RAFELSON, M.E. Jr. (1968). *J. Bacteriol.* 95: 426.

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

THIRKELL, D. y HUNTER, M.I.S. (1969). *J. Gen. Microbiol.* 58: 293.

- THOMAS, D.M.; HARRIS, R.C.; KIRK, S.T.O. y GOODWIN, T.W. (1967). *Phytochemistry*, 6: 361.
- TORRES-MARTÍNEZ, S. (1978). Tesis doctoral, Universidad de Sevilla.
- TORRES-MARTÍNEZ, S.; MURILLO, F.J. y CERDÁ-OLMEDO, E. (1980). *Gen. Res. Camb.* 36: 299.
- VAISBERG, A.J. y SCHIFF, J.A. (1976). *Plant Physiol.* 57: 260.
- VALADON, L.R.G. y MUMMERY, R.S. (1969). *Microbios* 1: 3.
- VALADON, L.R.G. y MUMMERY, R.S. (1973). *Microbios* 7: 173.
- VALADON, L.R.G.; TRAVIS, R.L. y KEY, J.L. (1975). *Physiol. Plant*, 34: 196.
- VARMA, T.N.R. y CHICHESTER, C.O. (1962). *Arch. Biochem. Biophys.* 96: 265.
- VERNON, L.P.; KE, B.; MOLLENHAUER, H.H. y SHAN, E.R. (1969) en *Progress in Photosynthesis Research*; Metzner, H. ed.; Tubigen, Germany; 1: 137.
- VEVERS; H.G. y MILLOT, N. (1957). *Proc. Zool. Soc. Lond.* 129: 75.
- VILLOUTREIX, J. (1960). *Biochim. Biophys. Acta* 40: 434.
- WACKENRODER, H. (1831). *Mag. Pham.* 33. 144.
- WALD, G. y HUBBARD, R. (1960) en *the Enzymes*, P. Boger ed.; H. Lardy & K. Hyrbäck, New York, Acad. Press, Vol. III, parte B, p. 369.
- WALLACE, R.A.; WALKER, S.L. y HAUSCHKA, P.V. (1967) *Biochemistry*, 6: 1582.

WHITAKER, B.D. y SHROPSHIRE, W. (1981). *Experimental Mycology* 5: 243.

WILLIAMS, R.J.H.; DAVIES, B.H. y GOODWIN, T.W. (1965). *Phytochemistry* 4: 759.

YOKOYAMA, H.; COGGINS, C.W. y HENNING, L.L. (1971). *Phytochemistry* 10: 138.

YOKOYAMA, H.; NAKAYAMA, T.O.M. y CHICHESTER, C.O. (1962). *J. Biol. Chem.* 237: 681.

ZAGALSKY, P.F. (1976). *Pure Appl. Chem.* 47: 103.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Prof. Dr. Enrique Cerdá Olmedo haberme permitido realizar este trabajo en su Departamento, así como sus críticas y sugerencias.

Al Prof. Dr. F.J. Murillo, no sólo su labor de dirección, sino también su inestimable ayuda y amistad.

Al personal del Departamento la colaboración que me ha prestado en todo momento.

Al Dr. P.M. Bramley y Dra. E. Skone por su ayuda y enseñanzas.

Agradezco también a Maribel Carretero y a Loli Suárez la mecanografía del texto.

Al I.N.A.P.E. y a la E.M.B.O. la ayuda financiera prestada.

Por último, quiero recordar muy especialmente a Fernando Parra Pedregal a quien tengo que agradecer, sobre todo, su amistad.

UNIVERSIDAD DE SEVILLA
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Reunido el Tribunal integrado por los abajo firmantes
en el día de la fecha, para juzgar la Tesis Doctoral
D. AMADOR DE LA CONCHA CONEJERO
titulada "BIOSÍNTESIS DE CAROTENOS Y CAROTENOPROTEÍNA
EN PHYCOMYCES BLAKESLEEANUS".

acordó otorgarle la calificación de Sobresaliente
"cum laude"

Sevilla, 23 de Junio 1. 983

El Vocal,

El Vocal,

El Vocal,

[Signature]
El Presidente,

[Signature]

El Secretario,

El Doctorado

[Signature]

[Signature]

[Signature]



500293132

FBI E 70-078

293 132