



FOTORRECEPCIÓN Y DESARROLLO EN *PHYCOMYCES*

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

Rafael Flores González

78

125

21 ABR. 1997

Sevilla, Mayo de 1997.

Stella Caffi

Fac. de Genética
Biología
21/4/97
9/5/97
9 mayo 1997
| Car...
Luis

Director y Ponente

R. Cerdá Olmedo

Dr. Enrique Cerdá Olmedo
Catedrático de Genética

TD-385



UNIVERSIDAD DE SEVILLA

FACULTAD DE BIOLOGIA
BIBLIOTECA

Doy mi autorización a la Biblioteca de esta Facultad para
que mi Tesis Doctoral _____

_____ "Fotorecepción y Desarrollo en Phycomyces" _____

sea consultada, según la modalidad/es indicadas:

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

FLORES GONZALEZ, RAFAEL

Firmado:

Sevilla, a 17 de Febrero de 1998.

A M^a José.
A mis padres.

ÍNDICE

1	Introducción general	1
1.1	La fotomorfogénesis y la investigación del desarrollo	2
1.2	El organismo de trabajo	3
1.3	Los ciclos de vida de <i>Phycomyces</i>	4
1.4	Respuestas a la luz azul	6
1.5	Objetivos del trabajo	6
2	Mutantes de la fotoforogénesis	8
2.1	Introducción	9
2.1.1	La forogénesis de <i>Phycomyces</i>	9
2.1.2	La fotoforogénesis	10
2.1.3	Genética de la fotoforogénesis	13
2.1.4	Objetivos	14
2.2	Resultados	14
2.2.1	Selección de mutantes de la fotoforogénesis	14
2.2.2	La fotoforogénesis de los mutantes <i>pim</i>	15
2.2.3	Fototropismo de los mutantes <i>pim</i>	20
2.2.4	Fotocarotenogénesis de los mutantes <i>pim</i>	21
2.3	Discusión	22

3 Mutantes resistentes a diaminobutanona	25
3.1 Introducción	26
3.1.1 La ruta biosintética	26
3.1.2 Regulación de la ruta	28
3.1.3 Transporte y degradación	30
3.1.4 El papel de las poliaminas en la célula	30
3.1.5 Las poliaminas en el desarrollo de los hongos Mucorales	32
3.1.6 Objetivos	34
3.2 Resultados	35
3.2.1 Efectos de la diaminobutanona en el desarrollo y el crecimiento de <i>Phycomyces</i>	35
3.2.2 Antagonistas de la inhibición por diaminobutanona	41
3.2.3 Aislamiento de mutantes resistentes a diaminobutanona	42
3.2.4 Características fenotípicas de los mutantes <i>dab</i>	42
3.2.4.1 Resistencia a diaminobutanona	42
3.2.4.2 Concentración de poliaminas en los mutantes <i>dab</i>	44
3.3 Discusión	47
4 Sitios que ligan riboflavina	50
4.1 Introducción	51
4.1.1 La fotorrecepción de la luz azul	51
4.1.2 Espectros de acción	51
4.1.3 Los carotenos como posibles fotorreceptores	53
4.1.4 Las pteridinas como posibles fotorreceptores	54
4.1.5 Las flavinas como posibles fotorreceptores	55
4.1.6 Dos posibles fotorreceptores de luz azul en plantas son flavoproteínas	55

4.1.7 Fotorreceptores de luz azul en <i>Phycomyces</i>	57
4.1.8 Proteínas que ligan riboflavina	58
4.1.9 Objetivos	59
4.2 Resultados	60
4.2.1 Sitios que ligan riboflavina en <i>Phycomyces</i>	60
4.2.2 Propiedades del sitio que ligaba riboflavina en la fracción microsomal	64
4.2.3 Propiedades del sitio que ligaba riboflavina en la fracción sobrenadante	71
4.2.4 Unión de riboflavina en el micelio y en los esporangióforos	75
4.2.5 Unión de riboflavina en mutantes de la fotorrecepción	76
4.2.5 Distribución de la fluorescencia <i>in vivo</i>	77
4.3 Discusión	83
4.3.1 Unión de riboflavina a la fracción microsomal	83
4.3.2 Unión de riboflavina a la fracción sobrenadante	85
4.3.3 Distribución <i>in vivo</i> de la fluorescencia en <i>Phycomyces</i>	86
5 Materiales y Métodos	88
5.1 Estirpes utilizadas en este trabajo	89
5.2 Medios de cultivo	90
5.3 Mutagénesis	91
5.4 Mutantes de la fotoforogénesis	92
5.4.1 Fotoforogénesis	92
5.4.1.1 Condiciones de cultivo	92
5.4.1.2 Condiciones de iluminación	92
5.4.1.3 Cuantificación de la forogénesis	93
5.4.2 Fototropismo	93
5.4.3 Fotocarotenogénesis	94
5.4.4 Medición de la luz	95
5.5 Mutantes resistentes a diaminobutanona	95
5.5.1 Condiciones de cultivo	95
5.5.2 Determinación de la masa seca de los cultivos	95

5.5.3 Análisis de poliaminas por cromatografía en capa fina	96
5.5.3.1 Marcaje con cloruro de dansilo	96
5.5.2.2 Cromatografía en capa fina	96
5.6 Sitios que ligan riboflavina	97
5.6.1 Condiciones de cultivo	97
5.6.2 Extracción	97
5.6.3 Determinación de la concentración de proteínas	98
5.6.4 Ensayos de unión de riboflavina	99
5.6.4.1 Ensayos de unión de riboflavina a la fracción de membranas	99
5.6.4.2 Ensayos de unión de riboflavina a la fracción sobrenadante	100
5.6.5 Solubilización del sitio que ligaba riboflavina en la fracción microsomal	100
5.6.6 Técnicas cromatográficas	100
5.6.7 Electroforesis en geles de poliacrilamida	101
5.6.8 Tinción de proteínas	102
5.6.9 Determinación de la concentración de fenoles	102
5.6.10 Microscopía confocal	102
6 Bibliografía	103
7 Resumen y conclusiones	119
8 Agradecimientos	121

1

Introducción general

1.1 La fotomorfogénesis y la investigación del desarrollo

El desarrollo de los seres vivos es un problema fascinante que desde hace mucho tiempo atrae la atención de los científicos. Todos los organismos, desde los virus a los mamíferos, cambian en mayor o menor medida durante su ciclo de vida. El caso más extremo lo constituyen los vertebrados, en los que a partir de una única célula, el cigoto, se origina una asombrosa variedad de formas y de funciones celulares.

Uno de los retos de la biología moderna es entender los procesos que controlan el desarrollo: ¿Qué mecanismos moleculares hacen posible que en un organismo aparezcan células con la misma dotación genética pero con aspectos y funciones distintas?

El desarrollo de los organismos se produce a través de un programa ordenado y preciso de procesos de diferenciación celular. Los factores ambientales condicionan y modifican el programa de desarrollo en un grado muy diferente según los organismos. La modificación de la estructura de un organismo por la luz se denomina fotomorfogénesis.

Muchos organismos de todos los grandes grupos (bacterias, algas, hongos, plantas y animales) utilizan la luz como fuente de información sobre el ambiente que les rodea. Entre las fotorrespuestas más comunes en estos organismos se encuentran la modificación del movimiento (fototaxis), del crecimiento (fototropismo) o del metabolismo (como la inducción de la síntesis de pigmentos), la regulación de los ciclos circadianos o la inducción de procesos morfogénéticos. La fotomorfogénesis es un fenómeno muy frecuente en la naturaleza, principalmente entre las plantas y los hongos. Algunos hongos utilizan la luz como señal de que la dispersión de sus esporas será más eficaz. La luz determina la aparición de estructuras que se forman para la esporulación y determina su forma y su número.

La fotomorfogénesis constituye un modelo sencillo para la investigación del desarrollo y de los procesos de diferenciación celular. La luz ofrece además muchas posibilidades experimentales porque permite precisar la cantidad, la cualidad, la dirección y la distribución temporal del estímulo.

La investigación de los hongos ofrece también varias ventajas: son eucariontes simples, que pueden cultivarse de forma fácil y rápida en medios

sintéticos; presentan un desarrollo sencillo, con estadios bien definidos, y son, en general, accesibles a los métodos de la genética clásica y molecular. Es de esperar también que en los hongos la investigación de la naturaleza molecular del fotorreceptor sea más fácil que en las plantas, ya que aquellos carecen de pigmentos muy abundantes en las plantas, como las clorofilas; se pueden cultivar prácticamente en dos dimensiones, lo que facilita las mediciones de la luz incidente; y sus micelios son translúcidos y delgados, lo que permite la iluminación homogénea.

En esta tesis se presentan los resultados de la investigación de algunos aspectos de la fotomorfogénesis del hongo *Phycomyces blakesleeanus*.

1.2 El organismo de trabajo

La especie *Phycomyces blakesleeanus* pertenece a la familia Mucoráceas, orden Mucorales y clase Cigomicetos. Se trata de un hongo saprofito terrestre que crece formando un micelio de hifas cilíndricas muy ramificadas. Las hifas no presentan tabiques, por lo que el micelio constituye una sola célula con numerosísimos núcleos (cenocito). Ciertos aspectos llamativos de su biología, su sencillez estructural y la facilidad de cultivo en el laboratorio han hecho que *Phycomyces* haya sido elegido para numerosas investigaciones, principalmente a partir de 1957, gracias al impulso dado por Max Delbruck y sus colaboradores a la investigación de su fotobiología.

Una de las particularidades de *Phycomyces* que desde un principio llamó más la atención de los científicos fué la conducta de sus macróforos, que son hifas aéreas cilíndricas y no ramificadas, de varios centímetros de largo, en cuyo extremo se desarrolla un esporangio esférico que contiene las esporas. La propiedad más llamativa de los macróforos es su sensibilidad a numerosos estímulos ambientales. El primer análisis cuantitativo de sus respuestas a la luz fué publicado en 1888 por Massart.

Los macróforos alteran su velocidad de crecimiento en respuesta a estímulos como la iluminación simétrica (fotomecismo), la introducción en el medio de ciertos compuestos químicos (quimiomecismo) y la colocación o remoción de una cajita a su alrededor (claustromecismo). Los estímulos que les llegan de forma asimétrica provocan cambios en la dirección del crecimiento: giran hacia la luz (fototropismo) y las corrientes de aire (anemotropismo), crecen contra la gravedad (gravitropismo) y se alejan de los objetos cercanos (evitación). La extrema sensibilidad de *Phycomyces* a la luz y

sus elaboradas respuestas a este estímulo motivaron numerosas investigaciones sobre su fotofisiología, que hicieron de este hongo un organismo pionero en el estudio de las respuestas a la luz azul.

También ha llamado la atención de los científicos la presencia de β -caroteno, responsable del color amarillo típico de este hongo. La investigación de su síntesis, sujeta a una compleja regulación, fué facilitada por la obtención de mutantes con nuevos colores, debidos a la interrupción de la ruta biosintética o a cambios en su regulación.

Se ha avanzado también en el conocimiento de distintos aspectos de la bioquímica y la genética de *Phycomyces*. Los resultados de todas estas investigaciones científicas han sido objeto de dos grandes revisiones: Bergman *et al.* (1969) y Cerdá-Olmedo y Lipson (1987).

1.3 Los ciclos de vida de *Phycomyces*

Las esporas vegetativas contienen entre 1 y 6 núcleos, aunque más del 80 % tienen tres o cuatro núcleos (Heisenberg y Cerdá-Olmedo, 1968). Las esporas germinan masivamente tras exponerlas a un choque térmico (Robbins *et al.*, 1942) o añadir al medio ciertos compuestos químicos, como el acetato o el propionato (Robbins *et al.*, 1942; Borchert, 1963; Van Mulders *et al.*, 1986). Tras la activación, la espora se hincha y emergen uno, dos o a veces tres tubos de germinación, que dan lugar al micelio (fig. 1). El ciclo asexual se cierra cuando en el micelio superficial se desarrollan las estructuras reproductoras vegetativas, los esporangióforos, que portan los esporangios que contienen las esporas. Los esporangióforos pueden ser de dos tipos, los macróforos ya descritos y los micróforos, mucho más pequeños y cuya conducta no ha sido investigada.

Phycomyces es un hongo heterotálico con dos tipos sexuales denominados (+) y (-), indistinguibles morfológicamente y sólo identificables por su reacción con el otro sexo (Blakeslee, 1904). El ciclo sexual se inicia con la interacción de micelios de distinto sexo (fig. 1), que intercambian feromonas que, como en otros mucorales, son los precursores metabólicos inmediatos de los ácidos trispóricos (Caglioti *et al.*, 1966; Sutter y Whitaker, 1981). Inducidos por las feromonas, los micelios emiten unas hifas especializadas denominadas cigóforos. Los cigóforos de sexos opuestos, cuando se encuentran, crecen juntos hacia el aire, tomando el nombre de

progametangios. Estos tabican sus ápices separando una célula llamada gametangio. La fusión de dos gametangios de sexo opuesto origina una cigospora, que contiene citoplasma y núcleos aportados por ambas estirpes conjugantes. La cigospora madura permanece en estado de latencia durante varios meses, al cabo de los cuales germina formando un germoesporangióforo, y en su extremo, un esporangio donde se forman las germosporas, capaces de iniciar un ciclo asexual normal (Cerdá-Olmedo y Lipson, 1987; Sutter, 1975).

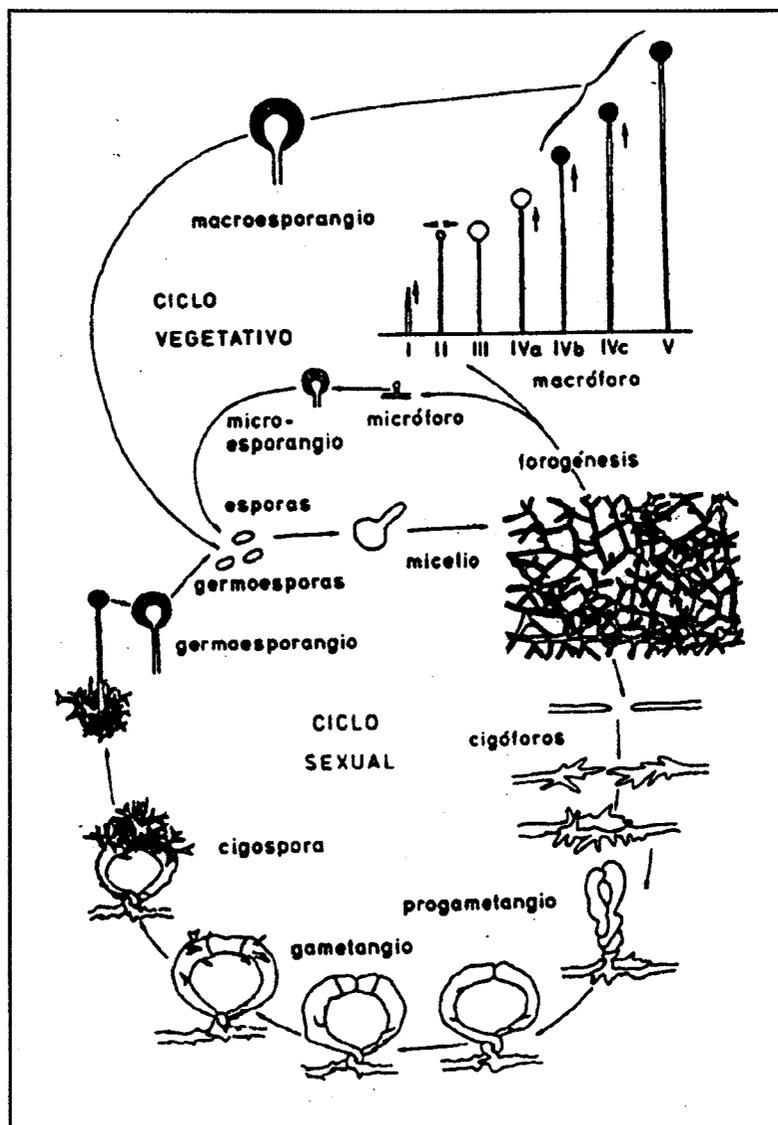


Figura 1. Ciclos de vida de *Phycomyces*. Se muestran las distintas etapas del desarrollo de los esporangióforos y de la formación de la cigospora.

1.4 Respuestas a la luz azul

La luz azul provoca distintos efectos en *Phycomyces*, que afectan tanto a su fisiología como a su desarrollo. Como se mencionó anteriormente, los esporangióforos son fotosensibles y crecen en dirección a la fuente de luz azul (fototropismo). En el micelio, la luz azul estimula la síntesis de caroteno (fotocarotenogénesis) y provoca cambios en la pauta de desarrollo (fotomorfogénesis).

La fotomorfogénesis se produce tanto en el ciclo sexual como en el asexual. En el primero, la luz inhibe la formación de algunas de las estructuras especializadas para la reproducción (Yamazaki *et al.*, 1996). En el segundo la luz condiciona la forogénesis (fotoforogénesis), decidiendo el número y el tipo de esporangióforos. Los efectos de la luz sobre la forogénesis de la estirpe silvestre han sido investigados en detalle y se conocen además algunos de los genes que intervienen en esta fotorrespuesta (Corrochano y Cerdá-Olmedo, 1991).

1.5 Objetivos del trabajo

En la regulación de la fotoforogénesis de *Phycomyces* convergen dos procesos celulares distintos. Por una parte, se decide la entrada en un nuevo estadio del desarrollo, la forogénesis. Por otra parte, se recibe y se procesa el estímulo luminoso y, en función de esta información, se modula la decisión anterior. El resultado final, la fotoforogénesis, producto de la integración de ambos procesos, ha sido el objeto de las investigaciones que se presentan en esta tesis.

Por una parte, decidimos buscar nuevos mutantes de la fotoforogénesis que nos permitieran identificar los genes implicados en la fotorrecepción y la transducción de la señal luminosa. Tales mutantes definirían genes con un papel clave en el desarrollo de *Phycomyces*.

Nos propusimos además investigar el papel de las poliaminas en el desarrollo de *Phycomyces*. En los hongos mucorales, la entrada en cada nuevo estadio de desarrollo conlleva un aumento en la síntesis de poliaminas, compuestos implicados en el desarrollo en multitud de organismos. Decidimos investigar los efectos que provoca en *Phycomyces* la alteración de la ruta de

biosíntesis de poliaminas mediante el empleo de la diaminobutanona, un inhibidor de la ruta, y el aislamiento de mutantes.

También nos han interesado los mecanismos por los que la luz modula la forogénesis. El efecto de la luz sobre el desarrollo requiere la acción de al menos un fotorreceptor y una cadena de transducción de señales. Se ha propuesto que el fotorreceptor de luz azul podría consistir en una proteína que ligara riboflavina de forma no covalente. Nuestra intención ha sido averiguar si estas proteínas intervienen en la fotorrecepción de luz azul por *Phycomyces*.

2

Mutantes de la fotoforogénesis

2.1 INTRODUCCIÓN

2.1.1 La forogénesis de *Phycomyces*

Se denomina forogénesis a la formación de los esporangióforos, estructuras reproductoras vegetativas. En *Phycomyces* los esporangióforos se desarrollan a partir de unas pequeñas protuberancias que aparecen en el micelio, llamadas primordios. Los macróforos y los micróforos se originan a partir de distintos tipos primordios (Thorton, 1972; 1975).

La diferencia principal entre macróforos y micróforos es el tamaño. Los macróforos llegan a medir varios centímetros de largo. Su esporangio, de unos 500 μm de diámetro, contiene unas cien mil esporas. Los micróforos, por el contrario, tienen alrededor de 1 mm de longitud y sostienen un esporangio de unos 100 μm de diámetro con unas mil esporas (Gutiérrez-Corona y Cerdá-Olmedo, 1985).

El momento en el que se inicia la forogénesis y el número de macróforos y micróforos formados dependen de diversos factores ambientales (Galland y Ootaki, 1987). En las condiciones de cultivo habituales el hongo esporula cuando se agotan los nutrientes. Las reservas acumuladas durante el crecimiento se emplean en la formación de las esporas, células resistentes destinadas a crecer en otro lugar o en otro momento, y de las estructuras que las producen y facilitan su dispersión.

La forogénesis depende de las condiciones de crecimiento. De forma general, los factores que limitan el crecimiento micelial inhiben la producción de macróforos y estimulan la de micróforos. Así ocurre con las bajas temperaturas, la escasez de nitrógeno y el aumento de la densidad de siembra, que hace disminuir la cantidad de nutrientes disponibles por micelio (Rudolph, 1958; Thorton, 1972; Gutiérrez-Corona y Cerdá-Olmedo, 1988). Por el contrario, la

adición de medio fresco a los cultivos reprime la microforogénesis (Rudolph, 1958).

Phycomyces no esporula cuando el micelio crece en medio líquido. Si el micelio se cubre durante parte de su crecimiento con una fina capa sólida o líquida, se induce la producción de micróforos y se reprime la de macróforos (Grehn, 1932; Gutiérrez-Corona y Cerdá-Olmedo, 1985). La escasez de oxígeno, causada, por ejemplo, por la falta de aireación de los cultivos, cuando no llega a afectar al crecimiento, favorece la microforogénesis e inhibe la macroforogénesis. La acumulación de CO₂ parece ser parcialmente responsable de este efecto (Russo *et al.*, 1981; Gutiérrez-Corona y Cerdá-Olmedo, 1985).

2.1.2 La fotoforogénesis

La luz es otro de los factores que regulan la forogénesis de *Phycomyces*. La iluminación del micelio estimula la macroforogénesis e inhibe la microforogénesis, aunque esto sólo se pone de manifiesto en determinadas condiciones de cultivo. En los últimos años se han propuesto varios modelos experimentales para el estudio de la fotoforogénesis de *Phycomyces* (Bergman, 1972; Russo, 1977; Thorton, 1979; Gutiérrez-Corona y Cerdá-Olmedo, 1985; Ortiz-Castellanos y Gutiérrez-Corona 1988; Corrochano y Cerdá-Olmedo, 1988). El protocolo propuesto por Corrochano y Cerdá-Olmedo (1988) conduce a resultados claros y cuantificables. En este protocolo se utiliza el agar mínimo usual en cajas de Petri inoculadas con 10⁵ esporas, lo que permite un crecimiento rápido y vigoroso y una producción homogénea de micróforos y macróforos. La forogénesis se produce sincrónicamente a partir del tercer día, llega al máximo al cuarto día y desaparece en los días sucesivos (Corrochano y Cerdá-Olmedo, 1988).

El umbral de la fotoforogénesis es de unos 10⁻⁸ W m⁻², cuando el micelio se ilumina con luz azul continua (fig. 2). En estas condiciones la respuesta máxima se alcanza con unos 10⁻³ W m⁻² (Corrochano y Cerdá-Olmedo, 1990a). Los umbrales de la fotoforogénesis son semejantes a los de otras fotorrespuestas de *Phycomyces* y mucho más bajos que los de las fotorrespuestas de otros hongos (Corrochano y Cerdá-Olmedo, 1991).

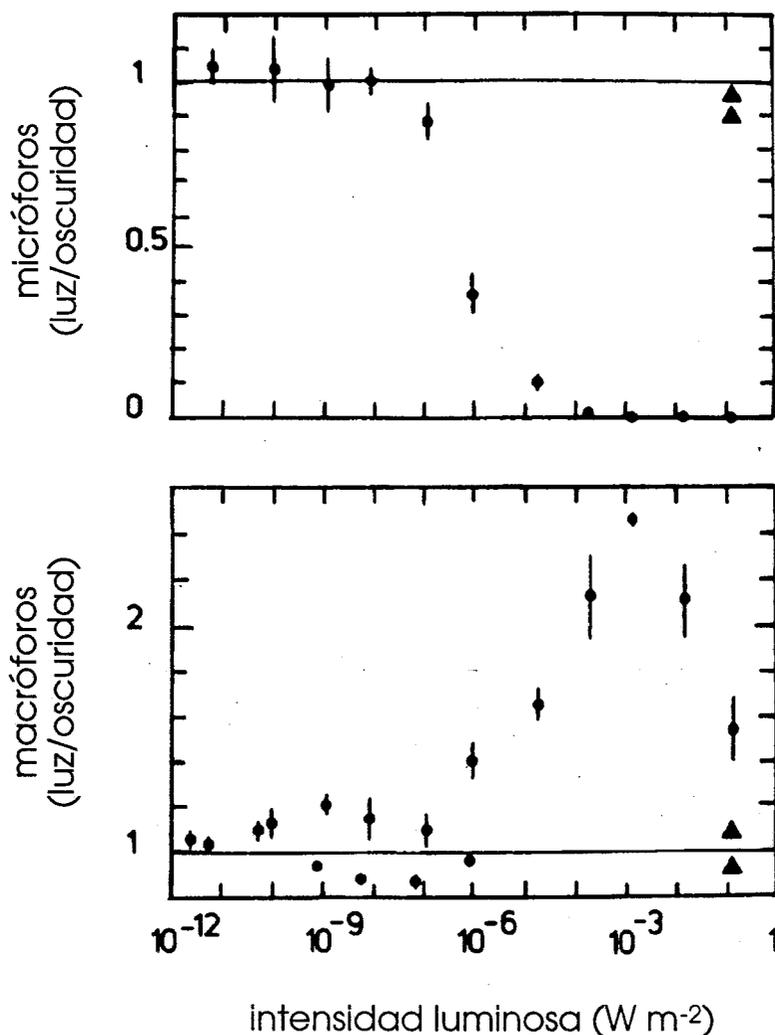


Figura 2. Fotoforogénesis de la estirpe silvestre en cultivos de cuatro días de edad crecidos bajo luz azul continua. Los triángulos indican micelios iluminados con luz roja. Tomado de Corrochano y Cerdá-Olmedo (1990a).

Los destellos luminosos tienen también efectos morfogenéticos. Los cultivos son competentes a la luz desde las 32 hasta las 68 horas después de la inoculación, con un máximo de sensibilidad a las 48 horas, poco antes de la aparición de los primeros esporangióforos. Los destellos inducen respuestas fotomorfogenéticas escalonadas, con dos componentes cuyos umbrales son aproximadamente 10^{-4} y 1 J m^{-2} de luz azul (fig. 3). Este tipo de respuesta con dos componentes es común a todas las fotorrespuestas de *Phycomyces*, y sugiere la existencia de dos sistemas de fotorrecepción, uno sensible a baja intensidad de luz y el otro a alta intensidad (Corrochano y Cerdá-Olmedo, 1990a). Los dos sistemas son competentes en momentos distintos tanto en un mismo micelio

como en los cien mil micelios que componen el cultivo. La respuesta escalonada se debe a que, en un momento dado, sólo una fracción de los micelios responde a baja intensidad, mientras que otra fracción lo hace a intensidad alta y otra no responde a ninguna. La respuesta resultante tiene dos componentes y no llegan a desaparecer todos los micróforos. Cuando la iluminación es continua (fig.2), en todos los micelios se estimula el fotorreceptor de mayor sensibilidad. En la representación de la fotoforogénesis en luz continua aparece, por tanto, un único componente (Corrochano y Cerdá-Olmedo, 1990a).

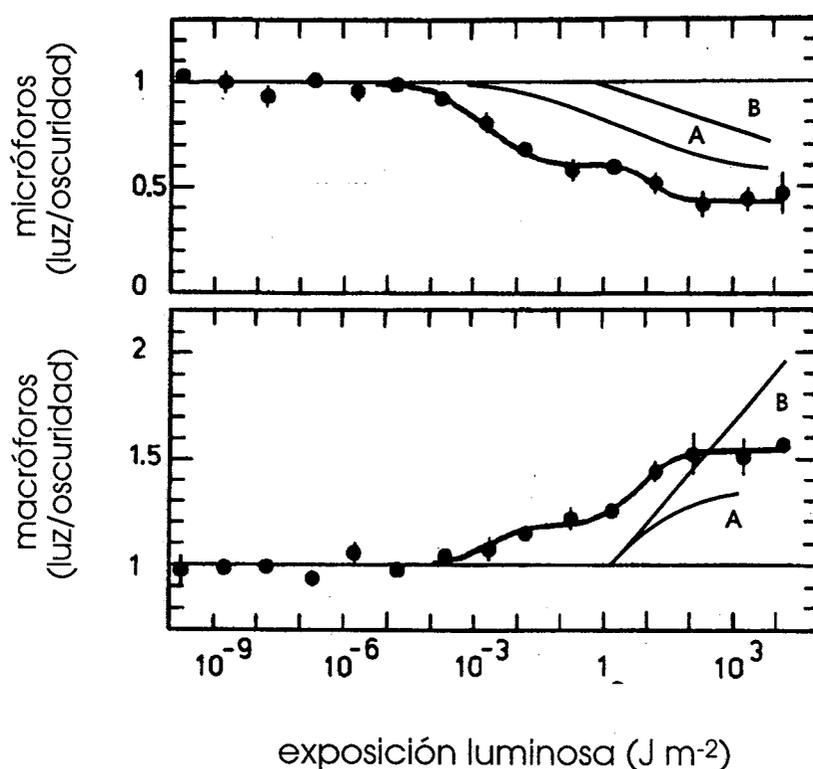


Figura 3. Fotoforogénesis de la estirpe silvestre (línea de trazo grueso) y de los mutantes C21 (*madA*) y C111 (*madB*) (líneas de trazo fino, A y B respectivamente) en cultivos de cuatro días de edad iluminados a las 48 h con un destello de luz azul. De Corrochano y Cerdá-Olmedo (1990a, b), modificado.

La luz y otros estímulos hacen variar la macro- y la microforogénesis en direcciones opuestas, pero no existe una tasa fija de intercambio entre ellas: un macróforo no sustituye a un número determinado de micróforos. Aunque ambos fenómenos morfogénéticos están relacionados, el conocimiento de uno no

permite predecir exactamente el otro. Parecen ser, por tanto, dos respuestas independientes.

Los dos componentes de la forogénesis tienen además sus espectros de acción particulares, con rasgos comunes y diferencias significativas entre sí y con los de otras fotorrespuestas a la luz azul, en *Phycomyces* y en otros organismos. Los resultados sugieren que *Phycomyces* utiliza para la fotoforogénesis cuatro fotorreceptores distintos con elementos comunes (Corrochano *et al.*, 1988).

2.1.3 Genética de la fotoforogénesis

Algunos mutantes del fototropismo y de la carotenogénesis presentan alteraciones en la fotoforogénesis. Los mutantes del fototropismo (*mad*) definen 10 genes no ligados, de *madA* a *madJ* (fig. 4). Las mutaciones en los genes *madA*, *madB*, *madC* y *madI* provocan defectos cualitativos en la visión de la luz, que sugieren que los productos de estos genes forman parte de la estructura del fotorreceptor. En estos mutantes el umbral del fototropismo es mayor que en el tipo silvestre, pero los tropismos a estímulos distintos de la luz son normales (Galland y Lipson, 1987). Otros datos genéticos y biofísicos sugieren que los productos de los genes *madA*, *B* y *C* interaccionan formando un complejo multimérico (Medina y Cerdá-Olmedo, 1977; López-Díaz y Lipson, 1983; Poe *et al.*, 1986).

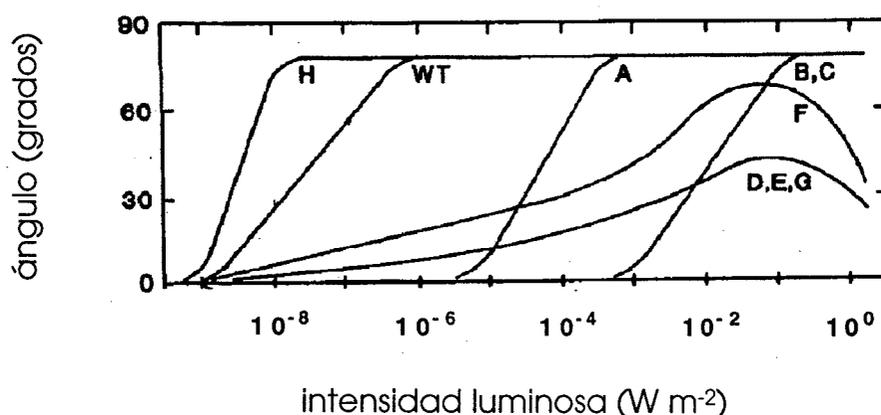


Figura 4. Fototropismo de los esporangióforos de la estirpe silvestre y de varios mutantes *mad*. La figura representa el ángulo formado por los esporangióforos y la vertical tras 8 h de iluminación unilateral con luz azul de la intensidad que se indica. Las letras mayúsculas indican el gen *mad* alterado. La estirpe silvestre se indica con las letras WT.

Los mutantes en los otros genes (*madD* a *madJ*) están alterados en el crecimiento del esporangióforo. Estos mutantes responden lentamente al estímulo luminoso, aunque su umbral de sensibilidad es igual al del tipo silvestre. Están alterados además en los tropismos a estímulos distintos de la luz, como la gravedad u obstáculos cercanos (Bergman *et al.*, 1973; Galland y Lipson, 1987). Algunas mutaciones en estos genes provocan también alteraciones leves en la percepción de la luz que podrían indicar que los productos de estos genes interaccionan con el fotorreceptor (Lipson y Teresaka, 1981; Campuzano *et al.*, 1996).

De todos los genes *mad* analizados, únicamente *madA* y *madB* intervienen en la fotoforogénesis. El umbral de la fotoforogénesis de los mutantes *madA* y *madB* analizados es, respectivamente, cien y diez mil veces mayor que el del tipo silvestre (fig. 3) (Bergman, 1972; Bergman *et al.*, 1973; Jayaram *et al.*, 1980; Lipson *et al.*, 1983; Corrochano y Cerdá-Olmedo, 1990b). Los genes *madA* y *madB* intervienen también en la fotocarotenogénesis (Bergman *et al.*, 1973; López-Díaz y Cerdá-Olmedo, 1980).

A diferencia de lo que ocurre con el fototropismo y la fotocarotenogénesis, el β -caroteno es imprescindible en la fotoforogénesis. En los mutantes *carA*, *carB*, *carR* y *carRA*, que no sintetizan β -caroteno, la forogénesis es casi insensible a la luz (Galland y Russo, 1979; Gutiérrez-Corona y Cerdá-Olmedo, 1988; Corrochano y Cerdá-Olmedo, 1990b). Curiosamente, al igual que ocurre con la fotocarotenogénesis, la fotoforogénesis requiere el producto del gen *carA*, que fué descubierto por su papel en la activación de la ruta de biosíntesis del caroteno (López-Díaz y Cerdá-Olmedo, 1980; Corrochano y Cerdá-Olmedo, 1990b).

En resumen, el análisis de los mutantes ha puesto de manifiesto algunos de los elementos que intervienen en la fotoforogénesis: los productos de los genes *madA*, *madB* y *carA*, y el β -caroteno.

2.1.4 Objetivos

Nuestro objetivo es identificar los genes implicados en la fotorrecepción y la transducción de la señal luminosa durante la fotoforogénesis de *Phycomyces*. Como se mencionaba anteriormente, los únicos mutantes de la fotoforogénesis que se conocen fueron aislados como mutantes del fototropismo o de la carotenogénesis. Nuestro propósito es buscar directamente mutantes de la fotoforogénesis, estudiar su fenotipo y comprobar si son distintos de los ya conocidos.

2.2 RESULTADOS

2.2.1 Selección de mutantes de la fotoforogénesis

Los mutantes se obtuvieron por mutagénesis del heterocariote C2 * S213 con N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina, según el procedimiento descrito por Roncero *et al.* (1984). Este método produce suspensiones de esporas que descienden en su mayoría de esporas con un solo núcleo S213 viable, sometido a una tasa de mutación elevada. Para la detección de los mutantes se inocularon 10^4 esporas mutagenizadas por cada caja de medio mínimo y se incubaron a 22 °C bajo una luz blanca continua de una intensidad de 10^{-4} W m⁻², condiciones en las que la estirpe silvestre produce muy pocos micróforos. Tras 6 días de incubación se arrancaron los macróforos para observar los micelios con ayuda de una lupa. Se detectaron pequeñas agrupaciones de micróforos que destacaban sobre un fondo de micróforos dispersos. Su frecuencia era de aproximadamente una por cada 5000 esporas sembradas en esos cultivos.

Se tomaron las esporas de estas agrupaciones de micróforos y se cultivaron por separado en oscuridad. Las esporas producidas por estos cultivos se inocularon de nuevo en las condiciones de escrutinio y se obtuvieron micelios que producían micróforos en distinto grado. Se tomaron esporas de los cultivos que presentaban una mayor cantidad de micróforos, precisamente de las áreas donde la concentración de micróforos era mayor. Estas esporas se inocularon por separado en medio ácido. Finalmente se tomaron nueve colonias procedentes de distintas agrupaciones iniciales de micróforos. Todas ellas produjeron más micróforos que el tipo silvestre cuando se subcultivaron en las condiciones de escrutinio.

En las nueve estirpes seleccionadas analizamos la fotoforogénesis en respuesta a destellos de luz azul de distinta intensidad, aplicados a

cultivos de 48 h de edad. En este primer análisis, seis de las nueve estirpes respondieron como la estirpe silvestre, y fueron desechadas. Las otras tres estirpes (S601, S602 y S603) presentaron una fotoforogénesis anómala, con umbrales de sensibilidad mayores que el silvestre. Las mutaciones responsables de esta conducta se denominaron *pim-1*, *pim-2* y *pim-3* respectivamente.

2.2.2 La fotoforogénesis de los mutantes *pim*

Para investigar con detalle la fotoforogénesis de estos mutantes comenzamos determinando su periodo de competencia a la luz. Iluminamos cultivos de distintas edades con un destello de alta intensidad (200 J m^{-2}) y contamos los micróforos cuando los cultivos tenían 5 días de edad (fig. 5). La fotomacroforogénesis presentó los mismos periodos de competencia que la fotomicroforogénesis. La estirpe S602 presentó un periodo de competencia muy similar al de la estirpe silvestre: ambas perdían su sensibilidad a la luz después de las 48 h de edad. Por el contrario, las estirpes S601 y S603 mostraron un periodo de competencia tardío, que aún no parecía alcanzar el máximo a las 64 h de edad. Se observó que, en iguales condiciones de cultivo, en las estirpes S601 y S603 los esporangióforos aparecían varias horas después que en la estirpe silvestre. El retraso en el periodo de competencia podía ser reflejo, por tanto, del retraso en el crecimiento.

En consecuencia, decidimos precisar la respuesta de S602 a destellos aplicados a las 48 h de edad, y emplear luz continua para cuantificar la fotoforogénesis de las estirpes S601 y S603.

La fotomicroforogénesis en la estirpe S602 presentó un umbral unas mil veces mayor que en la estirpe silvestre. El umbral de la fotomacroforogénesis de S602 fué semejante al de la estirpe silvestre (fig. 6).

En respuesta a luz continua, la estirpes S601 y S603 presentaron una fotomicroforogénesis muy similar (fig. 7). Ambas eran unas 10 veces menos sensibles a la luz que la estirpe silvestre. En la figura 7 se observa que a 10^{-4} W m^{-2} (la intensidad luminosa utilizada en el escrutinio de los mutantes) la luz provoca en la fotomicroforogénesis del silvestre un efecto doble del que provoca en las estirpes S601 y S603.

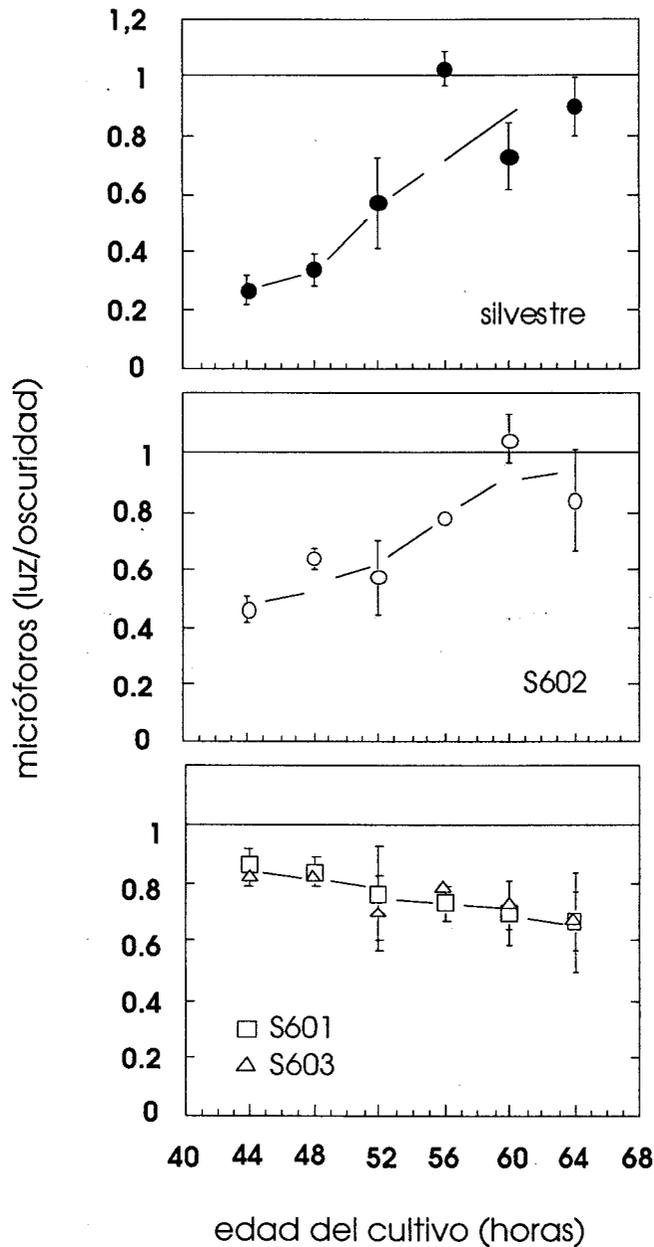


Figura 5. Periodo de competencia a la luz de las estirpes silvestre, S601, S602 y S603. A la edad que se indica los cultivos fueron iluminados durante dos minutos con 200 J m^{-2} de luz azul. Los microóforos se contaron a los cinco días de edad. Los resultados de los experimentos de esta y las siguientes figuras se representan como el cociente de los esporangióforos que se obtienen en la luz y la media de los que se obtienen en varios cultivos mantenidos en oscuridad, y se expresan como la media y su varianza en al menos dos experimentos independientes. La forogénesis en la oscuridad fue (miles de microóforos por caja): silvestre, 152 ± 4 ; S601, 297 ± 22 ; S602, 307 ± 14 ; y S603, 356 ± 10 .

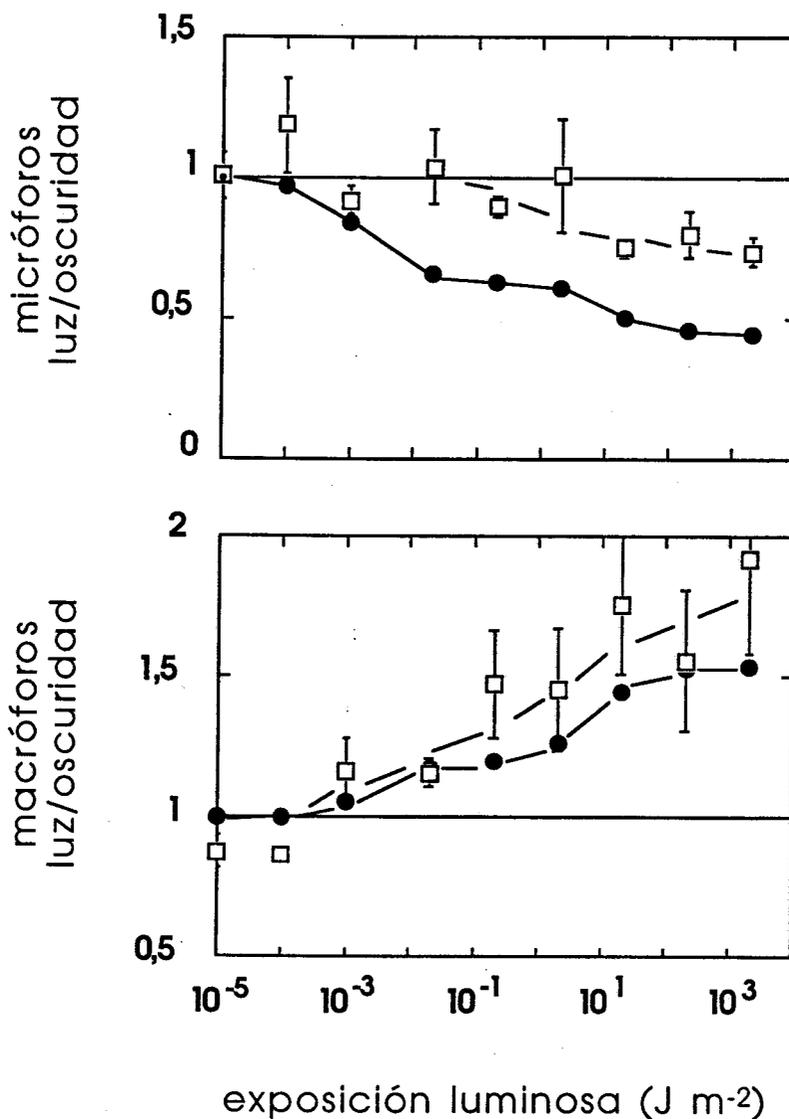


Figura 6. Fotoforogénesis de la estirpe S602. Microforogénesis y macroforogénesis de S602 (símbolos blancos) y el tipo silvestre (símbolos negros, tomado de Corrochano y Cerdá-Olmedo, 1990a), expuestos a la edad de 48 h a destellos con el flujo de luz azul indicado. En las cajas de S602 en la oscuridad había 364 ± 59 mil microforos y 27 ± 8 mg de masa seca de macróforos. Los símbolos representan la media y su varianza en al menos cuatro experimentos independientes.

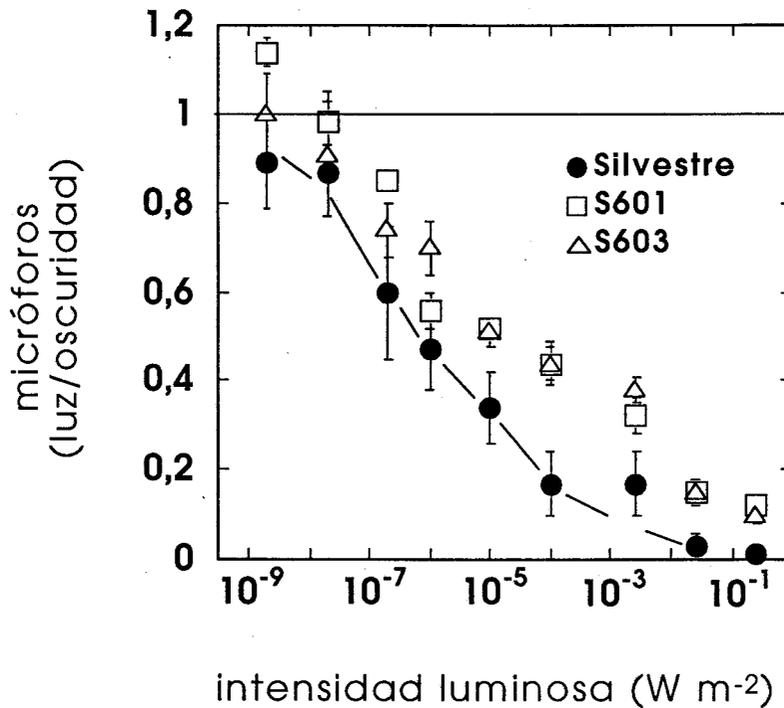


Figura 7. Microforogénesis en luz continua de las estirpes silvestre, S601 y S603. En la oscuridad la forogénesis fue: (miles de microforos por caja) 274 ± 24 ; S601, 322 ± 20 ; y S603, 363 ± 12 . Los símbolos representan la media y su varianza en al menos dos experimentos independientes.

S601 y S603 presentaron el mismo umbral para la fotomacroforogénesis que el tipo silvestre, pero difirieron en otros parámetros (fig. 8). S601 saturó la respuesta a la misma intensidad que el silvestre, pero a intensidades aún mayores su producción de macroforos bajó hasta los niveles de oscuridad. S603 necesitó unas 200 veces más luz que la estirpe silvestre para saturar su respuesta fotomacroforogénica, que alcanzó valores relativos mucho más altos que en el silvestre. Esto se debió a que S603 en la oscuridad producía muchos menos macroforos que la estirpe silvestre; a alta intensidad de luz ambas estirpes hacían cantidades similares de macroforos.

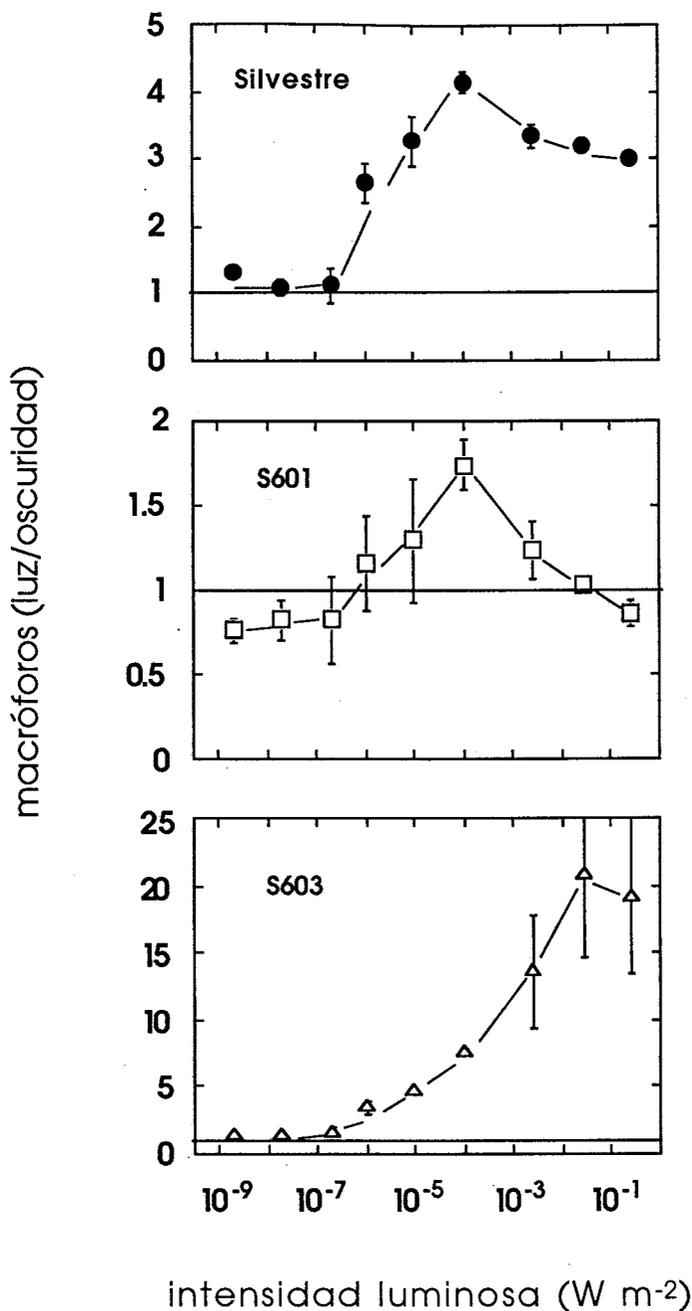


Figura 8. Macroforogénesis en luz continua de las estirpes silvestre, S601 y S603. La masa seca de macroforos por caja en la oscuridad fue: silvestre, 28.3 ± 1.8 ; S601, 28.3 ± 1.7 ; y S603, 4 ± 0.7 . Los símbolos representan la media y su varianza en al menos dos experimentos independientes.

Para determinar si estas mutaciones afectaban también a otras fotorrespuestas de *Phycomyces*, investigamos el fenotipo de estos mutantes respecto a la fotocarotenogénesis (otra fotorrespuesta miceliar) y al fototropismo (una fotorrespuesta del esporangióforo)

2.2.3 Fototropismo de los mutantes *pim*

Para determinar el fototropismo de los mutantes *pim* medimos la curvatura de sus esporangióforos en respuesta a iluminación azul horizontal. S601, S602 y S603 presentaron un fototropismo semejante al de la estirpe silvestre (fig. 9). Como testigo de una estirpe deficiente en esta respuesta empleamos la estirpe C21 (mutante *madA*), cuyo umbral fototrópico es de unos 10^{-5} W m^{-2} .

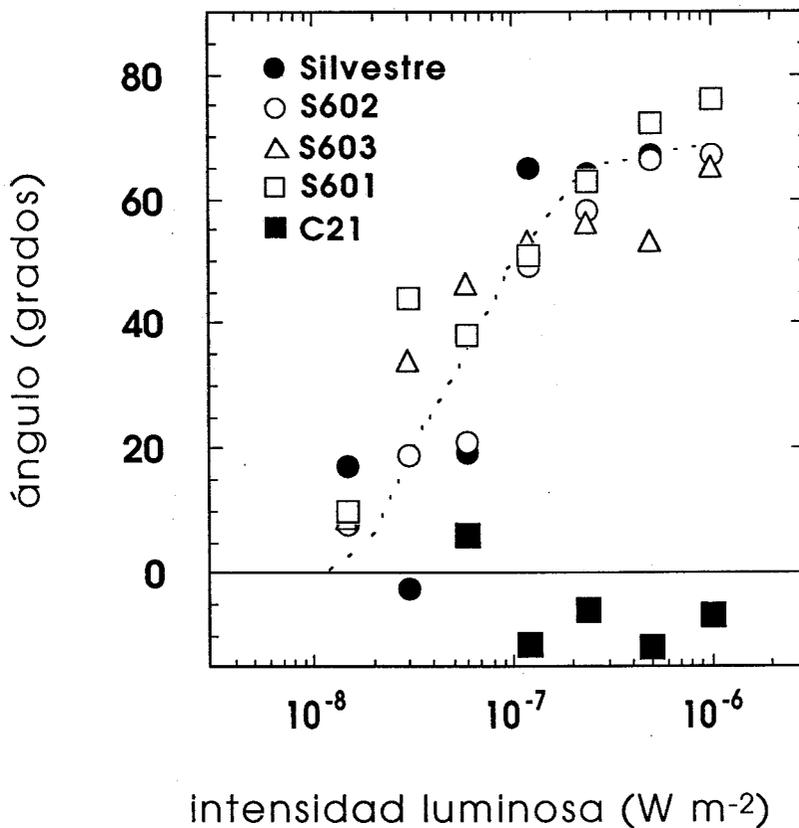


Figura 9. Fototropismo de las estirpes silvestre, S601, S602, S603 y C21. Los esporangióforos de cada estirpe se iluminaron lateralmente con luz azul de la intensidad que se indica en abscisas. Tras 10 horas de crecimiento se determinó el ángulo que formaban en dirección a la fuente de luz respecto a la vertical. Los símbolos representan la media de al menos dos experimentos distintos.

2.2.4 Fotocarotenogénesis de los mutantes *pim*

Los mutantes *pim* eran productores de β -caroteno. En la oscuridad produjeron cantidades semejantes a la estirpe silvestre: (en mg g^{-1} de masa seca) 70 ± 4 la estirpe S601; 70 ± 14 la estirpe S602 y 133 ± 31 la estirpe S603, frente a 68 ± 9 de la estirpe silvestre. La estirpe S603 sintetizó unas 2 veces más caroteno que la estirpe silvestre.

Incubada bajo luz azul continua, la estirpe S603 presentó una fotocarotenogénesis claramente alterada, con un umbral unas mil veces mayor que el tipo silvestre. A la máxima intensidad de luz utilizada el mutante produjo 4.1 veces más caroteno que en la oscuridad, frente a 12 veces en el silvestre (fig. 10).

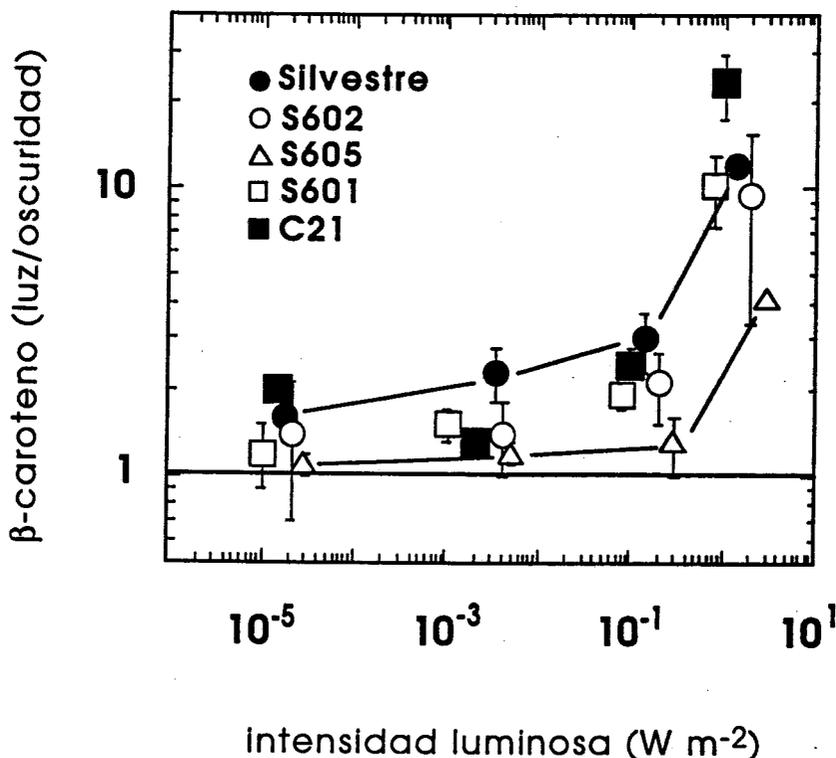


Figura 10. Fotocarotenogénesis de las estirpes silvestre, S601, S602, S603 y C21. Se determinó la cantidad de β -caroteno en cultivos de cinco días de edad iluminados con luz blanca continua de la intensidad que se indica en abscisas. Los resultados se expresan como el cociente entre la cantidad de β -caroteno que se obtuvo con luz y la media de varios cultivos mantenidos en oscuridad. Los símbolos representan la media y su varianza de al menos dos experimentos distintos.

La fotocarotenogénesis de las estirpes S602 y S601 fue ligeramente menor que la del tipo silvestre y semejante a la de la estirpe C21. La estirpe C21 (*madA*) presenta alteraciones leves en la fotocarotenogénesis que se ponen de manifiesto claramente cuando se utiliza un doble mutante *madA madB* (López-Díaz y Cerdá-Olmedo, 1980). La variabilidad de los resultados y la poca resolución del método no permiten asegurar si S602 y S601 presentan alteraciones leves en la fotocarotenogénesis como las que presenta C21.

2.3 DISCUSIÓN

Para investigar los mecanismos moleculares que controlan la fotoforogénesis de *Phycomyces* conviene obtener mutantes de genes implicados en este proceso. Los tres genes de la fotoforogénesis conocidos hasta el momento habían sido originalmente identificados por sus efectos en el fototropismo (*madA* y *madB*) o en la carotenogénesis (*carA*). Se sospechaba, por tanto, que aún quedaban por descubrir otros genes específicos de la fotoforogénesis. En este trabajo se presenta un método que nos ha permitido obtener nuevos mutantes de la fotoforogénesis distintos a los ya conocidos.

Nuestro protocolo para la selección de mutantes de la fotoforogénesis está basado en las condiciones de cultivo propuestas por Corrochano y Cerdá-Olmedo (1988) para la investigación de la fotoforogénesis, que dan resultados claros y cuantitativos. Para la selección de los mutantes cultivamos diez mil

esporas por caja, en lugar de cien mil, lo que permitió un mayor tamaño de los micelios y facilitó la identificación de las colonias mutantes. En la selección de los mutantes empleamos luz continua en lugar de destellos por varias razones. La luz continua permite inhibir totalmente la producción de micróforos en la estirpe silvestre, lo que hace destacar más a las colonias mutantes; los destellos inducen una respuesta parcial que, incluso a la máxima intensidad de luz, no inhibe totalmente la microforogénesis. Por otra parte, los destellos solo son efectivos cuando se aplican en el periodo en que los micelios son competentes a la luz. El empleo de destellos podría llevar al aislamiento de mutantes con cambios en el periodo de competencia y, entre ellos, los que crecieran lentamente. La iluminación continua nos aseguraba que todos los micelios recibirían la luz durante su periodo de máxima competencia.

Nuestro método para aislar colonias que producen micróforos no discrimina entre mutantes de la fotoforogénesis y mutantes superproductores de micróforos, con respuesta normal a la luz pero con más micróforos que el tipo silvestre a cualquier intensidad luminosa. De hecho, de los nueve mutantes aislados, únicamente tres fueron mutantes de la fotoforogénesis. Todos los mutantes produjeron más micróforos en la oscuridad que la estirpe silvestre. Como se menciona en la introducción a este capítulo, existen varios factores, además de la luz, que regulan la forogénesis de *Phycomyces*. Es de esperar por tanto la aparición de estirpes con mutaciones que afecten a la forogénesis pero no a la fotoforogénesis, entre ellas, por ejemplo, estirpes superproductoras de micróforos. Algunos mutantes de la carotenogénesis que presentan una fotoforogénesis normal difieren mucho del tipo silvestre en la producción de macróforos y micróforos (Corrochano y Cerdá-Olmedo, 1990 b).

Todos los mutantes *pim* estaban alterados en el umbral mínimo de sensibilidad a la luz de la fotomicroforogénesis, pero no en el de la fotomacroforogénesis, lo que indica que ambas son respuestas independientes.

Los tres mutantes *pim* tenían fenotipos distintos. Las estirpes S601 y S603 tenían muy retrasado el periodo de competencia a la luz. Es probable que este fenotipo refleje un retraso del crecimiento, no relacionado con la alteración de la fotoforogénesis. Tras una mutagénesis masiva es habitual la aparición de estirpes con mutaciones que provocan un crecimiento lento.

La estirpe S603 presentó alteraciones en la fotocarotenogénesis. Probablemente este mutante carece del componente que responde a intensidades luminosas bajas (Bejarano *et al.*, 1991), ya que la pendiente de la curva de inducción a alta intensidad luminosa es semejante en el mutante y en

el silvestre. Las estirpes S601 y S602 posiblemente también están afectadas en la fotocarotenogénesis, ya que presentan valores de inducción ligeramente más bajos que en el silvestre y en la estirpe C21.

Las mutaciones *pim* afectaban a la percepción de la luz por el micelio, pero no por los esporangióforos. Todos presentaron cambios en la sensibilidad a la luz para la microforogénesis, pero no para la macroforogénesis. Los errores experimentales en la determinación de la macroforogénesis no nos permiten confirmar si las diferencias observadas entre algunos parámetros de la macroforogénesis del silvestre y los mutantes son reales.

Los nuevos mutantes *pim* eran distintos de los otros mutantes de la fotoforogénesis ya conocidos (*madA*, *madB* y *carA*), ya que tenían un fototropismo normal y sintetizaban β -caroteno. Al menos *pim-3*, igual que ocurre con las mutaciones en el gen *carA*, afectaba tanto a la fotocarotenogénesis como a la fotoforogénesis, pero no al fototropismo del esporangióforo.

Nuestras condiciones de escrutinio favorecen la detección de los mutantes con un fenotipo más extremo, esto es, los que produzcan más micróforos en la luz. Los tres mutantes *pim* que hemos encontrado tienen defectos leves en la fotoforogénesis y ninguno de ellos es totalmente insensible a la luz. No se puede concluir, sin embargo, que no puedan aparecer mutantes con un fenotipo más extremo. Es necesario tener en cuenta que nuestra búsqueda de mutantes ha sido parcial y que en un escrutinio exhaustivo sería de esperar el aislamiento de mutantes *madA*, *madB* y *carA*. Es de suponer que la aplicación de nuestro método permita el descubrimiento de nuevos tipos de mutantes de la fotoforogénesis.

3

***Mutantes resistentes a
diaminobutanona***

3.1 INTRODUCCIÓN

Las poliaminas son compuestos nitrogenados policatiónicos de bajo peso molecular presentes en las células de todos los organismos y esenciales para el crecimiento (Tabor y Tabor, 1985; Davis, 1996). Las más comunes son la putrescina, la espermidina y la espermina.

Aunque se conoce con detalle la ruta de síntesis de las poliaminas de varios organismos y su regulación, aún se desconoce la función de las poliaminas en la célula. Muchos procesos fisiológicos, como la proliferación y la diferenciación celular, conllevan bruscas alteraciones en la síntesis de poliaminas. Se sospecha que las poliaminas juegan un papel determinante en el crecimiento, el desarrollo y el cáncer.

3.1.1 La ruta biosintética

En los animales y los hongos la ornitina es el único sustrato para la síntesis de poliaminas (fig. 11). La ornitina se sintetiza a partir de glutamato y es sustrato también para la síntesis de arginina. En *Neurospora* la acumulación de arginina inhibe la síntesis de ornitina a partir del glutamato. La ornitina se sintetiza entonces a partir de la arginina, en una reacción catalizada por la arginasa (Davis, 1996). Las plantas y las bacterias pueden utilizar agmatina en lugar de ornitina como sustrato de la ruta. La agmatina se sintetiza a partir de la arginina por la descarboxilasa de la arginina. En las plantas se utiliza uno u otro sustrato dependiendo de múltiples factores como el tipo celular, el estadio de desarrollo o las condiciones de crecimiento (Stevens y Winther, 1979).

La descarboxilasa de la ornitina, primera enzima de la ruta y punto clave en su regulación, convierte la ornitina en putrescina. A partir de putrescina se sintetizan sucesivamente espermidina y espermina, añadiéndose al sustrato en

cada paso un grupo aminopropilo procedente de S-adenosilmetionina descarboxilada (fig. 11). La S-adenosilmetionina descarboxilada es producida por la descarboxilasa de la S-adenosilmetionina, otra de las enzimas clave de la ruta (Tabor y Tabor, 1985; Glansdorff, 1987; Tiburcio *et al.*, 1990; Pitkin y Davis, 1990).

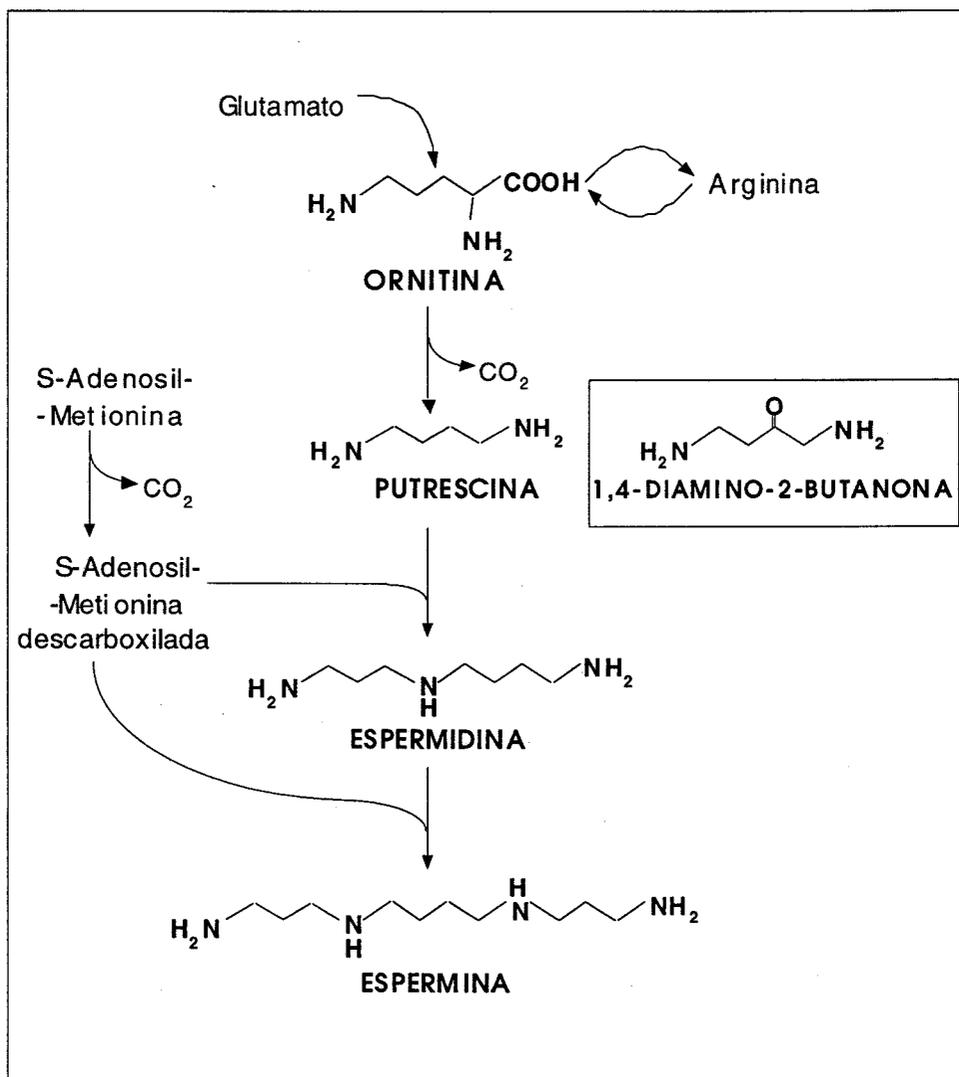


Figura 11. Esquema de la ruta de biosíntesis de poliaminas en hongos.

Las poliaminas son productos finales del metabolismo con función propia y, como tales, se acumulan hasta los niveles requeridos por la célula. Solo una baja proporción de las poliaminas se utiliza como sustrato para la síntesis de otros compuestos (Davis y Ristow, 1988, 1989; Davis *et al.*, 1991).

En la naturaleza, las poliaminas no sólo aparecen en forma de bases libres, sino también conjugadas, con péptidos, aminoácidos, antibióticos, etc. En las plantas existe una gran variedad de derivados de poliaminas, en su gran mayoría exclusivos de cada especie y probablemente con funciones distintas en cada caso (Tiburcio *et al.*, 1990). En las células vegetales, una fracción importante de las poliaminas aparece unida covalentemente a estructuras celulares, ya sean de pequeño tamaño (solubles en ácido tricloroacético), o grandes (insolubles). El contenido de poliaminas de estas fracciones varía durante el crecimiento (Torrighiani *et al.*, 1989).

3.1.2 Regulación de la ruta

En todos los organismos los niveles de síntesis de poliaminas varían según las condiciones de crecimiento o el estadio de desarrollo. En *Escherichia coli* la síntesis de poliaminas depende de la composición del medio de cultivo, el pH y la presión osmótica (Tabor y Tabor, 1985; Glansdorff, 1987). Durante la germinación de las esporas de los hongos la síntesis de poliaminas aumenta rápidamente, para descender de nuevo a niveles basales. En algunos hongos la síntesis de poliaminas aumenta transitoriamente durante los cambios de una etapa a otra del desarrollo (Stevens y Winther, 1979; Ruiz-Herrera, 1994). En los animales y las plantas la actividad biosintética suele variar en los diferentes órganos y tejidos. Un incremento transitorio en la síntesis de poliaminas precede usualmente a la inducción de la división celular en los tejidos en regeneración o estimulados por hormonas. Durante el ciclo celular, hay más poliaminas en el estadio G1 que en G2 y mitosis (Evans y Malmberg, 1989; Tiburcio *et al.*, 1990; Davis *et al.*, 1992).

La regulación de la ruta recae principalmente sobre la descarboxilasa de la ornitina, la descarboxilasa de la S-adenosilmetionina y la N'-acetiltransferasa de la espermidina y la espermina, actividad que interviene en los procesos de degradación e interconversión de poliaminas (Pegg, 1986; Heby y Persson, 1990).

En los últimos años se ha clonado el gen de la descarboxilasa de la ornitina de varios organismos, entre ellos *Escherichia*, *Saccharomyces*, *Neurospora*, *Drosophila*, *Caenorhabditis*, *Mus* y *Homo* (Macrae *et al.* 1995). Su secuencia es muy parecida en los distintos eucariontes pero difiere significativamente de la de *E. coli*.

La expresión de la descarboxilasa de la ornitina está sujeta a una regulación compleja (Pegg, 1986; Heby y Persson, 1990; Pitkin *et al.*, 1994). La transcripción del gen está regulada por secuencias específicas del promotor. La parte significativa del ARNm va precedida de una larga secuencia que, en función de la concentración de poliaminas en la célula, controla la estabilidad del mensajero y su acceso al ribosoma. La proteína suele presentar una o varias secuencias PEST, ricas en los aminoácidos P (prolina), E (glutámico), S (serina) y T (treonina), típicas de enzimas con alta tasa de recambio. Tanto en bacterias como en animales y plantas han sido identificadas otras proteínas llamadas "antizimas" que, inducidas por una alta concentración de poliaminas, se unen a la descarboxilasa de la ornitina y facilitan su degradación. Estas antizimas no se han encontrado sin embargo en eucariontes inferiores como *Saccharomyces* (Tabor y Tabor, 1985; Matsufuji *et al.*, 1995; Hayashi *et al.*, 1996). No se conocen casos de retroinhibición alostérica por producto final (Davis *et al.*, 1992).

La regulación de las actividades descarboxilasa de la S-adenosilmetionina y N'-acetiltransferasa de la espermidina y la espermina se ha investigado principalmente en animales. La concentración interna de poliaminas y el estado de crecimiento de la célula condicionan la transcripción, la traducción y la estabilidad de estas enzimas. Ambas actividades están, sin embargo, reguladas de forma opuesta y, así, las condiciones que activan la acetiltransferasa suelen inhibir la descarboxilasa de la S-adenosilmetionina, y al contrario (Pegg, 1986; Heby y Persson, 1990).

Las investigaciones sobre la regulación de la biosíntesis de poliaminas en varios organismos han llevado a un resultado paradójico. A pesar de que la ruta biosintética parece sometida a una regulación muy elaborada y compleja, la modificación drástica de la composición de poliaminas de la célula por mutación o por inhibidores específicos no tiene, en muchos casos, efecto alguno sobre el crecimiento (Davis *et al.*, 1992; Pitkin *et al.*, 1994).

3.1.3 Transporte y degradación

La mayoría de los organismos transportan las poliaminas al interior de la célula utilizando varios sistemas distintos. En muchos casos el transporte no es saturable o presenta muy baja afinidad por las poliaminas, y, probablemente, se produce por difusión a través de las membranas, de las interfases de lípidos y proteínas o de transportadores especializados en otras moléculas. En otros casos, el transporte es activo, dependiente del potencial de membrana e inhibible por distintos cationes o, de forma competitiva, por las diferentes poliaminas. A veces, en una misma célula aparecen varios transportadores con distinta afinidad por las distintas poliaminas (Davis y Ristow, 1988, 1989). *E. coli* tiene dos operones con los genes estructurales de sendos sistemas transportadores de poliaminas, con mayor afinidad el uno por la putrescina y el otro por la espermidina (Pistocchi *et al.*, 1993).

Las poliaminas se catabolizan a través de oxidaciones y transaminaciones que reciclan su carbono y su nitrógeno. La espermidina y la espermina pueden ser oxidadas hasta 1,3-diaminopropano y pirrolina o 1,3-diaminopropano y 1-(3-aminopropil)-pirrolina respectivamente. La putrescina se oxida también a pirrolina, que se transforma en ácido γ -aminobutírico y pasa al ciclo de Krebs. La mayoría de las enzimas responsables de la oxidación de las poliaminas han sido identificadas en microorganismos, animales y plantas (Yamada *et al.*, 1980; Pegg, 1986; Tiburcio *et al.*, 1990).

3.1.4 El papel de las poliaminas en la célula

Las poliaminas son esenciales para el crecimiento y la diferenciación. Los mutantes que no las sintetizan no crecen o lo hacen muy lentamente, y recuperan la normalidad en medios de cultivo suplementados con poliaminas. En los organismos pluricelulares, la inhibición de la síntesis de poliaminas durante el crecimiento suele provocar alteraciones en la pauta de desarrollo o en los procesos de diferenciación celular (Davis, 1996).

Por su carácter catiónico las poliaminas se unen a los constituyentes aniónicos celulares, principalmente el ARN (ribosomas, ARNm y ARNt), el ADN y los fosfolípidos de membranas. Probablemente una de sus funciones sea estabilizar estas estructuras neutralizando su carga eléctrica (Davis, 1996). La concentración de poliaminas libres (la fracción de poliaminas que regula la actividad de la ruta) depende de la disponibilidad de sitios de unión, que varía

según el estado de crecimiento de la célula, por ejemplo, a través de los niveles de ARN ribosómico y de agua, que a su vez depende de la presión osmótica externa (Davis *et al.*, 1992).

Las poliaminas intervienen en la modificación del factor eucariótico de iniciación de la traducción eIF-4D. En este proceso, un grupo aminobutilo de la espermidina se transfiere a un residuo de lisina de la proteína eIF-4D para formar el aminoácido hipusina. Esta modificación del eIF-4D es esencial y aparece en una gran variedad de organismos distintos. No se conoce ninguna otra proteína que contenga hipusina (Pegg, 1986).

Las poliaminas intervienen también en la senescencia de las plantas. Cuando se colocan trozos de hoja en la oscuridad, los tejidos entran en un rápido proceso de senescencia que aumenta los niveles de ribonucleasas y proteasas y disminuye los de clorofila. La senescencia se inhibe mediante la adición de poliaminas y se retrasa con guazatina, un inhibidor de la oxidasa de poliaminas y, por tanto, del catabolismo de las poliaminas. La guazatina mejora la viabilidad de los protoplastos de algunas monocotiledóneas facilitando la proliferación celular y la morfogénesis (Tiburcio *et al.*, 1994).

En células humanas, la sobreexpresión de la descarboxilasa de la ornitina aumenta los niveles de apoptosis, mientras que su inhibición con difluorometilornitina los reduce. El gen de la descarboxilasa de la ornitina está regulado por la proteína C-myc, un factor de transcripción esencial en la regulación del ciclo celular, la apoptosis, la diferenciación y la proliferación. La sobreexpresión de c-myc provoca un aumento correlativo en la actividad descarboxilasa de la ornitina y en los niveles de apoptosis (Packham y Cleveland, 1994).

En los últimos años se ha puesto de manifiesto una estrecha relación entre el cáncer y el metabolismo de las poliaminas. El gen de la descarboxilasa de la ornitina es un protooncogén, ya que su sobreexpresión induce la carcinogénesis (Auvinen *et al.*, 1992). En muchos casos la transformación carcinogénica de un tejido produce una expresión constitutiva del gen de la descarboxilasa de la ornitina. La inhibición de la enzima, ya sea por inhibidores específicos o por la expresión de un ARNm antisentido, contrarresta el proceso canceroso.

Se han obtenido líneas celulares de hamster que dependen para su crecimiento de la adición de poliaminas al medio de cultivo. La ausencia de

poliaminas provoca una rápida desaparición de los filamentos de actina y de los microtúbulos sin afectar a los filamentos intermedios (Pohjanpelto *et al.*, 1981).

En las células nerviosas las poliaminas bloquean específicamente los canales rectificadores de corriente que reincorporan el potasio que sale de la célula durante la despolarización (Lopatin, 1994). Se han encontrado mutaciones en uno de estos canales que provocan alteraciones en el desarrollo del sistema nervioso de *Drosophila* (Slesinger *et al.*, 1996). Este tipo de canales aparece también en las células musculares. En *Drosophila* se han encontrado mutantes en una antizima de la descarboxilasa de la ornitina que presentan alteraciones en el desarrollo de los sistemas nervioso y muscular (Salzberg *et al.*, 1996).

Recientemente se ha publicado un hallazgo sorprendente que parece contradecir el papel esencial de las poliaminas en la proliferación celular: la disrupción del gen de la descarboxilasa de la ornitina en *Caenorhabditis elegans* no es letal, aunque disminuye algo la fertilidad. Los mutantes homocigóticos para el alelo nulo son, en apariencia, normales, pero tienen niveles indetectables de esta actividad enzimática. No se ha comprobado, sin embargo, si estos mutantes tienen poliaminas (Macrae *et al.*, 1995).

3.1.5 Las poliaminas en el desarrollo de los hongos Mucorales

El papel de las poliaminas en el desarrollo de los mucorales se deduce de los efectos de la diaminobutanona (Ruiz-Herrera, 1994). La diaminobutanona es un análogo sintético de la putrescina que inhibe la actividad de la descarboxilasa de la ornitina de varios hongos (Stevens *et al.*, 1977).

En *Mucor* la germinación se desarrolla en tres pasos sucesivos (Cano y Ruiz-Herrera, 1988). En el estadio *1a* las esporas, inicialmente elipsoidales, se redondean. En el estadio *1b* las esporas redondeadas aumentan su diámetro (crecimiento isodiamétrico). En el estadio *2*, el crecimiento se localiza en un punto y se forma el tubo germinal. La actividad descarboxilasa de la ornitina y la concentración intracelular de poliaminas aumentan en *M. rouxii* y *M. bacilliformis* en el estadio *1b* (Calvo-Méndez *et al.*, 1987). En *M. rouxii*, la diaminobutanona impide el aumento de la actividad descarboxilasa de la ornitina y de la concentración intracelular de poliaminas y las esporas detienen su desarrollo antes de formar el tubo germinal. Sin embargo, el crecimiento continúa durante algún tiempo y las esporas alcanzan un diámetro 2-3 veces mayor que el alcanzado en el estadio *1b* normal (Ruiz-Herrera y Calvo-Méndez, 1987), con importantes alteraciones morfológicas intracelulares (Obregón *et al.*,

1990). Si la diaminobutanona se añade después del estadio *1b*, no tiene efecto sobre el crecimiento. La inhibición por diaminobutanona es reversible por putrescina, pero no por espermidina o espermina. La diaminobutanona inhibe la germinación en otros mucorales, como *Phycomyces* (Ruiz-Herrera y Calvo-Méndez, 1987).

Muchos hongos, entre ellos varios mucorales, son dimórficos, es decir, pueden crecer como levaduras o como filamentos miceliares. En *M. rouxii*, *M. moniliformis* y *M. racemosus*, el paso de la forma de levadura a la de micelio aumenta la actividad descarboxilasa de la ornitina y la concentración intracelular de poliaminas (Calvo-Méndez *et al.*, 1987; Inderlied *et al.*, 1980). En *M. rouxii*, la diaminobutanona inhibe el aumento en la síntesis de poliaminas y el cambio de una forma de crecimiento a otra, sin afectar sensiblemente la tasa de crecimiento del cultivo (Martínez-Pacheco *et al.*, 1989). El mismo fenómeno ocurre también en hongos dimórficos no mucorales como *Candida albicans* o *Yarrowia lipolytica* (Martínez *et al.*, 1990; Guevara-Olvera *et al.*, 1993).

En *M. rouxii* y en *Phycomyces* la síntesis de poliaminas aumenta en los micelios algunas horas antes de la aparición de los esporangióforos. La diaminobutanona, añadida al medio de cultivo antes de que se produzca ese aumento, inhibe el desarrollo de los esporangióforos (Reyna-López y Ruiz-Herrera, 1993).

En *M. rouxii*, la diaminobutanona, incluso a muy altas concentraciones, no elimina totalmente las poliaminas de la célula, ni detiene su crecimiento, aunque, a esas mismas concentraciones, inhibe *in vitro* la actividad descarboxilasa de la ornitina en más del 90 % (Martínez-Pacheco y Ruiz-Herrera, 1993). Tras una lisis suave de los protoplastos, la actividad sedimenta en las fracciones enriquecidas en orgánulos celulares, pero se hace soluble cuando la lisis es drástica. La actividad descarboxilasa de la ornitina es mayor y sus inhibidores son más efectivos en las células permeabilizadas con tolueno que en las permeabilizadas con un agente más débil, DEAE-dextrano, que preserva la integridad de las membranas internas. Se ha propuesto que la descarboxilasa de la ornitina se localiza en la célula en dos lugares distintos. Un compartimento accesible a la diaminobutanona contendría la fracción responsable de los incrementos de actividad durante la diferenciación. En el otro, inaccesible a la diaminobutanona, se encontraría la fracción responsable de la síntesis basal de poliaminas que sustenta el crecimiento vegetativo (Martínez-Pacheco y Ruiz-Herrera, 1993).

En los mucorales, las poliaminas podrían estar relacionadas con el control de la expresión génica por metilación del ADN. El ADN hipermetilado no se transcribe y la expresión génica durante el desarrollo de los hongos podría estar controlada por el grado de metilación de su ADN (Antequera *et al.*, 1984; Magill y Magill, 1989). En *M. rouxii* y en *Phycomyces* el ADN de la espora está más metilado que el del micelio (Antequera *et al.*, 1985). Las esporas de *M. rouxii* inhibidas por diaminobutanona, que crecen de forma isodiamétrica durante algún tiempo, mantienen hipermetilado su ADN (Cano *et al.*, 1988). La 5-azacitidina, un inhibidor de la metilación del ADN, revierte la inhibición de la germinación de las esporas de *M. rouxii* por la diaminobutanona (Cano *et al.*, 1988; Reyna-López y Ruiz-Herrera, 1993). En *Yarrowia lipolytica*, la 5-azacitidina revierte la inhibición de la transición dimórfica por diaminobutanona (Guevara-Olvera *et al.*, 1993). A concentraciones fisiológicas la poliaminas inhiben específicamente la actividad *in vitro* de ciertas metilasas de los residuos de citosina del ADN (Ruiz-Herrera *et al.*, 1995).

En *Phycomyces* la descarboxilasa de la ornitina, purificada parcialmente, presenta propiedades semejantes a las de otros hongos. La actividad es máxima en micelio en crecimiento activo e indetectable en los esporangióforos. En cultivos líquidos de 48 horas de edad iluminados durante 4 horas, la actividad aumenta hasta el 50% sobre el nivel en la oscuridad. Sin embargo, si los micelios se iluminan continuamente desde la inoculación del cultivo, no aparecen diferencias entre luz y oscuridad (Lapointe y Cohen, 1983). Las poliaminas podrían mediar el efecto de la luz en la morfogénesis.

3.1.6 Objetivos

Aunque se desconozcan los detalles, resulta evidente que las poliaminas están implicadas en el control del desarrollo en multitud de organismos distintos. En algunos hongos, entre ellos los mucorales, la diaminobutanona resulta un instrumento muy eficaz para investigar el papel de las poliaminas en el desarrollo, puesto que parece inhibir el desarrollo sin afectar al crecimiento.

Nuestro objetivo es utilizar la diaminobutanona para investigar el papel de las poliaminas en el control de la forogénesis y el desarrollo en general de *Phycomyces*.

Por una parte nos propusimos investigar los efectos que provoca la diaminobutanona sobre el desarrollo y el crecimiento de la estirpe silvestre de *Phycomyces*. Por otra parte buscamos mutantes resistentes a

diaminobutanona. Estos mutantes deberían completar su desarrollo en presencia del inhibidor y, por tanto, tendrían alterados, presumiblemente, algunos de los genes que median la síntesis y la acción de las poliaminas en *Phycomyces*.

3.2 RESULTADOS

3.2.1 Efectos de la diaminobutanona en el desarrollo y el crecimiento de *Phycomyces*

Como había sido descrito anteriormente (Ruiz-Herrera y Calvo-Méndez, 1987) la diaminobutanona (1 mM) inhibió el crecimiento de la estirpe silvestre de *Phycomyces*. Al microscopio se observó que, en su presencia, las esporas no llegaban a formar micelios ramificados, sino que detenían su crecimiento en las etapas iniciales del desarrollo. A los 6 días en presencia de diaminobutanona, se encontraban células hinchadas y esféricas, y células con tubo germinal no ramificado o con una o dos ramificaciones (fig. 12). Estas células eran muy opacas, presumiblemente porque acumulaban algo que dispersaba la luz. Los cultivos sin diaminobutanona alcanzaban su fase estacionaria varios días antes.

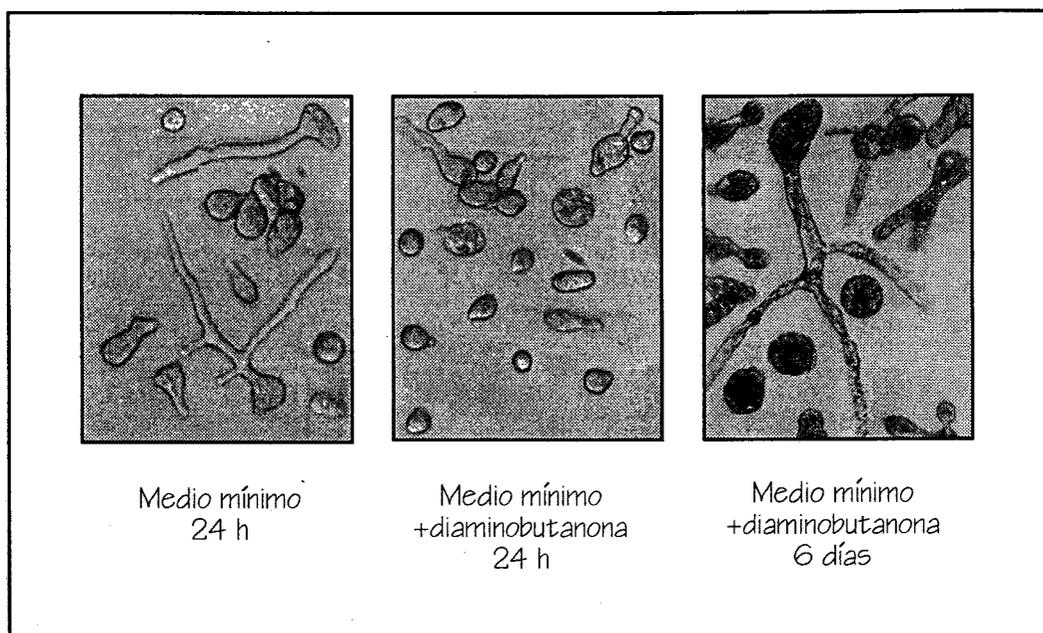


Figura 12. Efecto de la diaminobutanona (1 mM) en la germinación de las esporas.

Para establecer si la diaminobutanona es un inhibidor específico de la transición entre las distintas etapas del desarrollo de *Phycomyces*, decidimos determinar su efecto en cultivos de distintas edades.

Añadida a cultivos de más de 20 h de edad en medio líquido la diaminobutanona no modificó la masa miceliar alcanzada varios días después (fig. 13). Los cultivos más jóvenes aumentaron su masa miceliar en presencia de diaminobutanona, pero menos que los testigos sin tratar. La diaminobutanona inhibió el crecimiento incluso tras la germinación, como se observa, por ejemplo, en los cultivos de 8 a 16 h de edad (consideramos germinación al inicio del crecimiento esférico en las esporas).

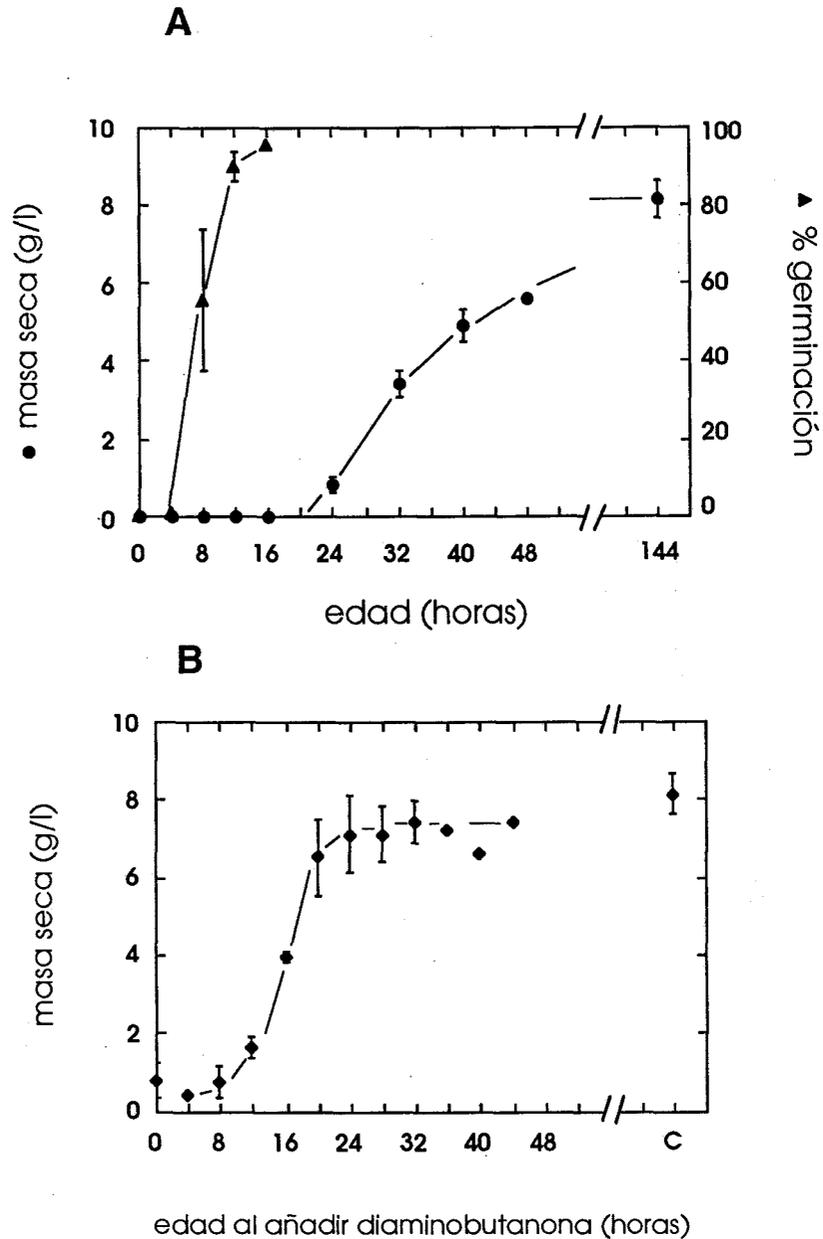


Figura 13. Inhibición por diaminobutanona del crecimiento en medio líquido en función del estado de crecimiento del cultivo. **(A)** Evolución de la masa seca de micelio y del porcentaje de germinación de las esporas en cultivos no tratados. **(B)** Masa seca alcanzada a los 6 días por cultivos expuestos a diaminobutanona (1 mM) a partir del momento indicado en abscisas (C= cultivo testigo sin diaminobutanona). Todos los cultivos se realizaron en 5 ml de medio mínimo líquido inoculados con 10^5 esporas por ml de la estirpe silvestre.

También en medio sólido la diaminobutanona tenía distintos efectos sobre el crecimiento dependiendo de la edad del cultivo (fig. 14 B). Los cultivos que se expusieron a la diaminobutanona cuando tenían menos de 20 h de edad no alcanzaron una masa apreciable. Aquellos que se expusieron a la diaminobutanona cuando tenían entre 20 y 32 h de edad crecieron, pero no llegaron a formar esporangióforos tras seis días de incubación. Los cultivos que entraron en contacto con la diaminobutanona cuando tenían más de 36 h de edad completaron su desarrollo antes de los seis días. El crecimiento en presencia de diaminobutanona mimetiza la pauta de crecimiento normal (fig. 14A), es decir, la diaminobutanona no altera el programa de desarrollo normal de *Phycomyces*, sino que lo retrasa drásticamente. Algunos cultivos con diaminobutanona (fig. 14B) alcanzaron una masa seca final mayor que la de los testigos (fig. 14A). Este efecto se debe a que el paso del micelio a medio con diaminobutanona supone también el paso a medio con nuevos nutrientes.

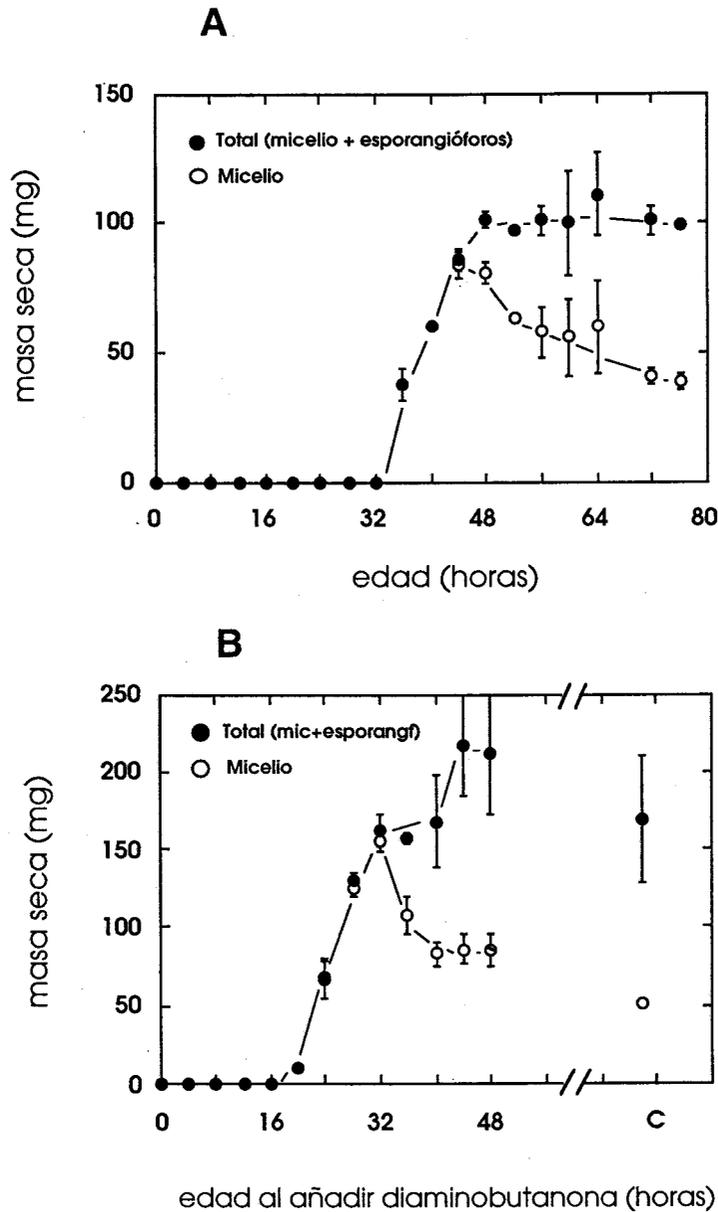


Figura 14. Inhibición por diaminobutanona del crecimiento en medio sólido en función del estado de crecimiento del cultivo. **(A)** Evolución de la masa seca del micelio y los esporangióforos en cultivos no tratados. **(B)** Masa seca alcanzada a los 6 días por cultivos pasados a medio con diaminobutanona (1 mM) a partir del momento indicado en abscisas (C= cultivo testigo sin diaminobutanona). Todos los cultivos se realizaron inoculando 10^5 esporas de la estirpe silvestre sobre papel de celofán en cajas de agar mínimo.

Para comprobar si la diaminobutanona en *Phycomyces* inhibe el crecimiento o la transición entre las distintas etapas del desarrollo, determinamos su efecto sobre el crecimiento del micelio en una superficie de agar, que es un proceso aparentemente homogéneo. Los micelios dejaron de crecer aproximadamente 24 h después de su paso a medio con diaminobutanona 1 mM (fig. 15). Se llegó a la misma conclusión cuando en estos cultivos consideramos la masa seca de micelio y esporangióforos en lugar del diámetro de la colonia. Los micelios crecieron en distinto grado cuando se cultivaron en presencia de concentraciones menores de diaminobutanona. En todos los casos estos micelios produjeron esporangióforos. No se encontró una concentración de diaminobutanona que inhibiera el desarrollo de los esporangióforos sin afectar al crecimiento del micelio.

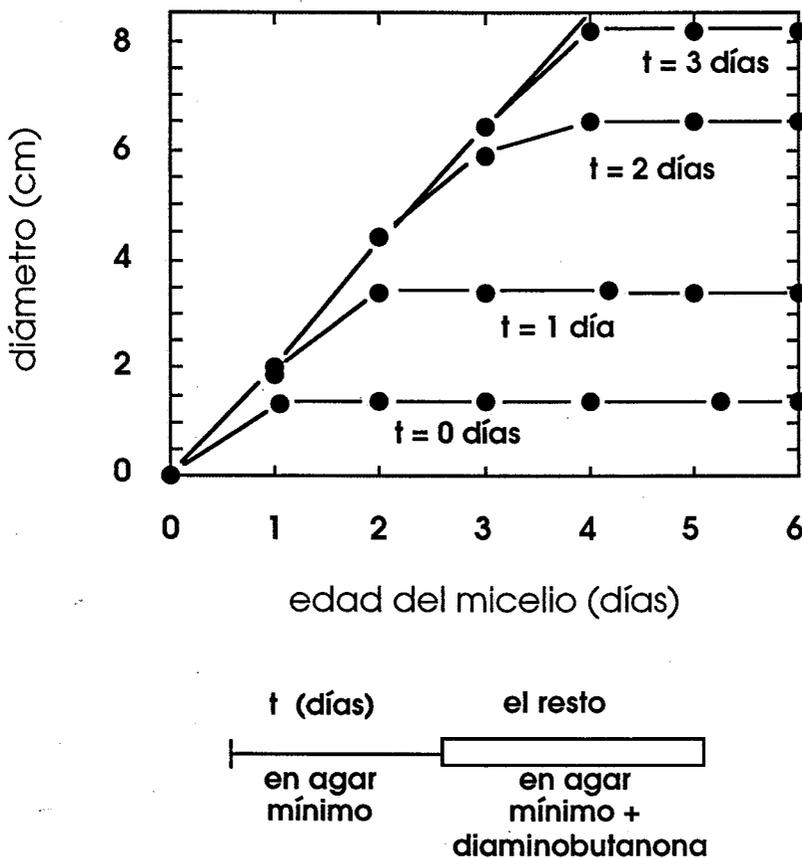


Figura 15. Inhibición por diaminobutanona de la expansión micelial (diámetro de la colonia). Se inocularon fragmentos de micelio en crecimiento de la estirpe silvestre en el centro de un disco de papel de celofán colocado sobre agar mínimo en una caja de 8,5 cm de diámetro y se midió el diámetro en los días siguientes. En el momento t , el papel de celofán con el cultivo se pasó a una nueva caja de medio mínimo con diaminobutanona 1 mM.

3.2.2 Antagonistas de la inhibición por diaminobutanona

La putrescina se comportó como un potente antagonista de la diaminobutanona. En medio mínimo con putrescina y diaminobutanona el crecimiento de los cultivos era indistinguible del observado en medio mínimo no suplementado. No crecieron, sin embargo, los cultivos que contenían únicamente diaminobutanona (tabla 1). La espermidina, la segunda poliamina de *Phycomyces* por su abundancia, fué menos efectiva. La 5-azacitidina entró en la célula e inhibió parcialmente el crecimiento, pero no contrarrestó el efecto de la diaminobutanona.

Tabla 1. Antagonistas de la diaminobutanona. Los cultivos se realizaron en 5 ml medio mínimo líquido inoculado con unas 10^3 esporas/ml de la estirpe silvestre. La concentración final de diaminobutanona y putrescina fué 1 mM, y la de 5-azacitidina, 5 mM. Cada valor representa la media de al menos dos determinaciones.

Suplementos	Masa seca (g/l)	
	a los 2 días	a los 7 días
ninguno	4,8	7,6
diaminobutanona	0	0
putrescina	4,8	7,5
diaminobutanona + putrescina	4,6	7,0
espermidina	4,4	7,5
diaminobutanona+espermidina	0,4	7,4
5-azacitidina	0	6,7
diaminobutanona + 5-azacitidina	0	0

3.2.3 Aislamiento de mutantes resistentes a diaminobutanona

Se obtuvieron mutantes resistentes a diaminobutanona 1 mM a partir de esporas del heterocarionte C2 * S213 tratadas con N-metil-N'-nitro-N-nitroso-guanidina según el procedimiento descrito por Roncero *et al.* (1984). Este método produce suspensiones de esporas con una alta tasa de mutación en sus núcleos, que provienen principalmente de los núcleos S213 del heterocarionte.

En cajas de agar mínimo con diaminobutanona 1 mM se sembraron cuatro suspensiones independientes de esporas mutagenizadas, a razón de unas 4×10^5 esporas por caja. A los 8 días de incubación a 22 °C en cada caja destacaban unas 5 colonias sobre un fondo de crecimiento débil.

Las colonias mayores se subcultivaron a través de esporas al menos dos veces más en las mismas condiciones. Finalmente se seleccionó una sola colonia procedente de cada suspensión de esporas mutagenizadas. Estas estirpes mutantes se denominaron S621, S622, S623 y S624, y las mutaciones respectivas *dab-1*, *dab-2*, *dab-3* y *dab-4*. En virtud del método utilizado, las cuatro estirpes son producto de mutaciones independientes.

3.2.4 Características fenotípicas de los mutantes *dab*

3.2.4.1 Resistencia a diaminobutanona

Los mutantes *dab* resistían concentraciones de diaminobutanona entre 10 y 100 veces mayor que el tipo silvestre (fig. 16). Las estirpes S623 y S624 eran más resistentes que las estirpes S621 y S622. Aquellas alcanzaron la fase estacionaria tras doce días de crecimiento en presencia de diaminobutanona 3 mM y crecieron poco en 10 mM. Las otras crecieron bien en diaminobutanona 1 mM, poco en 3 mM y nada en 10 mM. Estas determinaciones se hicieron en cultivos inoculados con un bajo número de esporas (unas mil por ml), ya que mayores concentraciones de esporas favorecerían la aparición espontánea de micelios resistentes en los cultivos de la estirpe silvestre. Los cultivos requerían un tiempo de incubación largo porque los mutantes *dab* crecían lentamente en presencia de diaminobutanona. Al igual que ocurría con la estirpe silvestre (ver tabla 1), la putrescina revertía el efecto inhibitorio de la diaminobutanona en los mutantes *dab*.

La resistencia a diaminobutanona presentó también distinto grado de penetrancia en los distintos mutantes: sólo el 14 % de las esporas de S621 formaban colonias en agar mínimo con diaminobutanona 1 mM; en S622 lo hacían el 17 %, en S623 el 70 % y en S624 el 88 %.

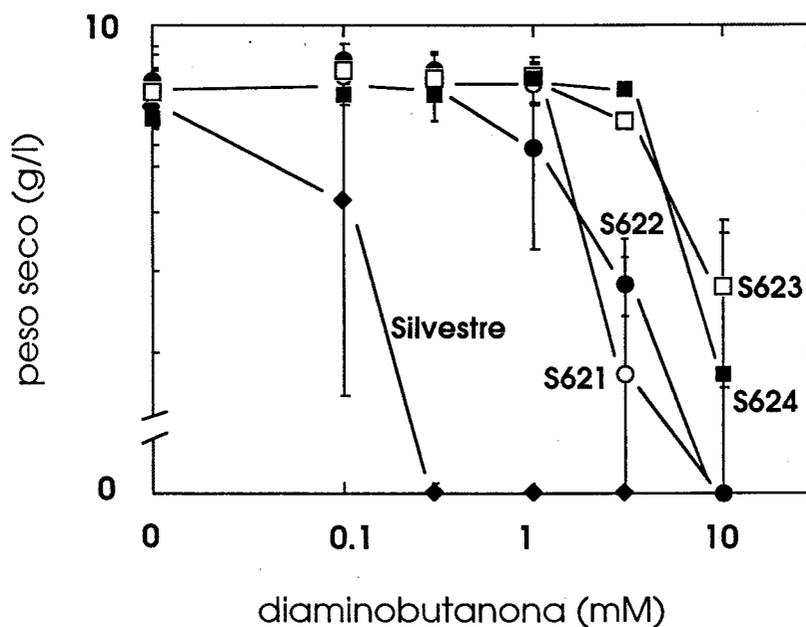


Figura 16. Crecimiento del tipo silvestre y los mutantes *dab* en presencia de diaminobutanona. Masa miceliar desarrollada a los 12 días de cultivo en 5 ml de medio mínimo líquido inoculado con 10^3 esporas por ml.

3.2.4.2 Concentración de poliaminas en los mutantes *dab*

La concentración de poliaminas en cada mutante se analizó por cromatografía en capa fina. Esta técnica permitió separar claramente la ornitina, la putrescina y la espermidina presentes en los micelios de 48 h de edad (fig. 17). No se encontraron niveles detectables de espermina. En la parte superior de cada carril apareció la banda del agente derivante, el cloruro de dansilo. También aparecieron otras bandas no identificadas.

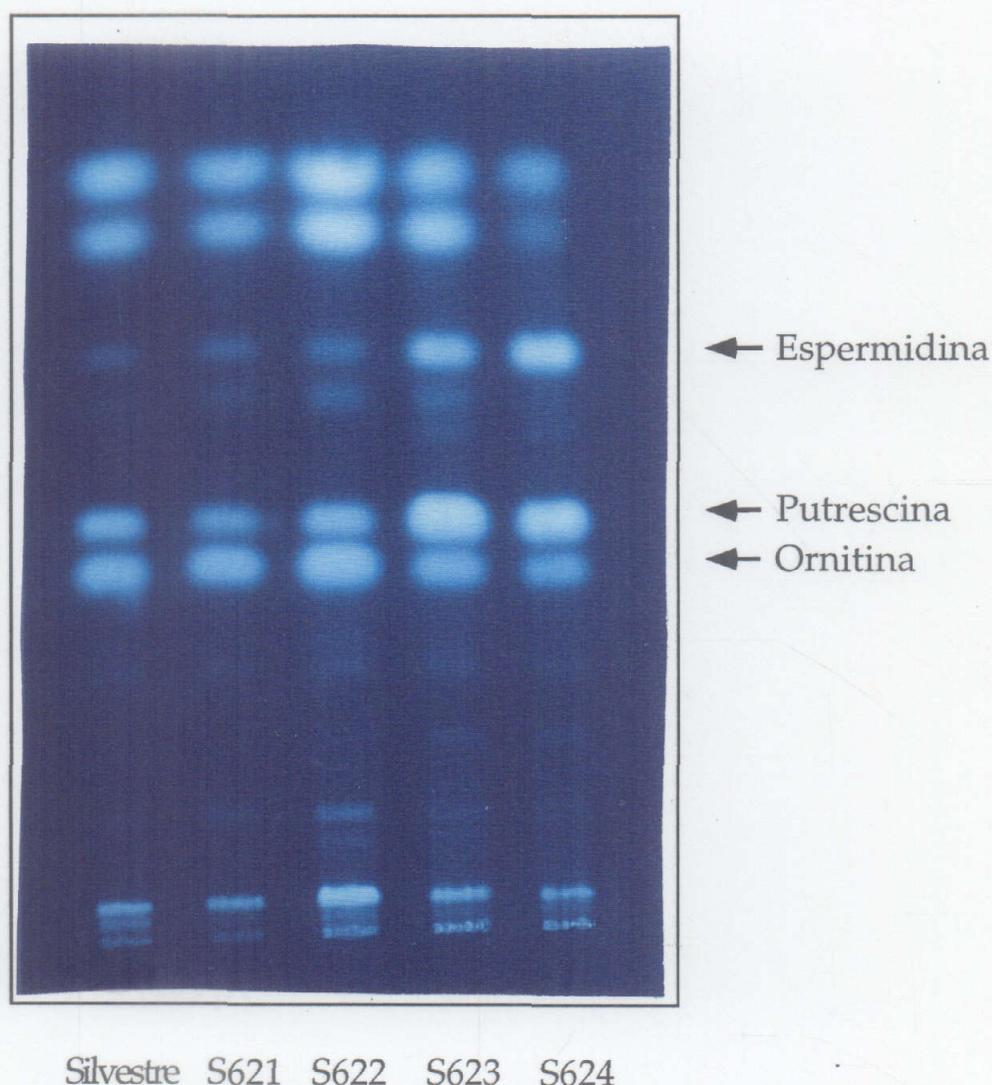


Figura 17. Cromatografía en capa fina de las poliaminas presentes en la estirpe silvestre y en los mutantes *dab* cultivados durante 48 h en agar mínimo. En cada carril se cargó el extracto de poliaminas procedente de 12 μ g de masa seca de micelio.

Dos mutantes, S621 y S622, presentaron concentraciones de putrescina similares a la del silvestre, aunque algo más bajas en S621 (tabla 2). Los otros dos, S623 y S624, presentaron entre 2 y 4 veces más putrescina que la estirpe silvestre, pero menos ornitina. La relación molar de la putrescina a la ornitina está próxima al 4% en las estirpes silvestre, S621 y S622 y es mucho mayor en S623 (21 %) y en S624 (40 %) (tabla 2). Estos datos sugieren que las estirpes S623 y S624 tienen más actividad descarboxilasa de la ornitina que el tipo silvestre y los otros dos mutantes.

Tabla 2. Concentración de poliaminas ($\mu\text{moles g}^{-1}$ de masa seca) en la estirpe silvestre y en los mutantes *dab* cultivados durante 48 h en agar mínimo.

Estirpes	Ornitina	Putrescina	Espermidina
Silvestre	221 \pm 15	11 \pm 2	1 \pm 0.4
S621	127 \pm 53	5 \pm 1	1 \pm 0.3
S622	274 \pm 15	9 \pm 1	2 \pm 1
S623	190 \pm 56	40 \pm 7	2 \pm 1
S624	62 \pm 12	25 \pm 8	2 \pm 1

En presencia de diaminobutanona la concentración interna de diaminobutanona encontrada en los mutantes fue igual o incluso mayor que la que se encontró en la estirpe silvestre, lo que sugiere que la resistencia a diaminobutanona no se debe a una deficiencia en la entrada del inhibidor a la célula (Tabla 3). En estas condiciones de cultivo se encontraron cantidades netas de ornitina y de poliaminas distintas de las encontradas en los cultivos sin diaminobutanona (tabla 2). Sin embargo, la cantidad relativa de putrescina respecto a ornitina seguía siendo más alta en las estirpes S623 y S624 que en las estirpes S621, S622 y silvestre.

Tabla 3. Concentración de poliaminas ($\mu\text{mol g}^{-1}$ de masa seca) en la estirpe silvestre y en los mutantes *dab* cultivados en agar mínimo durante 24 h, y en agar mínimo con diaminobutanona (1 mM) durante 40 h más.

Estirpes	Ornitina	Putrescina	Espermidina	Diamino- butanona
Silvestre	103 \pm 20	5 \pm 0.8	0.4 \pm 0.01	8 \pm 0.3
S621	121 \pm 27	4 \pm 0	0.4 \pm 0.1	5 \pm 1.2
S622	131 \pm 0.8	4 \pm 1	0.5 \pm 0.1	7 \pm 0.7
S623	230	25	0.8	36
S624	174 \pm 11	15 \pm 0.6	0.6 \pm 0.2	23 \pm 2

3.1 DISCUSIÓN

La diaminobutanona inhibió la formación del micelio o de los esporangióforos de *Phycomyces* según el momento en que se añadiera al medio de cultivo. Sin embargo, este resultado no significa necesariamente que la diaminobutanona inhiba el desarrollo, ya que el mismo efecto se obtendría si la diaminobutanona actuara como inhibidor del crecimiento. De hecho, el crecimiento vegetativo del micelio cesó por completo a las 24 h de la adición de diaminobutanona 1 mM, con independencia su edad. Añadida antes de la germinación de las esporas, la diaminobutanona no detuvo el desarrollo en un estadio definido; muchas células dejaron de crecer una vez emitido el tubo germinal, pasado el estadio de crecimiento isodiamétrico. Concluimos que la diaminobutanona inhibe el crecimiento de *Phycomyces*, pero no inhibe específicamente las transiciones entre las distintas etapas del desarrollo.

En otros Mucorales la diaminobutanona no inhibe el crecimiento, aún cuando se utilice a altas concentraciones. Se ha propuesto que, en estos casos, las enzimas para la biosíntesis de la fracción de poliaminas que es necesaria para mantener el crecimiento celular estarían localizadas en un compartimento impermeable a la diaminobutanona (Ruiz-Herrera, 1994). Es posible que en *Phycomyces* la diaminobutanona sí acceda a este compartimento. En ese caso, la interrupción del crecimiento nos habría impedido poner de manifiesto el efecto específico de otra fracción de poliaminas sobre el desarrollo.

Se podría pensar también que en *Phycomyces*, a diferencia de lo que ocurre en otros hongos, la diaminobutanona inhibiera el crecimiento a causa de un efecto tóxico no relacionado con la síntesis de poliaminas. Este argumento puede excluirse, ya que algunos mutantes resistentes a diaminobutanona presentaron cambios en los niveles de poliaminas.

La putrescina fue un antagonista de la diaminobutanona más efectivo que la espermidina. Una explicación a este resultado podría ser que la espermidina entre en la célula con mayor dificultad que la putrescina. Por el contrario, si ambas moléculas entran en la célula con igual eficiencia, este resultado sugiere que la espermidina sustituye con dificultad a la putrescina en la función de ésta, imprescindible para el crecimiento.

La 5-azacitidina es un antagonista de la diaminobutanona en varios Mucorales y en otros hongos. La 5-azacitidina inhibe la metilación del ADN, y por eso se ha propuesto que las poliaminas podrían dirigir la entrada en cada nueva etapa del desarrollo induciendo la desmetilación del ADN (Ruiz-Herrera, 1994). En *Phycomyces* la 5-azacitidina no fue antagonista de la inhibición del crecimiento por diaminobutanona. Como ya se ha comentado, el efecto de la diaminobutanona sobre el crecimiento no nos permite poner de manifiesto el papel de las poliaminas en el desarrollo de *Phycomyces*. Por eso no podemos descartar que las poliaminas intervengan también en el control del desarrollo de *Phycomyces* a través de la regulación de los niveles de metilación del ADN.

A diferencia de lo que ocurre en la mayoría de los hongos (Davis, 1996) en los micelios de 48 h de *Phycomyces* la putrescina era unas diez veces más abundante que la espermidina. En micelios de menos de 24 h la putrescina es tan abundante como la espermidina (Reyna-López y Ruiz-Herrera, 1993). Como ocurre habitualmente en los hongos (Davis, 1996), en *Phycomyces* no encontramos cantidades apreciables de espermina.

Se han aislado cuatro mutantes resistentes a diaminobutanona. Dos de ellos, S621 y S622, no diferían apreciablemente del tipo silvestre en la concentración intracelular de poliaminas. Los otros dos, S623 y S624, presentaban un aumento claro en la concentración interna de putrescina. Beatriz Morera (comunicación personal) ha comprobado que la actividad descarboxilasa de la ornitina de los mutantes S623 y S624 es mayor que la de la estirpe silvestre, que a su vez es semejante a la de los mutantes S621 y S622. Resulta lógico que si la diaminobutanona es un inhibidor de la descarboxilasa de la ornitina, los mutantes superproductores de putrescina puedan resistir una mayor concentración de diaminobutanona que la estirpe silvestre. Ese parece ser el caso de las estirpes S623 y S624.

En las estirpes S621 y S622 no se ha detectado un aumento apreciable en la síntesis de poliaminas o en la actividad descarboxilasa de la ornitina. Se podría pensar que en estas estirpes la resistencia se debe a la mutación del transportador de la diaminobutanona. En *Neurospora*, a diferencia de lo que ocurre en otros organismos, la mayoría de las estirpes resistentes a

difluorometilornitina, un inhibidor de la descarboxilasa de la ornitina, aparecen por mutación en el gen de la permeasa de aminoácidos básicos (Davis et al., 1994). En otros organismos se supone que la difluorometilornitina entra en la célula por difusión o a través de varios transportadores distintos, como ocurre con las poliaminas y, presumiblemente, también con la diaminobutanona. Cuando se cultivaron en presencia de diaminobutanona la concentración intracelular de este compuesto en las estirpes S621 y S622 fué similar a la de la estirpe silvestre, lo que excluye que la resistencia se deba a que el inhibidor no entre en la célula.

La descarboxilasa de la ornitina responsable de mantener el crecimiento de *Phycomyces* es accesible a la diaminobutanona. Los mutantes S621 y S622 podrían estar alterados en el acceso de diaminobutanona a un compartimento donde se sintetizaran las poliaminas implicadas en el crecimiento. Así los mutantes serían resistentes al inhibidor pero no superproductores de putrescina.

Otra posibilidad es que los mutantes S621 y S622 presenten cambios en la diana sobre la que actúa la putrescina para inducir el crecimiento. Según esa hipótesis, en estos mutantes la diaminobutanona al acumularse en la célula inhibiría la síntesis de putrescina pero, la putrescina formada o, como análogo suyo, la diaminobutanona incorporada serían suficientes para realizar la función normal. En este caso estos mutantes serían fundamentales para entender la función de las poliaminas en la célula.

Finalmente es importante considerar que las mutaciones de las estirpes S621 y S622 presentan además una penetrancia muy baja. La posibilidad de que estas estirpes sean heterocariontes con una baja proporción de núcleos portadores de la mutación *dab* es muy remota, ya que el método seguido para su selección favorece fuertemente la obtención de estirpes homocariontes. Es posible, sin embargo, que estas estirpes sean heterocariontes forzosos porque las mutaciones *dab-1* y *dab-2* sean dominantes en heterocariosis y letales en homocariosis. Por último existe la posibilidad de que estas mutaciones sean muy inestables y se pierdan con facilidad en sucesivas generaciones. Cualquiera de estas posibilidades haría que, en medio no selectivo, la mayoría de los núcleos de estas estirpes fueran silvestres y que, por tanto, no se apreciaran cambios en la concentración interna de poliaminas.

4

Sitios que ligan riboflavina

4.1 INTRODUCCIÓN

4.1.1 La fotorrecepción de la luz azul

Aunque se han encontrado fotorrespuestas en todo el espectro, desde 200 a 800 nm, la mayoría de los organismos fotosensibles responden principalmente a la luz azul. Las respuestas a la luz azul en los estos organismos presentan aspectos comunes que sugieren la utilización de mecanismos de fotorrecepción similares. A pesar de que hace más de 60 años que se investiga la naturaleza de los fotorreceptores de luz azul, el problema no puede considerarse resuelto (Galland, 1992).

Los modelos más aceptados proponen que el fotorreceptor de luz azul consistiría en una proteína de membrana que utilizara flavinas, carotenos o pteridinas como pigmentos fotosensibles. Además, en la mayoría de los casos, los resultados sugieren que los fotorreceptores deben ser estructuras complejas, probablemente con varios pigmentos fotosensibles distintos, y diferentes de un organismo a otro e incluso, en un mismo organismo, de una a otra respuesta.

4.1.2 Espectros de acción

Uno de los primeros pasos en la investigación de los fotorreceptores consiste en el análisis del espectro de acción de la luz. Los espectros de acción se obtienen determinando la eficacia cuántica de las distintas longitudes de onda en la inducción de la fotorrespuesta o, al menos, su eficacia relativa respecto a una longitud de onda arbitraria. El perfil del espectro de acción se corresponderá con el del espectro de absorción del pigmento fotorreceptor, si no hay causas de distorsión.

El espectro de acción de la luz azul presenta características semejantes en la mayoría de los organismos estudiados (fig.18) (Presti y Galland, 1987). Típicamente aparecen picos principales a 370 y 450 nm, con un hombro alrededor de 480 nm y una caída brusca mas allá de los 500 nm. Estas, a su vez, son las características típicas de los espectros de absorción de las flavinas (riboflavina, FMN y FAD) y los carotenos (principalmente β -caroteno) (fig. 18) y estos han sido, por tanto, durante mucho tiempo, los principales candidatos a pigmentos fotorreceptores de luz azul.

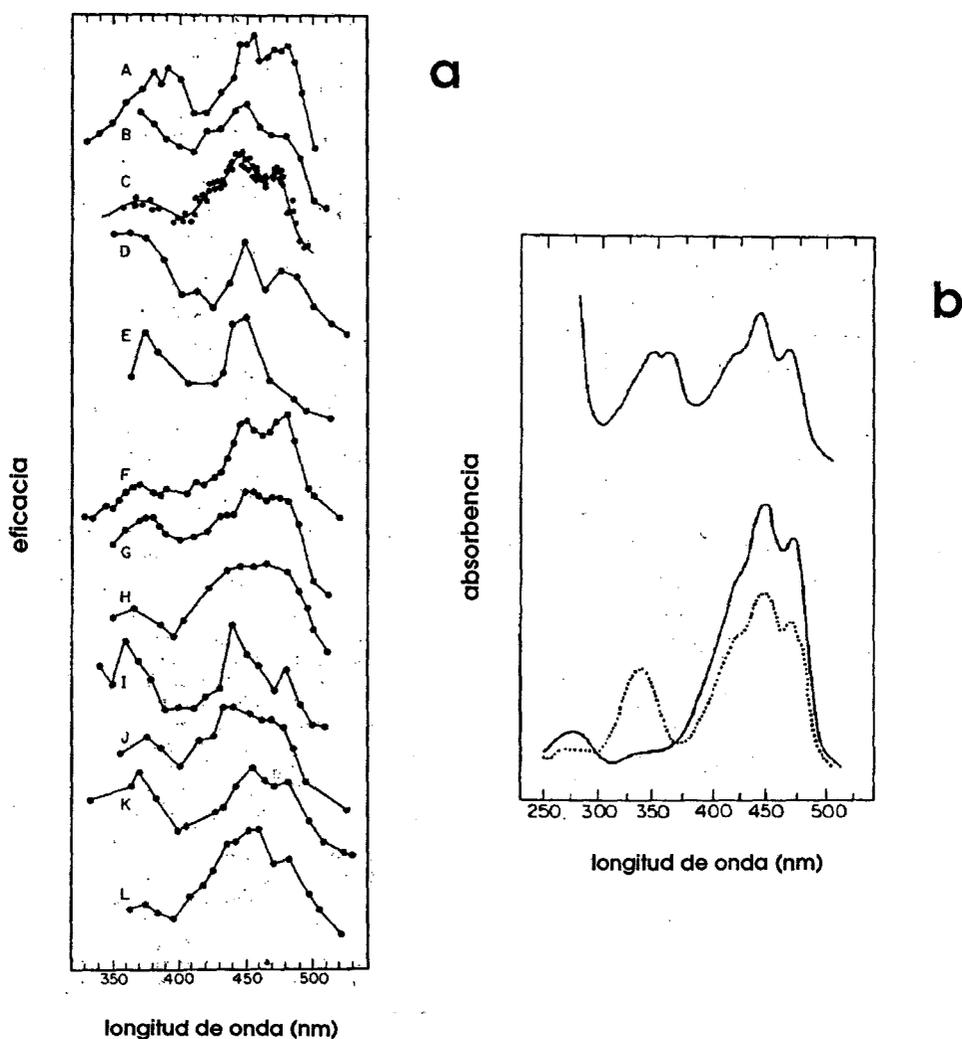


Figura 18. Espectros de acción y espectros de absorción. (a) Espectros de acción del fototropismo de *Phycomyces blakesleeenanus* (A), el hongo *Pilobolus kleinii* (B) y los coleoptilos de la planta *Avena sativa* (C), el fototactismo positivo del alga *Euglena gracilis* (D), el fototactismo negativo de *Physarum nudum* (E), la fotocarotenogénesis en los hongos *Neurospora crassa* (F), *Fusarium aquaeductuum* (G), y la bacteria *Micobacterium* (H), la estimulación del desarrollo sexual en el hongo *Nectria haematococca* (I), el incremento de la respiración en el alga *Chlorella* (J), la reorganización de los cloroplastos del musgo *Funaria* (K), y el cambio de fase en el ritmo circadiano de salida de la pupa de la mosca *Drosophila pseudoobscura*. (b) Espectros de absorción de la riboflavina (arriba) y del β -caroteno (abajo) en sus formas todo-*trans* (línea continua) y 15,15'-*cis* (línea de puntos). Figura tomada de Presti y Galland (1987).

4.1.3 Los carotenos como posibles fotorreceptores

El pigmento fotorreceptor mejor conocido es el retinal, un derivado de los carotenos. En las células fotosensibles de la retina de los animales el fotorreceptor se llama rodopsina y está compuesto por una proteína de membrana llamada opsina y, unida a ella, una molécula de retinal. Cuando el retinal absorbe un fotón, se isomeriza y provoca un cambio conformacional en la opsina, que activa la cadena de transducción de señales. Aunque el retinal absorbe principalmente la radiación ultravioleta A, su interacción con la opsina modifica sus propiedades. Las distintas opsinas que aparecen en los ojos de los vertebrados desplazan la absorbencia máxima del retinal a las ondas más largas, permitiendo la visión desde el rojo al ultravioleta.

Se han encontrado genes parecidos a los de las opsinas en varios invertebrados y organismos unicelulares, y proteínas semejantes a la rodopsina en varias bacterias y algas. También aparece retinal en los cuerpos paraflagelares, presuntos orgánulos fotorreceptores, de las microalgas *Euglena*, *Chlamydomonas* y *Spermatozopsis* (Gualtieri, 1993).

En *Chlamydomonas* los mutantes que no sintetizan carotenos son defectivos en la respuesta fototáctica y recuperan la visión tras la adición de retinal u otros compuestos análogos. La luz regula la síntesis de rodopsina a través de la propia rodopsina (Foster *et al.*, 1984, 1988). En *Euglena*, la nicotina, un inhibidor de la síntesis de carotenoides, inhibe también la fototaxis (Gualtieri, 1993). La efectividad de la rodopsina como molécula fotorreceptora, su capacidad para absorber luz de distintas longitudes de onda y su presunta distribución en toda la escala filogenética han llevado a algunos autores a proponerla como posible fotorreceptor de luz azul en todos los organismos (Gualtieri, 1993). En varias arqueobacterias se han encontrado dos rodopsinas que actúan como sendos fotorreceptores de luz roja-verde y radiación ultravioleta y de luz azul. El gen del fotorreceptor de luz azul en *Halobacterium salinarium* ha sido clonado recientemente (Zhang *et al.*, 1996).

En *Chlamydomonas* hay dos genes de la biosíntesis de clorofila cuya transcripción es inducible por luz azul. El espectro de acción de esta respuesta no coincide totalmente con el de las respuestas mediadas por el retinal. Sin embargo, otros carotenos parecen intervenir en la fotorrecepción, ya que estos genes no se inducen en un mutante incapaz de sintetizar carotenos (Matters y Beale, 1995).

En *Phycomyces* los mutantes que no sintetizan β -caroteno carecen de respuesta fotomorfogénica, aunque son normales para el resto de las fotorrespuestas a la luz azul. Dada la semejanza en los mecanismos de fotorrecepción entre las distintas fotorrespuestas de *Phycomyces*, resulta sorprendente el requerimiento estricto de carotenos en la fotomorfogénesis. Quizás en esta fotorrespuesta los carotenos actúan como pigmentos antena (Corrochano y Cerdá-Olmedo, 1990b).

4.1.4 Las pteridinas como posibles fotorreceptores

Se va abriendo paso el concepto de que el espectro de acción de la luz azul podría ser debido a varios pigmentos asociados al fotorreceptor. Una posibilidad es que, además de flavinas, contenga pteridinas, que serían las responsables de la absorción de ultravioleta A (Galland y Senger, 1988). Las pteridinas, como los carotenos y las flavinas, están ampliamente distribuidos entre todos los seres vivos. Las fotoliasas y las reductasas del nitrato, enzimas cuya actividad se induce por luz azul, utilizan como pigmentos fotosensibles una combinación de pterina y FAD o de pterina, FAD y citocromo b respectivamente (Johnson et al., 1988; Ninnemann, 1987).

En *Phycomyces* los mutantes del fototropismo afectados en el gen *madA* presentan una disminución sustancial en la concentración interna de FAD, FMN y algunas pterinas (Hohl et al., 1992a, b). Los mutantes del fototropismo afectados en el gen *madI* tienen niveles normales de flavinas, pero carecen de una pterina aún no identificada presente en el tipo silvestre. Estos mutantes presentan alteraciones en la región ultravioleta del espectro de acción del fototropismo (Hohl et al., 1992c). La 2,4-diamino-6-hidroxipirimidina, un inhibidor de la ruta de biosíntesis de las pteridinas *in vitro* e *in vivo*, reduce en ciertas condiciones de cultivo la respuesta fotomorfogénica de *Phycomyces*, aunque, en esas mismas condiciones, no se ha encontrado un descenso en la concentración de las pterinas mayoritarias (Maier y Ninnemann, 1995a, b).

Las lumazinas, un tipo de pteridina con propiedades espectrales y redox muy semejantes a las de las pterinas, son también candidatos a pigmentos fotorreceptores, particularmente de ultravioleta A. En *Phycomyces*, los mutantes *ribC*, auxótrofos de riboflavina, tienen, en medio mínimo suplementado con riboflavina 10^{-6} M, niveles muy bajos de flavinas, de pterinas y de 6,7-dimetil-8-ribitillumazina, precursor de la riboflavina. El fototropismo de estos mutantes presenta una reducción en la sensibilidad a la luz especialmente en la región del ultravioleta A. El fototropismo es normal en el auxótrofo *ribD*,

que, junto a niveles muy bajos de flavinas y pterinas, tiene una concentración normal de 6,7-dimetil-8-ribitillumazina (Tillmanns *et al.*, 1995).

4.1.5 Las flavinas como posibles fotorreceptores

Las flavinas, grupos prostéticos de muchas enzimas, están presentes en todos los organismos. Las más abundantes son la riboflavina, el riboflavín-5'-fosfato (flavín-mononucleótido, FMN) y el flavín-adenín-difosfato (FAD). La mayoría de las flavoproteínas conocidas utilizan como grupo prostético FMN o FAD, unidos fuertemente a la proteína por interacciones iónicas o covalentes. Desde que a mediados de siglo se propusiera que las flavinas podrían ser los pigmentos fotorreceptores de luz azul (Galston 1949, 1950), esta ha sido la hipótesis más aceptada. Numerosas revisiones recopilan los datos fisiológicos, espectroscópicos y genéticos obtenidos en distintos organismos que apoyan esta hipótesis (Briggs y Iino, 1983; Galland y Senger, 1991; Song *et al.*, 1991). Recientemente se ha realizado por primera vez el estudio molecular de dos proteínas que posiblemente actúen como fotorreceptores de luz azul en plantas. Ambas proteínas parecen utilizar flavinas como pigmento fotosensible.

4.1.6 Dos posibles fotorreceptores de luz azul en plantas son flavoproteínas

Las plantas regulan su crecimiento y su desarrollo en función de la luz que reciben. En *Arabidopsis thaliana* la luz provoca fototropismo, inhibe el crecimiento de los hipocótilos, estimula el de los cotiledones y los cloroplastos, y da lugar a un patrón de expresión génica distinto del que aparece en la oscuridad (Kaufman, 1993; Deng, 1994).

La luz roja y azul y la radiación ultravioleta son las más efectivas en la regulación del desarrollo de las plantas. Los fitocromos, fotorreceptores de luz roja, son proteínas solubles gobernadas, en *Arabidopsis*, por una familia de cinco genes. Al menos dos de los fitocromos de esta familia tienen propiedades distintas entre sí (Deng, 1994).

En varias plantas se han encontrado mutantes afectados en las distintas fotorrespuestas a la luz azul (Chory, 1993), pero ninguno alterado simultáneamente en todas ellas, lo que sugiere sistemas de fotorrecepción distintos para cada fotorrespuesta.

Algunos de estos mutantes se han analizado en detalle. El fototropismo de los mutantes del gen *NPH1* es menos sensible a la luz que el del tipo silvestre, y tiene alterado el espectro de acción (Khurana y Poff, 1989; Liscum y Briggs, 1995). Estos mutantes tienen menos del 10% de la concentración normal de una proteína de membrana de 120 kDa que se fosforila en las plantas silvestres al iluminarlas. Esta fotofosforilación se produce también *in vitro* e incluso una vez que la proteína ha sido solubilizada con un detergente, lo que sugiere que la proteína posee al mismo tiempo actividad fotorreceptora y autofosforilante. La fotofosforilación es inhibida por fenilacetato y yoduro potásico, compuestos que secuestran la energía de los estados excitados de las flavinas e impiden su transferencia química (Short et al., 1992, 1993). Los mutantes de este gen son ciegos para el fototropismo a luz azul y verde y a la radiación ultravioleta A, aunque el gravitropismo y el resto de sus fotorrespuestas son normales (Liscum y Briggs, 1995). La proteína *NPH1* es, por tanto, un posible fotorreceptor de luz azul y verde y radiación ultravioleta A, unido a membranas, fosforilable por efecto de la luz y dotado de uno o más cromóforos, uno de ellos probablemente una flavina.

Los mutantes *CRY1* (antes *hy4*) están alterados en la inhibición de la elongación del hipocótilo por luz azul. El gen *CRY1* ha sido clonado y secuenciado (Ahmad y Cashmore, 1993). La proteína correspondiente presenta dos grandes dominios: el extremo amino se parece a una proteína animal, la tropomiosina de músculo liso de rata; el extremo carboxilo es homólogo a algunas fotoliasas bacterianas. Las fotoliasas son proteínas solubles que, cuando absorben luz azul, separan los dímeros de pirimidinas inducidos en el ADN por la radiación ultravioleta C. Utilizan como grupos prostéticos fotosensibles el FADH₂ y una deazaflavina o, en otros casos, una pterina. La proteína *Cry1* de *Arabidopsis* no tiene actividad fotoliasa, es soluble y se une a FAD. Su sobreexpresión en plantas de tabaco conlleva una supersensibilidad a la luz azul y verde y a la radiación ultravioleta A. La alta estabilidad que presenta en ella el estado semiquinona de la flavina podría ser la responsable de la sensibilidad a la luz verde (Lin et al., 1995a, b; Ahmad et al., 1995). Esta proteína ha sido propuesta como el fotorreceptor que media la inhibición del crecimiento del hipocótilo por la luz azul en *Arabidopsis*. Es importante notar que se trata de una proteína citosólica y que la mutación *CRY1* no afecta al fototropismo.

4.1.7 Fotorreceptores de luz azul en *Phycomyces*

La gran variedad de fotorrespuestas que aparecen en *Phycomyces* han hecho de este hongo un organismo pionero en la investigación de los fotorreceptores de luz azul. Los resultados sugieren que, también en este caso, la flavinas actúan como pigmentos fotorreceptores.

El fotorreceptor de *Phycomyces* es probablemente una estructura compleja, con múltiples componentes y varios pigmentos fotosensibles distintos (Galland y Lipson, 1987). Las fotorrespuestas de *Phycomyces* presentan características similares, que sugieren sistemas de fotorrecepción con elementos comunes. Los espectros de acción de estas respuestas se parecen bastante entre sí y a los de otras respuestas a la luz azul en otros organismos, y coinciden también con el espectro de absorción de los carotenos y las flavinas (Presti y Galland, 1987; Corrochano *et al.*, 1988; Bejarano *et al.*, 1991). Las fotorrespuestas de *Phycomyces* tienen umbrales semejantes entre sí, muchísimo más bajos que las de otros hongos (Corrochano y Cerdá-Olmedo, 1991). Estas respuestas, cuando se inducen por destellos luminosos, presentan típicamente dos componentes aditivos, que operan a distintas intensidades de luz (Presti y Galland, 1987; Corrochano y Cerdá-Olmedo, 1991). La fotocarotenogénesis, la fotomorfogénesis y el fototropismo requieren la actividad de los productos de los genes *madA* y *madB* (Bergman *et al.*, 1973; Corrochano y Cerdá-Olmedo, 1990). Los mutantes en estos genes muestran un descenso en la concentración interna de las distintas flavinas (Hohl *et al.*, 1992a). El fototropismo y la fotocarotenogénesis de los mutantes que no sintetizan β -caroteno es idéntico al de la estirpe silvestre (Berman *et al.*, 1973; Presti *et al.*, 1977; Bejarano *et al.*, 1991), lo que descarta la intervención de los carotenos y sus derivados en estas fotorrespuestas.

Cuando se cultiva un mutante *ribB* de *Phycomyces*, auxótrofo de riboflavina, con poca riboflavina y mucha roseoflavina (proporción 1:14), la roseoflavina es incorporada por el micelio y transportada a los esporangióforos. El umbral fototrópico de estos esporangióforos es más alto y el espectro de acción se desplaza a la longitud de onda donde la roseoflavina tiene su absorbancia máxima (Otto *et al.*, 1981). Estos datos sugieren que la roseoflavina puede remplazar al pigmento del fotorreceptor, y que este probablemente sea una flavina. Sin embargo, también es posible que la roseoflavina fotoactivada estimule, sin mediación del fotorreceptor, la cadena de transducción sensorial. Un compuesto artificial, el azul de metileno, tiene un efecto semejante en la fotocarotenogénesis de *Fusarium aqueductum* (Lang-Feulner y Rau, 1975).

4.1.8 Proteínas que ligan riboflavina

Los modelos más aceptados asumen que el fotorreceptor de luz azul sería una flavoproteína de membrana. Los experimentos con luz polarizada sugieren que el pigmento del fotorreceptor se encuentra orientado y, por tanto, anclado a una estructura estable, la membrana celular (Jesaitis, 1974; Steinhardt, 1989). En las plantas la concentración de flavinas unidas a las membranas es bastante menor que la de flavinas libres en el citoplasma. Basándose en estos datos, Hertel (1980) propuso que el fotorreceptor de luz azul podría ser una proteína de membrana que uniera riboflavina no covalentemente, de forma que la riboflavina estuviera en continuo intercambio entre el sitio activo y el citoplasma.

El trabajo de Fritz *et al.* (1989, 1990) con mutantes de *Neurospora* auxótrofos de riboflavina apoya esta hipótesis. En condiciones limitantes de riboflavina, en las que su crecimiento es casi normal, estos mutantes pierden la regulación del ciclo circadiano por la luz. Si se aumenta la concentración de riboflavina en el medio de cultivo, aumenta proporcionalmente la sensibilidad a la luz en el mutante. Los análogos de riboflavina que no pueden entrar en la célula no tienen efecto fotosensibilizador. Sí aumentan la efectividad de la respuesta otros análogos que entran en la célula pero que no se fosforilan ni se unen covalentemente a ninguna flavoproteína (Fritz *et al.*, 1989). La respuesta no mejora si se aumenta la concentración de riboflavina justo después de la iluminación, lo que indica que la riboflavina es necesaria para la fotorrecepción. Los análogos de la riboflavina son tanto más efectivos cuanto mayor es la estabilidad de su estado triplete (Fritz *et al.*, 1990).

Hasta el momento se ha descrito la unión de riboflavina de forma específica y reversible a extractos de tejido fotosensible de *Cucurbita* y *Zea* (Hertel *et al.*, 1980), a los flagelos de *Euglena* (Nebenführ *et al.*, 1991; Neumann y Hertel, 1994) y al micelio y los esporangióforos de *Phycomyces* (Dohrman, 1983).

Se ha purificado una proteína de *Euglena gracilis* que une riboflavina (Neuman y Hertel, 1994). Es una proteína de membrana, de peso molecular aparente 68 kDa, con alta afinidad por la riboflavina, tanto en condiciones oxidantes ($k_D = 4$ nM), como reductoras ($k_D = 6$ nM), y menor afinidad por FMN y FAD. Esta proteína se localiza en el flagelo y no es especialmente abundante en el cuerpo paraflagelar, presunto órgano fotorreceptor de *Euglena*.

El alga móvil *Astasia longa*, estrechamente emparentada con *Euglena*, no tiene cloroplastos, ni cuerpo paraflagelar, ni respuesta fototáctica; sus extractos presentan una actividad de unión a riboflavina veinte veces menor que los de *Euglena*. Ello sugiere que esta actividad no es necesaria para el movimiento del flagelo y que podría estar relacionada, bien con la actividad de los cloroplastos, o bien con las respuestas a la luz, como transductor de la señal luminosa o como fotorreceptor (Brodhum *et al.*, 1994).

En *Phycomyces* también se ha descrito unión saturable y reversible de riboflavina a fracciones de membrana de micelio y esporangióforos (Dohrmann, 1983). De las tres flavinas mayoritarias en *Phycomyces*, riboflavina, FMN y FAD, la riboflavina es la que se une con mayor afinidad (K_D aprox. 4 μM). La afinidad aumenta en condiciones reductoras. La actividad desaparece al calentar el extracto a 90 °C. La concentración de sitio activo en los esporangióforos (0.7 nmol g^{-1} de masa fresca) supera la cantidad mínima teórica indispensable (0.3 nmol g^{-1} de masa fresca) para justificar el umbral del fototropismo de *Phycomyces* (Bergman *et al.*, 1969). Además, la concentración de riboflavina soluble en el citoplasma del esporangióforo es lo suficientemente alta como para saturar todos estos sitios de unión.

4.1.9 Objetivos

Los resultados experimentales sugieren que en *Phycomyces* el fotorreceptor de luz azul es una flavoproteína. La abundancia de riboflavina soluble en el citoplasma del esporangióforo y la presencia de un sitio que liga riboflavina en las membranas del esporangióforo hacen muy atractiva la hipótesis de que el fotorreceptor sea una proteína que ligue riboflavina de forma no covalente.

Nos propusimos continuar la investigación de este tipo de proteínas en *Phycomyces*. Para ello contamos con nuevas preparaciones de riboflavina radiactiva que tienen una mayor actividad específica (lo que permite detectarla a concentraciones más bajas) y con la información reciente que aporta la purificación de una proteína análoga de *Euglena* (Neumann y Hertel, 1994).

Nuestros objetivos inmediatos serán identificar los sitios que ligan riboflavina de forma no covalente en *Phycomyces*, comprobar su presencia en distintos mutantes de la fotorrecepción e intentar su purificación. Las proteínas purificadas podrían permitir luego conocer su gen correspondiente y su posible papel en la fotorrecepción de la luz azul.

4.2 RESULTADOS

4.2.1 Sitios que ligan riboflavina en *Phycomyces*

Para detectar y analizar la actividad de los sitios que ligan riboflavina de forma no covalente en *Phycomyces* seguimos los métodos generales aplicados a otras interacciones entre receptores y ligandos (Hulme y Birdsall, 1992). Esencialmente, el ensayo consiste en mezclar un extracto proteico con una cantidad conocida de ligando marcado. Tras incubar esta mezcla por cierto tiempo y a cierta temperatura, a veces en presencia de un agente reductor, se separa el ligando unido al receptor del ligando libre (en nuestro caso mediante filtración) y se cuantifican ambos. El ensayo permite medir la concentración de receptor e informa sobre la naturaleza química de la interacción. También permite comparar la actividad en el tipo silvestre y en varios mutantes, y detectar la presencia del receptor en extractos sometidos a distintos procesos de purificación.

Los extractos crudos de *Phycomyces*, una vez libres de paredes y otros fragmentos grandes, se dividieron por centrifugación en dos fracciones distintas: la fracción microsomal, formada básicamente por las membranas celulares, y el sobrenadante, que contiene el material soluble del protoplasma. Ambas fracciones ligaron riboflavina, aunque con distintas características cinéticas. Las figuras 19 y 20 muestran las curvas de saturación de los receptores de cada fracción utilizando riboflavina como ligando. En todas las muestras de un mismo experimento se utilizaron cantidades fijas de proteína y riboflavina radiactiva, y las cantidades variables que se indican de riboflavina no radiactiva. Cuando la

riboflavina no radiactiva era suficiente, saturaba los sitios de unión y desplazaba de ellos a la riboflavina radiactiva, que en consecuencia permanecía en solución y no se retenía en el filtro. La proporción de sitios de unión ocupados por la riboflavina dependerá de la afinidad del receptor por la riboflavina y de la concentración de receptor.

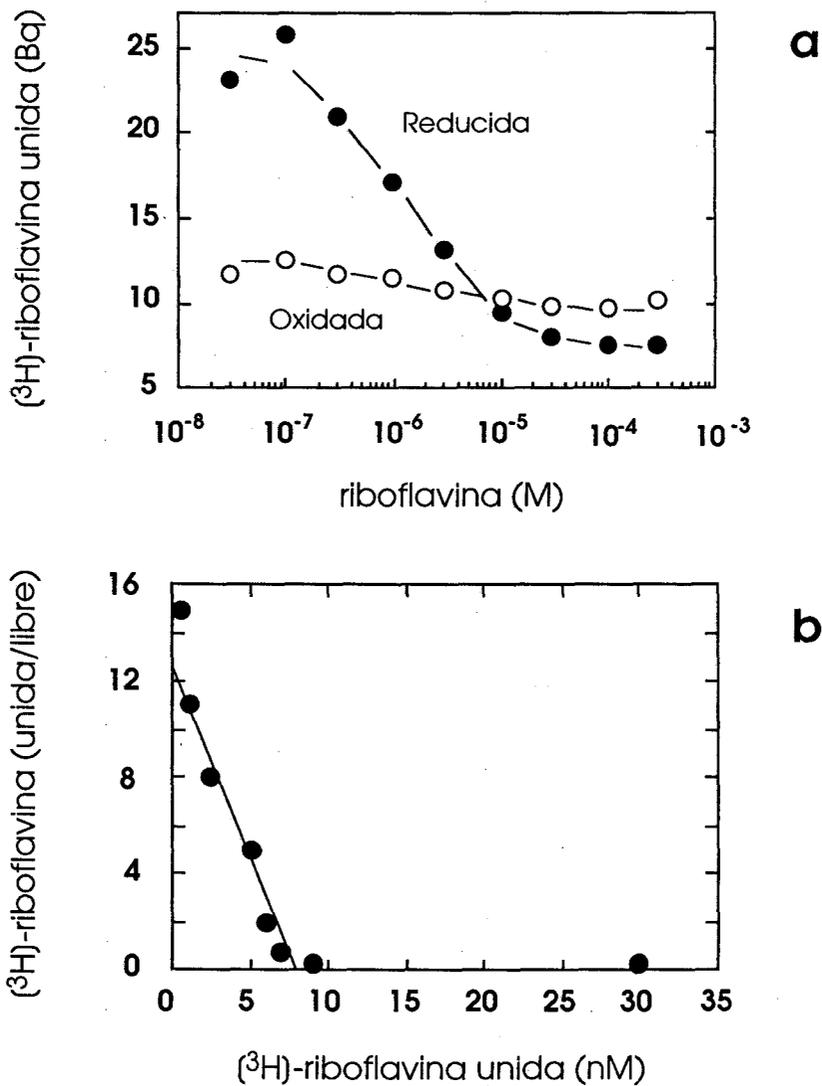


Figura 19. Unión de riboflavina a la fracción microsomal. **a)** Las curvas muestran la cantidad de riboflavina radiactiva retenida en el filtro en función de la concentración de riboflavina presente en el ensayo. Las preparaciones oxidadas contenían 60 μg de proteína y 1195 Bq de $[^3\text{H}]$ -riboflavina ($\approx 9 \times 10^{-9}$ M). Las reducidas tenían además ditionito de sodio 5 mM. **b)** Representación de Scatchard. Los datos de actividad en condiciones reductoras que aparecen en **a** fueron transformados en "[^3H]-riboflavina unida específicamente dividida por la [^3H]-riboflavina total en el ensayo" y "riboflavina específicamente unida (nM)" y representados.

El hecho de que los sitios de unión se saturan al aumentar la concentración de ligando indica que la muestra contiene un número finito de receptores. Incluso con las mayores concentraciones de riboflavina no radiactiva, la radiactividad unida al filtro no desaparecía totalmente, sino que se mantenía en un valor constante (fig. 19). Esta radiactividad es producto de la interacción de la riboflavina con sitios de unión muy abundantes (no saturables) y de muy baja afinidad. Puede representar la acumulación de riboflavina en el interior de los microsomas, la interacción inespecífica con proteínas o lípidos, o la retención inespecífica en el filtro. En todos los experimentos consideramos como actividad específica a aquella que es producto de la unión de riboflavina a los receptores saturables. Los valores experimentales son la suma de la unión de riboflavina a los receptores saturables y a los no saturables. La actividad específica se obtuvo restando a los valores experimentales los obtenidos cuando a las reacciones se añadieron concentraciones saturantes de riboflavina no radiactiva.

La fracción microsomal mostró la mayor afinidad por la riboflavina en condiciones reductoras (fig. 19a). En condiciones oxidantes, la unión de riboflavina fué siempre menor, aunque muy variable.

Los valores de la curva de saturación representados según el método de Scatchard permiten calcular la constante de afinidad y la abundancia del receptor (fig. 19b). La afinidad (K_D) por la riboflavina viene dada por el valor negativo del recíproco de la pendiente de la recta de regresión. En condiciones reductoras la K_D de este sitio activo que muestra la figura 19b fué de aproximadamente 0.5 μM . La K_D media en condiciones reductoras obtenida de tres experimentos independientes fué de 1,14 (± 0.4) μM .

La intersección de la recta de regresión con el eje de abscisas indica la concentración del sitio de unión en el ensayo, asumiendo que cada molécula de receptor liga una sola molécula de riboflavina. En el experimento que se muestra en la figura 19 la concentración del sitio que liga riboflavina en cada muestra fué de aproximadamente 8 nM. Las muestras contenían 30 μg de proteína procedentes de 86.4 mg de masa fresca de esporangióforos. La concentración de sitio de unión en el esporangióforo era, por tanto, de 9.2×10^{-8} M (0.09 nmoles g^{-1} de masa fresca). La concentración media de sitios de unión en el esporangióforo deducida a partir de cinco extractos similares fué de $1.4 (\pm 0.2) \times 10^{-7}$ M, lo que equivale a 0.14 (± 0.2) nmoles g^{-1} de masa fresca.

La fracción soluble del extracto crudo también ligó riboflavina (fig. 20). Se obtuvo actividad tanto en tampón fosfato como en tampón Tris, a una concentración 50 mM, con una mayor eficiencia a pH 8. La unión de riboflavina aumentó en presencia de sales, siendo máxima en presencia de sulfato amónico 1 M.

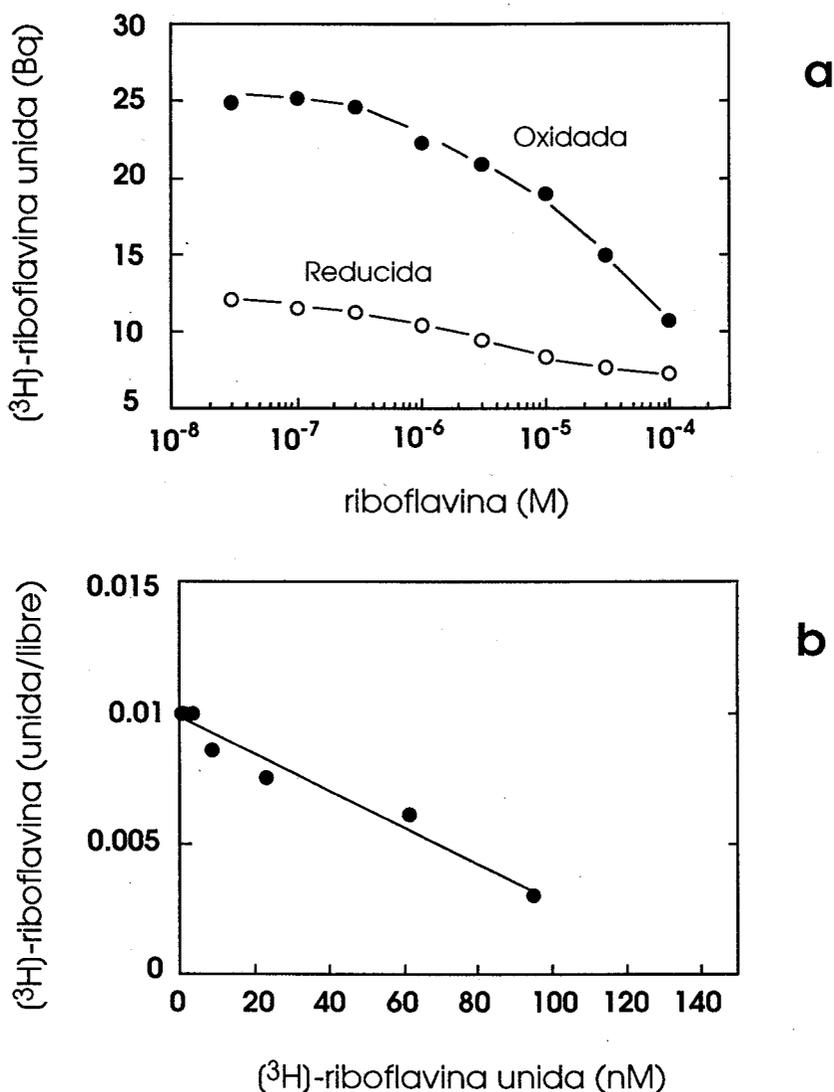


Figura 20. Unión de riboflavina a la fracción sobrenadante. **a)** Las curvas muestran la cantidad de riboflavina radiactiva retenida en el filtro en función de la concentración de riboflavina presente en el ensayo. Las preparaciones oxidadas contenían 15 μg de proteína (150 μl de extracto) y 1340 Bq de $[^3\text{H}]$ -riboflavina ($\approx 10^{-8}$ M). Las muestras reducidas tenían además ditionito de sodio 5 mM. **b)** Representación de Scatchard. Los datos de actividad en condiciones oxidantes que aparecen en **a)** fueron transformados en "[^3H]-riboflavina unida específicamente dividida por la [^3H]-riboflavina total en el ensayo" y "riboflavina específicamente unida (nM)" y representados.

La curva de saturación muestra que, a diferencia de lo que ocurre con el sitio de unión presente en la fracción microsomal, la unión de riboflavina por el sobrenadante era mayor en condiciones oxidantes que en condiciones reductoras (fig. 20a). La curva muestra que este sitio de unión no se saturaba a una concentración de riboflavina (10^{-4} M) cercana al límite de solubilidad. La afinidad calculada a partir de la representación de Scatchard viene determinada por una K_D de 14 μ M. La concentración de sitio activo por ensayo fué de 140 nM en muestras que contenían el equivalente a 15 mg de masa fresca de esporangióforos. En los esporangióforos la concentración del sitio soluble que liga riboflavina era, por tanto, de 10 μ M aproximadamente (10 nmoles g^{-1} de masa fresca).

4.2.2 Propiedades del sitio que ligaba riboflavina en la fracción microsomal

Aunque la unión de riboflavina a las preparaciones de microsomas fué muy variable, los resultados no se vieron afectados por las condiciones de iluminación. La unión de riboflavina a los microsomas fué igual de eficiente cuando los ensayos se hicieron en oscuridad, bajo una luz blanca intensa (unos 10 W m^{-2}), o en las condiciones de iluminación habituales del laboratorio. La incubación de las reacciones durante 30 min en hielo, a 22 °C o a temperatura ambiente no afectó a los resultados. Cuando el extracto se preincubó en hielo durante varias horas ligó riboflavina con mayor eficiencia. El incremento máximo (2.5 veces) se obtuvo con una preincubación en hielo durante 3 h. El calentamiento del extracto a 100 °C durante 30 min redujo drásticamente su capacidad para ligar riboflavina.

La unión de riboflavina a la fracción microsomal aumentó linealmente al aumentar la cantidad de extracto utilizada en el ensayo (fig. 21). La riboflavina se unía, por tanto, a algún componente de la fracción microsomal y no significativamente al filtro.

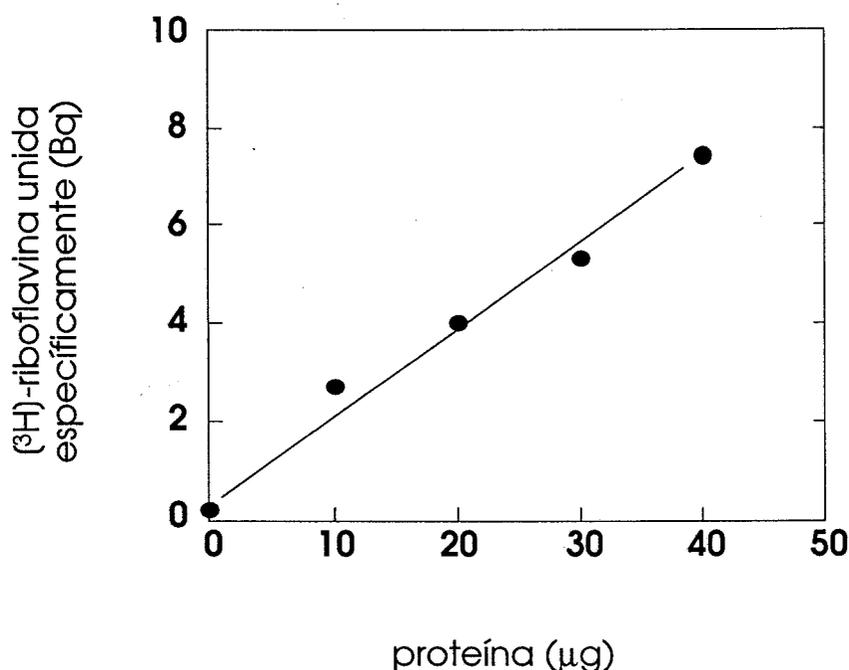


Figura 21. Unión de riboflavina a la fracción microsomal en función de la cantidad de proteína utilizada. Los ensayos se realizaron en condiciones reductoras (ditiotionito de sodio 5 mM).

La unión de riboflavina a la fracción de membranas era reversible (no covalente). La cantidad de riboflavina retenida en el filtro disminuía progresivamente cuando, tras incubar la reacción, la muestra se mantenía diluida en tampón antes de filtrarla (fig. 22). Las reacciones se hacían en un volumen pequeño (125 µl) en el que la formación de complejos riboflavina-receptor alcanzaba un equilibrio estable durante el tiempo de incubación. Comprobamos que 10 min de incubación en hielo eran suficientes para que la

unión de riboflavina a la fracción de microsomas alcanzase su valor máximo (situación de equilibrio). El efecto que se observa en la figura 22 se debe a que al diluir la muestra en 5 ml de tampón el equilibrio se rompe y la riboflavina unida se desprende del receptor.

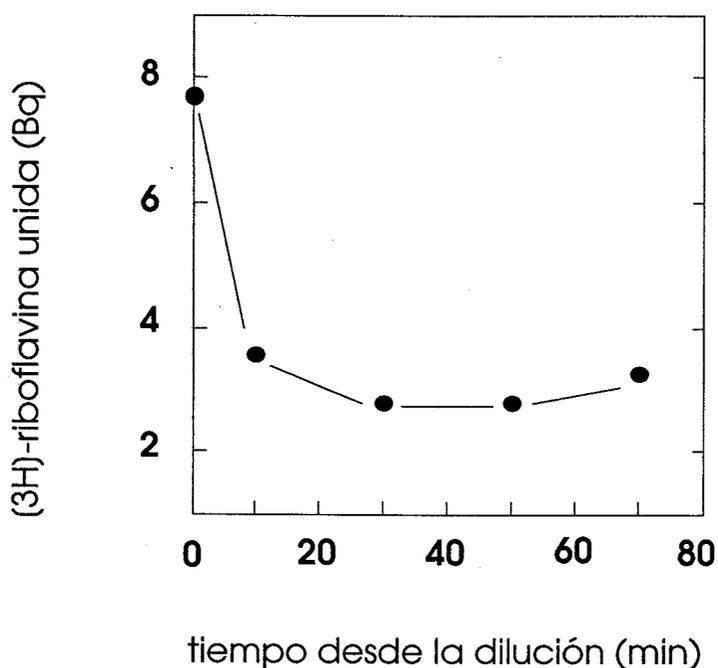


Figura 22. Efecto de la dilución sobre la unión de riboflavina a la fracción microsomal. Los ensayos de unión se hicieron en condiciones reductoras (ditionito de sodio 5 mM) en un volumen final de 125 μ l. Tras 20 min de incubación, las muestras se diluyeron en 5 ml de tampón Tris-HCl 50 mM, pH 8,0 a temperatura ambiente y se filtraron en el momento indicado.

La roseoflavina se unió a la fracción de membranas igual que la riboflavina (fig. 23). Cuando se utilizó roseoflavina para desplazar la riboflavina radiactiva del sitio de unión, se obtuvieron curvas muy semejantes a las obtenidas con riboflavina. La fracción microsomal mostró también una afinidad semejante por el FMN y menor por el FAD.

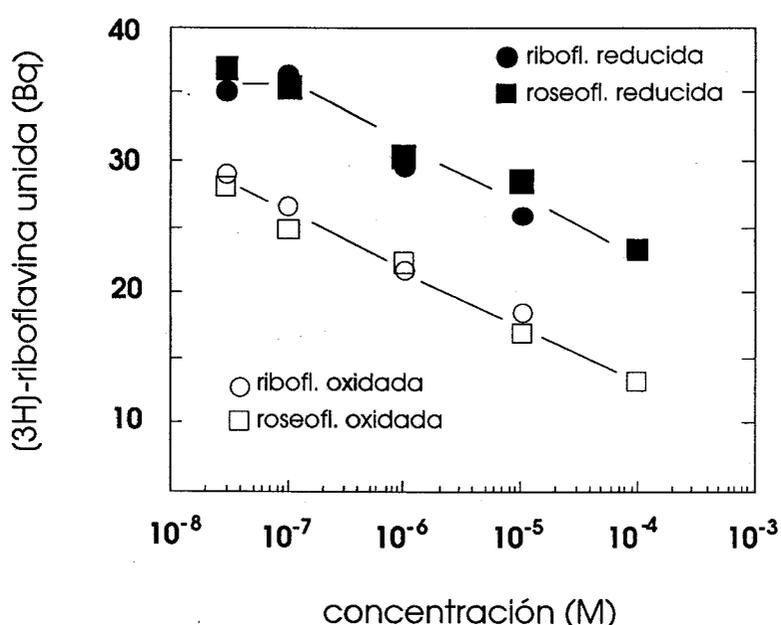


Figura 23. Unión de roseoflavina a la fracción microsomal. Las curvas muestran la cantidad de riboflavina radiactiva retenida en el filtro en función de la concentración de riboflavina o de roseoflavina presente en el ensayo. Las condiciones reductoras se obtuvieron añadiendo a las preparaciones ditionito de sodio 5 mM.

El sitio de unión de la fracción de membranas se solubilizó en presencia de determinados detergentes. Los más efectivos fueron el Zwittergent 3-12 a una concentración de 0,8 % (p/v) y el Tritón X-100 a una concentración de 0,5 % (p/v). En ambos casos se obtenía un máximo de actividad soluble de aproximadamente el 35 % de la actividad original. El empleo en el tampón de solubilización de agentes estabilizantes, como el cloruro de sodio o el glicerol, no

mejoró el rendimiento. Otros detergentes empleados, como de dodecilmaltósido, el deoxicolato sódico, la digitonina o el CHAPS, fueron menos efectivos. En general, todos los detergentes cuando se utilizaron a alta concentración (1 %) inhibieron la unión de riboflavina a la fracción microsomal.

El Zwittergent 3-12 se empleó habitualmente para solubilizar el sitio de unión con vistas a su purificación. Se aprovechaba así su mayor eficiencia en la solubilización, su carácter zwitter-iónico (posee ambas cargas eléctricas y se comporta en las resinas de intercambio iónico como una molécula neutra) y la formación de micelas de pequeñas (aproximadamente 18 kDa) que permiten concentrar el sitio activo por filtración sin concentrar el detergente.

El sitio de unión de riboflavina solubilizado se intentó purificar por cromatografía de intercambio iónico, exclusión molecular y cromatoenfoco en equipo de FPLC, y cromatografía de afinidad.

Para la cromatografía de afinidad se utilizó como soporte una resina de FMN-agarosa a la que se aplicaba el sobrenadante del extracto solubilizado con detergentes. El sitio activo se unió a la resina esporádicamente. En esos casos se eluyó utilizando una solución muy concentrada de riboflavina, y se obtuvo una solución de proteína muy purificada que presentaba dos bandas mayoritarias en la región de 65 kDa. No se encontraron, sin embargo, las condiciones que hicieran esta purificación repetible.

Utilizando otras técnicas cromatográficas en FPLC (intercambio iónico, exclusión molecular y cromatoenfoco) la actividad eluía formando un único pico aparente de actividad, en el que se recuperaba cerca del 100 % de la actividad original. Tras someter el extracto solubilizado a cromatografías de intercambio iónico y de exclusión molecular de forma consecutiva, las fracciones con mayor actividad de unión de riboflavina aparecieron enriquecidas principalmente en dos proteínas de aproximadamente 65 kDa de peso molecular (figs. 24 y 25). En estos experimentos, la fracción microsomal solubilizada se aplicó a una columna Mono Q de intercambio aniónico en tampón Tris-HCl a pH 7,8 con cloruro sódico 0,15 M. En estas condiciones la columna retenía el sitio activo y permitía el lavado de las proteínas que no se hubieran unido a la matriz. Al aplicar a la columna un gradiente 0.15-0.9 M de cloruro sódico la actividad eluyó formando un pico de actividad muy ancho que comenzaba en la fracción 8 y tenía su máximo en la fracción 16 (fig. 24).

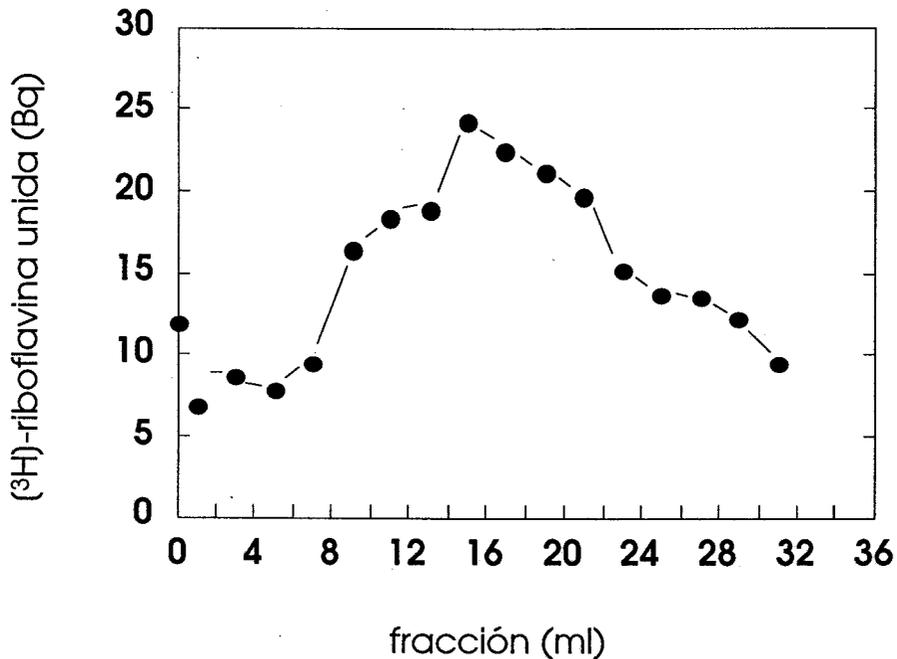


Figura 24. Cromatografía de intercambio iónico en columna Mono Q. Para la cromatografía se utilizó 1 ml de extracto solubilizado de membrana que contenía 11,5 mg de proteína total y capacidad para retener unos 666.6 Bq de [³H]-riboflavina. Para los ensayos de unión se emplearon 100 μ l de cada fracción, en un volumen final de 200 μ l, y unos 1700 Bq de [³H]-riboflavina ($\approx 1,3 \times 10^{-8}$ M).

Para la filtración en gel se tomaron las fracciones 9 a 21 procedentes de la columna Mono Q, mezcladas y concentradas hasta un volumen final de 500 μ l, y se aplicaron a una columna Superose 6 HR 10/30 que fracciona de 5 a 5000 kDa. La figura 25a muestra cómo la actividad eluyó formando un pico estrecho con un máximo en la fracción 16.

Las proteínas presentes en las distintas fracciones de la filtración en gel se separaron mediante electroforesis (Figura 25b). La electroforesis muestra que las fracciones que unían una mayor cantidad de riboflavina estaban enriquecidas en dos proteínas de un tamaño aproximado de 65 kDa.

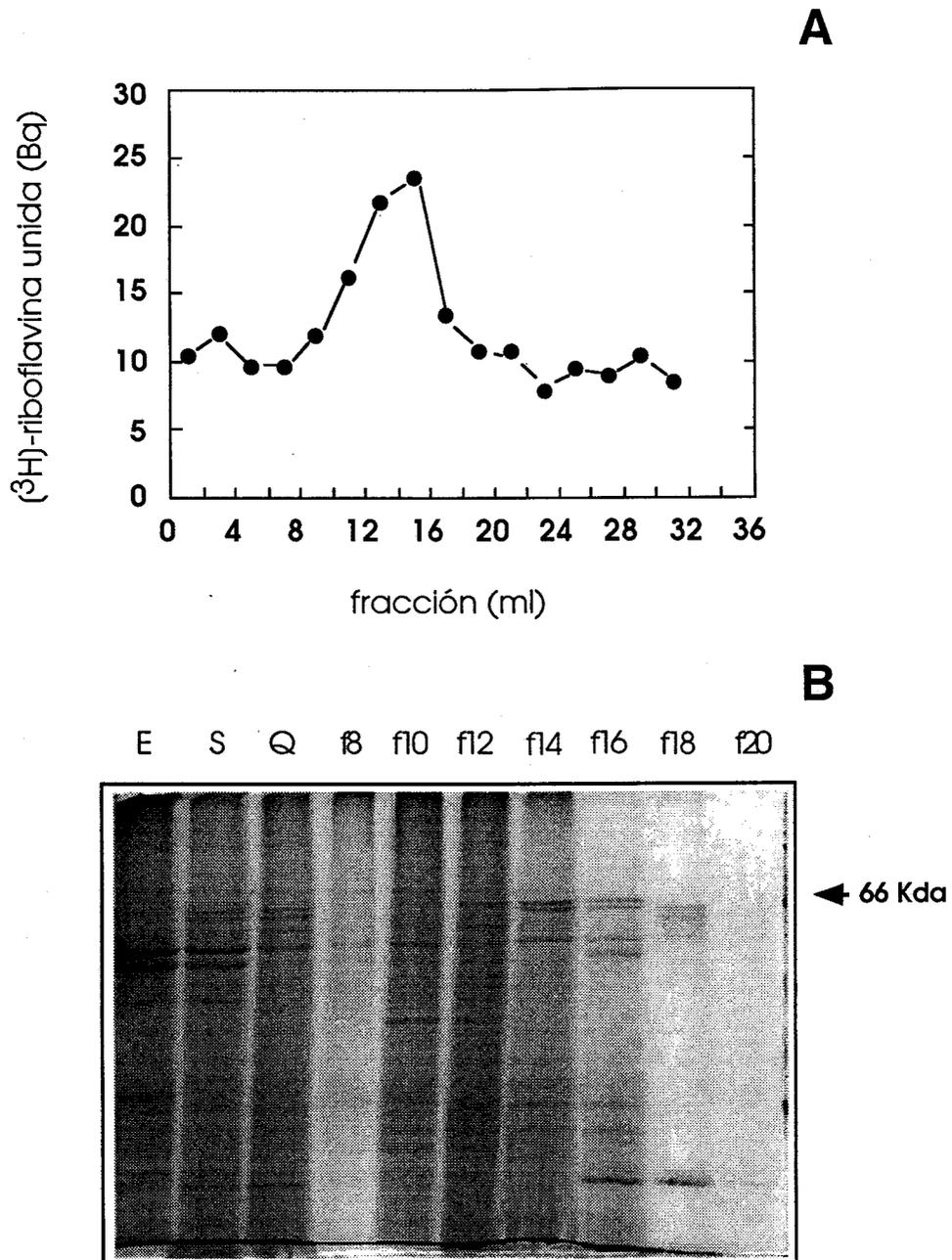


Figura 25. Unión de riboflavina (**A**) y electroforesis (**B**) de las fracciones obtenidas por filtración en la columna Superose 6. **A**) Se filtraron 6,25 mg de proteína procedentes de las fracciones 9 a 23 obtenidas por cromatografía en columna Mono Q (fig. 23) y concentradas hasta un volumen final de 500 μ l. Los ensayos de unión se hicieron con 200 μ l de cada fracción, en un volumen final de 300 μ l. Cada muestra contenía aproximadamente 2400 Bq de [³H]-riboflavina ($\approx 1,8 \times 10^{-8}$ M). **B**) Los carriles de la electroforesis contenían: **E**, 50 μ g de extracto original; **S**, 50 μ g de extracto solubilizado; **Q**, 50 μ g de una solución concentrada de las fracciones 9 a 23 obtenidas de la columna Mono Q (fig.23); **f8-f20**: 25 μ l de las fracciones 8 a 20 obtenidas por filtración. La cantidad de proteína en cada carril fue: **f8**, 5 μ g; **f10**, 15 μ g; **f12**, 30 μ g; **f14**, 45 μ g; **f16**, 16 μ g; **f18**, 2,5 μ g y **f20**, 0,3 μ g.

4.2.3 Propiedades del sitio que ligaba riboflavina en la fracción sobrenadante

El sitio que ligaba riboflavina en la fracción sobrenadante de los esporangióforos presentó algunas propiedades llamativas. Tenía un tamaño pequeño, que le permitía atravesar membranas de filtración y diálisis con un tamaño de poro de unos 10 kDa, y una capacidad para ligar riboflavina que resistía tratamientos que habitualmente inactivan las proteínas, como incubaciones en presencia de altas concentraciones de detergente (dodecilsulfato sódico al 1%) o a alta temperatura (100 °C durante 30 minutos). Las propiedades de este sitio que ligaba riboflavina se investigaron utilizando sobrenadantes hervidos durante 30 min y centrifugados (12000 rpm, 5 min), tratamiento que eliminaba del extracto la mayoría de las proteínas solubles.

Al igual que ocurría con la actividad asociada a membranas (fig. 22), la unión de riboflavina al sitio de unión de la fracción soluble era muy reversible (fig. 26).

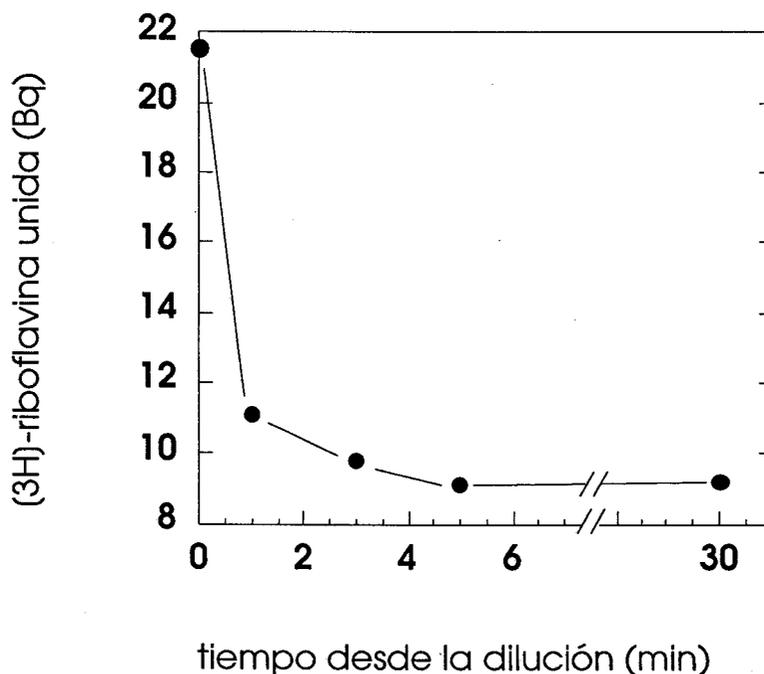


Figura 26. Efecto de la dilución sobre la unión de riboflavina a la fracción sobrenadante. Los ensayos de unión se hicieron en condiciones oxidantes, en un volumen final de 500 μ l. Tras 20 min de incubación, las muestras se diluyeron en 5 ml de tampón Tris-HCl 50 mM, pH 8,0 a temperatura ambiente y se filtraron en el momento indicado.

La fracción sobrenadante se sometió a cromatografía de filtración en geles de distintos intervalos de exclusión. La actividad de unión de riboflavina aparecía formando un único pico aparente, en fracciones muy tardías. Los fenoles del esporangióforo eluían también en estas fracciones activas. La figura 27 muestra el resultado de una filtración de extracto sobrenadante en gel de Sephadex G-25, que excluye moléculas de más de 5 kDa. En condiciones normales se espera que todas las proteínas del extracto aparezcan en el frente de elución. Sin embargo, el sitio que ligaba riboflavina aparecía muy tarde, a partir de la fracción 12, incluso después que una solución de ferricianuro potásico (aproximadamente 500 Da de peso molecular) que eluía totalmente en el ml 10. Esta alta retención podría deberse a que el sitio de unión interacciona con la matriz. La figura muestra cómo el aumento de actividad en las distintas fracciones correlacionaba con un aumento en la concentración de fenoles (fig. 27).

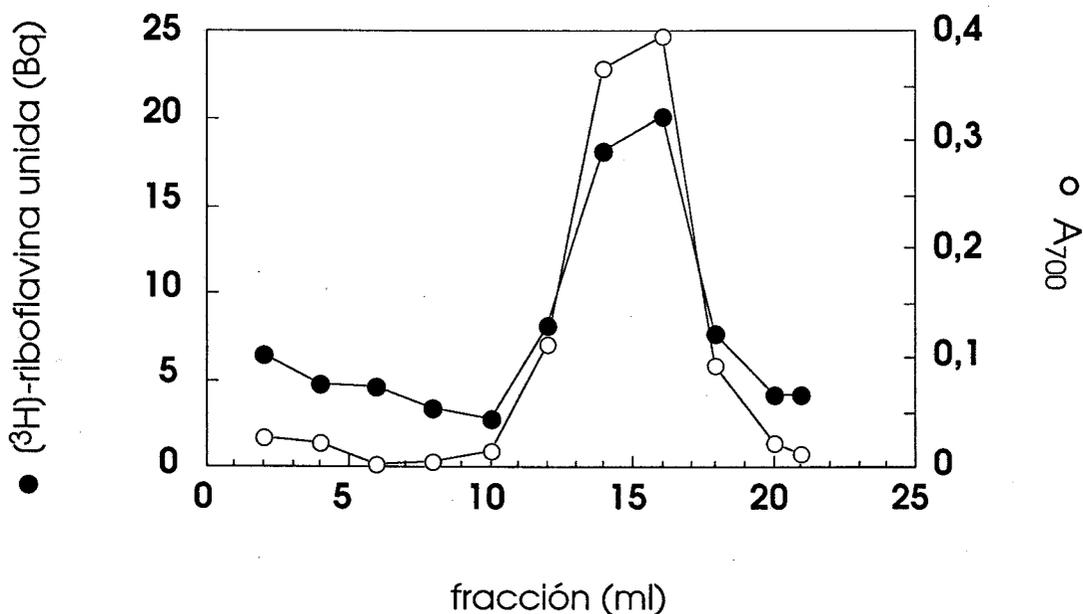


Figura 27. Filtración en columna de Sephadex G 25. Se filtraron 300 μ l de fracción sobrenadante hervida con capacidad para unir unos 166.6 Bq de [³H]-riboflavina. El ensayo de unión se hizo con 250 μ l de cada fracción en un volumen final de 500 μ l y 452.4 Bq de [³H]-riboflavina ($\approx 3,4 \times 10^{-9}$ M). Los fenoles se cuantificaron tiñéndolos según el método del azul de Prusia y midiendo su absorbencia a 700 nm. Para ello se tomaron 100 μ l de cada fracción diluídos en 900 μ l de agua.

La concentración total de fenoles que contenía la fracción de sobrenadante de los extractos fué de aproximadamente 0,8 mM. Dependiendo de las condiciones de cultivo, *Phycomyces* presenta gran cantidad de fenoles, principalmente en los esporangióforos. Los fenoles mayoritarios son el ácido gálico y, en menor cantidad, el ácido protocatequico (Hilgenberg et al., 1987; Barrero *et al.*, 1996). Se comprobó que, en un ensayo de unión típico, una solución 1 mM de ácido gálico en tampón de extracción presentaba una actividad de unión a riboflavina similar a la que presenta el extracto de esporangióforos. La figura 28 muestra que la unión de riboflavina a una solución de ácido gálico puro seguía una cinética semejante a la que se obtuvo cuando se utilizó el extracto sobrenadante.

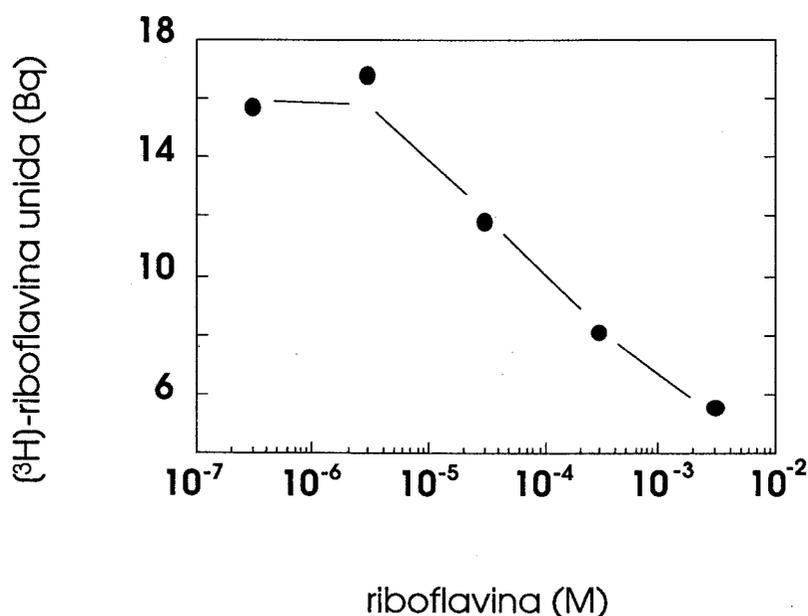


Figura 28. Curva de saturación de la unión de riboflavina en una solución de ácido gálico puro. Los ensayos de unión se realizaron con 150 μ l de una solución de ácido gálico 1 mM en tampón de extracción, hervida durante 30 min y luego enfriada. Los ensayos se realizaron en tampón Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, sulfato amónico 1 M, en un volumen final de 500 μ l, y 1240 Bq de [³H]-riboflavina ($\approx 9,5 \times 10^{-9}$ M).

La actividad del ácido gálico puro no dependía únicamente de su concentración, sino también de su estado de polimerización. Como se muestra en la figura 29, la adición de cloruro férrico a la solución de ácido gálico aumentó enormemente su capacidad para unir riboflavina. El cloruro férrico oxida el ácido gálico y favorece su polimerización. El efecto del cloruro férrico sugiere que la unión de riboflavina al ácido gálico dependía principalmente del estado de polimerización de éste.

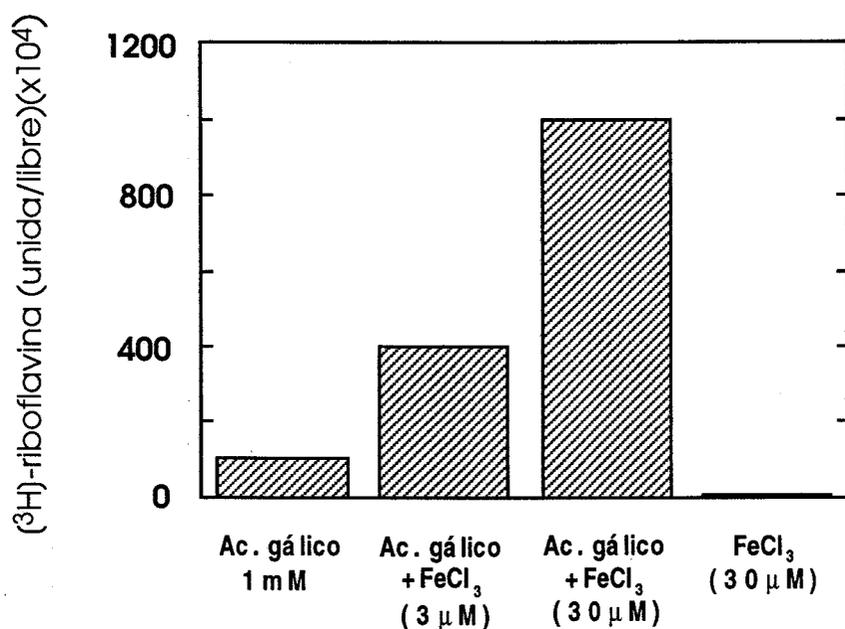


Figura 29. Unión de riboflavina por ácido gálico en presencia de distintas concentraciones de cloruro férrico. Los ensayos de unión se hicieron como se describe para la figura 9. Cada muestra contenía 1253 Bq de [³H]-riboflavina ($\approx 9,6 \times 10^{-9}$ M).

4.2.4 Unión de riboflavina en el micelio y en los esporangióforos

Los sitios que ligaban riboflavina en ambas fracciones estaban presentes tanto en el micelio como en los esporangióforos (tabla 4). La riboflavina se unió por igual a fracciones microsomales de micelio y de esporangióforos, tanto si éstos habían sido cultivados en la luz como en la oscuridad. Por el contrario, la fracción soluble obtenida del micelio ligó muy poca riboflavina. Este resultado se explica por las concentraciones de fenoles de estos sobrenadantes que fueron 1.1 mM en los esporangióforos en oscuridad y < 0.01 mM en el micelio. La unión de riboflavina a los sobrenadantes de los esporangióforos fué similar tanto si estos habían crecido en la luz como en la oscuridad (tabla 4).

Tabla 4. Unión de riboflavina a extractos de micelio y de esporangióforos crecidos en luz o en oscuridad. Se emplearon condiciones reductoras para analizar la actividad en los microsomas y oxidantes para la actividad en el sobrenadante.

Material	Cultivado en	Actividad específica ¹ (Bq unidos / libres por mg de proteína)	
		Microsomas	Sobrenadante
Esporangióforos	Oscuridad	15.6	33.6
Esporangióforos	Luz	9.6	47.4
Micelio	Oscuridad	12	2.4

¹ En esta y en la siguiente tabla la actividad específica se definió como la fracción máxima de riboflavina que ligaba 1 mg de proteína. La actividad específica de los sitios de unión (actividad saturable) se calculó hallando la diferencia entre la radiactividad retenida en las muestras que no contenían riboflavina no radiactiva y la de aquellas que la contenían a una concentración saturante (aprox. 10^{-4} M). El valor resultante se dividió por la radiactividad total y los mg de proteína presentes en los ensayos.

4.2.5 Unión de riboflavina en mutantes de la fotorrecepción

Dada la posibilidad de que el fotorreceptor de luz azul sea una proteína que ligue riboflavina de forma no covalente, decidimos comprobar si alguno de los mutantes de la fotorrecepción estaba alterado en su capacidad para ligar riboflavina. La unión de riboflavina a las fracciones de membranas y de sobrenadante fué la misma en la estirpe silvestre y en los distintos mutantes de la fotorrecepción analizados (Tabla 5).

Es posible que la riboflavina se una, no a un fotorreceptor, sino a cualquier otra proteína celular. Un candidato sería la proteína que transporta riboflavina al interior de la célula. Se ha propuesto que la mutación *dar*, que conlleva resistencia a deazarriboflavina, se produce por la inserción de un transposón en el gen de la proteína de membrana transportadora de riboflavina (Delbrück y Ootaki, 1979). La unión de riboflavina a las membranas de las estirpes S601 y S602, dobles mutantes *pim dar*, fué muy semejante a la encontrada en la estirpe silvestre (las mutaciones *pim* afectan a la fotomicroforogénesis -ver capítulo primero-). En condiciones oxidantes, tampoco se apreciaron diferencias en la unión de riboflavina a la fracción de membranas de la estirpe silvestre y de los distintos mutantes.

Tabla 5. Actividad de unión de riboflavina en la estirpe silvestre y en distintos mutantes de la fotorrecepción. Se emplearon condiciones reductoras para analizar la actividad en los microsomas y oxidantes para la actividad en el sobrenadante.

Estirpes	Genotipo relevante	Actividad Específica (Bq unidos / libres por mg de proteína)	
		Microsomas	Sobrenadante
NRRL1555	silvestre	0.28	0.56
L72	<i>madABC</i>	0.46	0.32
L149	<i>madI</i>	0.43	0.43
A327	<i>madF</i>	0.28	0.48
A909	<i>madJ</i>	0.26	0.51
S601	<i>pim-1 darA</i>	0.26	0.44
S602	<i>pim-2 darA</i>	0.31	0.40

4.2.5 Distribución de la fluorescencia *in vivo*

Nuestra hipótesis de trabajo proponía que el fotorreceptor de luz azul contiene riboflavina unida no covalentemente a una proteína. Según esta hipótesis se podría imaginar que la riboflavina disuelta se concentre en la zona del citoplasma más próxima a la membrana plasmática, donde se localizan los fotorreceptores. Para investigar esta posibilidad decidimos observar *Phycomyces* mediante un microscopio confocal de fluorescencia.

El microscopio confocal utiliza un potente láser para iluminar la muestra y un dispositivo que hace que solo percibamos la emisión procedente de un finísimo plano de enfoque. De esta forma se pueden obtener secciones ópticas del interior de la muestra y construir, superponiéndolas, su imagen tridimensional. El microscopio confocal de fluorescencia permite observar el aspecto y la distribución de las estructuras fluorescentes de la superficie y el interior de la muestra.

En el microscopio confocal, los esporangióforos intactos de la estirpe silvestre de *Phycomyces* mostraron una intensa fluorescencia a 510 nm cuando se iluminaron con luz de 488 nm. En general, los esporangióforos fluorescían en toda su longitud y en todas las etapas de su desarrollo.

En el estadio II fluorescían tanto los esporangióforos como los esporangios. La fluorescencia se concentraba principalmente en la superficie de estas estructuras (fig. 30). En el estadio IV la fluorescencia del esporangio se localizaba en el interior de las esporas (fig. 31a). En las esporas la fluorescencia presentó una distribución heterogénea (fig. 31b). La matriz que separa las esporas y el interior de los esporangios no fluorescían.

En los esporangióforos maduros se distinguían dos zonas en las que la fluorescencia se distribuía de forma distinta. En el ápice (la zona más próxima al esporangio, de varios milímetros de longitud) la fluorescencia se distribuía homogéneamente desde la cara proximal a la distal (fig. 32). La región fluorescente en el interior del ápice tenía unos 100 μm de diámetro, es decir, lo mismo que el esporangióforo. En el ápice se apreciaban dos tipos de fluorescencia, una difusa, y otra concentrada, de aspecto vesicular. En la zona más interna aparecían manchas negras no fluorescentes, de tamaños variados y distribución irregular (fig. 32a).

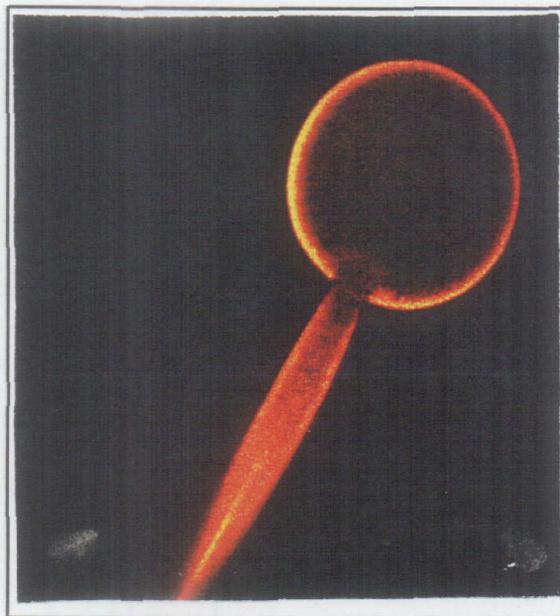
Fuera de la región apical del esporangióforo la fluorescencia se concentraba en una estrecha capa periférica de unos 15 μm de grosor (fig. 33). En esta capa periférica la fluorescencia se distribuía según un gradiente desde la

superficie al interior. En la superficie la fluorescencia era más intensa y de naturaleza tanto difusa como vesicular (fig. 33a). Hacia el interior, desaparecía la fluorescencia difusa, y se mantenía sólo la vesicular (fig. 33b). Se comprobó, tomando fotografías de la misma sección en distintos tiempos, que estas vesículas fluorescentes se desplazaban longitudinalmente por el esporangióforo. El interior del esporangióforo, la región que ocupa la vacuola, no fluorescía (fig. 33c).

En el micelio la fluorescencia se concentraba principalmente en los extremos de las hifas y en las zonas en ramificación. La fluorescencia disminuía progresivamente en las zonas más viejas y era nula en las hifas vacías de citoplasma.

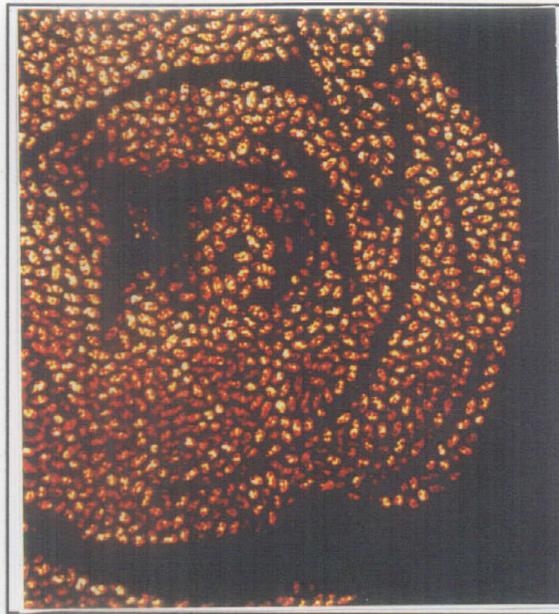


a

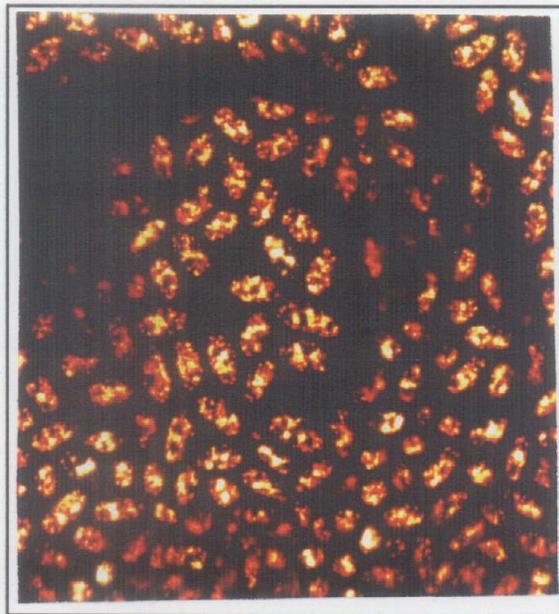


b

Figura 30: Imágenes al microscopio confocal de fluorescencia de un esporangióforo en estadio II. **a)** Sección casi tangencial. **b)** Sección transversal. Ambas secciones estaban separadas por una distancia de 30 μm . Tamaño del lado mayor de la imagen: 1 mm.

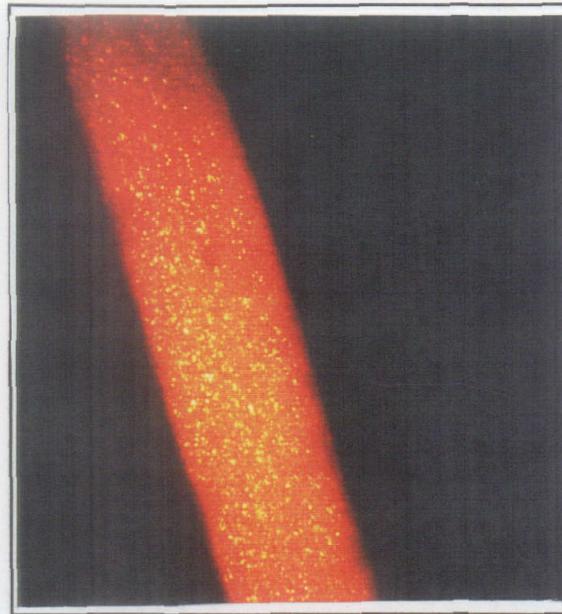


a

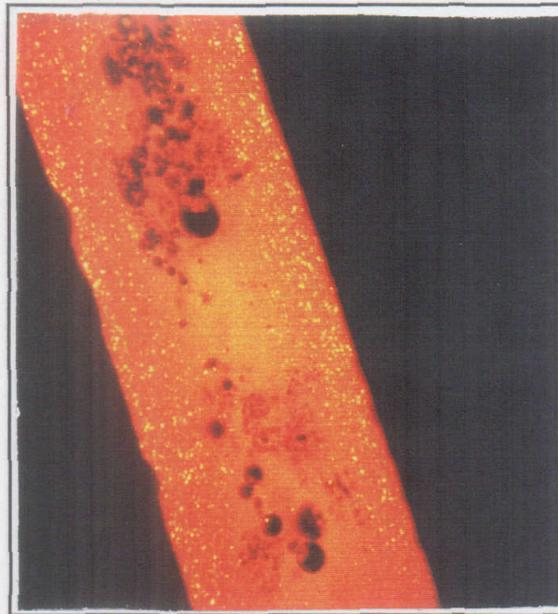


b

Figura 31: Imágenes al microscopio confocal de fluorescencia de la superficie de un esporangio en estado IV. **a)** Tamaño del lado mayor de la imagen: 250 μm . **b).** Tamaño del lado mayor de la imagen: 96 μm .



a



b

Figura 32: Imágenes al microscopio confocal de fluorescencia de la zona apical de un esporangióforo en estadio IV. **a)** Sección casi tangencial. **b)** Sección transversal. Ambas secciones estaban separadas por una distancia de 26 μm . Tamaño del lado mayor de la imagen: 250 μm .

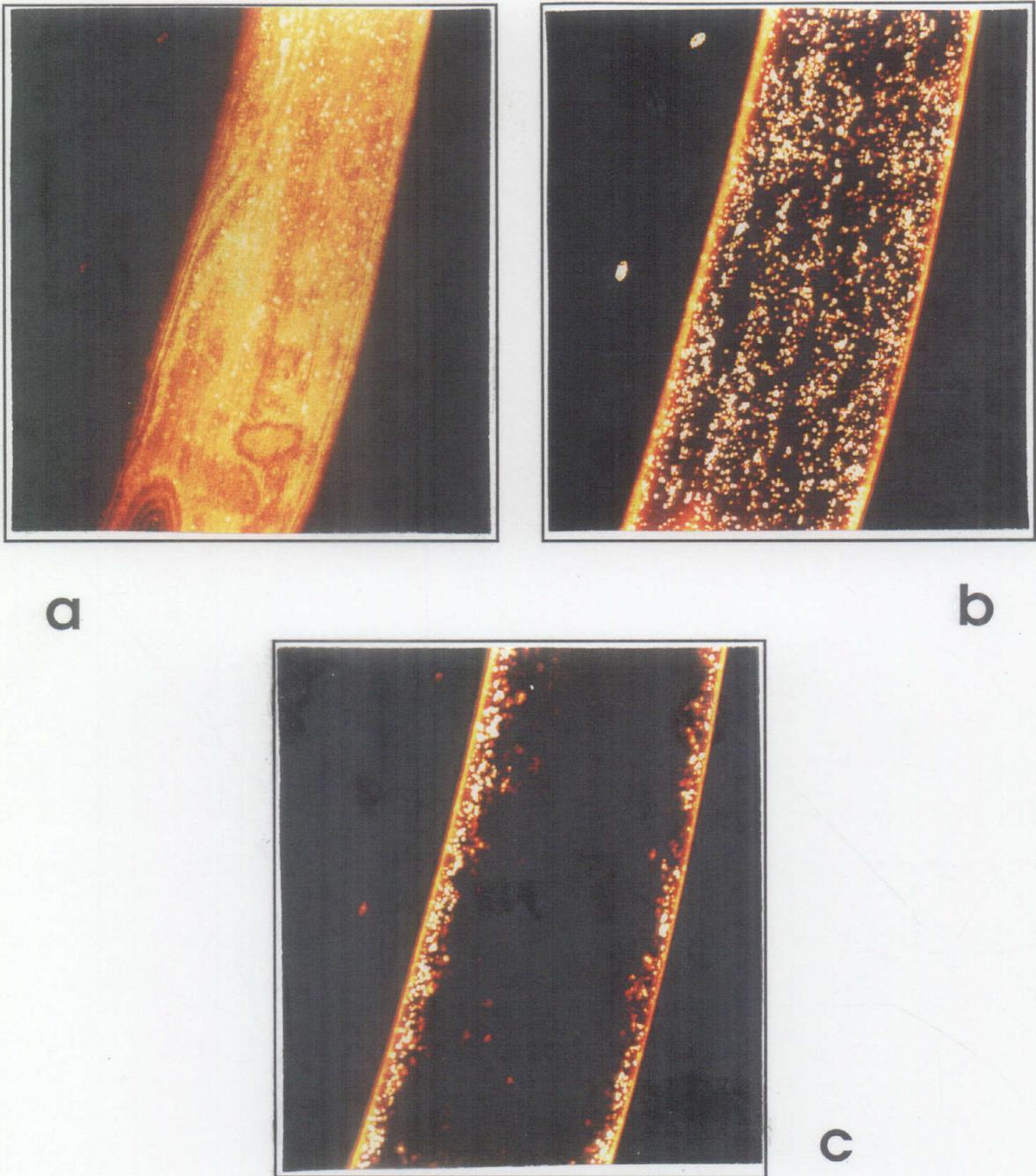


Figura 33: Imágenes al microscopio confocal de fluorescencia de un esporangióforo (zona no apical) en estadio IV. **a)** Sección casi tangencial. **b)** y **c)** Secciones transversales. **a** y **b** estaban separadas por una distancia de 5 μm . **b** y **c** estaban separadas por una distancia de 6 μm . Tamaño del lado mayor de la imagen: 250 μm .

4.3 DISCUSIÓN

4.3.1 Unión de riboflavina a la fracción microsomal

La unión reversible de riboflavina a la fracción de membranas que muestran nuestros resultados presentó características muy semejantes a las descritas por Dohrman (1983). La afinidad por la riboflavina en condiciones reductoras obtenida por nosotros ($k_D = 1.1 \times 10^{-6} \text{ M}$) era similar a la ya descrita ($k_D = 4 \times 10^{-6} \text{ M}$). Ambos valores contrastan con los de la proteína que liga riboflavina purificada del flagelo de *Euglena* tiene una constante casi mil veces menor (Neuman y Hertel, 1994), o sea, una afinidad mucho mayor. Es difícil aventurar qué significado podría tener esta diferencia en relación con el posible papel de estas proteínas en la fotorrecepción. Las diferencias de afinidad podrían reflejar diferencias en la concentración de riboflavina libre en ambos organismos.

En nuestras preparaciones la concentración del sitio que liga riboflavina en las membranas de los esporangióforos fué de al menos $0.14 \text{ nmoles g}^{-1}$ de masa fresca de esporangióforos, un valor menor que el calculado por Dohrman ($0.7 \text{ nmoles g}^{-1}$) y aproximadamente la mitad de la concentración mínima teórica calculada para el fotorreceptor en *Phycomyces* ($0.3 \text{ nmoles g}^{-1}$) (Bergman *et al.*, 1969). Sin embargo, hemos comprobado que durante la extracción una fracción importante de las membranas (y por tanto, de los sitios de unión) permanece retenida junto a las paredes celulares que se desechan. Las membranas de las fracciones de pared celular contienen $0.43 (\pm 0.1) \text{ nmoles}$ de sitios que ligan riboflavina por g de masa fresca de esporangióforos. Por tanto, la concentración total de sitios que ligan riboflavina en las membranas de los esporangióforos fué de al menos $0.57 \text{ nmoles g}^{-1}$ de

masa fresca. Las cifras aumentan además cuando en el tampón de extracción se emplea una mezcla de inhibidores de proteasas (A. Dederich, comunicación personal). En resumen, los sitios que ligan riboflavina en las membranas son suficientemente abundantes para poder ser el fotorreceptor.

Como ya había sido descrito anteriormente (Dohrman, 1983), en general la riboflavina se unió con mayor eficiencia a la fracción de membranas en condiciones reductoras que en condiciones oxidantes. Ocurre lo mismo también en las membranas de *Zea* y *Cucurbita* (Hertel *et al.*, 1980). Este hecho podría cuestionar el posible papel de esta interacción en la fotorrecepción. Se esperaría que la riboflavina que forme parte del fotorreceptor se encuentre en estado oxidado, ya que es el espectro de absorción de la riboflavina oxidada el que coincide con el espectro de acción de la luz. Es posible sin embargo, que las condiciones *in vitro* en las que detectamos la unión sean solo un reflejo lejano de las condiciones reales en las que *in vivo* se produce la interacción. Si, como se supone, el fotorreceptor es una estructura compleja en la que interaccionan múltiples elementos, podría ocurrir que durante la extracción y la purificación de la fracción de membranas se alterase en parte esta estructura o se perdiesen algunos de sus elementos. De hecho, la alta variabilidad de los resultados en condiciones oxidantes podría reflejar la pérdida ocasional de algún componente de una estructura compleja o de algún cofactor que interaccione con el sitio de unión y facilite la unión de riboflavina en condiciones oxidantes. También sería posible que las condiciones reductoras faciliten la unión de la riboflavina a la proteína, no sólo porque alteren la estructura de la riboflavina, sino porque alteren la de la proteína. Por último, cabría la posibilidad de que existieran dos proteínas distintas que unieran riboflavina, una en condiciones reductoras y la otra en condiciones oxidantes. Sin embargo, la proteína que liga riboflavina purificada de *Euglena* lo hace en ambas condiciones, con una afinidad semejante, ligeramente superior en condiciones oxidantes (Neumann y Hertel, 1994).

El experimento de Otto *et al* (1981) sugiere que la roseoflavina añadida al medio de cultivo puede actuar *in vivo* como pigmento del fotorreceptor y provocar cambios en el espectro de acción de la luz. Nosotros hemos comprobado que la roseoflavina se unía al sitio que liga riboflavina con una afinidad semejante a la de la propia riboflavina.

Ninguno de los mutantes analizados (*mad* y *pim*, que afectan a las fotorrespuestas, y *dar* que afecta a la entrada de riboflavina en la célula)

presentó diferencias llamativas respecto al silvestre en la unión de riboflavina a la fracción de membranas. Este resultado no es, sin embargo, totalmente concluyente y no significa necesariamente que el sitio que liga riboflavina no sea el fotorreceptor o la permeasa de riboflavina. Cualquiera de estas mutaciones podría afectar a la proteína que une riboflavina en un dominio distinto del sitio de unión, de forma que aunque la proteína no pudiera realizar su papel fisiológico normal, su capacidad para unir riboflavina se mantuviera intacta.

La solubilización de la proteína que ligaba riboflavina en la fracción microsomal nos ha permitido iniciar su purificación. Los resultados preliminares sugieren un tamaño de unos 65 kDa.

4.3.2 Unión de riboflavina a la fracción sobrenadante

Atribuimos a los fenoles presentes en los esporangióforos de *Phycomyces* la unión de riboflavina que hemos detectado en la fracción sobrenadante. Esta conclusión se basa en varias observaciones. El sitio soluble que liga riboflavina es de pequeño tamaño y muy resistente a la inactivación por altas temperaturas o detergentes, propiedades poco comunes en las proteínas pero fácilmente aplicables a los fenoles. El sobrenadante de los extractos de micelio (que contenían unas 10 veces menos fenoles que los esporangióforos) unió unas 10 veces menos riboflavina que el sobrenadante de los extractos de esporangióforos. Cuando el sobrenadante de los esporangióforos se fraccionó mediante filtración en gel, los fenoles aparecieron en las fracciones que unían riboflavina. Por último, comprobamos que las soluciones de ácido gálico puro ligaban riboflavina de forma similar a como lo hace la fracción sobrenadante de los extractos.

El cloruro de hierro tiene efectos drásticos sobre la capacidad del ácido gálico para ligar riboflavina. Se sabe que oxida al ácido gálico y facilita su polimerización. Las características cinéticas de la unión de riboflavina a la fracción soluble del esporangióforo reflejarían el estado de polimerización de los fenoles celulares. Esto hace que la concentración de sitios de unión calculada a partir de los datos cinéticos no sea igual necesariamente a la concentración de fenoles en las preparaciones.

Aunque los fenoles están presentes en la mayoría de los hongos, en *Phycomyces* alcanzan concentraciones inusualmente altas. Experimentos recientes (Popescu et al., 1989; Martín-Rojas et al., 1995) contradicen el papel

que se le atribuyó al ácido gálico en la fotorrecepción de radiación ultravioleta (Delbrück y Shropshire, 1960). Nada sugiere que la interacción de los fenoles con las flavinas intervenga en algún proceso relacionado con la percepción de la luz. Ambas moléculas están presentes en los esporangióforos y nuestros resultados mostraron que, al menos *in vitro*, ambas interaccionaban entre sí de forma reversible. Las fotografías de fluorescencia mostraban que la vacuola, que es el sitio donde presumiblemente se localizan los fenoles, no contenía riboflavina. La localización de ambas moléculas en compartimentos celulares distintos privaría a su interacción de significado biológico.

4.3.3 Distribución *in vivo* de la fluorescencia en *Phycomyces*

Es muy llamativa la intensa fluorescencia natural de *Phycomyces*. No conocemos otros organismos en los que se dé un fenómeno semejante. Otros organismos sensibles a la luz azul como las plantas y *Drosophila* presentan en las mismas condiciones una fluorescencia natural casi inapreciable. La intensa fluorescencia natural que observamos en *Phycomyces* podría estar relacionada con su enorme sensibilidad a la luz, poco común entre otros organismos fotosensibles.

La fluorescencia de *Phycomyces* podría proceder de una o varias moléculas distintas. Esta o estas moléculas tendrían dos particularidades principales: ser muy abundantes en la célula, y fluorescer a 510 nm cuando se excitan a 488 nm. Las flavinas comparten ambas características. De las tres flavinas mayoritarias en *Phycomyces*, riboflavina, FMN, y FAD, las dos primeras fluorescen intensamente en estado soluble, con una emisión máxima a 525 nm. En estado reducido, o formando parte de flavoproteínas, su fluorescencia decae considerablemente (Galland y Senger, 1991). La concentración de riboflavina y FMN solubles en el citoplasma de los esporangióforos de *Phycomyces* es de 5.5 y 4.0 μM , respectivamente (Hohl et al., 1992a); esta concentración sería más alta si las flavinas solubles ocupan únicamente el volumen que fluorescía en los esporangióforos, esto es, una estrecha banda superficial. El β -caroteno, pigmento mayoritario de *Phycomyces*, no es fluorescente.

En los esporangióforos aparecían dos tipos de fluorescencia: una difusa y otra corpuscular. Se observó que los corpúsculos fluorescentes se desplazaban a lo largo del esporangióforo, arrastradas por las fuertes corrientes citoplásmicas. Podría tratarse de vesículas que transportan la molécula

fluorescente hacia la zona de crecimiento. La fluorescencia difusa podría proceder de una molécula disuelta en el citoplasma, probablemente la misma que transportaban las vesículas fluorescentes.

La zona central no fluorescente del esporangióforo podría corresponder a la gran vacuola que lo recorre longitudinalmente (Galland y Ootaki, 1987). La vacuola termina antes de alcanzar la llamada zona de crecimiento, los milímetros más apicales del tallo (Galland y Ootaki, 1987). En concordancia con estas observaciones, la fluorescencia se distribuía homogéneamente por el interior del ápice, a diferencia de lo ocurría en la base del esporangióforo.

La movilidad de las vesículas fluorescentes sugiere que se localizan en el citoplasma que circunda la vacuola una región de sólo unos 15 μM de grosor. El volumen interno restante del esporangióforo en esta zona correspondería a la vacuola. En el ápice, la fluorescencia vesicular ocupa el mismo espacio que la difusa, lo que indica que también esta se localiza en el citoplasma.

Si la fluorescencia que observamos al microscopio procede de riboflavina y FMN solubles, es posible que esta fluorescencia y la unión no covalente de riboflavina a la fracción de membranas de *Phycomyces* (ver apartado 4.2.1) sean manifestaciones de un mismo proceso celular. La actividad y la fluorescencia aparecían en el micelio y en los esporangióforos, y en estos, en toda su longitud. También las esporas fluorescían y se ha comprobado que sus extractos de membrana unen riboflavina de forma no covalente (A. Dederichs, comunicación personal).

La fluorescencia y la actividad estaban presentes en estructuras aparentemente no fotosensibles, como la base del esporangióforo o las esporas. En la zona de crecimiento, la zona fotosensible del esporangióforo (Galland y Ootaki, 1987), la fluorescencia presentó una distribución particular que corresponde a la ausencia de vacuola en esta zona. Ningún resultado demuestra que la unión de riboflavina a las membranas sea un proceso relacionado con la fotorrecepción, aunque tampoco se excluye. Sería posible que esta riboflavina intervenga no sólo en la fotorrecepción sino en algún otro proceso esencial para el crecimiento. Este hecho justificaría la ausencia de mutantes sin capacidad para ligar riboflavina a sus membranas. En cualquier caso, el que esta fluorescencia tan intensa no aparezca en otros organismos sugiere que debe ser un reflejo de procesos celulares poco comunes.

5

Materiales y Métodos

5.1 Estirpes utilizadas en este trabajo

Las estirpes de *P. blakesleeanus* utilizadas en este trabajo, su genotipo, fenotipo y origen se presentan en la tabla 6.

Tabla 6. Estirpes de *Phycomyces blakesleeanus* empleadas en este trabajo.

Estirpe	Genotipo	Fenotipo relevante	Referencias
NRRL1555	(-)	Silvestre	
C21	<i>madA7 pde-1</i> (-)	Alterado en el fototropismo	1
L72	<i>madA7 madB103 madC119</i> (-)	Alterado en varias fotorrespuestas	2
L149	<i>madI712</i> (-)	Alterado en el fototropismo	3
A327	<i>madF48 nicA101</i> (+)	Alterado en el fototropismo	4
A909	<i>madJ407</i>	Alterado en el fototropismo	4
C2*S213	<i>carA5</i> (-) * <i>dar-52</i> (-)	Heterocarionte. Amarillo	5
S601	<i>pim-1 dar-52</i> (-)	Alterado en la fotoforogénesis. Resistente a deazarriboflavina	Esta tesis
S602	<i>pim-2 dar-52</i> (-)	Alterado en la fotoforogénesis. Resistente a deazarriboflavina	Esta tesis
S603	<i>pim-3 dar-52</i> (-)	Alterado en la fotoforogénesis. Resistente a deazarriboflavina	Esta tesis
S621	<i>dab-1 dar-52</i> (-)	Resistente a diaminobutanona y a deazarriboflavina	Esta tesis
S622	<i>dab-2 dar-52</i> (-)	Resistente a diaminobutanona y a deazarriboflavina	Esta tesis
S623	<i>dab-3 dar-52</i> (-)	Resistente a diaminobutanona y a deazarriboflavina	Esta tesis
S624	<i>dab-4 dar-52</i> (-)	Resistente a diaminobutanona y a deazarriboflavina	Esta tesis

¹ Bergman *et al.*, (1973) ² Lipson y Teresaka (1980) ³ Alvarez *et al.*, (1989)

⁴ Campuzano *et al.*, (1994) ⁵ Roncero *et al.*, (1984)

Siguiendo la nomenclatura genética propuesta por Demerec *et al.* (1966), las estirpes se designan con una letra mayúscula que corresponde al laboratorio donde fueron obtenidas (A, Departamento de Genética de la Universidad de Salamanca; C, California Institute of Technology; L, Department of Physics, Syracuse University; S, Departamento de Genética de la Universidad de Sevilla) y un número de aislamiento. La estirpe silvestre NRRL1555 proviene de la colección del Northern Regional Research Laboratory, USDA, Peoria, Illinois, USA.

Los genotipos de los mutantes se nombran con tres letras minúsculas que indican el proceso biológico afectado, junto a una letra mayúscula que hace referencia al gen mutado, si se conoce, o junto a un guión, si no se conoce, y un número de alelo. Las mutaciones *mad* afectan a las respuestas fototrópicas; la mutación *carA5* bloquea la síntesis de carotenoides y da lugar a micelios blancos; la mutación *dar-52* confiere resistencia a 5-deaza-5-carbono-riboflavina; la mutación *nicA101* provoca auxotrofia para ácido nicotínico, y la mutación *pde-1* disminuye la actividad fosfodiesterasa en un 80 %. El tipo sexual de la estirpe se indica con los signos (+) y (-).

Los heterocariontes se designan con el símbolo "*" situado entre los nombres de las estirpes que los componen.

5.2 Medios de cultivo

Como medio mínimo se utilizó el descrito por Sutter (1975) con 2 g l⁻¹ de L-asparagina como fuente de nitrógeno. Para su uso como medio sólido se añadieron 15 g l⁻¹ de agar. Para obtener colonias aisladas, el medio se acidificó con HCl hasta pH 3.3.

Para seleccionar mutantes *dar* se añadió 1 µg ml⁻¹ de 5-deaza-5-carbono-riboflavina.

Los extractos que contenían los sitios que ligan riboflavina se obtuvieron a partir de cultivos en agar mínimo con 1 g l⁻¹ de extracto de levadura.

Los experimentos de fototropismo se realizaron en pequeños viales cilíndricos de vidrio llenos con 1.5 ml de agar patata. El agar patata se preparó hirviendo durante una hora 200 g de patatas troceadas. Al extracto resultante se le añadieron, tras filtrarlo, 20 g de sacarosa y 15 g de agar; el volumen se completó con agua destilada hasta un litro; a la mezcla, una vez autoclavada, se le añadió 1 mg de tiamina-HCl.

5.3 Mutagénesis

Los mutantes se obtuvieron a partir de suspensiones de esporas mutagenizadas siguiendo el protocolo descrito por Roncero *et al.* (1984). Las esporas del heterocarionte C2 * S213 inoculadas en agar mínimo ácido dieron tres tipos de colonias: blancas (con solo núcleos C2), amarillas (con solo núcleos S213) y amarillas claras (heterocariontes con mezclas de ambos tipos de núcleos en diferentes proporciones). Se subcultivaron en agar mínimo varias colonias amarillas muy claras (esperando que tuvieran más núcleos C2 que S213), se cosecharon sus esporas, se inocularon en agar mínimo ácido y se contaron las colonias de cada color. Se eligió una suspensión de esporas que daba un 79% de colonias blancas, que corresponde a una proporción $p=0.06$ de núcleos amarillos S213 (Heisenberg y Cerdá-Olmedo, 1968).

Se expusieron 4.5×10^7 esporas de este heterocarionte a 0.5 mg del mutágeno N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina en 5 ml de agua destilada estéril durante 30 minutos a temperatura ambiente. El porcentaje de esporas supervivientes a la mutagénesis fué del 10% aproximadamente. Las esporas supervivientes se inocularon en cuatro cajas de agar mínimo suplementado con 5-deaza-5-carbono-riboflavina a razón de 1.1×10^6 esporas por caja. Se cosecharon separadamente las esporas producidas en cada caja, y se congelaron. La alta densidad de siembra en el medio de selección favorecía el desarrollo de las colonias con crecimiento normal frente a las de crecimiento lento. En este medio con 5-deaza-5-carbono-riboflavina sólo pueden germinar las esporas homocariontes con núcleos S213. Como antes de realizar la mutagénesis la proporción de núcleos S213 en el heterocarionte era muy baja, la gran mayoría de las colonias resistentes a 5-deaza-5-carbono-riboflavina debe proceder de esporas con un sólo núcleo viable. Este protocolo favorece la selección de mutantes homocariontes, y facilita la obtención de mutaciones recesivas.

5.4 Mutantes de la fotoforogénesis

5.4.1 Fotoforogénesis

Se siguieron los métodos propuestos por Corrochano y Cerdá-Olmedo (1988).

5.4.1.1 Condiciones de cultivo

Los cultivos se realizaron en cajas de Petri (8.5 cm de diámetro interno) que contenían 25 ml de agar mínimo. Cada caja se inoculó con 10^5 esporas activadas por choque térmico (48 °C, 15 min) en 2 ml de agar de cobertera (agar mínimo con 7.5 g l^{-1} de agar). Los cultivos se incubaron a 22 °C durante 4-5 días en distintas condiciones de iluminación.

5.4.1.2 Condiciones de iluminación

Para la iluminación continua con luz azul los cultivos se colocaron bajo una batería de cinco lámparas fluorescentes (Sylvania GTE, Standard, 40 W), dentro de una caja de cartón sin tapadera, dividida en compartimentos y con las paredes y el fondo cubiertos de cartulina negra para evitar la reflexión de la luz. La caja se cubrió con una lámina de plástico azul (plexiglás, máxima transmisión alrededor de 460 nm) y cada compartimento se cubrió con varias láminas de plástico neutro para ajustar la intensidad luminosa.

La iluminación por destellos se hizo colocando los cultivos (3 cajas de Petri cada vez) en el interior de un compartimento opaco que tenía una pequeña abertura en su parte superior por donde entraba la luz. Como fuente de luz se utilizó una lámpara de cuarzo halógeno (Sylvania FCS, 150W) colocada en un proyector de diapositivas (Hanimex 2100 EF). El rayo de luz pasaba a través de dos filtros térmicos (KG1; Schott, Mainz, Alemania), filtros de densidad neutros (tipo NG, Schott) y un filtro azul (5-61; Corning Glass Works, Corning, N.Y., U.S.A; máxima transmisión alrededor de 440 nm).

La incubación en oscuridad se hizo colocando los cultivos en el interior de cajas de cartón, protegidos de la luz mediante cartulina negra. En estas condiciones se incubaron también los cultivos que iban a ser iluminados por destellos. En este caso, en el momento oportuno para la iluminación, los cultivos se sacaron de la caja negra, se iluminaron y se colocaron de nuevo en oscuridad. Todas las manipulaciones se hicieron en oscuridad.

5.4.1.3 Cuantificación de la forogénesis

La producción de micróforos se determinó contándolos en un microscopio (x40 aumentos) a través de un retículo calibrado. El número total de micróforos por caja se estimó a partir de varias áreas de micelio tomadas al azar. En cada caja se contaron al menos 200 micróforos.

La producción de macróforos se estimó determinando su masa seca. Para ello, los macróforos se arrancaron del micelio, se secaron en un horno a 85 °C durante al menos 24 horas y se pesaron.

5.4.2 Fototropismo

Se siguió básicamente el método propuesto por Bergman *et al.* (1973) para la determinación de umbrales en un túnel oscuro.

Los cultivos se realizaron en pequeños viales cilíndricos de vidrio llenos con 1.5 ml de agar patata. Los viales se inocularon con unas 10 esporas activadas por choque térmico, y se incubaron a 22 °C en oscuridad. Al segundo día los cultivos se pasaron a condiciones de iluminación continua, bajo luz azul cenital de una intensidad de 10^{-2} W m^{-2} aproximadamente. Al tercer día desde la inoculación se arrancaron y desecharon todos los esporangióforos producidos, ya que, típicamente, esta primera cosecha consta de esporangióforos más finos y de comportamiento más errático que las cosechas sucesivas (segunda y tercera). Al cuarto día, para evitar las interacciones quimiotrópicas que se producen entre esporangióforos muy próximos y que afectan al fototropismo, se arrancaron casi todos los esporangióforos de la segunda cosecha, dejando sólo un único esporangióforo por vial. Para el estudio del fototropismo se seleccionaron esporangióforos verticales, en estadio IV temprano, de 1-2 cm de longitud.

La iluminación de los esporangióforos se hizo en un cuarto oscuro en el que la temperatura rondaba los 22 °C, y en el que todas las superficies eran de color negro para evitar la reflexión de la luz. La fuente de luz se colocó fuera del cuarto oscuro de forma que, a través de un agujero en la pared de 15 x 15 cm, iluminase directamente los esporangióforos. Los viales que contenían los esporangióforos se colocaron en fila sobre soportes negros de madera de 175 mm de alto, 300 mm de largo y 25 mm de grosor. Los soportes se colocaron de forma perpendicular al rayo de luz, sobre una mesa de unos 3.5 m de longitud. La

distancia de cada soporte a la fuente de luz fué de 177, 250, 353, 707, 1000, 1414, 2000 y 2828 mm. Dado que la intensidad luminosa en un punto determinado es inversamente proporcional al cuadrado de la distancia que separa ese punto de la fuente de luz, esta disposición hacía que cada una de los soportes recibiera la mitad de la intensidad de luz que recibía el soporte anterior.

Como fuente de luz se utilizó una lámpara halógena de tungsteno (Mazda, 60W), que actuaba como un punto de irradiación de luz no colimada. Las características del rayo de luz que la lámpara emitía hacia el cuarto oscuro se modificaron con distintos filtros colocados, con ayuda de un dispositivo especial, en el hueco de la pared. Se utilizaron, un filtro anticalórico (KG1; Schott), un filtro azul (5-61; Corning Glass Works, máxima transmisión alrededor de 440 nm) y varios filtros neutros (tipo NG; Schott).

Los esporangióforos crecieron sometidos a iluminación lateral durante unas 10 horas. El fototropismo se calculó midiendo en cada esporangióforo la desviación angular en dirección a la fuente de luz respecto al eje vertical.

5.4.3 Fotocarotenogénesis

Se siguieron básicamente los métodos descritos por Bejarano *et al.* (1991) y Lopez-Díaz y Cerdá-Olmedo, (1981).

Los cultivos se realizaron en cajas de Petri pequeñas (5.5 cm de diámetro interno) que contenían aproximadamente 10 ml de agar mínimo. Las cajas se inocularon con unas mil esporas activadas por choque térmico en 1 ml de agar mínimo de cobertera ($7.5 \text{ g} \times \text{l}^{-1}$ de agar). Los cultivos se incubaron a 22 °C durante 4-5 días en las condiciones descritas en el apartado de fotomorfogénesis, pero se empleó luz blanca, por lo que se prescindió de la lámina de plástico azul.

A los 4 días desde la inoculación se tomó el micelio y los esporangióforos de cada caja, se congeló, se liofilizó y se pesó. El material liofilizado se mezcló con arena de mar lavada y se trituró en un mortero hasta conseguir un polvo fino. Se añadieron 5 ml de éter de petróleo (punto de ebullición 40-60 °C), se agitó para disolver los carotenos y se recogieron con una pipeta. Esta operación se repitió hasta extraer todo el caroteno. Las fracciones se centrifugaron durante 5 min a 1000 rpm para eliminar la arena y los mayores restos de micelio. El sobrenadante se secó evaporando el éter de petróleo a 45 °C en un evaporador rotatorio conectado a una bomba de vacío (Büchi, RE 111, Suiza). Los carotenos se resuspendieron luego en *n*-hexano. La concentración de β -caroteno en estas

soluciones se estimó midiendo su absorbencia a 450 nm en un espectrofotómetro.

5.4.4 Medición de la luz

Las medidas de la luz se hicieron con un fotodiodo de silicio (PIN-10DP/SB; United Detector Technology, Hawthorne, CA, USA) conectado a un picoamperímetro (480; Keithley Instruments, Cleveland, OH, USA). Los fotodiodos se calibraron con un termopar (E4, Eppley Laboratory, Newport, RI, USA) conectado a un microvoltímetro (modelo 197; Keithley Instruments, Cleveland, OH, USA). Las medidas y las calibraciones se realizaron como aparece descrito en Galland y Lipson (1987).

5.5 Mutantes resistentes a diaminobutanona

5.5.1 Condiciones de cultivo

Los cultivos se realizaron en medio mínimo, inoculado con unas mil esporas por ml activadas por choque térmico (48 °C durante 15 minutos) o con pequeños trozos de micelio. Los cultivos líquidos (5 ml de medio mínimo en tubos de cultivo de 15 x 2 cm) se incubaron en agitación a 240 rpm. Los cultivos sólidos se hicieron en cajas de Petri de 8,5 cm de diámetro. Cuando fué necesario pasar el micelio a una nueva caja, el agar se cubrió antes de la inoculación con un disco de celofán estéril de 8.5 cm de diámetro, previamente lavado en agua destilada hirviendo y autoclavado entre hojas húmedas de papel de filtro.

5.5.2 Determinación de la masa seca de los cultivos

La masa seca de los cultivos se determinó secando los micelios en un horno a 80 °C durante al menos 24 h y pesándolos en una balanza de precisión.

5.5.3 Análisis de poliaminas por cromatografía en capa fina

En el análisis de poliaminas por cromatografía en capa fina se siguió a Calvo-Mendez *et al.* (1987) y Davis *et al.* (1985) con ligeras modificaciones. Se inocubaron unas 2.5×10^4 esporas activadas por caja de agar mínimo, se recogieron los micelios aproximadamente a las 48 horas de edad, antes de que aparecieran los esporangióforos, y se dividieron en dos mitades iguales. Una mitad se secó en un horno a $80\text{ }^\circ\text{C}$ durante al menos 24 horas para determinar su masa seca (se obtuvieron en estas condiciones unos 20 mg por cada media caja). La otra mitad se extrajo triturándola en un mortero en presencia de 1-2 ml de ácido perclórico 0.3 M; EDTA 1 mM. Los restos sólidos se eliminaron centrifugando el extracto dos veces en una microcentrífuga (IEC, modelo Micromax) a 8000 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante se empleó para el marcaje con cloruro de dansilo.

5.5.3.1 Marcaje con cloruro de dansilo

Se mezclaron 200 μl de sobrenadante con 20 mg de carbonato de sodio y 600 μl de una solución (5 g/l) de cloruro de dansilo en acetona. Las muestras se incubaron durante toda la noche a $22\text{ }^\circ\text{C}$ en oscuridad. Para eliminar el exceso de cloruro de dansilo a las muestras se añadieron 20 μl de prolina (50 g/l), se incubaron a $55\text{ }^\circ\text{C}$ durante 1 h y se centrifugaron a 8000 rpm durante 2 min. A cada sobrenadante se añadieron 5 ml de benceno, se agitó bien, y se centrifugó a 6000 rpm durante 10 min. La fase orgánica de cada muestra se evaporó a $70\text{ }^\circ\text{C}$ en un evaporador rotatorio conectado a una bomba de vacío (Büchi, RE 111, Suiza). Finalmente los restos secos se disolvieron en 300 μl de benceno para su análisis en capa fina.

Como controles para identificar y estimar la abundancia de cada una de las bandas de la cromatografía se utilizaron soluciones puras de L-ornitina, putrescina, espermidina, espermina y diaminobutanona, todas ellas de Sigma Chem. Co., St. Louis, MO, USA. Estas moléculas, a una concentración 10 mM en ácido perclórico, se marcaron con cloruro de dansilo del mismo modo que los extractos celulares.

5.5.2.2 Cromatografía en capa fina

Se utilizaron placas de gel de sílice en poliéster de 20 x 20 cm (Polygram SIL G, Aldrich, Alemania) activadas durante aproximadamente 1 hora a $80\text{ }^\circ\text{C}$ antes de su uso. El solvente fué 25 ml de una mezcla de cloroformo:trietilamina

(5:2) que se añadió al tanque al menos una hora antes del inicio de la cromatografía. Se cargaron 5-25 μ l de muestra por carril. Una vez cargadas todas las muestras, la placa se volvió a secar en el horno a 80 °C durante 10 minutos. Tras enfriarla a temperatura ambiente, el extremo de la placa se puso en contacto con el solvente para iniciar la cromatografía. A los 90 min la placa se sacó del tanque de cromatografía y se secó a temperatura ambiente durante unos minutos. Las bandas se visualizaron con una lámpara de radiación ultravioleta A (Sylvania, Blacklite-Blue, 18 W), se rasparon y se pasaron por separado a viales Eppendorf de 1.5 ml; a cada vial se añadió 1 ml de metanol y se agitó bien. La cantidad de poliaminas presente en cada banda se determinó midiendo la fluorescencia a 525 nm de la solución de metanol excitada con luz de 360 nm, en un espectrofluorímetro Perkin-Elmer modelo LS-3B. En las condiciones citadas los coeficientes de migración (RF) fueron: ornitina, 0.40; putrescina, 0.47; espermidina, 0.67 y diaminobutanona, 0.35.

5.6 Sitios que ligan riboflavina

5.6.1 Condiciones de cultivo

Se inocularon aproximadamente 5×10^4 esporas por caja en 2 ml de agar de cobertera (igual al medio de cultivo pero con sólo 7 g l⁻¹ de agar). Previamente las esporas se activaron por choque térmico a 48 °C durante 15 min. Estos cultivos se incubaron en oscuridad a 20-22 °C durante 4-5 días.

5.6.2 Extracción

Los extractos de membranas y sobrenadante se realizaron según el método descrito por Dohrmann (1983) con ligeras modificaciones. Los esporangióforos se arrancaron y se pesaron para determinar su peso fresco. Luego se congelaron rápidamente sumergiéndolos en nitrógeno líquido y se pulverizaron en un mortero hasta obtener un polvo homogéneo y fino. El material resultante se disolvió en tampón de extracción (Tris-HCl 50 mM, pH 8,0; sacarosa 0,25 M; cloruro de magnesio 0,1 mM; EDTA 1 mM) a razón de 0,1 g de masa fresca por ml, y se filtró a través de varias capas de gasa para eliminar los trozos grandes de pared celular. El eluente se centrifugó a 500 g durante 5 min a 4 °C para eliminar otros restos de pared, las esporas y las

mitocondrias. El sobrenadante se volvió a centrifugar a 200.000 g durante 20 min a 4 °C. El precipitado obtenido (fracción microsomal que contiene las membranas celulares) se resuspendió en tampón Tris-HCl 50 mM, pH 8,0 con ayuda de un homogenizador de vidrio, a una concentración de 5-8 g de masa fresca equivalente por ml, y se dividió en alícuotas de 0,5-1 ml que se congelaron en nitrógeno líquido y se guardaron a -70 °C hasta su uso.

También se obtuvo la fracción microsomal que permanecía asociada a los grandes restos de paredes celulares retenidos en los filtros de gasa en el primer filtrado del extracto celular. Estas paredes se resuspendieron en tampón de extracción frío (Tris-HCl 50 mM, pH 8,0; sacarosa 0,25 M; cloruro de magnesio 0,1 mM; EDTA 1 mM) a razón de aproximadamente 1 g de masa fresca equivalente por ml. Para desprender las membranas asociadas a las paredes celulares, esta suspensión se sonicó en un ciclo de 12 pulsos de 10 s a máxima intensidad con paradas de 20 s entre cada pulso en un sonicador Branson modelo B15 (Micro Tip). Para evitar el calentamiento la suspensión se mantuvo en un baño de hielo durante la sonicación. La suspensión resultante se filtró, centrifugó y guardó como se describió anteriormente para la fracción microsomal del filtrado. Estas fracciones de membranas retenidas en las paredes celulares se usaron principalmente en los experimentos de purificación, ya que en ellas la concentración de sitios de unión era unas 2-3 veces mayor que en la fracción de membranas del filtrado.

Para los ensayos de actividad en el sobrenadante, se tomaron alícuotas del sobrenadante obtenido en la segunda centrifugación del proceso de extracción (200.000 rpm). Estas muestras se hirvieron en agua durante 30 min y posteriormente se centrifugaron en una microcentrífuga a 12.000 r.p.m. durante 5 min. El sobrenadante resultante se congeló en nitrógeno líquido y se guardó a -70 °C hasta su uso .

5.6.3 Determinación de la concentración de proteínas

La concentración de proteínas se determinó con azul de Coomassie (Spector, 1978). Se mezclaron 10 µl de la solución de proteína con 25 µl de hidróxido de sodio 1 M y 1 ml de solución de Coomassie (25 mg de azul de Coomassie 6250; 12,5 ml de etanol 95 %, 25 ml de ácido fosfórico 85 % (p/v) y agua hasta un volumen final de 250 ml). El calibrado se realizó con seroalbúmina bovina.

5.6.4 Ensayos de unión de riboflavina

Se siguieron básicamente los métodos descritos por Nebenführ *et al.* (1991) y Neumann y Hertel (1994). Hulme y Birdsall (1992) contiene una revisión general sobre la teoría y la metodología utilizada en la investigación de las interacciones receptor-ligando.

5.6.4.1 Ensayos de unión de riboflavina a la fracción de membranas

Como marcador radiactivo se utilizó [³H]-riboflavina (666 GBq mmol⁻¹) sintetizada por Amesham Buchler (Braunschweig, Alemania).

Los ensayos de unión se iniciaron mezclando extractos de membrana (típicamente 30 µg de proteína total), [³H]-riboflavina (concentración final aproximada 10⁻⁸ M), ditionito sódico (concentración final 5 mM) y la concentración que se indique de riboflavina no radiactiva en tampón Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, en viales eppendorf de 1,5 ml. El volumen final de reacción fue normalmente de 125 µl; en los casos de muestras de proteína muy diluidas, como las fracciones cromatográficas, el volumen final se aumentó en distinto grado, hasta un máximo de 300 µl.

Tras 20 min. de incubación en condiciones de luz y temperatura ambiente, cada muestra se diluyó en 5 ml de tampón Tris-HCl 50 mM, pH 8,0 enfriado en hielo y se filtró rápidamente a través de un filtro de fibra de vidrio (Whatman GF/B; Bender & Hobein, Alemania) colocado sobre un soporte de Kitasato conectado a una bomba de vacío. Previamente, los filtros se incubaron durante aproximadamente 1 hora en una solución de polietileneimina (0,3 g/l), resina de carga eléctrica positiva que retiene las proteínas. Los complejos de proteína-riboflavina formados durante el ensayo de unión quedaban así retenidos en el filtro impregnado de polietileneimina.

Los filtros se enjuagaron inmediatamente con 2 ml del tampón de dilución frío para lavar la riboflavina radiactiva retenida de forma no específica. Dado que los complejos proteína-riboflavina son inestables, tanto las diluciones como las filtraciones se hicieron a la máxima velocidad posible.

Los filtros se transfirieron a viales de centelleo de 10 ml a los que se añadieron 3 ml de líquido de centelleo (Ultima Gold, Beckman Co., Munich, Alemania). La radiactividad contenida en los viales se midió en un contador de centelleo (Beckman Liquid Scintillation Counter).

5.6.4.2 Ensayos de unión de riboflavina a la fracción sobrenadante

Los ensayos se iniciaron mezclando en viales eppendorf de 1,5 ml volúmenes iguales de sobrenadante (unos 15-20 μg de proteína) y tampón Tris-HCl 50 mM pH 8,0, que contenía [^3H]-riboflavina (concentración final aproximada 10^{-9} M), sulfato de amonio (concentración final 1 M) y riboflavina no radiactiva (hasta la concentración final que se indique). El volumen final de reacción fué normalmente de 500 μl .

Las mezclas se incubaron a 4 °C durante 30 min y se filtraron como se indica para los ensayos de unión de riboflavina a la fracción de membranas.

5.6.5 Solubilización del sitio que ligaba riboflavina en la fracción microsomal

Los extractos de membrana se solubilizaron habitualmente en tampón Tris-HCl 50 mM, pH 8,0; Zwittergent 3-12 (8 g/l), a una concentración final de aprox. 5 mg de proteína por ml. Tras 30 min de incubación a 4 °C, las muestras se centrifugaron a 400.000 g durante 15 min a 4 °C. El sobrenadante resultante contenía las proteínas solubilizadas. Para evitar que una alta concentración de detergente dañara la actividad, la concentración de Zwittergent 3-12 en el sobrenadante se rebajó a 2 g/l (la concentración mínima a la que el Zwittergent 3-12 forma micelas -concentración crítica micelar- es de 1.2 g/l).

5.6.6 Técnicas cromatográficas

Las cromatografías se realizan con un equipo de cromatografía líquida (FPLC, Pharmacia, Uppsala, Suecia) siguiendo las instrucciones del fabricante. Todas estas cromatografías se realizaron a 4 °C. Cuando fué necesario, las muestras se concentraron por filtración en filtros Microcon 30 (Amicon) con un tamaño de exclusión para proteínas globulares de 30 KDa.

Para la filtración en gel se utilizó la columna Superose 6 HR 10/30 (Pharmacia) que contiene una matriz de agarosa, con un límite de exclusión para proteínas globulares de aprox. 40 MDa de peso molecular y capaz de separar proteínas de 5 kDa a 5 MDa de peso molecular. La columna se equilibró y eluyó con tampón Tris-HCl 25 mM, pH 7,8, Zwittergent (2 g/l), glicerol 1 % (v/v), cloruro de sodio 0,15 M. La velocidad de flujo fué de 0,3 ml/min. Se tomaron fracciones de 1 ml.

La columna para las cromatografías de intercambio aniónico (Mono Q HR 5/5, Pharmacia) se equilibró con tampón Tris-HCl 25 mM, pH 7,8, Zwittergent (2 g/l), glicerol 1 % (v/v), cloruro de sodio 0,15 M. La elución se hizo con un gradiente lineal de 0,15-0,9 M de cloruro sódico en 15 ml del mismo tampón a una velocidad de flujo de 0,5 ml/min. Se tomaron fracciones de 0,5 ml.

Las filtraciones en gel de los extractos de fracción sobrenadante se realizaron manualmente en columnas de Sephadex G25 de 30 cm de altura y 1 cm de anchura. El tampón de equilibrado y elución fué Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, que fluyó a través de la columna por gravedad. El volumen interno y el volumen de fraccionamiento de la columna se establecieron siguiendo el flujo de una solución 1:1 de azul dextrano (peso molecular 2 MDa) y ferricianuro (peso molecular 320 Da) (5 g l⁻¹ de cada uno). Se tomaron manualmente fracciones de 1 ml.

5.6.7 Electroforesis en geles de poliacrilamida

Las proteínas de las distintas fracciones se separaron mediante electroforesis desnaturalizante en geles de poliacrilamida al 12 % según el sistema discontinuo descrito por Laemmli (1970). Los geles de separación (15 x 7 cm) se prepararon mezclando 3,75 ml de tampón Tris-HCl 1,5 M, pH 8,8, 0,15 ml de laurilsulfato sódico (SDS, 100 g/l), 6 ml de una solución de acrilamida (300 g/l) y N',N'-bis-metilen-acrilamida (8 g/l), 5 ml de agua destilada, 75 µl de persulfato de amonio (100 g/l) y 7,5 µl de TEMED. Los geles de empaquetamiento (15 x 3 cm) se prepararon mezclando 1,3 ml de la misma solución de acrilamida empleada para el gel de separación, 2,5 ml de tampón Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8, 0,1 ml de laurilsulfato sódico (100 g/l), 6,1 ml de agua destilada, 50 µl de persulfato de amonio (100 g/l) y 10 µl de TEMED. Ambos geles tenían un grosor de 1 mm y se prepararon inmediatamente antes de su uso. El gel de empaquetamiento se vertió sobre el gel de separación una vez que éste estaba completamente polimerizado.

El tampón de carga contenía, para un volumen final de 10 ml, 1,2 ml de tampón Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8, 2 ml de laurilsulfato sódico (100 g/l), 0,5 ml de azul de bromofenol (5 g/l), 4,8 g de urea (concentración final 8 M) y agua destilada hasta completar 9,5 ml. Justo antes de usarlo se añadieron 50 µl de β-mercaptoetanol por cada 950 µl de tampón de carga. Las muestras se mezclaron con 1-2 volúmenes de tampón de carga y se calentaron a 100 °C durante 4 min para desnaturalizar las proteínas.

El tampón de electrodo contenía Tris 25 mM, glicina 192 mM y laurilsulfato sódico (1 g/l). Tras prepararlo se verificó que el pH resultante fuese 8,3 ($\pm 0,2$).

Las electroforesis se realizaron a temperatura ambiente y una intensidad de corriente constante de 50 mA. Como patrón de referencia se utilizó una mezcla de proteínas puras preteñidas suministrada por Sigma Chem. Co. que contenía anhidrasa carbónica de eritrocitos bovinos (29 kDa), ovoalbúmina (45 kDa), albúmina bovina (66 kDa), fosforilasa b de músculo de ratón (97,4 kDa), b-galactosidasa de *E. coli* (116 kDa) y miosina de músculo de ratón (205 kDa).

5.6.8 Tinción de proteínas

Las proteínas se visualizaron sumergiendo los geles en una solución de 1 g de azul de Coomassie R-250, 100 ml de ácido acético, 400 ml de metanol y agua destilada hasta completar un volumen de 1 l. Tras 15-30 min de tinción a temperatura ambiente, los geles se lavaron varias veces con una solución de metanol (400 ml/l) y ácido acético (100 ml/l) en agua destilada. Tras este tratamiento las proteínas aparecían como bandas de color azul.

5.6.9 Determinación de la concentración de fenoles

La concentración total de fenoles se determinó según el método del azul de Prusia (Budini *et al.*, 1980). A 1 ml de solución fenólica se añadieron 65 μ l de ferricianuro potásico 0,1 M en HCl 0,1 M, e inmediatamente se añadieron otros 65 μ l de cloruro férrico 8 mM. Tras 5 min se midió la absorbancia a 700 nm en un espectrofotómetro. El calibrado se hizo con una solución de ácido gálico puro.

5.6.10 Microscopía confocal

Se utilizaron esporangióforos de la estirpe silvestre cultivada en agar mínimo a 20 °C en oscuridad. Los esporangióforos se colocaron en una gota de agua sobre un portaobjetos y se cubrieron con un cubreobjetos.

Se utilizó un microscopio confocal Leica CLSM TCS⁴D equipado con un láser de criptón-argón que emitía luz de 488 nm. La luz emitida por la muestra se filtró a través de un filtro monocromático de 510 nm. Las imágenes se grabaron y se procesaron utilizando el programa "Scanware" de Leica. El tamaño de las imágenes fue de 1024 x 1024 pixels.

6

Bibliografía

- Ahmad, M. y Cashmore, A. R. (1993) "HY4 gene of *A. thaliana* encodes a protein with characteristics of blue-light photoreceptor". *Nature* **366**: 162-166.
- Ahmad, M., Lin, C. y Cashmore, A. R. (1995) "Mutations throughout an *Arabidopsis* blue-light-responsive anthocyanin accumulation and inhibition of hypocotyl elongation". *The Plant Journal* **8**: 653-658.
- Alvarez, M. I., Eslava, A. P. y Lipson, E. D. (1989) "Phototropism mutants of *Phycomyces blakesleeanus* isolated at low light intensity". *Exp. Mycol.* **13**: 38-48.
- Antequera, F., Tamame, M., Villanueva, J. R. y Santos T. (1984) "DNA methylation in the fungi". *J. Biol. Chem.* **259**: 8033-8037.
- Antequera, F., Tamame, M., Villanueva, J. R. y Santos, T. (1985) "Developmental modulation of DNA methylation in the fungus *Phycomyces blakesleeanus*". *Nucleic Acids Res.* **13**: 6545-6558.
- Auvinen, M., Paasinen, A., Andersson, L. C. y Hölttä, E. (1992) "Ornithine decarboxylase activity is critical for cell transformation". *Nature* **360**: 355-358.
- Barrero, A. F., Oltra, J. E. y Poyatos J. A. (1996) "Acidic metabolites from *Phycomyces blakesleeanus*". *Phytochem.* **42**: 1427-1433.
- Bejarano, E. R., Avalos, J., Lipson E. D. y Cerdá-Olmedo, E. (1991) "Photoinduced accumulation of carotene in *Phycomyces*". *Planta* **183**: 1-9.
- Bergman, K. (1972) "Blue-light control of sporangiophore initiation in *Phycomyces*". *Planta* **107**: 53-67.
- Bergman, K., Burke, P. V., Cerdá-Olmedo, E., David, C. N., Delbrück, M., Foster, K. W., Goodell, E. W., Heisenberg, M., Meissner, G., Zalokar, M., Dennison, D. S. y Shropshire, W. (1969) "*Phycomyces*". *Bacteriol. Rev.* **33**: 99-157.
- Bergman, K., Eslava A. P. y Cerdá-Olmedo, E. (1973) "Mutants of *Phycomyces* with abnormal phototropism". *Mol. Gen. Genet* **123**: 1-16.

- Blakeslee, A. F. (1904) "Sexual reproduction in the Mucorineae" *Proc. Am. Acad. Arts Sci.* **40**: 205-319.
- Borchert, R. (1963) "Über die Azetat-Aktivierung der Sporangiosporen von *Phycomyces blakesleeanus*". *Beiträge zur Biologie der Pflanzen* **38**: 31-61.
- Briggs, W. R. y Iino, M. (1983) "Blue light absorbing photoreceptors in plants". *Phil. Trans. R. Soc. London (Biol.)* **303**: 347-359.
- Brodhun, B., Neumann, R., Hertel, R. y Häder, D. P. (1994) "Riboflavin-binding sites in the flagella of *Euglena gracilis* and *Astasia longa*". *J. Photochem. Photobiol.* **23**: 135-139.
- Budini, R., Tonelli, D. y Giriotti, S. (1980) "Analysis of total phenols using the Prussian Blue method". *J. Agric. Food Chem.* **28**: 1236-1238.
- Caglioti, L., Cainelli, G., Camerino, B., Mondelli, R., Prieto, A., Quilico, A., Salvatori, T. y Selva, A. (1966) "The structure of trisporic-C acid". *Tetrahedron Supplement*, **7**: 175-187.
- Calvo-Mendez, C., Martinez-Pacheco, M. y Ruiz-Herrera J. (1987) "Regulation of Ornithine Decarboxilase activity in *Mucor bacilliformis* and *Mucor rouxii*". *Exp. Mycol.* **11**: 270-277.
- Campuzano, V., Galland, P., Eslava, A. P. y Alvarez, M. I. (1995) "Genetic characterization of two phototropism mutants of *Phycomyces* with defects in the genes *madI* and *madJ*". *Curr. Genet.* **27**: 524-527.
- Campuzano, V., Galland, P., Alvarez, M. I. y Eslava, A. P. (1996) "Blue-light receptor requirement for gravitropism, autochemotropism and ethylene response in *Phycomyces*". *Photochem. Photobiol.* **63** (5): 686-694.
- Campuzano, V., Galland P., Senger, H., Alvarez, M. I. y Eslava, A. P. (1994) "Isolation and characterization of phototropism mutants of *Phycomyces* insensitive to ultraviolet light". *Curr. Genet.* **26**: 49-53.
- Campuzano, V., Díaz-Minguez, J. M., Eslava, A. P. y Alvarez, M. I. (1990) "A new gene (*madI*) involved in the phototropic response of *Phycomyces*". *Mol. Gen. Genet.* **223**: 148-151.

- Cano, C. y Ruiz-Herrera, J. (1988) "Developmental stages during the germination of *Mucor* sporangiospores". *Exp. Mycol.* **12**: 47-59.
- Cano, C., Herrera-Estrella, L. y Ruiz-Herrera, J. (1988) "DNA methylation and polyamines in regulation of development of the fungus *Mucor rouxii*". *J. Bacteriol.* **170**: 5946-5948.
- Cerdá-Olmedo, E. y Lipson, E.D. (eds.) (1987a) *Phycomyces*. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
- Cerdá-Olmedo, E. y Lipson, E.D. (1987b) "A biography of *Phycomyces*". En *Phycomyces*, pp. 7-26. Eds. E. Cerdá-Olmedo y E. D. Lipson. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
- Chory, J. (1993) "Out of darkness: mutants reveal pathways controlling light-regulated development in plants". *Trends in Genetics* **9**: 167-172.
- Corrochano, L. M. y Cerdá-Olmedo, E. (1988) "Photomorphogenesis in *Phycomyces*: dependence on environmental conditions". *Planta* **174**: 309-314.
- Corrochano, L. M. y Cerdá-Olmedo, E. (1990a) "Photomorphogenesis in *Phycomyces*: competence period and stimulus response relationships". *J. Photochem. Photobiol.* **5**: 255-266.
- Corrochano, L. M. y Cerdá-Olmedo, E. (1990b) "Photomorphogenesis in behavioural and colour mutants of *Phycomyces*". *J. Photochem. Photobiol.* **6**: 325-335.
- Corrochano, L. M. y Cerdá-Olmedo, E. (1991) "Photomorphogenesis in *Phycomyces* and in other fungi". *Photochem. Photobiol.* **54**: 319-327.
- Corrochano, L. M. y Cerdá-Olmedo, E. (1992) "Sex, light and carotenes: the development of *Phycomyces*". *TIGS* **8**: 268-274.
- Corrochano, L. M., Galland, P., Lipson, E. D. y Cerdá-Olmedo, E. (1988) "Photomorphogenesis in *Phycomyces*: fluence-response curves and action spectra". *Planta* **174**: 315-320.

- Dartnall, H. J. A. (1972) "Photochemistry of vision" en Handbook of Sensory Physiology. Springer-Verlag, Berlin.
- Darwin, C. (1880) "The power of movements in plants". (London:John Murray).
- Davis, R. H. (1996) "Polyamines in fungi". En *The Mycota III. Biochemistry and Molecular Biology*, 347-356. Eds. R. Brambl y G. A. Marzluf. Springer-Verlag. Berlin-Heidelberg.
- Davis, R. H., Krasner, G. N., DiGangi, J. J. y Ristow, J. L. (1985) "Distinct roles of putrescine and spermidine in the regulation of ornithine decarboxilase in *Neurospora crassa*". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**: 4105-4109.
- Davis, R. H., Lieu, P. y Ristow, J. L. (1994) "Neurospora mutants affecting polyamine-dependent processes and basic aminoacid transport mutants resistant to the polyamine inhibitor α -difluoromethylornithine". *Genetics* **138**: 649-655.
- Davis, R. H., Morris, D. R. y Coffino, P. (1992) "Sequestered end products and enzyme regulation: the case of ornithine decarboxilase". *Microbiol. Rev.* **56**: 280-290.
- Davis, R. H. y Ristow, J. L. (1988) "Polyamine transport in *Neurospora crassa*". *Arch. Biochem. Biophys.* **267**: 479-489.
- Davis, R. H. y Ristow, J. L. (1989) "Uptake, intracellular binding and excretion of polyamines during growth of *Neurospora crassa*". *Arch. Biochem. Biophys.* **271**: 315-322.
- Davis, R. H. y Ristow, J. L. (1991) "Polyamine toxicity in *Neurospora crassa*: protective role of the vacuole". *Arch. Biochem. Biophys.* **285**: 306-311.
- Davis, R. H., Ristow, J. L., Howard, A. D. y Barnett, G. R. (1991) "Calcium modulation of polyamine transport is lost in a putrescine-sensitive mutant of *Neurospora crassa*". *Arch. Biochem. Biophys.* **285**: 297-305.
- Delbrück, M., y Ootaki, T. (1979) "An unstable nuclear gene in *Phycomyces*". *Genetics* **92**: 27-48.

- Demerec, M., Adelber, E. A., Clark, A. J. y Hartman, P. E. (1966) "A proposal for a uniform nomenclature in bacterial genetics". *Genetics* **54**: 61-76.
- Deng, X-W. (1994) "Fresh view of light signal transduction in plants". *Cell* **76**: 423-426.
- Dohrmann, U. (1983) "In vitro riboflavin binding and endogenous flavins in *Phycomyces blakesleeanus*". *Planta* **159**: 357-365.
- Eslava, A. P., Alvarez, M. I., Lipson, E. D., Presti, E. D. y Kong, K. (1976) "Recombination between mutants of *Phycomyces* with abnormal phototropism". *Molec. Gen. Genet.* **147**: 235-241.
- Evans, P. T. y Malmberg, R. L. (1989) "Do polyamines have roles in plant development?" *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **40**: 235-269.
- Foster, K. W., Saranak, J., Patel, N., Zarilli, G., Okabe, M., Kline, T. y Nakinishi, K. (1984) "A rhodopsin is the functional photoreceptor for phototaxis in the unicellular eukaryote *Chlamydomonas*". *Nature* **311**: 756-759.
- Foster, K. W., Saranak, J. y Zarrilli, G. (1988) "Autoregulation of rhodopsin synthesis in *Chlamydomonas reinhardtii*". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **85**: 6379-6383.
- Fritz, B. J., Kasai, S. y Matsui, K. (1989) "Free cellular riboflavin is involved in phase shifting by light of the circadian clock in *Neurospora crassa*". *Plant Cell Physiol.* **30**: 557-564.
- Fritz, B. J., Kasai, S. y Matsui, K. (1990) "Blue light photoreception in *Neurospora* circadian rhythm: evidence for involvement of the flavin triplet state". *Photochem. Photobiol.* **51**: 607-610.
- Galland, P. (1983) "Action spectra of photogeotropic equilibrium in *Phycomyces* wild type and three behavioral mutants". *Photochem. Photobiol.* **37**: 221-228.
- Galland, P. (1992) "Forty years of blue-light research and no anniversary". *Photochem. Photobiol.* **56**: 847-853.

- Galland, P. y Lipson, E. D. (1985) "Modified action spectra of photogeotropic equilibrium in *Phycomyces blakesleeenanus* mutants with defects in genes *madA*, *madB*, *madC* and *madH*". *Photochem. Photobiol.* **41**: 331-335.
- Galland, P. y Lipson, E.D. (1987) "Light physiology of *Phycomyces* sporangiophores". En *Phycomyces*, pp. 49-92. Eds. E. Cerdá-Olmedo y E. D. Lipson. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
- Galland, P. y Ootaki, T. (1987) "Differentiation and cytology" en *Phycomyces*, pp. 281-316. Eds. E. Cerdá-Olmedo y E. D. Lipson. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
- Galland, P. y Russo, V. E. A. (1979) "Photoinitiation of sporangiophores in *Phycomyces* mutants deficient in phototropism and mutants lacking beta-carotene". *Photochem. Photobiol.* **29**: 1009-1014.
- Galland, P. y Senger, H. (1988) "The role of pterins in the photoreception and metabolism of plants". *Photochem. Photobiol.* **48**: 811-820.
- Galland, P., Senger, H. (1991) "Flavins as possible blue light photoreceptors". En *Photoreceptors Evolution and Function*. pp. 65-124. Ed. M. G. Holmes. Academic Press, London-New York.
- Galston, A. W. (1949) "Riboflavin-sensitized photooxidation of indoleacetic acid and related compounds". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **35**: 10-17.
- Galston, A. W. (1950) "Riboflavin, light and the growth of plants". *Science* **111**: 619-624.
- Glansdorff, N. (1996) "Biosynthesis of arginine and polyamines". En *Escherichia coli and Salmonella*, pp 408-433. Vol. 1. Ed. F. C. Neidhardt. American Society for Microbiology Press. Washington.
- Grehn, J. (1932) "Untersuchungen über Gestalt und Funktion des Sporangienträger bei den Mucorineen. I. Entwicklungsgeschichte der Sporangienträger". *Jahrb. Wiss. Bot.* **76**: 93-165.
- Gualtieri, P. (1993) "New trends in photobiology". *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* **19**: 3-14.

- Guevara-Olvera, L., Calvo-Mendez, C. y Ruiz-Herrera, J. (1993) "The role of polyamine metabolism in dimorphism of *Yarrowia lipolytica*". *J. Gen. Microbiol.* **193**: 485-493.
- Gutiérrez-Corona, F. y Cerdá-Olmedo, E. (1985) "Environmental influences in the development of *Phycomyces* sporangiophores" *Exp. Mycol.* **9**: 56-63.
- Gutiérrez-Corona, F. y Cerdá-Olmedo, E. (1988) "Genetic determination of sporangiophore development in *Phycomyces*". *Develop. Genet.* **9**: 733-741.
- Hayashi, S., Mukarami, Y. y Matsufuji, S. (1996) "Ornithine decarboxylase antizyme: a novel type of regularory protein" *TIGS.* **21**: 27-30.
- Heby, O., y Persson, L. (1990) "Molecular genetics of polyamine synthesis in eukaryotic cells". *TIBS* **15**: 153-158.
- Heisenberg, M. y Cerdá-Olmedo, E. (1968) "Segregation of heterocarions in the asexual cycle of *Phycomyces*". *Mol. Gen. Genet.* **102**: 187-195.
- Hertel, R. (1980) "Phototropism of lower plants". En *Photoreception and sensory transduction in aneural organisms*, pp 89-105. Ed. F. Lenci y G. Colombetti. Plenum Press. New York, London.
- Hertel, R., Jesaitis, A. J., Dohrmann, U. y Briggs, W. R. (1980) "In vitro binding of riboflavin to subcellular particles from maize coleoptiles and *Cucurbita* hypocotyls" *Planta* **147**: 312-319.
- Hilgenberg, W., Burke, P. V. y Sandmann, G. (1987) "Methabolic pathways" en *Phycomyces*. Ed. E. Cerdá-Olmedo y E. D. Lipson. pp 155-198.
- Hohl, N., Galland, P. y Senger, H. (1992a) "Altered flavin patterns in photobehavioural mutants of *Phycomyces blakesleanus*". *Photochem. Photobiol.* **55**: 247-255.
- Hohl, N., Galland, P. y Senger, H. (1992b) "Altered pterin patterns in photobehavioural mutants of *Phycomyces blakesleanus*". *Photochem. Photobiol.* **55**: 239-245.

- Hohl, N., Galland, P., Senger, H. y Eslava, A. P. (1992c) "Altered pterin patterns in photoreceptor mutants of *Phycomyces blakesleeana* with defective madI gene". *Botanica Acta* **105**: 441-448.
- Hulme, E. C. y Birdsall, N. J. M. (1992) "Strategy and tactics in receptor-binding studies". En *Receptor-Ligand Interactions*. pp. 63-176. Ed. E. C. Hulme. Oxford University Press. Oxford.
- Inderlied, C. B., Cihlar, R. L. y Sypherd, P. S. (1980) "Regulation of Ornithine Decarboxylase during morphogenesis of *Mucor racemosus*". *J. Bacteriol.* **141**: 699-702.
- Jayaram, M., Leutwiler, L. y Delbrück, M. (1980) "Light-induced carotene synthesis in mutants of *Phycomyces* with abnormal phototropism". *Photochem. Photobiol.* **32**: 241-245.
- Jesaitis, A. J. (1974) "Linear dichroism and orientation of the *Phycomyces* photopigment". *J. Gen. Physiol.* **63**: 1-21.
- Johnson, J. L., Hamm-Alvarez, S., Payne, G., Sancar, G. B., Rajagopalan, K. V. y Sancar, A. (1988) "Identification of the second chromophore of E. coli and yeast DNA photolyases as 5,10-methenyltetrahydrofolate". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **85**: 2046-2050.
- Kaufman, L. S. (1993) "Transduction of blue-light signals" *Plant Physiol.* **102**: 333-337.
- Khurana, J. P. y Poff, K. L. (1989) "Mutants of *Arabidopsis thaliana* with altered phototropism". *Planta* **178**: 400-406.
- Laemmli, U. K. (1970) "Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4". *Nature* **227**: 680-685.
- Lang-Feulner, J. y Rau, W. (1975). "Redox dyes as artificial photoreceptors in light-dependent carotenoid synthesis". *Photochem. Photobiol.* **21**: 179-183.
- Lapointe, L. y Cohen, B. (1983) "Ornithine Decarboxylase in *Phycomyces*: *In vitro* and *in vivo* properties". *Arch. Biochem. Biophys.* **224**: 515-525.

- Lin, C., Ahmad, M., Gordon, D. y Cashmore, A. R. (1995a) "Expression of an *Arabidopsis* cryptochrome gene in transgenic tobacco results in hypersensitivity to blue, UV-A, and green light". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **92**: 8423-8427.
- Lin, C., Robertson, D. E., Ahmad, M., Raibekas, A. A., Jorns, M. S., Dutton, P. L. y Cashmore, A. R. (1995b) "Association of flavin adenine dinucleotide with the *Arabidopsis* blue light receptor CRY 1". *Science* **269**: 968-970.
- Lipson, E. D., López-Díaz, I. y Pollock, J.A. (1983) "Mutants of *Phycomyces* with enhanced tropism". *Exp. Mycol.* **7**, 241-252.
- Lipson, E. D. y Teresaka, D. T. (1983) "Photogeotropism in *Phycomyces* double mutants". *Exp. Mycol.* **5**, 101-111.
- Liscum, E. y Briggs, W. R. (1995) "Mutations in the NPH1 locus of *Arabidopsis* disrupt the perception of phototropic stimuli". *Plant Cell* **7**: 473-485.
- Lopatin, A. N., Makhina, E. N. y Nichols, C. G. (1994) "Potassium channel block by cytoplasmic polyamines as the mechanism of intrinsic rectification". *Nature* **372**: 366-369.
- López-Díaz, I. y Cerdá-Olmedo, E. (1980) "Relationship of photocarotenogenesis to other behavioural and regulatory responses in *Phycomyces*". *Planta* **150**: 134-139.
- López-Díaz, I. y Cerdá-Olmedo, E. (1981) "Light-controlled phorogenesis and mycelial growth in *Phycomyces* mutants". *Current Genet.* **3**: 23-26.
- López-Díaz, I. y Lipson, E. D. (1983) "Genetic analysis of hypertropic mutants of *Phycomyces*". *Molec. Gen. Genet.* **190**: 318-325.
- Macrae, M., Plasterk, R. H. A. y Coffino, P. (1995) "The Ornithine Decarboxilase gene of *Caenorhabditis elegans*: Cloning, mapping and mutagenesis". *Genetics* **140**: 517-525.
- Magill, J. M. y Magill, C. W. (1989) "DNA methylation in fungi". *Dev. Genet.* **10**: 63-67.

- Maier, J. y Ninnemann, H. (1995a) "Biosynthesis of pteridines in *Neurospora crassa*, *Phycomyces blakesleeanus* and *Euglena gracilis*: detection and characterization of biosynthetic enzymes". *Photochem. Photobiol.* **61**: 43-53.
- Maier, J. y Ninnemann, H. (1995b) "Inhibition of light-dependent photomorphogenesis of sporangiophores from *Phycomyces blakesleeanus* by application of pteridine biosynthesis inhibitors" *Photochem. Photobiol.* **61**: 206-209.
- Martín-Rojas, V., Greiner, H., Wagner, T., Fukshansky, L. y Cerdá-Olmedo, E. (1995) "Specific tropism caused by ultraviolet C radiation in *Phycomyces*" *Planta.* **197**: 63-68.
- Martinez, J. P., Lopez-Ribot, J. L., Gil, M. L., Sentandreu, M. L. y Ruiz-Herrera J. (1990) "Inhibition of the dimorphic transition of *Candida albicans* by the Ornithine Decarboxilase inhibitor 1,4-diaminobutanone: alterations in the glycoprotein composition of the cell wall". *J. Gen. Microbiol.* :1937-1941.
- Martinez-Pacheco, M. y Ruiz-Herrera, J. (1993) "Differential compartmentation of Ornithine Decarboxilase in cells of *Mucor rouxii*". *J. Gen. Microbiol.* **139**: 1387-1391.
- Martinez-Pacheco, M., Rodriguez, G., Reyna, G., Calvo-Mendez, C. y Ruiz-Herrera J. (1989) "Inhibition of the yeast-mycelial transition and the phorogenesis of Mucorales by diaminobutanone". *Arch. Microbiol.* **151**: 10-14.
- Massart, J. (1888) "Recherches sur les organismes inférieurs 1.-La loi de Weber vérifiée pour l'héliotropisme du champignon" *Bull. Acad. R. Sci. Belg., 3rd Ser.* **16**: 590-601.
- Matsufuji, S., Matsufuji, T., Miyazaki, Y., Murakami, Y., Atkins, J. F., Gesteland, R. F. y Hayashi, S. (1995) "Autoregulatory frameshifting in decoding mammalian Ornithine Decarboxilase Antizyme". *Cell* **80**: 51-60.
- Matters, G. L. y Beale, S. I. (1995) "Blue-light regulated expression of genes for two early steps of chlorophyll biosynthesis in *Chlamydomonas reinhardtii*". *Plant Physiol.* **109**: 471-479.

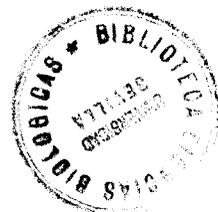
- Medina, J. R. y Cerdá-Olmedo, E. (1977) "Allelic interaction in the photogeotropism of *Phycomyces*". *Exp. Mycol.* **1**: 286-292.
- Mulders, R. M. van, Laere, A. J. van y Verbeke, M. N. (1986) "Effects pH and cations on the germination induction of *Phycomyces* spores with carboxylic acids". *Biochem. Physiol. Pflanzen* **181**:103-115.
- Nebenfürhr, A., Schäfer, A., Galland, P., Senger, H. y Hertel, R. (1991) "Riboflavin-binding sites associated with flagella of *Euglena*: a candidate for blue-light photoreceptor?" *Planta* **185**: 65-71.
- Neumann, R. y Hertel, R.(1994) "Purification and characterization of a riboflavin-binding protein from flagella of *Euglena gracilis*" *Photochem. Photobiol.* **60**: 76-83.
- Nickerson, K. W., Dunkle, L. D. y Van Etten, J. L. (1977) "Absence of spermine in filamentous fungi". *J. Bacteriol.* **129**: 173-176.
- Ninnemann, H. (1987) "Photoregulation of eucaryotic nitrate reductase". En *Blue Light Responses: Phenomena and Occurrence in Plants and Microorganisms*, pp. 17-19, Vol. 1. Ed. H. Senger.
- Obregon, A., Monzalvo, S., Calvo-Mendez, C. y Ruiz-Herrera, J. (1990) "Ultrastructural and chemical alterations in germinating spores of *Mucor rouxii* (Zygomycetes), induced by two compounds which inhibit their developmental pattern". *Crypt. Bot.* **1**: 323-331.
- Ootaki, T., Fischer, E. P. y Lockhart, P. (1974) "Complementation between mutants of *Phycomyces* with abnormal phototropism". *Molec. Gen. Genet.* **131**: 233-246.
- Ortiz-Castellanos, M.L. y Gutiérrez-Corona, F. (1988) "The sensitive period for light and temperature regulation of sporangiophore development in *Phycomyces*". *Planta* **174**: 305-308.

- Otto, M. K., Jayaram, M., Hamilton, R. M. y Delbrück, M. (1981) "Replacement of riboflavin by an analogue in the blue-light photoreceptor of *Phycomyces*" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **78**: 266-269.
- Packham, G. y Cleveland, J. L. (1994) "Ornithine Decarboxilase is a mediator of c-myc-induced apoptosis". *Mol. Cel. Biol.*, **14**: 5741-5747.
- Pegg, A. E. (1986) "Recent advances in the biochemistry of polyamines in eukaryotes". *Biochem. J.* **234**: 249-262.
- Pistocchi, R., Kashiwagi, K., Miyamoto, S., Nukui, E., Sadakata, Y., Kobayashi, H. y Igarashi, K. (1993) "Characteristics of the operon for a putrescine transport system that maps at 19 minutes on the *E. coli* chromosome". *J. Biol. Chem.* **268**: 146-152.
- Pitkin, J. y Davis, R. H. (1990) "The genetics of polyamine synthesis in *Neurospora crassa*". *Arch. Biochem. Biophys.* **278**: 386-391.
- Pitkin, J., Perriere, M., Kanehl, A., Ristow, J. L. y Davis R. H. (1994) "Polyamine metabolism and growth of *Neurospora* strains lacking cis-acting control sites in the Ornithine Decarboxilase gene". *Arch. Biochem. Biophys.* **315**: 153-160.
- Poe, R. C., Pratap, P. y Lipson, E. D. (1986) "System analysis of *Phycomyces* light-growth response: double mutants". *Biol. Cybern.* **55**: 105-113.
- Pohjanpelto, P., Virtamen, I. y Höltta, E. (1981) "Polyamine starvation causes disappearance of actin filaments and microtubules in polyamine-auxotrophic CHO cells". *Nature* **293**: 475-477.
- Popescu, T., Roessler, A. y Fukshansky, L. (1989) "A novel effect in *Phycomyces* phototropism". *Plant Physiol.* **91**: 1586-1593.
- Presti, D. E. y Galland, P. (1987) "Photoreceptor biology of *Phycomyces*" en *Phycomyces*. Ed. E. Cerdá-Olmedo y E. D. Lipson. pp 93-126.
- Presti, D. E., Hsu, W. J. y Delbrück, M. (1977) "Phototropism in *Phycomyces* mutants lacking β -carotene" *Photochem. Photobiol.* **26**: 403-405.

- Quiñones, M. A. y Zeiger, E. (1994) "A putative rol of the xantophyll, zeaxanthin, in blue light photoreception of corn coleoptiles". *Science* **264**: 558-561.
- Reyna-López, G. y Ruiz-Herrera, J. (1993) "Polyamines and the phorogenesis of Mucorales". *Exp. Mycol.* **17**: 79-89.
- Robbins, W. J., Kavanagh, V. W. y Kavanagh, F. (1942) "Growth substances and dormancy of spores of *Phycomyces*". *Bot. Gaz.* **104**: 224-242.
- Roncero, M. I. G., Zabala, C. y Cerdá-Olmedo (1984) "Mutagenesis in multinucleate cells: the effects of N-methyl-N'-nitro-N-nitroso-guanidine on *Phycomyces* spores". *Mutat. Res.* **125**: 195-204.
- Rudolph, H. (1958) "Entwicklungsphysiologische Untersuchungen an den Sporangioophoren von *Phycomyces blakesleeanus*". *Biol. Zentralbl.* **77**: 385-437.
- Ruiz-Herrera, J. (1994) "Polyamines, DNA methylation, and fungal differentiation". *Crit. Rev. Microbiol.* **20**: 143-150.
- Ruiz-Herrera, J. y Calvo-Mendez, C. (1987) "Effect of Ornithine Decarboxilase inhibitors on the germination of sporangiospores of Mucorales". *Exp. Mycol.* **11**: 287-296.
- Ruiz-Herrera, J. y Ruiz-Medrano, R y Domínguez, A. (1995) "Selective inhibition of cytosine-DNA methylases by polyamines". *FEBS Lett.* **357**: 192-196.
- Russo, V. E. A. (1977) "The role of blue light in synchronization of growth and inhibition of differentiation of stage I sporangiophore of *Phycomyces blakesleeanus*". *Plant. Sci. Lett.* **10**: 373-380.
- Russo, V. E. A., Brody, S., Cove, D. y Ottolenghi, S. (1992). "*Development. The molecular genetic approach*". Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.
- Russo, V. E. A., Pohl, U., Volpi, L. (1981) "Carbon dioxide inhibits phorogenesis in *Phycomyces* and blue light overcomes this inhibition". *Photochem. Photobiol.* **34**: 233-236.

- Short, T. W., Porst, M. y Briggs, W. R. (1992) "A photoreceptor system regulating *in vivo* and *in vitro* phosphorylation of a pea plasma membrane protein". *Photochem. Photobiol.* **55**: 773-781.
- Short, T. W., Reymond, P. y Briggs, W. R. (1993) "A pea plasma membrane protein exhibiting blue light-induced phosphorylation retains photosensitivity following Triton solubilization". *Plant Physiol.* **101**: 647-655.
- Slesinger, P. A., Patil, N., Liao, Y. J., Jan Y. N. y Cox, D. R. (1996) "Functional effects of the mouse weaver mutation on G protein-gated inwardly rectifying K⁺ channels". *Neuron.* **16**: 321-331.
- Song, P. S., Suzuki, S., Kim, I. D. y Kim, J. H (1991) "Properties and evolution of photoreceptors". En *Photoreceptors Evolution and Function*. Ed. M. G. Holmes. pp. 21-63. Academic Press, London-New York.
- Spector, T (1978) "Refinement of the Coomassie-blue method of protein quantitation". *Anal. Biochem.* **86**: 142-146.
- Steinhardt, A. R., Popescu, T y Fukshansky, L. (1989) "Is the dichroic photoreceptor for *Phycomyces* phototropism located at the plasma membrane or at the tonoplast?". *Photochem. Photobiol.* **49**: 79-87.
- Stevens, L. y Winther, M. D. (1979) "Spermine, spermidine and putrescine in fungal development". *Adv. Microb. Physiol.* **19**: 63-148.
- Stevens, L., McKinnon, I. M. y Winther, M. D. (1977) "The effects of 1,4-diaminobutanone on polyamine synthesis in *Aspergillus nidulans*". *FEBS Letters* **75**: 180-182.
- Sutter, R. P. (1975) "Mutants affecting sexual development in *Phycomyces blakesleeanus*". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **72**: 127-130.
- Sutter, R. P. y Whitaker, J. P. (1981) "Zygosphore-stimulating precursors (pheromones) of trisporic acids active in (-)-*Phycomyces blakesleeanus*. Acid catalized anhydro derivatives of methyl 4-dihydrotrisporate-C and 4-dihydrotrisporate-C*" *J. Biol. Chem.* **256(5)**: 2334-2341.

- Tabor, C. W. y Tabor, H. (1985) "Polyamines in microorganisms". *Microbiol. Rev.* **49**: 81-99.
- Thorton, R. M. (1972) "Alternative fruiting pathways in *Phycomyces*". *Plant Physiol.* **49**: 194-197.
- Thorton, R. M. (1975) "Photoresponses of *Phycomyces blakesleeanus*: initiation and development of sporangiophore primordia". *Amer. J. Bot.* **62**: 370-378.
- Tiburcio, A. F., Besford, R. T., Capell, T., Borrell, A., Testillano, P. S. y Risueño, M. C. (1994) "Mechanisms of polyamine action during senescence responses induced by osmotic stress". *J. Exper. Botany.* **45**: 1789-1800.
- Tiburcio, A. F., Kaur-Sawhney, R. y Galston A. W. (1990) 'Polyamine metabolism'. En *The Biochemistry of Plants*, pp. 283-325, Vol. 16. Eds. P. K. Stumpf. y E. E. Conn. Academic Press. London-New York.
- Tillmanns, S., Senger, H. y Galland, P. (1995) "Reduced near-UV sensitivity in *Phycomyces* mutants affected in the biosynthesis of 6,7-dimethyl-8-ribityllumazine". *Photochem. Photobiol.* **62**: 588-595.
- Torrigiani, P., Altamura, M. M., Capitani, F., Serafini-Fracassini, D. y Bagni, N. (1989) "De novo root formation in thin cell layers of tobacco: changes in free and bound polyamines". *Physiol. Plant.* **77**: 294-301.
- Yamada, H., Isobe, K. y Tani, Y. (1980) "Oxidation of polyamines by fungal enzymes". *Agric. Biol. Chem.* **44**: 2469-2476.
- Yamazaki, Y., Kataoka, H., Miyazaki, A., Watanabe, M. y Ootaki, T. (1996) "Action spectra for photoinhibition of sexual development in *Phycomyces blakesleeanus*". *Photochem. Photobiol.* **64**: 387-392.
- Zhang, W., Brooun, A., Mueller, M. y Alam, M. (1996) "The primary structures of the Arqueon *Halobacterium salinarium* blue light receptor sensory rhodopsin II and its transducer, a methyl-accepting protein". *PNAS* **93**: 8230-8235.



7 RESUMEN Y CONCLUSIONES

En esta tesis se investigan varios aspectos del desarrollo del hongo mucoral *Phycomyces blakesleeanus* y su regulación por la luz. Se presenta un método para aislar mutantes de *Phycomyces* alterados en la fotorregulación del desarrollo de los esporangióforos. Este método nos permitió aislar tres nuevos mutantes (llamados *pim*) con fenotipos originales. Los mutantes *pim* necesitan más luz que el tipo silvestre para modificar la formación de micróforos, pero no para modificar la de macróforos. Ninguno presenta alteraciones en el fototropismo, y todos sintetizan β -caroteno. Al menos uno de ellos está alterado también en la fotoinducción de la producción de β -caroteno. Los resultados indican que las mutaciones *pim* modifican los efectos de la luz sobre el micelio, pero no sobre los esporangióforos. Además separan la inducción de los macróforos de la inhibición de los micróforos, que no pueden considerarse dos aspectos de una misma respuesta a la luz.

A diferencia de lo que ocurre en otros hongos mucorales, la diaminobutanona, un inhibidor de la biosíntesis de poliaminas, inhibe el crecimiento de *Phycomyces*, pero no la transición entre las distintas etapas de su desarrollo. Hemos encontrado cuatro mutantes (llamados *dab*) que resisten concentraciones de diaminobutanona al menos diez veces mayores que la concentración que resiste la estirpe silvestre. Dos de estos mutantes superproducen putrescina, debido a una elevada actividad descarboxilasa de la ornitina. Los otros dos mutantes no presentan cambios apreciables en la biosíntesis de poliaminas.

Hemos investigado los sitios que ligan riboflavina de forma reversible, en relación a su posible papel como fotorreceptores. Nuestros resultados sugieren que una o dos proteínas de unos 65 kDa son las responsables de la unión de

riboflavina a las membranas de *Phycomyces*. La riboflavina se une también eficaz y reversiblemente al ácido gálico presente en el citoplasma, pero no hemos podido atribuir ninguna función fisiológica a esta interacción. Los extractos de los mutantes de la fotorrecepción analizados ligaron riboflavina con la misma eficacia que la estirpe silvestre.

Con el microscopio confocal de fluorescencia hemos encontrado, tanto en el micelio como en los esporangióforos, una intensa fluorescencia natural atribuible a flavinas del citoplasma. Esta fluorescencia y las proteínas que ligan riboflavina en las fracciones de membranas están presentes a lo largo de todo el ciclo de vida de *Phycomyces*, incluso en etapas o partes de la célula en las que no se conoce ninguna respuesta a la luz.

8 AGRADECIMIENTOS

Esta tesis fue financiada por la Junta de Andalucía con una Beca de F. P. I.

Agradezco a los profesores B. Fischbach, Universität Freiburg i. Br. y J. Campos Ortega, Universität zu Köln, y al Dr. Modolell, Max-Plank-Institut für Immunforschung, Freiburg i. Br., que nos permitieran acceder a los respectivos microscopios confocales. También al Prof. J. Lozano Campoy, del Departamento de Física de la Escuela Técnica Superior de Ingenieros Industriales de Sevilla, que nos cediera el picoamperímetro.

A los profesores del Departamento les debo la afición por la genética. En sus clases me empecé a imaginar la suerte que sería poder dedicarse a esto.

Parte de esta tesis la hice en Friburgo, y quedé condenado a sentir nostalgia perpetua de esa ciudad. Mucha culpa la tiene la gente que conocí allí. A Rainer Hertel le agradezco que me acogiera en su grupo y, sobre todo, su simpatía y su amabilidad, y el entusiasmo increíble con que siguió los experimentos. A Ralf, Angelika y Andreas les agradezco su entrañable amistad y lo mucho que me ayudaron. Tampoco me olvido de los otros amigos, sobre todo de Kai, Jule, el Prof. Michalke, Conny, Brigitte, Petra, Evi, Veronika ...

Por último, estoy muy agradecido a todos los amigos del Departamento y a algunos otros de los alrededores. Con ellos he pasado infinidad de buenos ratos y he aprendido muchísimo. Luis Corrochano fué además fundamental para sacar adelante el capítulo de fotomorfogénesis.

Sobre todo, me acuerdo de la AAB115 y de algunos otros, que sin ser miembros oficiales es como si lo fueran. Con ellos he compartido todos estos años lo bueno y lo malo. Ahora, echando cuentas, me sale que todos estos amigos han sido lo mejor de esta tesis.

"Y le gusta pensar a menudo en aquel episodio en que don Quijote y Sancho están montados en el caballo Clavileño y de pronto Sancho desliza la sospecha de si no serán víctimas de una burla cruel. ¿Y qué? viene a responder don Quijote, allá ellos con sus burlas, que a nosotros nadie podrá arrebatarnos la gloria del empeño. (...) Apliquémonos el cuento: que la persona amada no nos quiera, que lo increíble no se deje decir: ¡allá ellos!. A nosotros que nos quiten lo bailao."

Luis Landero
Entre Líneas.

Rafael Flores González
en Fotorrecepción y desarrollo
en Phycompuer

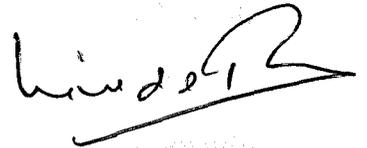
Por unanimidad
Junta, 26

APTO CUM LAUDE

mayo

97

Asistió



501014473

FBI ETD / 385

1014473