



Genes *car* y enzimas de la carotenogénesis en *Fusarium fujikuroi*

Alfonso Prado Cabrero
Tesis Doctoral
Universidad de Sevilla

2006

Genes *car* y enzimas de la carotenogénesis en *Fusarium fujikuroi*

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

Sevilla, Octubre de 2006

El doctorando

El director de la Tesis

Fdo: Alfonso Prado Cabrero

Fdo: F. Javier Avalos Cordero,
Profesor Titular de Genética

INDICE

INTRODUCCIÓN	1
1. El organismo: Biología de <i>Fusarium fujikuroi</i>	1
1.1 El género <i>Fusarium</i>	2
1.2 Genética de <i>Fusarium</i>	3
1.3 Estirpes silvestres utilizadas en esta Tesis	3
1.4 Actividad patogénica de <i>F. fujikuroi</i>	4
1.5 Metabolismo secundario de <i>Fusarium</i>	5
1.5.1 Los terpenoides	5
1.5.2 Las giberelinas	7
1.5.3 Agrupamientos génicos	9
2. Los carotenoides	9
2.1 Rutas biosintéticas de carotenoides	9
2.2 Bases físicas del color de los carotenoides	10
2.3 Los apocarotenoides	11
2.4 Funciones de los carotenoides en animales y plantas	12
2.5 Funciones de los carotenoides en los hongos	12
3. Las enzimas de la carotenogénesis: rutas biosintéticas y metabolismo	13
3.1 Desaturasas de carotenoides	13
3.1.1 Nuevas enzimas de la familia con funciones diferentes a la desaturación	13
3.1.2 Interés aplicado de las desaturasas de carotenoides	14
3.1.3 El problema de la regeneración del poder reductor	14
3.2 Ciclasas de carotenoides y sintasas de fitoeno	15
3.3 Oxigenasas de carotenoides	16
3.3.1 Estructura de las dioxigenasas de carotenoides	17
4. Las opsinas	19
4.1. Tipos de opsinas	19
4.2. Cromóforo de las opsinas y su respuesta a la luz	20
4.3. Proteínas fúngicas de la familia de las opsinas	20
4.4. Opsinas fúngicas relacionadas con la luz	21
5. Genética de la carotenogénesis en hongos	22
5.1. Carotenogénesis en hongos mucorales	22
5.2. Carotenogénesis en hongos ascomicetos y basidiomicetos	23
5.3. Síntesis de carotenoides en <i>F. fujikuroi</i>	24
5.4. Regulación de la carotenogénesis en <i>F. fujikuroi</i>	25
OBJETIVOS DE LA TESIS	27
RESULTADOS	29
Resumen	31
CAPÍTULO 1	33
Caracterización de un mutante <i>carB</i> superproductor de γ -caroteno y β -caroteno	
1.1. Fenotipo del mutante SF21	34
1.2. El alelo <i>carB</i> de SF21 está mutado	36
1.3. Reemplazamiento de un alelo <i>carB</i> silvestre por el alelo <i>carB36</i>	37
1.4. Búsqueda de mutantes <i>carB36</i> en el fondo genético silvestre	37
1.5. Generación de mutantes <i>carB36</i> en un fondo superproductor de carotenoides	39
1.6. Fenotipo de los mutantes <i>carB36</i> obtenidos por reemplazamiento alélico	40

1.7. Mutantes derivados de SF21	40
1.8. Expresión de los genes <i>car</i> en los mutantes del gen <i>carB</i>	41
1.9. Predicciones estructurales de CarB y ubicación de la mutación <i>carB36</i>	42
1.10. Discusión	44
CAPÍTULO 2	49
Secuencia y regulación del gen <i>carO</i> , que determina una proteína de la familia de las opsinas	
2.1. El gen <i>carO</i>	50
2.2. Similitud de CarO con otras proteínas	50
2.3. Predicciones sobre la estructura de CarO	52
2.4. Regulación de <i>carO</i> a nivel de ARNm	52
2.5. Discusión	54
CAPÍTULO 3	59
Caracterización del gen <i>carX</i> , que determina una proteína de la familia de las oxigenasas de carotenoides	
3.1. CarX es una posible oxigenasa de carotenoides	60
3.2. Transcripción de <i>carX</i>	61
3.3. Función del gen <i>carX</i>	62
3.4. Fenotipo de mutantes $\Delta carX$	62
3.5. Expresión de los genes <i>car</i> en los mutantes $\Delta carX$	64
3.6. Discusión	66
CAPÍTULO 4	69
Determinación de la actividad enzimática de la proteína CarX: síntesis de retinal	
4.1. La expresión de <i>carX</i> en células de <i>E. coli</i> altera el fenotipo cuando estas acumulan β -caroteno	70
4.2. Los cultivos de <i>E. coli</i> productores de β -caroteno que expresan <i>carX</i> contienen retinal	70
4.3. Producción de retinal libre <i>in vivo</i>	73
4.4. Espectrometría de masas del producto de CarX <i>in vivo</i>	73
4.5. Actividad <i>in vitro</i> de la proteína CarX	74
4.6. Relación entre la producción de retinal y el fenotipo de los mutantes <i>carX</i>	75
4.7. Discusión	77
CAPÍTULO 5	81
Identificación del gen <i>carT</i> , que determina la oxigenasa de carotenoides responsable del corte oxidativo de toruleno	
5.1. Clonación del gen <i>carT</i>	82
5.2. El gen <i>carT</i> está mutado en la estirpe productora de toruleno SG68	82
5.3. CarT es una oxigenasa de carotenoides que corta licopeno <i>in vivo</i>	84
5.4. CarT convierte el toruleno en β -apo-4'-carotenal (C35) <i>in vitro</i>	84
5.5. El lugar de rotura de CarT está determinado por la distancia al extremo no ciclado	85
5.6. CarT muestra preferencia de corte por extremos no oxigenados frente a extremos oxigenados	86
5.7. El gen <i>carT</i> muestra una regulación común con los otros genes <i>car</i> de <i>F. fujikuroi</i>	87
5.8 Elementos reguladores en los genes <i>car</i>	89
5.9. Discusión	90
DISCUSIÓN GENERAL	93
CONCLUSIONES	99
APÉNDICE	103

MATERIAL Y MÉTODOS	107
1. Estirpes	108
2. Vectores de clonación y plásmidos auxiliares	108
3. Plásmidos construidos	109
4. Medios, soluciones y condiciones de cultivo	111
4.1 <i>Fusarium fujikuroi</i>	111
4.1.1. Medios de cultivo para <i>F. fujikuroi</i>	111
4.1.2. Condiciones de cultivo	112
4.2. <i>Escherichia coli</i>	112
5. Mutagénesis de <i>F. fujikuroi</i> con N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina.	113
6. Transformación	113
6.1. Transformación de <i>F. fujikuroi</i>	113
6.1.1. Preparación de protoplastos	113
6.1.2. Transformación	113
6.2. Transformación de <i>E. coli</i>	114
6.2.1. Preparación de células competentes	114
6.2.2 Transformación	114
7. Extracción y manipulación de ácidos nucleicos	114
7.1. Extracción de ácidos nucleicos	114
7.1.1. Extracción de ADN plasmídico de <i>E. coli</i>	114
7.1.2. Extracción de ADN genómico de <i>F. fujikuroi</i>	115
7.1.3. Extracción de ADN genómico de <i>F. fujikuroi</i> a pequeña escala	115
7.1.4. Extracción de ARN total de <i>F. fujikuroi</i>	115
7.2. Cuantificación de la concentración de ácidos nucleicos	115
7.3. Manipulación enzimática del ADN	116
7.3.1. Digestiones con enzimas de restricción	116
7.3.2. Relleno de extremos de moléculas de ADN	116
7.3.3. Ligaciones	116
7.4. Electroforesis de ácidos nucleicos	116
7.4.1. Electroforesis de ADN	116
7.4.2. Electroforesis de ARN	117
7.5. Aislamiento de fragmentos de ADN de geles de agarosa	117
8. Detección de secuencias de ADN y ARN con el sistema DIG	117
8.1. Detección de secuencias de ADN (<i>Southern-blot</i>)	117
8.1.1. Marcaje de sonda de ADN con DIG-dUTP	117
8.1.2. Transferencia de ADN a la membrana de hibridación	118
8.1.3. Hibridación de ADN transferido a la membrana	118
8.1.4. Detección	118
8.2. Detección de secuencias de ARN con el sistema DIG	118
8.2.1. Obtención y marcaje de sondas	118
8.2.2. Transferencia de ARN a la membrana de hibridación	119
8.2.3. Hibridación y detección de ARN transferido a membranas	119
9. Reacciones de PCR	119
9.1. Enzimas utilizadas	119
9.2. Condiciones de la reacción	119
10. Análisis de proteínas	121
10.1. Extracción y purificación de proteínas expresadas en <i>E. coli</i>	121
10.1.1. Preparación e inducción del cultivo	121
10.1.2. Extracción de proteínas y purificación	121
10.1.3. Tratamiento con Trombina	121

10.1.4. Fraccionamiento de proteínas en geles desnaturalizantes (SDS-PAGE)	122
10.2. Ensayos in vitro	122
11. Análisis de carotenoides	123
11.1. Análisis de carotenoides de <i>F. fujikuroi</i>	123
11.1.1. Extracción y análisis del espectro crudo de las muestras	123
11.1.2. Separación de carotenoides neutros y polares	123
11.1.3. Cromatografía en capa fina (TLC)	123
11.1.4. Cromatografía de alta presión (HPLC)	124
11.2. Análisis de carotenoides de <i>E. coli</i>	124
11.2.1. Protocolo básico de extracción	124
11.2.2. Extracciones modificadas de carotenoides	124
11.2.2.1. Acetilación de retinol	125
11.2.2.2. Extracción con formaldehído	125
11.2.2.3. Extracción con hidroxilamina	125
11.2.3. Análisis de Cromatografía de Gases-Espectrometría de Masas (CG-EM)	125
12. Informática	125
12.1. Escritura, cálculo y dibujo	126
12.2. Análisis de secuencias de ADN	126
12.3. Similitud con secuencias publicadas en las bases de datos	126
12.4. Predicción de estructura secundaria	126
BIBLIOGRAFÍA	127

Introducción

1. El organismo: Biología de *Fusarium fujikuroi*

1.1. El género *Fusarium*

El género *Fusarium*, definido por Link en 1809 (Booth, 1971), recoge numerosos hongos imperfectos con esporas fusiformes, denominadas conidios. Muchos de ellos son patógenos de plantas con interés económico, lo que ha estimulado la atención de los investigadores (Booth, 1971). Se denominan hongos imperfectos aquellos en los que no se ha observado ciclo sexual, de manera que se carece de la base para clasificarlos dentro de algunos de los grandes grupos de hongos, definidos originalmente por las estructuras sexuales características en su ciclo de vida (ascas, basidios, oosporas o zigosporas). Siguiendo un mal hábito sin fundamento genético, los taxónomos cambian el nombre de las especies de hongos imperfectos que desarrollan ciclo sexual en laboratorio. La mayoría de las estirpes del género *Fusarium* con ciclo sexual se renombraron como *Nectria*, *Calonectria* y *Gibberella*, pertenecientes al orden Hypocreales, a la subclase Ascomycotina y a la clase Euascomycetes (Nelson et al., 1983). A esta clase pertenecen también los géneros *Neurospora*, *Aspergillus* y *Saccharomyces*. Los taxónomos han reconocido en el género *Gibberella* 15 especies distintas (Nelson et al., 1983), entre ellas *G. pulicaris*, *G. zaeae*, *G. subglutinans* y *G. fujikuroi*. Esta última tiene su origen en el hongo imperfecto *Fusarium moniliforme*, incluido en la sección parafilética *Liseola* (Kuhlman, 1982).

Gibberella fujikuroi es un hongo haplonte y heterotálico con un sistema sexual con dos alelos (+) y (-) de un único gen (Steenkamp et al., 2000). Esta especie constituye realmente un grupo de especies (*species complex*) separables por criterios genéticos y moleculares. Los criterios genéticos (compatibilidad sexual) han distinguido al menos nueve grupos de cruzamiento, denominados con letras desde la A a la I (Tabla I). Cada una de estas especies parasita preferentemente una especie de planta (Kuhlman, 1983; Leslie, 1991; Voigt et al., 1995). Los criterios moleculares, basados en la comparación de diferentes tipos de secuencias altamente conservadas, han confirmado estas diferencias y han permitido asignar nombres definitivos a las especies del grupo, englobadas todas bajo el género *Fusarium* (O'Donnell et al., 1998).

La especie objeto de estudio en esta Tesis es la correspondiente al grupo de

Tabla 1. Especies de *Fusarium* pertenecientes al "complejo *Gibberella fujikuroi*", dentro del cual constituyen el grupo de cruzamiento indicado. Se indican en la tercera columna las referencias donde se definió su nombre como especie y en la cuarta columna referencias anteriores a su nombramiento como especie independiente por O'Donnell et al. (1998)

Grupo de cruzamiento	Especie	referencia	referencia anterior
A	<i>verticillioides</i>	O'Donnell et al 1998	Wineland, 1924
B	<i>sacchari</i>	"	Nelson et al., 1983
C	<i>fujikuroi</i>	"	Nirenberg, 1976
D	<i>proliferatum</i>	"	Kuhlman, 1982
E	<i>subglutinans</i>	"	Nelson et al., 1983
F	<i>thapsicum</i>	"	Klittich et al., 1997
G	<i>nygamai</i>	"	Klaasen y Nelson, 1996
H	<i>circinatum</i>	Britz et al., 1999	
I	<i>konzum</i>	Zeller et al., 2003	

cruzamiento C del complejo, denominada *Fusarium fujikuroi*. Esta estirpe destaca entre las demás por su capacidad de producir giberelinas, hormonas vegetales descritas en el apartado 1.5.2.

1.2 Genética de *Fusarium*

El ciclo sexual de *Fusarium* se reproduce en condiciones de laboratorio añadiendo conidios de la estirpe de sexo (+) sobre micelio de la estirpe (-) cultivada en un medio apropiado (Sidhu, 1983a; Klittich y Leslie, 1988). Tras varios días de incubación se forman los peritecios, estructuras especializadas en las que se desarrollan tétradas con ascosporas desordenadas.

En *Fusarium* se han descrito estirpes heterocariontes, aisladas de la naturaleza (Sidhu, 1983a; 1983b) o conseguidas en el laboratorio tanto por anastomosis (Ming et al., 1966; Correll et al., 1987; Adams et al., 1987) como por fusión de protoplastos (Adams et al., 1987). Es frecuente la incompatibilidad vegetativa o incapacidad de formar heterocariontes de unas estirpes con otras (Puhalla y Spieth, 1983; 1985), y la autoincompatibilidad, o incapacidad de formarlos con ella misma (Correll et al., 1989).

Fusarium se reproduce asexualmente mediante esporas denominadas conidios (Fig. I.1). Se distinguen dos tipos de conidios: los microconidios, pequeños, fusiformes y uninucleados (Avalos et al., 1985), y los macroconidios, más grandes, arqueados, tabicados y presumiblemente multinucleados (Kuhlman, 1983). Las estirpes empleadas en esta Tesis prácticamente solo producen microconidios, un carácter habitual en *F. fujikuroi*. La presencia en los microconidios de un solo núcleo facilita el aislamiento de estirpes con mutaciones recesivas (Avalos et al., 1985), y su exposición a diversos agentes mutagénicos, físicos o químicos, produce elevadas tasas de mutación (Puhalla y Spieth, 1983; Avalos et al., 1985; Koelblin et al., 1990).

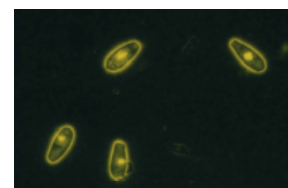


Fig. I.1 Conidios de *F. fujikuroi*. Los núcleos fueron teñidos con mitramicina y visualizados por fluorescencia (Avalos et al., 1985).

1.3. Estirpes silvestres utilizadas en esta Tesis

La mayor parte del trabajo previo sobre la síntesis de carotenoides de *F. fujikuroi*, tema de esta Tesis, se ha llevado a cabo con la estirpe silvestre IMI58289. Recientemente, el grupo de investigación ha extendido sus investigaciones a una segunda estirpe silvestre de la misma especie, FKMC1995, utilizada como patrón de cruzamiento del grupo C. Esta estirpe presenta ventajas sobre IMI58289 como objeto de investigación, ya que esta última muestra una baja capacidad de esporulación, una limitada fertilidad sexual y autoincompatibilidad vegetativa. La estirpe silvestre FKMC1995, por el contrario, es sexualmente fértil (Leslie, 1991) (Fig. I.2), conidia abundantemente y sus hifas fusionan espontáneamente para formar heterocariontes, permitiendo los análisis de complementación. Además, presenta una elevada capacidad de producir giberelinas (Oller-López et al., 2003) y su carotenogénesis es equivalente a la de la estirpe IMI58289 tanto en los carotenoides producidos como en su regulación. En esta Tesis se ha usado una u otra estirpe en función de lo que aconsejaran los experimentos y, en su caso, han sido objeto de comparación.

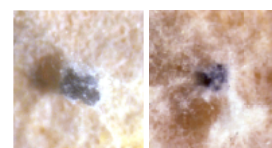


Fig. I.2. Peritecios procedentes del cruzamiento de dos estirpes derivadas de FKMC1995

Se ha utilizado también para propósitos puntuales la estirpe silvestre de *F. fujikuroi* m567, de características más parecidas a IMI58289 que a FKMC1995. Esa estirpe fue elegida por su capacidad de producción de giberelinas como modelo de trabajo por el grupo de la Dra. B. Tudzynski en la Universidad de

Münster (Alemania), con el que se ha mantenido una colaboración en esta Tesis.

A lo largo del trabajo experimental de esta Tesis fue puesta a disposición de los investigadores la secuencia del genoma de la primera especie del género *Fusarium*, *F. graminearum*, así como las herramientas informáticas para su análisis a través de Internet. Algunas estrategias experimentales se han basado en el análisis de secuencias de este genoma.

1.4. Actividad patogénica de *F. fujikuroi*

Como ya se ha indicado, las especies del género *Fusarium* suelen ser patógenas de plantas. *F. fujikuroi* es patógena del arroz (Stitt et al., 2002), al que produce una enfermedad conocida desde antiguo en Japón como *bakanae* (planta loca). Se trata de una enfermedad sistémica, transmitida principalmente por la presencia de esporas del hongo en las semillas (Fig. I.3). Los síntomas más tempranos de la enfermedad aparecen un mes después de la siembra, manifestándose como plantas más altas, más delgadas y ligeramente cloróticas en comparación con las plantas sanas. La rápida elongación de las plantas infectadas se debe a la producción de giberelinas por el hongo (ver apartado 1.5.2); éstas crecen tanto que destacan sobre la superficie de los cultivos, cayendo arqueadas por su propio peso sobre las plantas sanas. A medida que avanza la estación, una parte de las plantas enfermas mueren antes de llegar a la madurez, y otras sobreviven lo suficiente para formar panículas, aunque casi vacías de semillas. La presencia generalizada de plantas enfermas en los arrozales da lugar a reducciones importantes en los rendimientos de los cultivos, motivo original de la atención prestada por los investigadores a la enfermedad y al hongo que la causa.

Cuando las plantas enfermas entran en senescencia, el micelio del hongo emerge entre sus nódulos y puede verse la esporulación por encima del nivel del agua, pudiendo alcanzar altos niveles en el tallo cuando se drena el arrozal. Las esporas producidas contaminan la cubierta de las semillas sanas durante la cosecha, donde pueden aguantar hasta su siembra facilitando así el siguiente ciclo de infección incluso en campos previamente no infectados. Cuando los dos grupos de cruzamiento están presentes pueden formarse peritecios, distinguibles a simple vista como pequeños puntos de color azul violáceo oscuro en los nodos y en el tallo de las plantas infectadas. Las ascosporas producidas en los peritecios también pueden contaminar semillas y servir de inóculo para la siguiente generación.

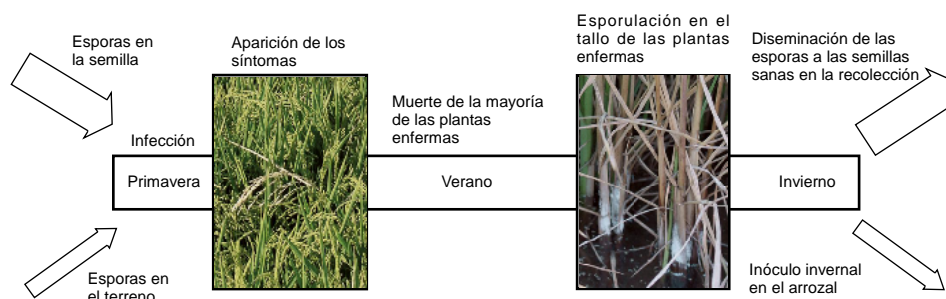


Fig. I.3. Ciclo de infección de *Fusarium fujikuroi* en arroz

1.5. Metabolismo secundario de *Fusarium*

Las especies del género *Fusarium* producen gran cantidad de metabolitos secundarios (Fig. I.4), entre los que destacan por su relevancia las toxinas. Algunas de éstas afectan a la especie humana (Marasas et al., 1988) y a animales domésticos (Uhlinger, 1997) a través del consumo de alimentos vegetales contaminados. Entre las micotoxinas producidas se encuentran las fumonisinas (Gelderblom et al., 1988), las fusarinas (Barrero et al., 1991), el ácido fusárico (Bacon et al., 1996), las bicaverinas (Giordano et al., 1999), la moniliformina (Marasas et al., 1986) y la fusaproliferina (Moretti et al., 1996).

Otros metabolitos secundarios relevantes producidos por *Fusarium* pertenecen a la familia de los terpenoides, como las caurenolidas (Rojas et al., 2004), el fujenal (Fernández-Martín et al., 1995), los carotenoides (Avalos y Cerdá

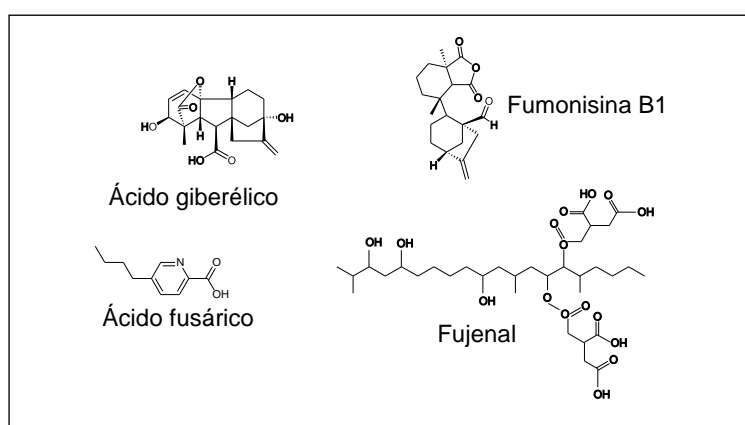


Fig. I.4. Ejemplos de metabolitos secundarios producidos por *Fusarium*

Olmedo, 1986) y las giberelinas (Fernández-Martín et al., 1995, Tudzynski, 2005). Se desconoce la toxicidad de caurenolidas y fujenal, mientras que los carotenoides y las giberelinas son compuestos inofensivos. Los carotenoides son acumulados en cantidades similares por diferentes especies pertenecientes al “complejo *Gibberella fujikuroi*” (Avalos y Cerdá-Olmedo, 1987), mientras que las giberelinas solo son producidas por estirpes del grupo C del complejo, *F. fujikuroi* (Malonek et al., 2005).

1.5.1 Terpenoides

Los terpenoides conforman un basto y heterogéneo grupo de compuestos químicos presentes en todos los seres vivos y empleados para funciones muy diversas. Todos ellos tienen en común la síntesis a partir de una misma molécula de cinco átomos de carbono, el pirofosfato de isopentenilo (IPP). Esta molécula puede ser sintetizada por dos rutas bioquímicas diferentes. Una de ellas, la mejor conocida y durante mucho tiempo considerada como única vía para su síntesis, se conoce como ruta del mevalonato (Fig. I.5). El precursor en esta ruta es el acetil-CoA, del cual se sintetiza, vía acetoacetil-CoA, el 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA (HMG-CoA), que se convierte posteriormente en mevalonato por mediación de una reductasa (Goodwin y Lijinsky, 1952). Dos fosforilaciones y una descarboxilación convierten el mevalonato en IPP.

La segunda ruta conocida de síntesis de IPP comienza con la condensación

de gliceraldehído-3-fosfato e hidroxietilamina, producto de la decarboxilación del piruvato. Inicialmente se demostró la existencia de esta ruta en eubacterias (Rohmer et al., 1993; Horbach et al., 1993), pero se ha comprobado más tarde que coexiste con la ruta del mevalonato en algas (Schwender et al., 1996) y en plantas (Eisenreich et al., 1996; Lichtenthaler et al., 1997).

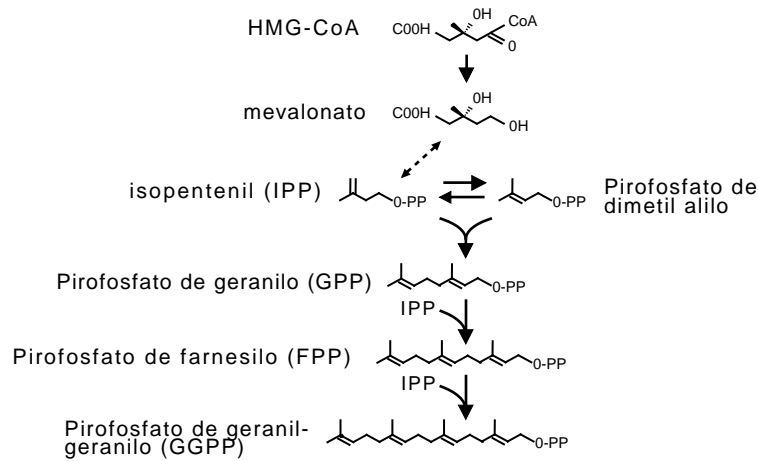


Fig. I.5. Primeros pasos de la ruta de los terpenoides

El primer terpenoide propiamente dicho surge de la fusión de una molécula de IPP con un isómero de sí misma, el pirofosfato de dimetilalilo. El producto posee 10 átomos de carbono, y se denomina pirofosfato de geranilo (GPP). Esta molécula es origen de numerosos terpenoides de bajo peso molecular, frecuentemente volátiles y olorosos, como el mentol y los pinenos (Fig. I.6). El más simple es el isopreno, un gas inocuo emitido a la atmósfera en grandes cantidades por las plantas (Logan et al., 2000).

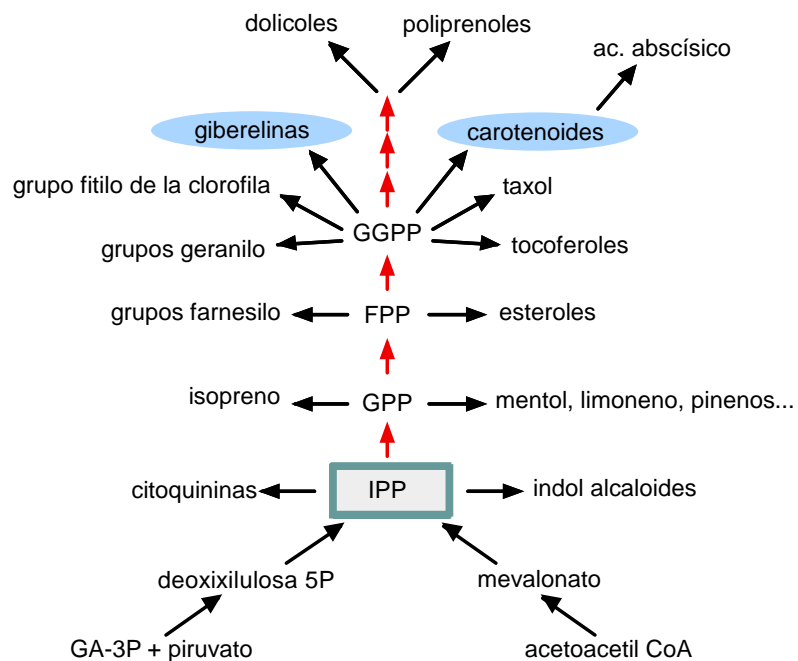


Fig. I.6. Árbol de los terpenoides.

Posteriores adiciones de IPP dan lugar a moléculas de quince átomos de carbono (el pirofosfato de farnesilo o FPP) y de veinte (el pirofosfato de geranylgeranilo o GGPP) mediante reacciones llevadas a cabo por transferasas de prenilo. El geraniol constituye un terpeno, y los isoprenoides se clasifican según el número de unidades de terpeno que los originan. Así, los monoterpenos derivan de modificaciones químicas del GPP y los sesquiterpenos derivan del FPP. Los esteroides son triterpenos, ya que derivan de la unión de dos moléculas de FPP.

Un importante grupo de terpenoides constituyen los esteroides, componentes esenciales de la membrana plasmática. El precursor de los esteroides en la ruta de los terpenoides es el escualeno, que se produce por la condensación de dos moléculas de FPP (Weete y Ghandi, 1996). El escualeno sufre posteriormente diversas oxidaciones y ciclaciones que dan lugar a los distintos esteroides. Uno de ellos es el colesterol, de gran importancia para la salud humana.

También son terpenoides ciertas hormonas vegetales, como el ácido abscísico y las ya citadas giberelinas, o animales, como los esteroides. El ácido abscísico es un derivado de la ruta de los carotenoides. La presencia de las síntesis de giberelinas y carotenoides en *F. fujikuroi* es el origen de su uso como modelo de investigación, que ha tenido continuidad en esta Tesis.

1.5.2 Giberelinas

Las giberelinas son hormonas vegetales de la familia de los terpenoides, sintetizadas a partir del pirofosfato de geranylgeranilo (Fig. 1.7). Comparten por tanto los primeros pasos de la ruta con la síntesis de carotenoides, descrita en la sección 2 de esta Introducción. La historia de estas hormonas comenzó hace más de cien años en Japón, a raíz de las investigaciones sobre la causa de la enfermedad *bakanae* en arroz (ver apartado 1.4). Inicialmente descubiertas como metabolitos producidos por *F. fujikuroi*, juegan un papel relevante en la fisiología de las plantas, en las cuales se encuentran de forma universal. Debido a su papel hormonal, sus concentraciones en las plantas son muy bajas, lo que explica su tardío descubrimiento (Mitchell et al., 1951; Radley, 1956).

Desde el punto de vista de su estructura, las giberelinas son diterpenoides tetracíclicos altamente oxigenados con 20 ó secundariamente 19 carbonos. Desde la caracterización química de las primeras giberelinas, se han nombrado por las letras GA seguidas de un número (Mander, 1992). Hasta la fecha se han caracterizado 26 giberelinas diferentes en *F. fujikuroi*, y muchas más en las plantas, superando el centenar el número total de giberelinas conocidas (McMillan, 2002).

Las giberelinas, comunes en las plantas y desconocidas en los animales, son producidas por algunos microorganismos además de *F. fujikuroi*. Entre ellos figuran otros ascomicetos, como *Phaeosphaeria sp.* y *Sphaceloma manihoticola*, y algunas bacterias (McMillan, 2002). La ruta biosintética la presentan también otras especies próximas a *F. fujikuroi*, aunque no se ha detectado en ellos producción de giberelinas en condiciones de laboratorio (Malonek et al., 2005).

Al contrario que en las plantas, se desconoce el papel biológico de las giberelinas en *F. fujikuroi* o en otros hongos. Los mutantes afectados en la producción de giberelinas (Candau et al., 1991; Fernández-Martín et al., 1995) no muestra ningún tipo de alteración detectable en condiciones de laboratorio. Se sospecha que pueden jugar algún tipo de papel en la patogénesis sobre el

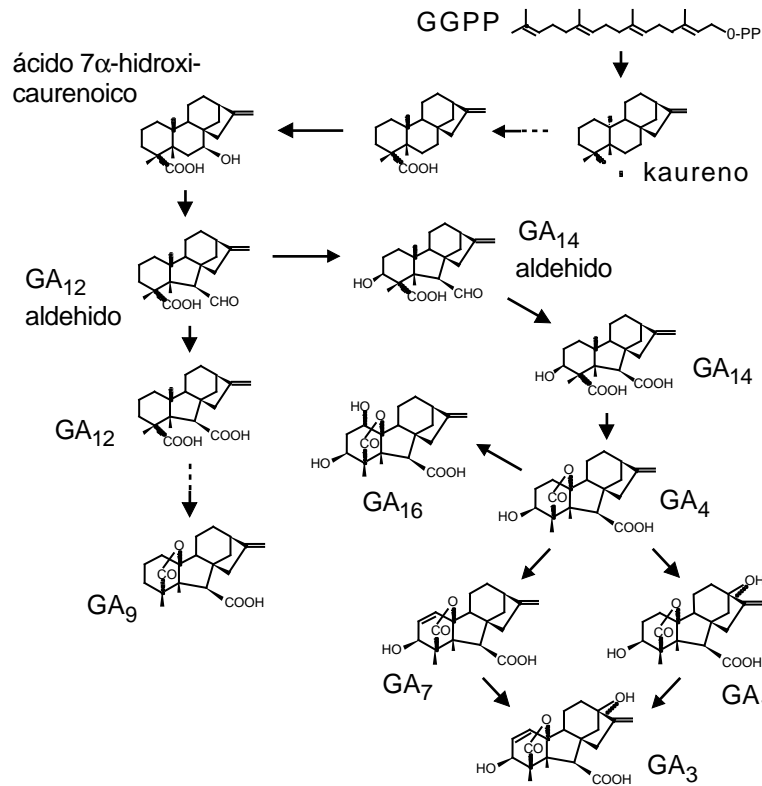


Fig. 1.6. Síntesis de giberelinas en *Fusarium fujikuroi*. Se muestran solo los pasos más relevantes. El producto mayoritario es el ácido giberélico (GA₃).

arroz, pero este aspecto de la biología de *F. fujikuroi* no ha sido aún objeto de suficiente atención.

Las giberelinas son un arquetipo de metabolito secundario excretado al medio en fase estacionaria (Borrow, 1964; Bu'Lock et al., 1974). Su síntesis no se induce por el cese de crecimiento, sino por la desaparición de nitrógeno en el medio, siendo casi indetectable si la fase estacionaria se produce por agotamiento de un nutriente que no sea el nitrógeno (Candau et al., 1992). La inducción por ausencia de nitrógeno es mediada por la proteína AreA (Mihlan et al., 2003), encargada de la utilización de fuentes alternativas de nitrógeno (Caddick et al., 1994).

La ruta biosintética de giberelinas de *F. fujikuroi* muestra numerosas similitudes con la de las plantas, lo que llevó a sugerir su procedencia a partir de éstas por transferencia horizontal de sus genes (Chapman y Ragan, 1980), organizados en un agrupamiento génico (ver apartado siguiente). Sin embargo, un análisis más profundo muestra diferencias significativas en los pasos enzimáticos, lo que da lugar a la síntesis de diferentes juegos de giberelinas. Además, en contraste con los de *F. fujikuroi*, los genes de las giberelinas en los primeros genomas de plantas conocidos, como el de *A. thaliana*, se encuentran dispersos. La comparación de los genes y enzimas sugiere que, a pesar de las similitudes, ambas rutas poseen orígenes evolutivos diferentes, pudiéndose tratar por tanto de un ejemplo de evolución convergente (Hedden et al., 2002).

1.5.3 Agrupamientos génicos

Los genes involucrados en la biosíntesis de metabolitos secundarios de *Fusarium* se encuentran frecuentemente agrupados formando *clusters*. Entre los ejemplos mejor conocidos figuran los agrupamientos génicos de las giberelinas (Tudzynski, 2005), los tricotecenos (Brown et al., 2004), las fumonisinas (Seo et al., 2001), la zearalenona (Kim et al., 2005) y la aurofusarina (Malz et al., 2005). Se espera que muchos más agrupamientos génicos salgan a la luz como consecuencia del estudio de sus genomas.

La organización de estos genes formando agrupamientos en los genomas puede tener su causa en su procedencia por transmisión horizontal o en ventajas regulatorias. En los casos investigados, los genes comparten una misma regulación. En algunos casos se sospecha la existencia de mecanismos de inactivación a gran escala por regulación a nivel de organización de la cromatina (Bok et al., 2006).

Los genes de la carotenogénesis conocidos hasta ahora en *F. fujikuroi* forman también un agrupamiento génico, cuyo estudio es uno de los objetivos de esta Tesis.

2. Carotenoides

2.1 Rutas biosintéticas de carotenoides

Los carotenoides son terpenoides procedentes de la fusión de dos moléculas de GGPP, y son por tanto tetraterpenos. Estos pigmentos son sintetizados por todas las plantas, y por numerosas bacterias, arqueas y hongos (Armstrong y Hearst, 1996; Umeno et al., 2005). Están presentes también en los animales, aunque estos carecen de la ruta biosintética y los adquieren a través de la dieta.

Desde la identificación de la primera molécula en los inicios del siglo XIX, se han descubierto centenares de carotenoides diferentes (Britton et al., 1998). Se trata de moléculas hidrocarbonadas de estructura lineal, generalmente con anillos cerrados en los extremos y a veces con radicales oxigenados. Los carotenos propiamente dichos poseen solo carbono e hidrógeno, denominándose xantofilas cuando poseen además oxígeno.

Las rutas biosintéticas de carotenoides en los hongos son muy similares en los primeros pasos y más diversas en las reacciones tardías. Todas comienzan con la síntesis de un caroteno incoloro, el fitoeno (Fig. I.8), por condensación de dos moléculas de GGPP, reacción catalizada por la sintetasa de fitoeno. Posteriormente actúa una desaturasa para introducir al menos cuatro dobles enlaces conjugados en la molécula, cinco en algunos hongos, como es el caso de *F. fujikuroi*. Los dobles enlaces permiten a los consiguientes productos absorber luz visible y les confieren sus colores característicos (Fig. I.8). Debido a la simetría de la molécula, estas reacciones se hacen por pares, una a cada lado a la misma distancia del eje central. A diferencia de los hongos, las plantas poseen dos desaturasas diferentes, cada una responsable de cada par de reacciones.

Los extremos de los carotenos suelen ser objeto de una reacción de ciclación. Existen tres tipos de ciclasas en función del tipo de anillo introducido, denominados α , β ó γ . En los hongos investigados, los anillos introducidos son de tipo β . La ciclación de un extremo del licopeno produce el γ -caroteno, y la ciclación del otro extremo produce el β -caroteno. Esta ruta, consistente en cuatro desaturaciones y dos ciclaciones β , conocida como ruta de Porter y

Lincoln (Porter y Lincoln, 1950), está presente en diversos hongos mucorales, como *Phycomyces blakesleeanus* (Cerdá-Olmedo, 1987), *Mucor circinelloides* (Fraser et al., 1996) o *Blakeslea trispora* (Mehta et al., 2003), éste último empleado para su producción a escala industrial (Avalos y Cerdá-Olmedo, 2004). La ruta de Porter y Lincoln también se ha encontrado en hongos de otros grupos taxonómicos, como los ascomicetos *Aspergillus giganteus* (El-Jack et al., 1988) o *Cercospora* sp. (Norman, 1991; Ehrenshaft y Daub, 1994). No es inusual, sin embargo, que las rutas biosintéticas difieran de este modelo. Así, por ejemplo, la síntesis de astaxantina en el basidiomiceto *Xanthophyllomyces dendrorhous*, anteriormente conocido como *Phaffia rhodozyma* (Johnson y Lewis, 1979) requiere dos reacciones enzimáticas adicionales sobre los dos anillos del β-caroteno. Una actividad cetolasa introduce grupos ceto y una actividad hidrolasa introduce grupos hidroxilo, dando lugar a la astaxantina, una xantofila de interés biotecnológico. En este hongo ambas actividades enzimáticas las lleva a cabo un solo producto génico (Ojima et al., 2006)

La astaxantina es un ejemplo representativo de los carotenoides oxigenados o xantofilas. Estas son estructuralmente muy heterogéneas, y se conocen numerosos ejemplos en bacterias, algas y plantas. Entre ellos figuran el esferoideño y el esferoideneno en *Rhodobacter*, el ceto-toruleno y la mixobactona en *Myxococcus*, la criptoxantina y la zeaxantina en *Erwinia*, o la zeaxantina y la equinona en diversas cianobacterias (revisado por Armstrong, 1997). El producto principal de la carotenogénesis de *F. fujikuroi* es una xantofila, la neurosporaxantina (Fig. I.8) (Aasen y Jensen, 1965), descubierta previamente en el ascomiceto *N. crassa*.

2.2. Bases físicas del color de los carotenoides

Los carotenoides son conocidos por sus atractivos colores, habitualmente desde el amarillo hasta el rojo. Su diversidad de colores se debe a pequeñas

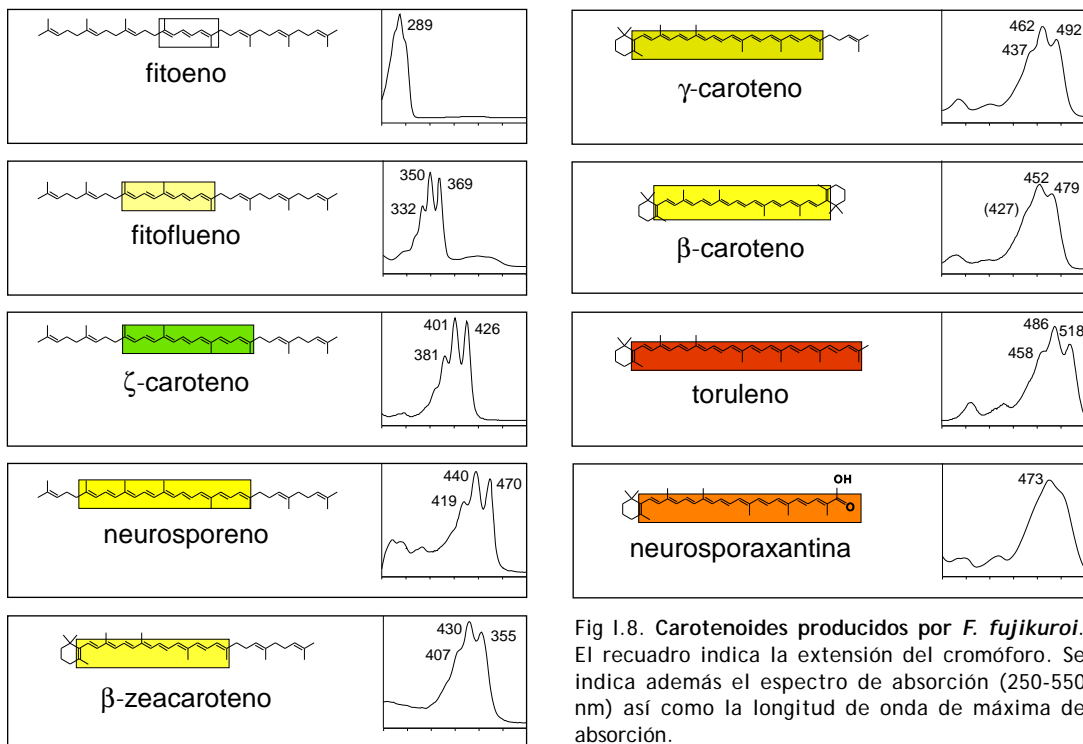


Fig I.8. Carotenoides producidos por *F. fujikuroi*. El recuadro indica la extensión del cromóforo. Se indica además el espectro de absorción (250-550 nm) así como la longitud de onda de máxima de absorción.

variaciones en su estructura química (Kohler, 1995). Todos los carotenoides comparten un esqueleto formado por una cadena poliénica que contiene un número variable de dobles enlaces conjugados. Este segmento de la molécula es el cromóforo, que contiene electrones deslocalizados. Cuanto más extensa es la región de dobles enlaces conjugados, menos energía es necesaria para que sean excitados los electrones. Así, un número reducido de dobles enlaces conjugados solo absorbe luz de alta energía, en la región UV del espectro, y por tanto no confieren color. Sin embargo, si el cromóforo es suficientemente extenso, absorbe fotones de menor energía, entrando ya en la región visible del espectro y confiriendo color a la molécula (Fig. 1.8). El cromóforo es responsable también de la capacidad de neutralizar especies reactivas de oxígeno y, por tanto, de las propiedades antioxidantes de los carotenoides (ver Apartado 2.4). La presencia de anillos en los extremos de la molécula acorta la región poliénica y eleva sensiblemente la energía necesaria de los fotones para poder interactuar con la molécula. A ello se debe, por ejemplo, la diferencia de color entre el licopeno y el β -caroteno, siendo el primero capaz de absorber fotones de energía ligeramente inferior, dando lugar a su típico color rojo.

2.3. Apocarotenoides

Los apocarotenoides son moléculas procedentes de reacciones de corte o rotura oxidativa de carotenoides (ver apartado 3.3). Distintos apocarotenoides o moléculas derivadas juegan papeles relevantes en el control del crecimiento celular y el desarrollo en plantas, animales y organismos inferiores. El ejemplo más evidente en plantas es el ácido abscísico (ABA), hormona necesaria para el desarrollo de la semilla y la adaptación a cambios ambientales (Leung et al., 1998). La síntesis del ácido abscísico tiene su arranque en la rotura asimétrica de un carotenoide, la 9-cis-violaxantina. Otros apocarotenoides producto de rotura asimétrica son la β -ionona, el β -ciclocitral o el safranal, entre otros (Giuliano et al., 2003; Auldridge et al., 2006). Sus funciones son muy diversas, incluyendo la quimioatracción, o la proporción de aromas o sabores.

Una categoría particularmente importante dentro de los apocarotenoides son los retinoides, derivados principalmente del corte del β -caroteno. Entre los retinoides más relevantes figuran el retinal y el ácido retinoico. El retinal es el cromóforo que hace posible la detección de luz por las proteínas de la visión, las opsinas (Filipek et al., 2003), presentes en la retina de los animales (Morris-Kay y Ward, 1999). Como consecuencia, la ausencia persistente de β -caroteno en la dieta puede producir ceguera. De manera similar, el retinal unido a opsinas es responsable de la fototaxis en algas verdes (Foster et al., 1984), bacterias y arqueas (Spudich, 2006), así como del bombeo de protones (Bibikov et al., 1993). Por su parte, el ácido retinoico es un morfógeno crítico en el desarrollo de los cordados (Marletaz et al., 2006). La alteración en los niveles de ácido retinoico durante el desarrollo embrionario temprano produce malformaciones en el feto, que afectan especialmente a la determinación de su eje antero-posterior.

El β -caroteno es también fuente de otros retinoides mediante rotura asimétrica. Entre ellos figuran la β -ionona y el β -10'-apocarotenal en vertebrados, apocarotenoides cuya función biológica aun no ha sido establecida (Kiefer et al., 2001).

2.4. Funciones de los carotenoides en animales y plantas

Los carotenoides se encuentran en la inmensa mayoría de los seres vivos, incluso cuando no son capaces de sintetizarlos, como ocurre con los animales. La mayor parte de los carotenoides presentes en la naturaleza se encuentran en plantas y algas, aunque su presencia es enmascarada por la clorofila. Su función en organismos fotosintéticos es actuar de pigmentos fotorreceptores, absorbiendo la luz y transfiriéndola en forma de energía a los centros de reacción de la fotosíntesis (Edge et al., 1997). La importancia de este papel la pone en evidencia el efecto herbicida de los inhibidores de las enzimas de la carotenogénesis.

Los carotenoides pueden jugar un papel secundario como pigmentos. En las plantas proporcionan colores llamativos a flores y frutos facilitando su atracción sobre los animales y, en consecuencia, la polinización o la dispersión de semillas. En algunos animales, como crustáceos, peces y aves, la ingesta de carotenoides es necesaria para adquirir su pigmentación, que puede jugar un papel importante en su etología, por ej. en la atracción sexual (Favre et al., 2003; Blount et al., 2003).

Además del papel jugado en la apariencia de animales y plantas, los carotenoides tienen otras funciones derivadas de sus especiales características químicas. Al ser pigmentos hidrofóbicos se localizan en las membranas celulares, regulando su fluidez. Poseen además propiedades antioxidantes que les permiten neutralizar singletes de oxígeno molecular (Conn et al., 1991) y radicales generados en la peroxidación lipídica (Sies y Stahl, 1995). Además actúan sinérgicamente con otras vitaminas como protectores ante la fotooxidación (Edge et al., 1997; Stahl y Sies, 2002). A esta actividad antioxidante se atribuye el papel supuestamente beneficioso que el consumo de carotenoides puede ejercer sobre la salud humana, que incluye protección frente al cáncer (Giovannucci et al., 1995; Rao et al., 1999) o mejora de la respuesta inmunológica (Jyocouchi et al., 1991).

En el caso de la especie humana, los carotenoides, muy especialmente el β -caroteno (provitamina A), son importantes para la salud, existiendo sistemas específicos de asimilación y enzimas encargadas de su metabolismo (Von Lintig et al., 2005). Los tejidos animales retienen cantidades considerables de diferentes carotenoides, como el licopeno, la zeaxantina y la luteína, que unen su efecto antioxidante al del β -caroteno. Además, la zeaxantina y la luteína están presentes en la región central de la retina, la denominada mácula lútea, donde ejercen de filtro de protección de las células de la retina y disminuyen la aberración cromática (Snodderly et al., 1995; Landrum y Bone, 2001). La deficiencia en el consumo de luteína está asociado con diferentes anomalías de la visión que pueden derivar en ceguera, como las cataratas o la degeneración macular (Moeller et al., 2000).

2.5. Funciones de los carotenoides en los hongos

La función de los carotenoides en los hongos no se ha establecido con claridad, pero numerosas observaciones experimentales sugieren que su papel principal es la protección frente a la oxidación (Gessler et al., 2002; Ligusa et al., 2005). La luz aumenta el estrés oxidativo de la célula, lo que puede explicar la frecuente regulación por la luz de la carotenogénesis en estos organismos (Avalos et al., 1993). En los casos investigados, los carotenoides no parecen ser

usados como cromóforo responsable de fotorrespuestas, tales como la inducción de la conidiación o de la propia síntesis de carotenoides. El descubrimiento reciente de proteínas de la familia de las opsinas en hongos ha abierto nuevas perspectivas sobre las funciones de los carotenoides en este grupo taxonómico, ya que, como se ha indicado anteriormente, muchas de estas proteínas requieren retinal para ser funcionalmente activas. Hasta la fecha no se ha identificado ningún gen de hongos implicado en la síntesis de apocarotenoides.

Ciertos zigomicetos, como *B. trispora* o *P. blakesleeanus* emplean como hormonas sexuales moléculas derivadas de apocarotenoides. Estas hormonas, llamadas ácidos trispóricos, se sintetizan a partir del β -caroteno (Austin et al., 1970). Por ese motivo, los mutantes de *P. blakesleeanus* bloqueados en la ruta biosintética son sexualmente incompetentes (Sutter, 1975).

3. Enzimas de la carotenogénesis: rutas biosintéticas y metabolismo

3.1. Desaturasas de carotenoides

Como ya se mencionó en el apartado 2.1, las desaturasas de carotenoides introducen dobles enlaces de carbono en las rutas biosintéticas de estos pigmentos. Los miembros más conocidos de esta familia de enzimas son las desaturasas de fitoeno, que introducen 2, 3, 4 ó 5 desaturaciones a lo largo de la ruta empezando por este sustrato. Otras desaturasas utilizan como sustrato solo carotenoides que ya han sufrido desaturaciones por medio de una primera desaturasa. Entre sus sustratos figuran el ζ -caroteno (Linden et al., 1994), el hidroxineurosporeno (Albrecht et al., 1997), el metoxineurosporeno (Albrecht et al., 1997), el dehidroescualeno (Wieland et al., 1994) o el propio β -caroteno (Schumann et al., 1996). A nivel de secuencia existe considerable variación entre estas enzimas y la similitud entre aquellas pertenecientes a distintos grupos taxonómicos puede llegar a ser muy baja. La mayor divergencia se encuentra entre las desaturasas de fitoeno de bacterias y de plantas (Pecker et al., 1992; Sandmann, 1994). En base a sus notables diferencias, se ha postulado que ambos tipos de desaturasas tienen orígenes evolutivos distintos, y que sus similitudes se deben a necesidades estructurales para catalizar la misma reacción enzimática.

3.1.1. Nuevas enzimas de la familia con funciones diferentes a la desaturación

Recientemente se han clonado y caracterizado dos proteínas con evidente parecido a las desaturasas de carotenoides pero con otras funciones enzimáticas. La primera de ellas, llamada CRTISO, fue descrita en paralelo por dos grupos (Isaacson et al., 2002 y Park et al., 2002). Esta enzima produce licopeno en el tomate a partir de prolicopeno (7Z,9Z,7Z,9Z-tetracis-licopeno) mediante una reacción de isomerización. La similitud de secuencia de la CRTISO con las desaturasas ha llevado a postular que su mecanismo de acción consiste en una reacción de saturación, un giro a través del enlace simple generado y la restitución del estado anterior mediante una desaturación (Giuliano et al., 2002) (Fig. I.9).

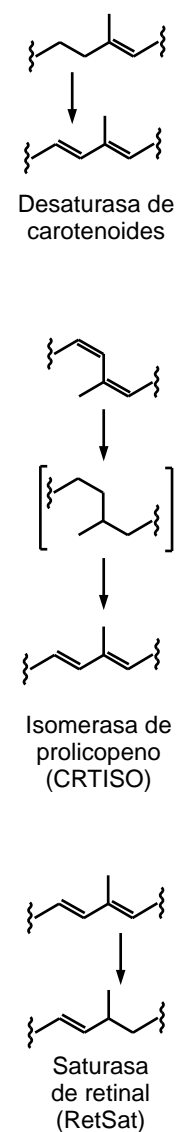


Fig I.9. Representación esquemática de las reacciones catalizadas por las desaturasas de carotenoides, isomerasa de prolicopeno (CRTISO) y saturasa de retinal (RetSat)

La secuencia de la CRTISO permitió la identificación de otra enzima, abreviada RetSat (Moise et al., 2004), que lleva a cabo una reacción de saturación sobre retinol todo-*trans* en vertebrados. Todavía no se conoce el papel biológico del producto de esta reacción, el 13,14-dihidroretinol todo-*trans*.

A pesar de pertenecer a organismos superiores, las secuencias de estas dos enzimas son más parecidas a las de las desaturasas de bacterias y hongos que a las de plantas, lo que sugiere su procedencia por transmisión horizontal. Por otro lado, la existencia de proteínas de esta familia con funciones distintas a las reacciones de desaturación, como la isomerización o la saturación (Fig. I.9), indica una versatilidad y diversidad funcional mayor de lo que los datos disponibles hasta hace poco permitían anticipar.

Tanto las desaturasas de carotenoides como estas nuevas enzimas de la misma familia comparten dos dominios en los que la similitud de secuencia es marcadamente más alta que en el resto de la proteína. El primero de ellos es el dominio de unión de dinucleótido (Armstrong et al., 1990; Bartley et al., 1990). Se trata de un corto segmento en la región del extremo amino de la proteína que une el cofactor (FAD ó NAD), necesario para que se lleve a cabo la reacción de desaturación (ver apartado 3.1.3). El segundo es el dominio de unión de caroteno (Armstrong et al., 1989), localizado en la región del extremo carboxilo.

3.1.2. Interés aplicado de las desaturasas de carotenoides

Las desaturasas de carotenoides, especialmente las que actúan sobre el fitoeno, han sido objeto de considerable atención por parte de los investigadores. El motivo principal es de tipo económico, pues la desaturasa de fitoeno de plantas es la diana de numerosos herbicidas comercialmente importantes (Bramley, 1994). Además, esta enzima se considera un factor limitante en la síntesis de carotenoides en plantas; al ser estos compuestos importantes en la maduración del fruto o la semilla, se ha tratado de aumentar su actividad (Chamovitz et al., 1993; Al-Babili et al., 2006). En tercer lugar, dado el interés aplicado de los carotenoides en medicina, alimentación animal, colorantes y suplementos vitamínicos, se ha investigado en el campo de su producción industrial. Un hito importante en la metodología de los estudios bioquímicos de la carotenogénesis es el uso de *E. coli* como vehículo de expresión heteróloga de genes relevantes. Expresando los genes bajo los elementos reguladores apropiados, se han desarrollado estirpes de *E. coli* capaces de sintetizar carotenoides, facilitando enormemente los ensayos de actividades enzimáticas de esta ruta. Esto ha permitido enfoques experimentales más sofisticados, como la realización de estudios de evolución dirigida de las desaturasas (Schmidt-Dannert et al., 2000; Wang et al., 2001).

3.1.3. El problema de la regeneración del poder reductor

Como se ha descrito en el apartado anterior, las desaturasas de carotenoides utilizan un cofactor para aceptar los protones que se liberan del carotenoide cuando éste es desaturado. En esta Tesis utilizamos el término desaturación en lugar de deshidrogenación porque no se conoce el cofactor utilizado ni el mecanismo por el que se lleva a cabo este proceso. Si bien parece que el cofactor preferido por las desaturasas bacterianas (Fraser et al., 1992; Raisig et al., 1996; Dailey y Dailey, 1998) y vegetales (Huguene y et al., 1992; Al-Babili et al., 1996)

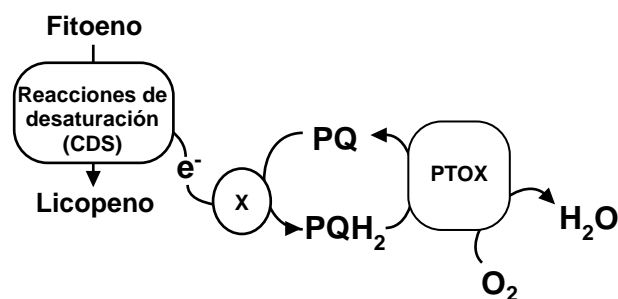


Fig. I.10. Reacciones en el cloroplasto destinadas a regenerar el poder reductor necesario para la actividad de las desaturasas de carotenoides. PQ, plastoquinona, PTOX, *Plastid Terminal Oxidase*. Adaptado de Carol y Kuntz (1999).

es el FAD, existen indicios de que en hongos (Hausmann y Sandmann, 2000) y cianobacterias (Schneider et al., 1997) el cofactor es el NAD. Incluso se ha sugerido para algunas enzimas que el aceptor no es ninguno de estos cofactores, sino el oxígeno molecular (Albrecht et al., 1997; Schneider et al., 1997)

Tampoco se sabe cómo se regenera el cofactor utilizado (FAD o NAD) para poder aceptar un nuevo par de protones de la siguiente desaturación. Se ha sugerido que en el caso del FAD, éste se mantiene unido a la proteína (Al-Babili et al., 1996), de forma que deberían existir otras proteínas que le asistan para la renovación del poder reductor. Se ha demostrado que en plantas este agente regenerador es la plastoquinona (Norris et al., 1995), equivalente vegetal de la ubiquinona. También se ha caracterizado la enzima que deshidrogena la plastoquinona, llamada PTOX (*Plastid Terminal Oxidase*) (Carol y Kuntz., 1999; Wu et al., 1999), que acopla la deshidrogenación de la plastoquinona a la reducción del oxígeno molecular (Josse et al., 2000) (Fig. I.10). Se ha postulado la intervención de una proteína o complejo multiproteico en la transferencia de los electrones a la plastoquinona (Nivelstein et al., 1995).

Finalmente, se ha propuesto que las reacciones de desaturación de los carotenoides están acopladas al proceso de clororrespiración (Bennoun, 2001), asociado a los cambios en el estado redox de la plastoquinona.

3.2. Ciclasas de carotenoides y sintasas de fitoeno

La ciclación de carotenoides es llevada a cabo en diferentes grupos filogenéticos por al menos dos tipos de enzimas. En organismos con carotenogénesis oxigénica, el gen de la ciclasa se ha denominado *crtL*, y en aquellos con carotenogénesis no oxigénica, *crtY* o *lyc*. Ambos tipos de ciclasa son muy diferentes en secuencia, aunque conservan tres pequeños dominios conservados. Contienen además regiones hidrofóbicas correspondientes probablemente a dominios transmembranales (Armstrong, 1997; Sieiro et al., 2003). Se conocen representantes de *crtY* o *crtL* en eubacterias, algas y plantas, pero no en hongos.

Los intentos de identificar el gen responsable de la ciclasa en hongos por similitud con las ciclasas mencionadas fracasaron, retrasando el estudio de esta enzima en este grupo taxonómico. La primera ciclasa fúngica se identificó en el basidiomiceto *X. dendrorhous* (Verdoes et al., 1999a). La nueva enzima, denominada *CrtYB* y descubierta mediante expresión del gen en una estirpe de *E. coli* productora de licopeno, resultó ser muy similar a la proteína Al-2 de *N. crassa*, identificada previamente como sintasa de fitoeno en este hongo. Esta proteína resultó ser por tanto bifuncional, pues cataliza tanto la síntesis de

fitoeno como la ciclación de licopeno. La actividad ciclasa del gen bifuncional fue posteriormente confirmada en otros hongos, como *M. circinelloides* (Velayos et al., 2000) y *P. blakesleeanus* (Arrach et al., 2001), o el mismo *N. crassa* (Schmidhauser et al., 1994). Los dos dominios de la proteína son distinguibles por su hidrofobicidad, mayor en el caso de la ciclasa, que se encuentra en la región del extremo amino.

Las comparaciones de secuencia sugieren que el dominio sintasa de fitoeno es similar a la sintasa de fitoeno de organismos fotosintéticos y también a la sintasa de escualeno. Por su parte, el dominio responsable de la actividad ciclasa de licopeno no guarda similitud con CrtY o con CrtL, pero sí con dos proteínas presentes en *Brevibacterium linens* y *Myxococcus xanthus*. Estas proteínas están determinadas por dos genes contiguos, y su similitud de secuencia sugiere que se originaron por una duplicación génica (Krubasic y Sandmann, 2000). Particularmente interesante es la organización génica en *Halobacterium salinarum*, donde ambas proteínas son determinadas por un mismo gen que incluye un nuevo segmento transmembrana que mantiene unidos a los dos dominios y les permite mantener su topología (Peck et al., 2002). Estos datos sugieren una posible relación evolutiva entre las ciclasas de licopeno de bacterias y hongos. Primeramente una duplicación y posterior fusión habría dado lugar a la ciclasa de licopeno de *H. salinarum*. Seguidamente, el gen bifuncional de hongos podría haberse originado por la fusión de la ciclasa de licopeno de arqueas con una sintasa de fitoeno (Arrach et al., 2001; Peck et al., 2002; Velayos et al., 2000b; Verdoes et al., 1999a).

3.3. Oxigenasas de carotenoides

Las oxigenasas de carotenoides constituyen una familia de enzimas con más de 100 miembros conocidos. La primera enzima identificada en esta familia fue el producto del gen *viviparous14* (VP14) de maíz, una oxigenasa de 9'-cis-epoxicarotenoides que corta la 9-cis-violaxantina para producir el precursor de la hormona vegetal ácido abscísico (Fig. I.11A) (Schwartz et al., 1997). Este trabajo pionero facilitó el subsiguiente descubrimiento de nuevas enzimas de la misma familia. Entre ellas figuran otras oxigenasas de carotenoides de plantas, en algunos casos implicadas en la producción de apocarotenoides de valor comercial, como el azafrán (Bouvier et al., 2003a) o la bixina (Bouvier et al., 2003b). Una consecuencia importante del descubrimiento de estas enzimas fue la identificación de oxigenasas de carotenoides en animales, especialmente la β -caroteno-15,15'-oxigenasa (BCO-I, Fig. I.11B), que corta β -caroteno simétricamente para dar dos moléculas de retinal (Von Lintig et al., 2000; Wyss et al., 2000; Redmon et al., 2001). Otra enzima de vertebrados, la BCO-II, corta asimétricamente el β -caroteno para producir β -ionona (Kiefer et al., 2001). No todos los miembros de la familia cortan carotenoides. Un ejemplo lo constituye la RPE65, proteína que juega un papel indispensable en la visión recogiendo el re-tinal todo *trans* de la membrana y transfiriéndolo a la proteína que lo isomeriza a 11-*cis* retinol para cerrar el ciclo visual (Mata et al., 2004).

La mayoría de estas enzimas se distribuyen en 5 subfamilias. Dos de ellas comprenden proteínas dedicadas al metabolismo de carotenoides en plantas: corte de dobles enlaces 9,10 y 9',10' de diferentes carotenoides (Schwartz et al., 2001) y oxigenasas de 9-cis epoxicarotenoides, que cortan epoxi-xantofilas en la ruta del ácido abscísico (Taylor et al., 2000), mencionada arriba. Otras dos subfamilias engloban enzimas de animales implicadas en el metabolismo de la

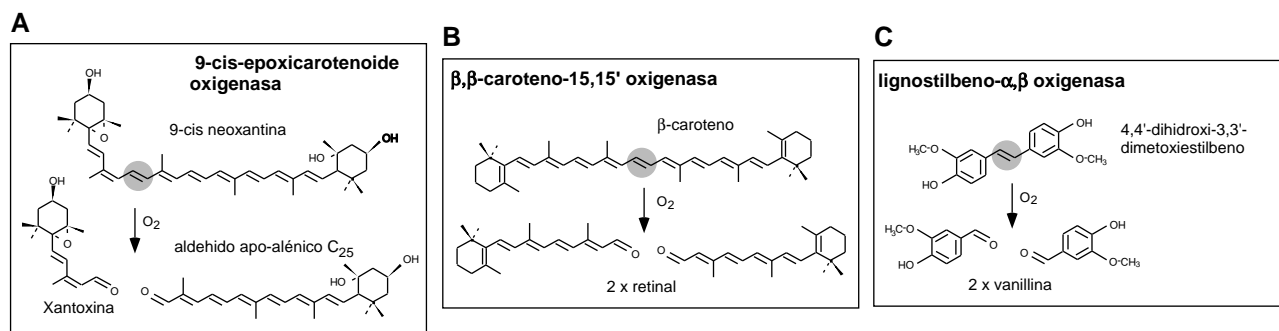


Fig. I.11. Reacciones características de los miembros de tres subfamilias representativas de oxigenasas de carotenoides.

vitamina A: 15,15' oxigenasas que convierten el β -caroteno en dos moléculas de retinal (von Lintig y Wyss 2001) y proteínas del grupo de RPE65 (Redmond et al., 1998). Este último grupo incluye también enzimas animales que cortan carotenoides de forma asimétrica (Kiefer et al., 2001). El último grupo está formado por las lignostilbeno- α,β -oxigenasas bacterianas (Fig. I.11C). Estas enzimas cortan lignostilbeno, empleado como modelo bifenólico de lignina, y otras moléculas relacionadas (Kamoda et al., 2003). Este compuesto, químicamente distante de los carotenoides, tiene un doble enlace central similar al doble enlace que cortan las oxigenasas de carotenoides, aunque no en el contexto de un sistema de dobles enlaces conjugados.

Todas las enzimas de la familia con actividad de corte dejan en los extremos de los productos un grupo aldehído (Fig. I.11 y 12).

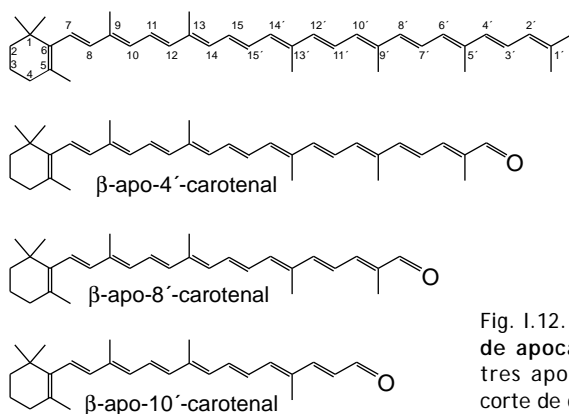


Fig. I.12. Nomenclatura y ejemplos de apocarotenales. Se muestran tres apocarotenales producto de corte de oxigenasas de carotenoides.

3.3.1. Estructura de las oxigenasas de carotenoides

Todos los miembros de la familia de las oxigenasas de carotenoides presentan similitudes significativas a nivel de secuencia. Entre ellas destacan 4 histidinas estrictamente conservadas en su secuencia primaria y una especial abundancia en láminas β en las estructuras secundarias predichas. Esto hace pensar que todas estas proteínas comparten la misma estructura tridimensional.

Recientemente se ha purificado y cristalizado una proteína de esta familia, la apocarotenoide-15,15'-oxigenasa de *Synechocystis* sp. (conocida como ACO), y se ha determinado su estructura tridimensional (Kloer et al., 2005). Dicha estructura está formada por una hélice compuesta de 7 hojas, con 4 histidinas en el eje de la hélice que median la unión de un átomo de Fe^{2+} . Cada hoja la forman varias láminas β antiparalelas (cuatro láminas las hojas 2, 3 y 4, y cinco láminas las hojas 1 y 5), situándose las histidinas en las láminas β más internas de la

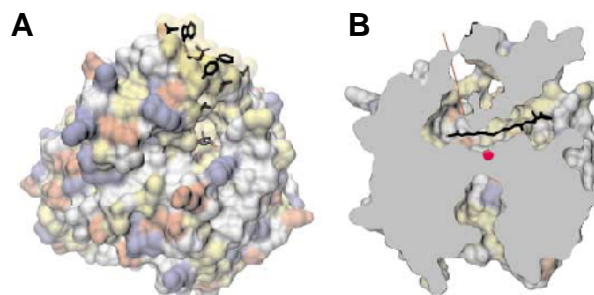


Fig. I.13. Estructura tridimensional de la enzima SynACO. A. Aspecto exterior. B. Corte de la proteína donde se observa el túnel por donde entra el carotenoide que va a ser cortado. (Tomado de Kloer et al., 2005).

hélice. Los giros de la parte superior de la hélice son muy largos, formando una gran cúpula sobre el centro activo. Los giros en la parte inferior en general son más cortos. La superficie de la cúpula, un dominio apolar formado en su mayoría por leucinas y fenilalaninas, se ha propuesto como la parte de la proteína que se introduce en la membrana, por donde entraría el sustrato, fuertemente apolar (Fig. I.13 y I.14). El análisis de la estructura sugiere por tanto que se trata de una proteína de membrana monotópica (penetra solo la mitad de la bicapa lipídica), como se ha sugerido para otra proteína de la ruta, la desaturasa de carotenoides (Schmidt y Sandmann, 1990).

La enzima ACO contiene un túnel que se extiende hacia el interior de la proteína, cerca del presunto dominio apolar de integración en la membrana, hasta alcanzar el centro activo. Después de pasar el ion Fe^{2+} , el túnel gira y se comunica con el exterior en otro punto de la proteína (Fig. I.13B). La enzima contiene además un bolsillo profundo y estrecho que comienza en un lugar próximo al eje del túnel y termina cerca del ion Fe^{2+} . Se ha propuesto que su

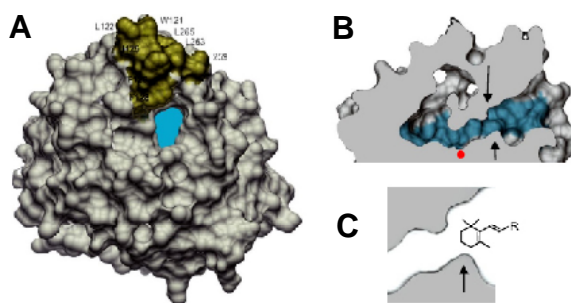


Fig. I.14. Estructura tridimensional de la enzima NosACO. A. Representación de superficie mostrando el lugar de entrada del carotenoide y el dominio de unión a membrana, que se destaca en verde. B. Corte de la proteína que muestra el túnel de unión y corte de sustrato. Se indica con flechas la constricción que evita la entrada de carotenoides ciclados. Se señala con un círculo la posición del átomo de Fe^{2+} responsable de la reacción de corte. C. Vista ampliada de la constricción con un carotenoide ciclado a escala. Se aprecia la imposibilidad de éste para entrar en la proteína. Adaptado de Schezinger et al. (2006).

función es la de vía de acceso para el oxígeno, necesario para la reacción de rotura oxidativa. Las oxigenasas de carotenoides discriminan el sustrato a nivel de entrada en la proteína por medio de constricciones en la abertura, la cual se sitúa adyacente al dominio de unión a membrana (Fig. I.14). La proximidad de ambos dominios facilita el acceso del sustrato desde la membrana (Kloer et al., 2005; Schezinger et al., 2006).

Presumiblemente, todos los miembros de esta familia conservan los aspectos básicos de esta estructura y poseen centros activos similares que llevan a cabo

reacciones con mecanismos parecidos. Las peculiaridades de la estructura de hojas β rodeando un eje central, denominada por los autores originales *propeller*, permiten identificar con facilidad la región de la proteína que rodea al centro activo en los distintos miembros de la familia (Kloer et al., 2005).

4. Opsinas

4.1. Tipos de opsinas

Además de las enzimas directamente involucradas en la biosíntesis de carotenoides, existen otras proteínas capaces de reconocer carotenoides y usarlos para su función. Entre ellas destacan las opsinas, un grupo de proteínas fotoquímicamente reactivas que usan retinal como cromóforo, y de las que se han descrito más de trescientas en organismos procariotas y eucariotas. Todas ellas tienen en común una estructura consistente en siete hélices α embebidas en membrana, formando un bolsillo en el que se une el retinal (Fig. I.15). Las comparaciones de sus secuencias permiten clasificarlas en dos grupos, denominados tipo 1 y tipo 2. El grado de similitud es elevado dentro de cada grupo y muy dispar entre los dos grupos, sugiriendo una vez más orígenes evolutivos distintos (Spudich et al., 2000).

Las primeras opsinas conocidas, las de tipo 1, se identificaron en arqueas, y se encontraron también posteriormente en bacterias y algas. Los ejemplos más representativos lo constituyen la bacteriorrodopsina (Fig. I.15) y la halorrodopsina, bombas de iones que utilizan la luz como fuente de energía (Spudich, 1998). A este grupo pertenecen también las rodopsinas sensoras I y II, que actúan como receptores fototácticos (Spudich et al., 1998). También se han identificado rodopsinas en hongos, pero solo recientemente comienza a dilucidarse la función de algunas de ellas (Waschuck et al., 2005).

Las opsinas de tipo 2 son básicamente los receptores fotosensibles de los ojos de los animales (Helmreich y Hofmann, 1996; Rao y Oprian, 1996; Sakmar, 1998; Tokunaga et al., 1999), y los receptores de la glándula pineal, hipotálamo y otros tejidos de vertebrados inferiores (Gärtner y Towner, 1995). También a este grupo pertenecen los retinocromos, opsinas oculares extrarretinales (localizadas en tejido ocular pero fuera de la retina) que actúan como fotoisomerasas de retinal (Pepe y Cugnoli, 1992). Otras opsinas de animales superiores están situadas fuera del ojo, como las pinopsinas de la glándula pineal, o la encefalopsina del cerebelo. Todas las opsinas de tipo 2 conocidas se encuentran en eucariotas superiores.

A pesar de las diferencias en secuencia entre las dos familias, su estructura presenta características similares, representando un ejemplo de convergencia estructural. Además de la arquitectura de siete hélices, los análisis espectroscópicos y químicos han mostrado en proteínas de ambos grupos que el retinal se une por medio de un enlace de base de Schiff a un residuo de lisina de la séptima hélice (Eyring y Mathies, 1979). Sin embargo los cambios que induce la luz en la estructura del cromóforo y la proteína son distintos en ambas familias (Spudich et al., 2000).

También existen coincidencias en las funciones de las proteínas de ambos grupos. Los pigmentos visuales y las pinopsinas de animales llevan a cabo señalización fotosensora por medio de interacciones proteína-proteína inducidas por la luz (Okano y Fukada 1997), tal como hacen las opsinas sensoras de arqueas, que interaccionan con proteínas transductoras de la

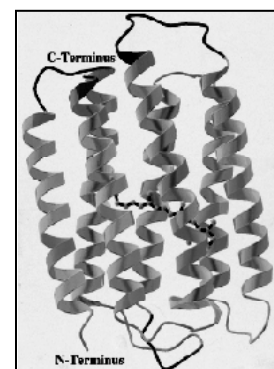


Fig. I.15. Representación de la bacteriorrodopsina de *H. salinarum*. Pueden observarse las siete hélices transmembrana y la molécula de retinal. Adaptado de Grigorieff et al. (1996)

fototaxis. Los retinocromos, homólogos a los pigmentos visuales, son isomerasas de retinal que usan la energía de la luz (Pepe y Cugnoli, 1992). Las opsinas acopladas a proteínas G pueden tener ambas funciones, isomerización y señalización. Por su parte, entre las opsinas de arqueas figuran opsinas sensoras y opsinas de transporte, que bombean iones a través de la membrana plasmática.

4.2. Cromóforo de las opsinas y su respuesta a la luz

El retinal, el cromóforo de las opsinas, fue aislado a partir de opsina bovina como una sustancia amarilla con un máximo de absorbanza de 385 nm (Wald, 1933). Pocos años después se identificó esta sustancia como aldehído de la vitamina A o retinal (Morton y Goodwin, 1944). Como ya se ha mencionado, el retinal se produce en animales por la rotura oxidativa de β -caroteno y otros carotenos, denominados por ese motivo provitamina A. Si bien es conocida la existencia de opsinas en otros grupos taxónomicos, no se sabe tanto acerca de la síntesis del cromóforo. Solo se ha publicado un trabajo sobre la producción de retinal en eucariotas inferiores (Ruch et al., 2005), y no existe información sobre la presencia o la síntesis de retinal en hongos. La existencia de opsinas fúngicas permite adelantar la existencia de la síntesis de retinal en estos microorganismos.

El primer evento en el proceso de fototransducción de las opsinas tras el estímulo de luz es la isomerización del cromóforo. En las opsinas de tipo 1 el

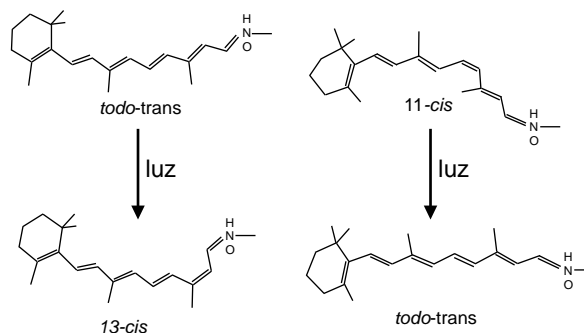


Fig. I.16. Fotoisomerización del retinal. Se muestran los cambios conformacionales que produce la luz en el retinal según esté unido a una opsina de tipo 1 (a la izquierda) o de tipo 2 (a la derecha). Adaptado de Spudich (2000).

retinal *todo-trans* se fotoisomeriza a *13-cis* retinal (Fig. I.16). En las opsinas de tipo 2 el retinal se encuentra en la oscuridad en su conformación *11-cis*, y la fotoisomerización lo convierte en *todo-trans* (Fig. I.16). Los retinocromos reciclan el retinal *todo-trans* a su forma *11-cis* para su reutilización (Hao y Fong, 1999).

4.3. Proteínas fúngicas de la familia de las opsinas

En los últimos años se han descubierto en hongos diversos genes que determinan proteínas del tipo de las opsinas (Saranak y Foster, 1997; Bieszke et al., 1999; Idnurm y Howlett, 2001). Se distribuyen en dos clases: un primer tipo lo forman proteínas de características similares a las opsinas de tipo 1, anteriormente descritas. Las funciones de estas opsinas, denominadas rodopsinas fúngicas por Brown (2004), se describen en el apartado siguiente.

Un segundo tipo lo forman proteínas cuyos genes responden a situaciones de estrés. Estas proteínas, denominadas por el mismo autor como proteínas relacionadas a opsinas (*Opsin-Related Proteins*), fueron inicialmente descubiertas en *S. cerevisiae* por su inducción en respuesta al choque térmico (Graul y Sadee, 1997). El ejemplo más representativo es HSP30 (Piper, 1995), para el cual existen genes homólogos en otros hongos. Se han encontrado indicios de un papel de esta proteína en la regulación de la ATPasa de H⁺ de membrana plasmática (Piper, 1997) y en el mantenimiento de la homeostasis de pH (Chattopadhyay et al., 2000).

Al segundo grupo pertenece también la proteína fdd123 de *C. versicolor*, cuyo gen es regulado por estrés químico (Iimura y Tatsumi, 1997). En algunos casos la expresión es controlada por la presencia de nutrientes, como es el caso de los genes de la HSP30 e YRO2 de *S. cerevisiae* (Crauwels et al., 1997) y ORP-1 de *N. crassa* (Nemcovic y Borkovich, 2003). En el caso de YRO2 se ha propuesto que podría actuar como una chaperona que obtiene energía por el paso de protones (Zhai et al., 2001). Por extensión, se considera la posibilidad de que todas las proteínas fúngicas de este tipo, emparentadas con las opsinas, cumplan funciones de chaperonas extracitoplasmáticas. No existen datos que indiquen un posible papel como fotoproteínas, y la comparación de sus secuencias con las de las opsinas capaces de ligar retinal muestra la carencia de aminoácidos críticos relacionados con las funciones dependientes de la luz, lo cual confirma su clasificación como un grupo aparte de las opsinas auténticas (Brown, 2004).

Al examinar los genomas fúngicos disponibles se observa que hay diferentes combinaciones en una misma especie de proteínas de uno y otro grupo (presuntas fotoproteínas y proteínas de estrés). Hay hongos con representantes de un grupo o de ambos, variando además el número de proteínas en cada caso. Brown (2004) propone varias explicaciones a la multiplicidad de proteínas de estas familias en un mismo organismo. Entre ellas figuran la diversificación de funciones, las diferencias en sensibilidad a la luz (Sineshchekov et al., 2002) o las redundancias funcionales por duplicaciones génicas recientes (Seoighe y Wolfe, 1999).

4.4. Opsinas fúngicas relacionadas con la luz

Como ya se ha indicado, las características de algunas de las opsinas fúngicas investigadas permiten atribuirles funciones relacionadas con la captación de luz a través del cromóforo retinal. La opsina investigada más en detalle en hongos es NOP-1, de *N. crassa*. La mutación dirigida del gen no mostró cambios fenotípicos externos relevantes, con la excepción de alteraciones morfológicas en la luz en presencia de oligomicina (Bieszke et al. 1999a). Subsiguientes trabajos con NOP-1 demostraron que une retinal todo-*trans*, formando una proteína fotoquímicamente activa (Bieszke et al., 1999b), con un fotociclo típico de una opsina sensora (Bergo et al., 2002). Investigaciones posteriores han demostrado la función de la opsina de otro hongo, *Laeptosphaeria maculans*, que de forma análoga a la bacteriorrodopsina, bombea protones utilizando luz como fuente de energía (Waschuck et al., 2005).

El análisis del genoma de *F. graminearum* revela la existencia de al menos tres genes de opsinas, dos de ellas supuestamente capaces de ligar retinal. La elevada proximidad filogenética con *F. fujikuroi* permite sospechar la existencia de genes similares en este hongo. Uno de ellos, *carO*, es objeto de estudio de esta Tesis (Resultados, Capítulo 2) y un segundo gen, supuestamente homólogo

de *nop-1*, está siendo actualmente analizado por A. F. Estrada en el mismo grupo de investigación. Algunos de los experimentos de esta Tesis están dedicados a completar investigaciones previas con el gen *carO*.

5. Genética de la carotenogénesis en hongos

5.1. Carotenogénesis en hongos mucorales

La síntesis de carotenoides es un carácter frecuente en el reino de los hongos. Como se ha explicado anteriormente (apartado 2.1), en algunos mucorales la ruta biosintética tiene como producto final el β -caroteno. En tres hongos de este grupo taxonómico, perteneciente a los zigomicetos, esta ruta ha sido objeto de especial atención: *P. blakesleeanus* (Ruiz-hidalgo et al., 1997; Arrach et al., 2001), *M. circinelloides* (Velayos et al., 2000a; 2000b; Velayos et al., 2003) y *B. trispora* (Rodríguez-Saiz et al., 2004; Mehta et al., 2003). En los tres casos los dos genes responsables de la ruta, *carRA* (*carRP* en *M. circinelloides*) y *carB*, se encuentran juntos en el genoma y se expresan de forma divergente posiblemente bajo el control de secuencias reguladoras comunes. El primero de ellos determina la proteína bifuncional que sintetiza el fitoeno y cicla el licopeno y el γ -caroteno. El segundo es responsable de la desaturasa, encargada de introducir cuatro dobles enlaces en el fitoeno hasta producir el licopeno, primer sustrato de la ciclasa.

La presencia de micelio del sexo opuesto estimula fuertemente la acumulación de β -caroteno en al menos dos mucorales, *B. trispora* y *P. Blakesleeanus* (Mehta y Cerdá-Olmedo, 1995; Govind y Cerdá-Olmedo, 1986). Este fenómeno es debido a la síntesis de unas hormonas, los ácidos trispóricos, que solo tiene lugar cuando ambos sexos están presentes. En este grupo de hongos, especialmente en *P. blakesleeanus*, se conocen numerosos compuestos químicos que estimulan la carotenogénesis, tales como la vitamina A (Eslava et al., 1974) o ciertos compuestos fenólicos (Cerdá-Olmedo y Hüttermann, 1986). En otros hongos, como los ascomicetos, no se conocen compuestos químicos que ejerzan un efecto estimulador similar.

La iluminación induce la síntesis de carotenoides en muchos hongos, fenómeno que ha sido objeto de detallada investigación en *P. blakesleeanus* (Jayaram et al., 1979; Bejarano et al., 1991). La síntesis es fotoinducible también en *M. circinelloides*, pero no en *B. trispora*, donde ejerce un efecto inhibitorio (Sutter, 1970). El análisis de la expresión de los genes a nivel molecular ha mostrado que la fotoinducción de la carotenogénesis es llevada a cabo a través de un aumento transitorio en los niveles de ARNm (Ruiz-Hidalgo et al., 1997; Velayos et al., 2000a; 2000b; Velayos et al., 2003). Este enfoque experimental ha mostrado también un efecto inductor de la luz en *B. trispora*, especialmente si el hongo se expone a la luz durante cortos periodos de tiempo (Quiles-Rosillo et al., 2005).

La comparación de los niveles de caroteno presentes en las estirpes silvestres y en mutantes bloqueados en la ruta revela la existencia en *P. blakesleeanus* de un sensible mecanismo de regulación por producto final (Cerdá-Olmedo, 1985). La pérdida de la actividad de cualquiera de las enzimas de la ruta da lugar a aumentos considerables en la cantidad de caroteno, lo cual delata la existencia de este tipo de mecanismo, conocido también como regulación *feed-back* o retroinhibición. Este fenómeno no se manifiesta en los otros mucorales investigados, indicando diferencias relevantes en sus mecanismos de regulación

que contrastan con la gran similitud de sus rutas biosintéticas y enzimas implicadas.

La regulación es particularmente compleja en *P. blakesleeanus*, como pone en evidencia la existencia de mutantes superproductores afectados en tres genes diferentes, *carS* (Murillo et al., 1976), *carD* (Salgado et al., 1989) y *carF* (Mehta et al., 1997). La existencia de estos mutantes revela funciones génicas asociadas a mecanismos de represión de la ruta. Al contrario que ocurre con la inducción por la luz, regulada por los genes *mad* (Idnurm et al., 2006) y la estimulación sexual, los incrementos en caroteno en estos mutantes no se ve acompañada por aumentos proporcionales en los niveles de ARNm de los genes *carRA* y *carB* (Almeida, 2006). También se obtienen mutantes desregulados en *B. trispora* (Mehta et al., 2003), aunque en este caso no alcanzan los niveles de producción de los mutantes de *P. blakesleeanus*.

La existencia de un método de transformación eficaz en *M. circinelloides* ha permitido identificar el primer gen cuya mutación da lugar a un fenotipo de superproducción de carotenoides en hongos (Navarro et al., 2000; 2001). Dicho gen, denominado *crgA*, determina una proteína de la familia *ring finger*. Por analogía con las funciones de otras proteínas de la misma familia, se ha propuesto que CrgA controla la ubiquitinación de otras proteínas, como pueden ser las enzimas de la carotenogénesis y, en consecuencia, su eliminación por el proteosoma. Se sospecha que algunos de los tres genes regulatorios identificados en *P. blakesleeanus* determina la proteína homóloga a CrgA.

5.2. Carotenogénesis en hongos ascomicetos y basidiomicetos

Los ejemplos conocidos de carotenogénesis en hongos no zigomicetos se alejan con frecuencia del modelo de ruta establecido por los estudios en mucorales. Salvo los ejemplos ya citados en el apartado 2.1 de *A. giganteus* o *C. nicotianae*, productores de β -caroteno, los ejemplos más representativos producen xantofilas. Entre ellos destacan el basidiomiceto *X. dendrorhous* y el ascomiceto *N. crassa*, que acumulan astaxantina y neurosporaxantina respectivamente. Todos los genes responsables de la producción de astaxantina en *X. dendrorhous*, *crtI*, *crtYB* (homólogos a *carRA* y *carB*) y *ast* (responsable de la conversión de β -caroteno en astaxantina) han sido clonados y caracterizados (Verdoes et al., 1999a; 1999b; Ojima et al., 2006), aunque su organización a nivel genómico no ha sido objeto de atención.

El caso de *N. crassa* es especialmente paradigmático, ya que se trata de un modelo genético extensamente estudiado (Davis, 2000). La intensa pigmentación anaranjada de los cultivos aéreos de este hongo, ricos en conidios, ha facilitado el aislamiento de mutantes albinos, carentes de carotenoides. Las facilidades que ofrece *N. crassa* para el análisis genético explica que los primeros genes de la carotenogénesis identificados en hongos fueran de este organismo. Se trata de los genes *al-1* (de la desaturasa, Schmidhauser et al., 1990), *al-2* (de la sintetasa de fitoeno / ciclasa de caroteno, Schmidhauser et al., 1994; Arrach et al. 2002), y *al-3* (de la sintetasa de GGPP, Sandmann et al., 1993), ubicados en diferentes lugares del genoma de este hongo.

La luz ejerce especial influencia en muchos aspectos de la biología de *N. crassa*, incluyendo la carotenogénesis (Harding y Turner, 1981). En la oscuridad, sus hifas vegetativas carecen de carotenoides, pero su síntesis se estimula en las células que forman los conidios (Baima et al., 1992). Los genes *al-1*, *al-2* y *al-3*, son regulados de forma independiente por factores de transcripción

responsables de la detección de la luz y del control del desarrollo (Li y Schmidhauser, 1995; Li et al., 1997). Los conidios son siempre pigmentados, aunque tanto la cantidad de conidios como la cantidad de pigmento que contienen son mayores en la luz. La fotoinducción de la carotenogénesis ha sido también objeto de atención en otros ascomicetos, como *Fusarium aquaeductuum* (Rau y Rau-Hund, 1977) o *Aspergillus giganteus* (El-Jack et al., 1988). La luz, sin embargo, no induce la síntesis de astaxantina en *X. dendrorhous* (An y Johnson, 1990).

En estos hongos se han demostrado conexiones regulatorias entre la carotenogénesis y el estrés oxidativo. El oxígeno en estado singlete estimula la síntesis de carotenoides en la oscuridad en *X. dendrorhous* (Schroeder y Johnson, 1995). Los mutantes en los genes *sod-1* (Yoshida y Hasunuma, 2004) o *cat-3* (Michan et al., 2003) de *N. crassa*, involucrados en la defensa frente al estrés oxidativo, acumulan más carotenoides en la luz que la estirpe silvestre. En *F. aquaeductuum*, un hongo próximo a *F. fujikuroi*, la carotenogénesis es estimulada por para-hidroximercuribenzoato en la oscuridad (Rau et al., 1967) y por azul de metileno o azul de toluidina en presencia de luz roja (Lang-Feulner y Rau, 1975).

5.3. Síntesis de carotenoides en *F. fujikuroi*

Aunque difiere en algunos detalles, la ruta biosintética de carotenoides de *F. fujikuroi* es similar a la de *N. crassa*, con la acumulación de neurosporaxantina como producto mayoritario (Avalos y Cerdá-Olmedo, 1986). Como en *N. crassa*, su síntesis requiere al menos cuatro reacciones enzimáticas: la condensación de dos moléculas de GGPP para producir fitoeno, cinco reacciones de desaturación, una ciclación y una rotura oxidativa para producir el apo-carotenoide final, de 35 átomos de carbono (Fig. I.17).

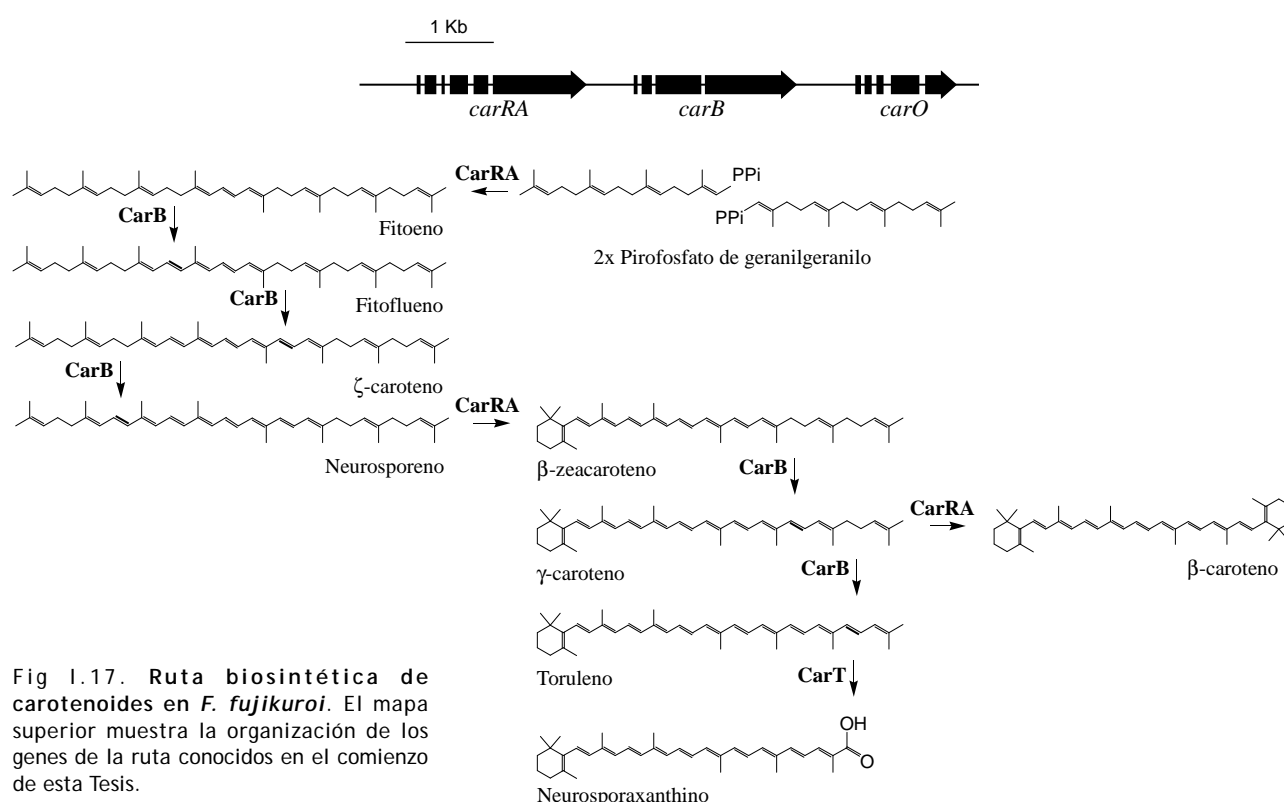
La síntesis de fitoeno es catalizada por el producto del gen *carRA* y las cinco desaturaciones por la desaturasa determinada por el gen *carB* (Linnemannstöns et al., 2002). Este gen, identificado gracias a su parecido con el gen homólogo de *N. crassa*, se clonó con el objetivo de ser utilizado como marcador en el desarrollo de un método de mutagénesis dirigida (Fernández-Martín et al., 2000). Estos mismos experimentos permitieron confirmar su función, ya que los mutantes del gen acumulan fitoeno. Aunque no existe evidencia bioquímica directa, las cinco desaturaciones son probablemente mediadas por la misma enzima, como parece indicar la inexistencia de mutantes bloqueados en pasos intermedios de desaturación. En *N. crassa* se ha obtenido evidencia bioquímica de su participación en las cinco reacciones mediante el análisis de su actividad en *E. coli* (Hausmann y Sandmann, 2000).

Por similitud con proteínas fúngicas homólogas investigadas en más detalle (Verdoes et al., 1999a; Velayos et al., 2000; Arrach et al., 2001; Arrach et al., 2001), se asume que el gen *carRA* es también responsable del paso de ciclación, que sumado a las cinco desaturaciones da como resultado el toruleno, un caroteno de color rojo. Este compuesto es el sustrato de al menos una reacción química adicional de rotura oxidativa para generar la neurosporaxantina. La enzima (o enzimas) responsable de esta conversión no ha sido identificada aún en ningún hongo, aunque sí se han descrito mutantes de *F. fujikuroi* supuestamente carentes de dicha reacción, ya que acumulan toruleno como producto mayoritario (Avalos y Cerdá-Olmedo, 1987).

La ruta incluye una bifurcación, ya que la ciclasa es capaz de ciclar el otro

extremo del precursor del toruleno, el γ -caroteno, para producir β -caroteno (Fig. I.17). Este compuesto es un producto minoritario en comparación con la neurosporaxantina, lo que demuestra que el γ -caroteno es más eficazmente metabolizado por la desaturasa que por la ciclasa, desviando en esa dirección de la ruta la mayor parte del sustrato. La presencia de opsinas supuestamente capaces de ligar retinal en *Fusarium* (Resultados, Capítulo 2) sugiere que el β -caroteno es el precursor de este apocarotenoido.

Los genes *carRA* y *carB* se encuentran contiguos en el genoma (Fig. CI.17) (Linnemannstöns et al., 2002), junto con el gen de la opsina *carO* (Prado et al., 2004). En esta Tesis se ha identificado un cuarto gen adyacente a los tres ya mencionados, asociado también al metabolismo de los carotenoides.



5.4. Regulación de la carotenogénesis en *F. fujikuroi*

Como en otros hongos, la biosíntesis de neurosporaxantina en *F. fujikuroi* es inducida por luz (Avalos y Cerdá-Olmedo, 1987; Avalos y Schrott, 1990). Esta regulación tiene lugar a nivel de ARNm, tal como se deduce de la casi inexistencia de ARNm de *carRA* y *carB* en oscuridad y su rápido incremento tras exponer el hongo a la luz, alcanzando su máximo aproximadamente después de una hora (Prado et al., 2004; Thewes et al., 2005). Aunque existe la posibilidad de que la regulación se lleve a cabo a nivel de estabilidad de ARNm, la información disponible en *N. crassa* y la proximidad filogenética con este organismo sugiere que la regulación tiene lugar a nivel de su síntesis, probablemente mediado por proteínas similares a las WC de este hongo (Talora

et al., 1999). Este sistema de regulación está siendo objeto de atención detallada en el mismo grupo de investigación.

En *F. fujikuroi* se aíslan con facilidad mutantes superproductores de carotenoides, los cuales acumulan elevadas cantidades de pigmento independientemente de la presencia de luz (Avalos y Cerdá-Olmedo, 1987). Este incremento en la producción se corresponde con un alto nivel de ARNm de los genes *carRA* y *carB* (Prado et al., 2004; Thewes et al., 2005) y con una mayor actividad enzimática de sus productos (Avalos et al., 1988). Se desconoce el gen o genes responsables de este fenotipo, que se ha denominado *carS*.

Los mutantes *carB* nulos, carentes totalmente de actividad desaturasa, acumulan cinco veces más carotenoides que la estirpe parental (Fernández-Martín et al., 2000). Este dato sugiere la existencia de un mecanismo de retroinhibición por un producto posterior de la ruta. En apoyo a esta hipótesis, mutantes en los genes *carB* o *carRA* obtenidos por reemplazamiento génico en un mutante *carS* muestran un sensible incremento en los niveles de ARNm de sus genes (Linnemannstöns et al., 2002).

OBJETIVOS DE LA TESIS

Por su versatilidad metabólica, facilidad de cultivo y manipulación en el laboratorio, los hongos filamentosos han constituido una potente herramienta en la investigación de los genes y las enzimas responsables de la síntesis de carotenoides (Avalos y Cerdá-Olmedo, 2004). En los últimos 20 años *F. fujikuroi* se ha reafirmado como un modelo en este campo. A ello ha contribuido la coexistencia en el mismo organismo de otra ruta biosintética de terpenoides de interés aplicado, como son las giberelinas, y la posesión de una ruta biosintética de carotenoides peculiar, cuyos últimos pasos no han sido investigados aún en ningún organismo. La información disponible sobre los genes de la carotenogénesis de *F. fujikuroi*, sus funciones y su regulación, tanto a nivel genético como bioquímico, es sin embargo aún muy limitada. El objetivo de esta Tesis es ahondar en el conocimiento de esta ruta, prestando especial atención a la identificación de nuevos genes involucrados cuya existencia es predecible por la información disponible. Para ello se han planteado dos objetivos generales:

1. Caracterizar el agrupamiento génico de la carotenogénesis de *F. fujikuroi*. Se pretende investigar nuevos aspectos de la función y regulación de los genes ya conocidos, y explorar la existencia de nuevos genes del agrupamiento mediante el análisis de genes adyacentes y su posible relación con la carotenogénesis.

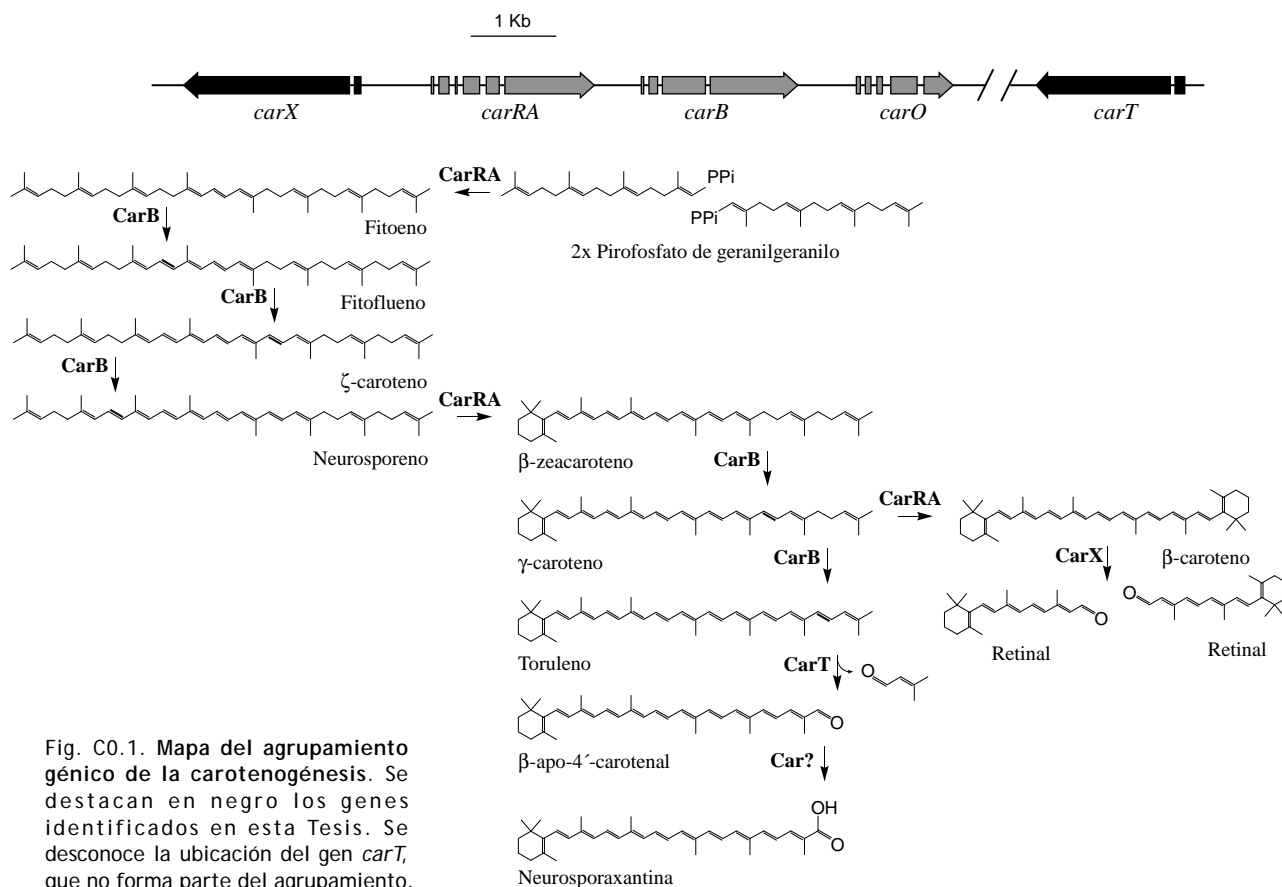
2. Identificar nuevos genes asociados a la carotenogénesis de *F. fujikuroi*. Se pretenden identificar el gen *carT*, cuya existencia fue puesta en evidencia por mutación, y un supuesto gen para producción de retinal, cuya existencia cabe predecir de la presencia de genes de opsinas potencialmente capaces de emplear este cromóforo. En ambos casos se espera que las enzimas responsables sean capaces de llevar a cabo reacciones de rotura oxidativa de distintos sustratos de la ruta.

Resultados

RESUMEN

Los resultados descritos en esta Tesis han profundizado en el conocimiento de los genes y enzimas de la síntesis de carotenoides y han identificado dos nuevos genes de su metabolismo. En la Fig. C0.1 se muestra el mapa del agrupamiento génico de la carotenogénesis antes y después de las aportaciones descritas en este trabajo.

Esta Tesis ha contribuido al esclarecimiento del papel de la desaturasa determinada por el gen *carB*, en especial a su papel como enzima responsable también de la quinta desaturación (Capítulo 1), y al conocimiento de la secuencia y regulación del gen *carO* (Capítulo 2). La existencia de ambos genes se conocía anteriormente. El agrupamiento génico se ha extendido a un cuarto gen, denominado *carX* (Capítulo 3), el cual se ha demostrado que es responsable de la síntesis de retinal (Capítulo 4), supuesto cromóforo de la proteína determinada por el gen *carO*. Finalmente, las herramientas de análisis de secuencias han permitido identificar un gen de la misma familia de *carX*, alejado de los otros genes *car*, que se ha identificado como *carT* (Capítulo 5). El análisis bioquímico de la enzima determinada por este gen ha permitido demostrar que su función es la catálisis del corte oxidativo del toruleno, paso crítico en la síntesis de neurosporaxantina. El producto de la reacción sugiere la existencia de una nueva enzima necesaria para generar el extremo carboxilo de esta xantofila.



Capítulo 1.

Caracterización de un mutante *carB* superproductor de γ -caroteno y β -caroteno

La primera estrategia experimental abordada en esta Tesis fue la obtención de mutantes de la carotenogénesis en el fondo genético FKMC1995, que como se indica en la Introducción (apartado 1.3), presenta ventajas metodológicas sobre la estirpe silvestre IMI58289.

Por la experiencia previa con esta última estirpe, las alteraciones de color son más visibles en un fondo superproductor de carotenoides. Por tanto, el primer paso fue la obtención de mutantes superproductores a partir de la estirpe FKMC1995. Se eligió como estirpe patrón el mutante SF4, cuyas características fenotípicas son muy similares a las del mutante *carS* SG22, anteriormente descrito (Avalos y Cerdá-Olmedo, 1987). La mutagénesis de SF4 permitió identificar distintos mutantes con la coloración alterada, entre los cuales llamó especialmente la atención una estirpe con una intensa pigmentación amarilla, que se denominó SF21 (Fig. C1.1). De acuerdo con la información disponible sobre la carotenogénesis de *F. fujikuroi*, no se espera ningún fenotipo de ese color por pérdida de función de cualquiera de los genes de la ruta. Por ese motivo, se decidió investigar el mutante más en detalle.

1.1. Fenotipo del mutante SF21

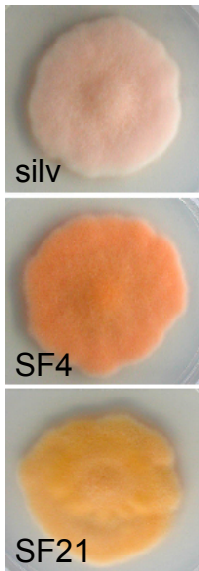


Fig. C1.1. Aspecto de las colonias de la estirpe silvestre FKMC1995 (silv), y los mutantes SF4 y SF21. Las estirpes se cultivaron en la luz a 22°C en medio mínimo con asparagina como fuente de nitrógeno.

Se analizaron los carotenoides acumulados por el mutante SF21 y su estirpe parental SF4 mediante HPLC (Fig. C1.2), así como espectrofotometría y cromatografía en capa fina (Fig. C1.3 y C1.4). Los análisis mostraron que SF21 acumula mayores cantidades de carotenoides que SF4, siendo en su gran mayoría neutros en el primero frente a una composición mayoritaria en carotenoides polares en el segundo. Las concentraciones totales fueron sensiblemente mayores en la luz que en la oscuridad en el mutante SF4, mientras que no hubo diferencias significativas en el caso de SF21. Este fenotipo fotosensible de SF4 contrasta con el de otros mutantes superproductores de carotenoides de *F. fujikuroi* obtenidos a partir de la estirpe IMI58289, cuyas concentraciones de carotenoides no se ven influenciadas por la luz (Avalos y Cerdá-Olmedo, 1987).

Los análisis por HPLC de los carotenoides acumulados por ambos mutantes mostraron una elevada cantidad de γ -caroteno y β -caroteno en SF21 en comparación con SF4, donde apenas se detectaron estos compuestos (Fig. C1.2). En su lugar, SF4 acumuló cantidades menores de toruleno y altas concentraciones de neurosporaxantina, que no aparece en el cromatograma. El nivel de γ -caroteno de SF21 fue unas 400 veces mayor que el de SF4, y el de β -caroteno aproximadamente 800 veces (Fig. C1.2). La concentración de fitoeno en SF21 es unas 50 veces mayor que en SF4.

Uno de los picos del cromatograma de SF21 (pico a, Fig. C1.2A) corresponde a un carotenoide ausente en la estirpe SF4, cuyo espectro no nos permite su identificación. Su absorción máxima se produce a 446 nm, y la forma de su espectro sugiere la presencia de al menos un anillo de β -ionona en su estructura.

En el cromatograma de SF21 no se detectó toruleno, que es el carotenoide neutro mayoritario en el mutante SF4. Las condiciones de separación empleadas están optimizadas para la separación de carotenos no polares; a fin de determinar la presencia de neurosporaxantina en el mutante SF21 decidimos

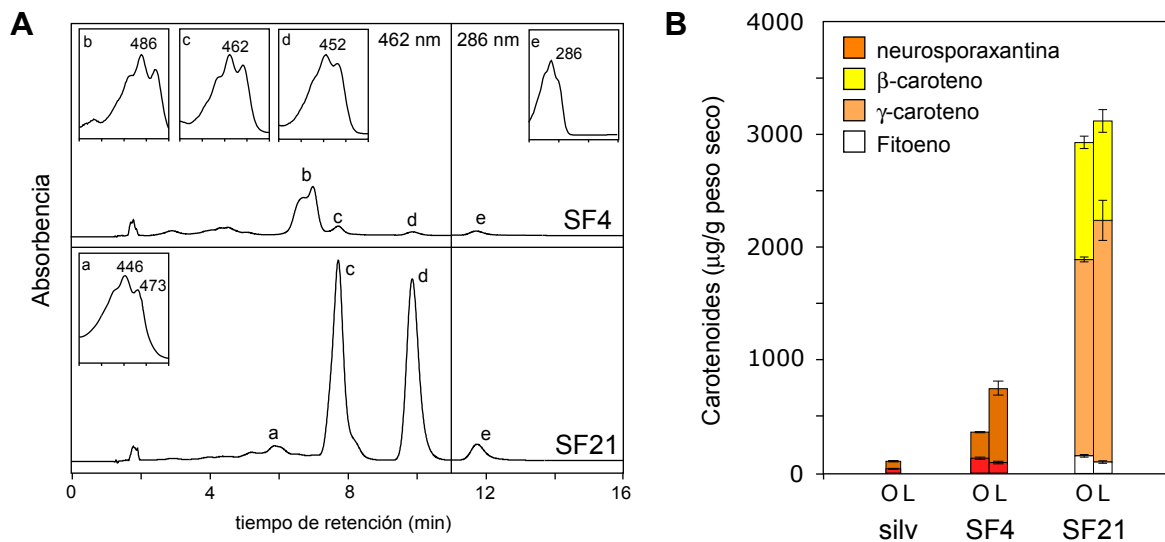
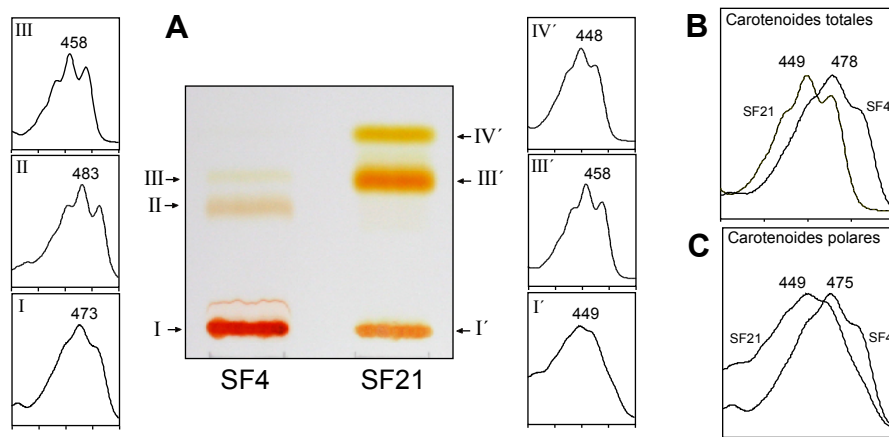


Fig. C1.2. Análisis de los carotenoides acumulados por SF4 y SF21. A. Análisis mediante HPLC de los carotenos neutros acumulados por ambas estirpes cultivadas 9 días en oscuridad en medio DG con asparagina. Se muestra el cromatograma a 462 y 286 nm. Se muestra el espectro de absorción de los carotenos coloreados (350-550 nm) y del fitoeno (250-400 nm), así como su longitud de onda de absorción máxima. B. Carotenoides acumulados por la estirpe silvestre FKMC1995 (silv) y los mutantes SF4 y SF21 en luz (L) y oscuridad (O). Los datos mostrados combinan resultados de análisis por HPLC y espectrofotometría de muestras neutras y polares.

aprovechar su polaridad para separarla de los carotenos no polares en cromatografía en capa fina. En las condiciones empleadas en la separación cromatográfica mostrada en la Fig. C1.3, se pudo apreciar que la gran mayoría de los carotenoides acumulados por el mutante SF4 quedan retenidos en el origen de la capa fina. El espectro de los carotenoides eluidos de esta



banda, intensamente pigmentada, coincidieron con el de la neurosporaxantina, con una absorción máxima a 473 nm (espectro I, Fig. C1.3). En el mismo carril, se apreciaron más arriba una tenue banda correspondiente a toruleno (II) y una tercera banda aún más tenue, reconocible como γ -caroteno (III). Los resultados fueron muy diferentes en el caso de SF21, que mostró dos bandas de carotenos no polares, correspondientes a γ -caroteno (III') y β -caroteno (IV'), y una banda de carotenoides polares retenidos en el origen (I'), en cantidad mucho menor que la presente en el mutante SF4. El espectro de esta banda difiere del de la neurosporaxantina, tanto en su forma como en su longitud de onda de máxima absorción (Fig. C1.3C). Hemos calculado que los carotenoides presentes en esta banda no supera el 7% del total de carotenoides acumulados por la estirpe SF21. Esta estima se ha hecho atribuyendo a esta fracción el coeficiente de extinción de la neurosporaxantina, aunque desconocemos la naturaleza química de los carotenoides que la forman. Estos resultados nos permiten afirmar, sin embargo, que la síntesis de neurosporaxantina por el mutante SF21 es muy reducida o inexistente.

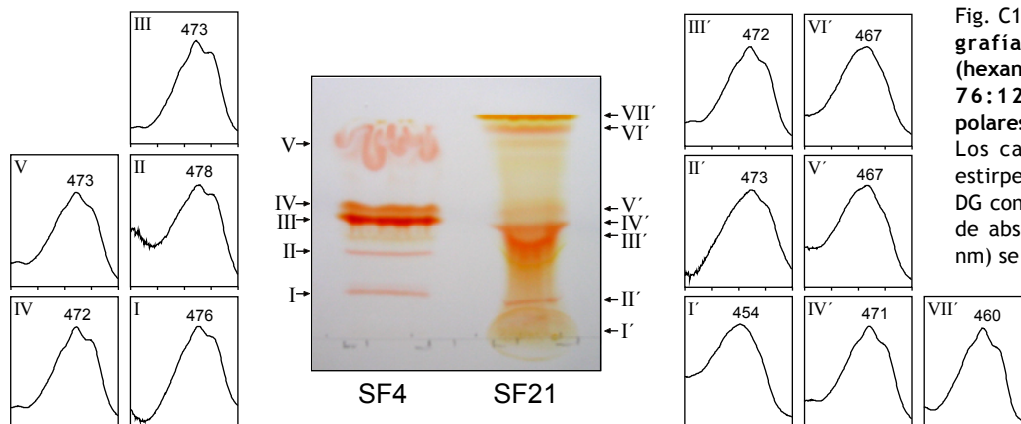


Fig. C1.4. A. Separación por cromatografía en capa fina de silica gel (hexano:acetato de etilo:isopropanol 76:12:12) de los carotenoides polares acumulados por SF4 y SF21. Los carotenoides provienen de las estirpes cultivadas durante 9 días en DG con asparagina en luz. El espectro de absorción de cada banda (350-550 nm) se indica con números romanos.

A fin de obtener más información sobre los carotenoides polares presentes en SF21, las muestras se analizaron en otra capa fina en condiciones que permiten su separación (Fig. C1.4). El resultado muestra que la fracción de carotenoides polares de esta estirpe tiene componentes distintos a la de SF4, diferenciándose no solo en el número de bandas sino también en su posición y su color. Los carotenoides polares presentes en SF4 se separaron en 2 bandas principales y tres bandas secundarias, con espectros y longitudes de onda de máxima absorción semejantes a los de la neurosporaxantina. La presencia de estas presuntas variantes del producto final puede deberse a modificaciones químicas de su grupo carboxilo, tales como reacciones de esterificación (Sakaki et al., 2002). En el caso de SF21, las bandas centrales se resolvieron peor en la separación cromatográfica, posiblemente porque la muestra se concentró para equiparar la cantidad de carotenoides polares con la del mutante SF4. A pesar de ello se distinguen al menos 7 bandas, lo que implica la presencia de otros tantos carotenoides polares en este mutante. Tres de las bandas (II', III' y IV', Fig. C1.4) muestran un espectro y una longitud de onda de máxima absorción semejante a los mostrados por las bandas de SF4. La elución y cuantificación de estas bandas con el coeficiente de extinción de la neurosporaxantina indicó que aproximadamente el 1% del total de carotenoides acumulados por SF21 corresponde a esta xantofila o a derivados de ella.

El extracto de carotenoides polares de SF21 mostró otras bandas de interés. Entre ellas destaca la banda VII', que muestra un espectro semejante al del γ -caroteno. El resto de las bandas presenta un espectro menos definido, en todos los casos con una longitud de onda de máxima absorción inferior al de la neurosporaxantina.

La acumulación de γ -caroteno y β -caroteno y la casi inexistencia de neurosporaxantina en SF21 sugieren que este mutante está afectado en el paso de desaturación que convierte el γ -caroteno en toruleno. Esta desaturación, como las cuatro anteriores de la ruta, se atribuyen a la desaturasa de fitoeno determinada por el gen *carB*. De ser cierta esta hipótesis, la mutación habría afectado la capacidad de la desaturasa para reconocer el γ -caroteno pero no a los sustratos precedentes.

1.2. El alelo *carB* de SF21 está mutado

Para investigar la posible relación del fenotipo amarillo con el gen *carB*, se determinó la secuencia del alelo correspondiente en SF21. La comparación con la secuencia silvestre reveló una sola diferencia, consistente en una transición C608->T, que da lugar a un cambio Pro173->Ser. Este alelo se denominó *carB36*.

Con el objetivo de analizar la relación de la mutación *carB36*, así como la de otras mutaciones conocidas en el gen homólogo de *P. blakesleeanus* (Sanz et al., 2002), con la estructura de la proteína se realizaron predicciones de la estructura secundaria de la desaturasa de *F. fujikuroi* y de otros hongos con el programa 3D-PSSM (Kelley et al., 2000) (Fig. C1.5). La mutación *carB36* está localizada lejos de la región afectada en el gen *carB* en los mutantes albinos de *P. blakesleeanus*, que corresponde al dominio de unión de caroteno (Armstrong et al., 1989). A su vez la mutación está próxima al dominio de unión de dinucleótido, la segunda región característica de estas enzimas (Armstrong et al., 1990; Bartley et al., 1990). En el apartado 1.9 se analizan en más detalle las estructuras predichas para estas y otras proteínas afines.

Los alelos *carB* de las estirpes IMI58289 y FKMC1995 solo se diferencian en xx

una base (C196 frente a T196, respectivamente), pero este cambio no altera la secuencia polipeptídica. La desaturasa de *F. fujikuroi* muestra un 80% de identidad con la de *F. graminearum* (código de acceso XP_383241.1). Cuando la comparación se lleva a cabo con las desaturasas de otros hongos, como el ascomiceto *N. crassa*, el badisiomiceto *X. dendrorhous* o el zigomiceto *P. blakesleeanus* (Fig. C1.5), los porcentajes de identidad bajan a 58%, 47% y 48%, respectivamente.

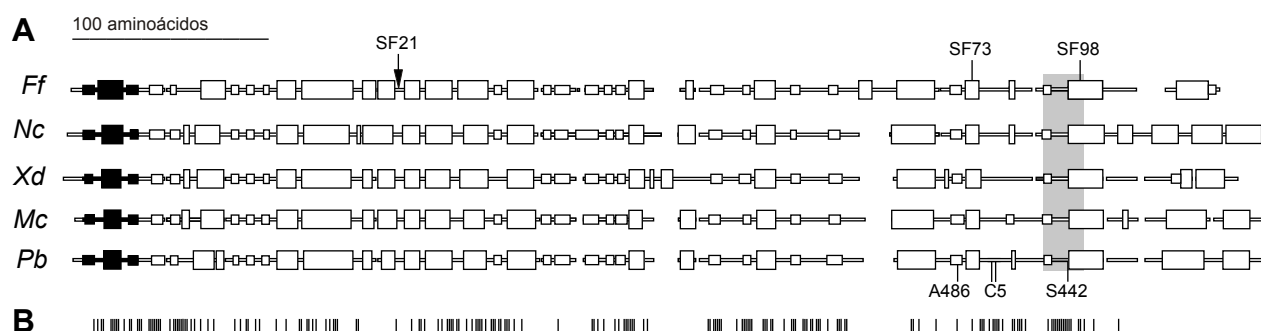


Fig. C1.5. Alineamiento y predicción de estructura secundaria de la desaturasa de carotenoides de varios hongos y localización de mutaciones estudiadas. A. Alineamiento de las estructuras de las desaturasas CarB de *F. fujikuroi* (Ff, código de acceso CAD19989.2), Al-1 de *N. crassa* (Nc, XP964713.1), CrtI de *X. dendrorhous* (Xd, AAO53257.1), CarB de *M. circinelloides* (Mc, CAB40843.1) y CarB de *P. blakesleeanus* (Pb, CAA55197.1) deducidas con el programa 3D-PSSM. Los rectángulos grandes representan hélices α , y los rectángulos pequeños representan láminas β . Los rectángulos negros indican el dominio de unión de dinucleótido, y la zona sombreada indica el dominio previamente descrito como de unión de caroteno. Las mutaciones son las siguientes: SF21 Pro173->Ser; SF73 Trp449->Stop; SF98 Gly504->Asp (descritas en esta Tesis) y A486 Glu426->Lys; C5 Ser444->Phe; Leu446->Phe; S442 Glu482->Lys, descritas por Sanz et al., (2002). B. Posiciones donde se encuentran aminoácidos idénticos en las cinco secuencias (indicadas por barras verticales).

1.3. Reemplazamiento de un alelo *carB* silvestre por el alelo *carB36*

Los resultados mostrados sugieren que el fenotipo amarillo del mutante SF21 es debido a la mutación Pro173->Ser, descrita en el apartado anterior. Sin embargo, puesto que SF21 se obtuvo por mutagénesis, existe la posibilidad de que la mutación observada en *carB* sea accidental y que el fenotipo se deba realmente a una mutación en un segundo gen. Para descartar esta posibilidad, y para averiguar el fenotipo que tendría la mutación en un fondo genético silvestre, se decidió hacer un experimento de reemplazamiento alélico mediante el método en dos pasos descrito por Fernández-Martín et al., (2000), esquematizado en la Fig. C1.6. Para ello se construyó el plásmido pB21H, que contiene el alelo *carB* del mutante SF21 y un gen de resistencia a higromicina, y se empleó para transformar protoplastos de la estirpe SF1 (estirpe silvestre con una mutación espontánea en el gen de la reductasa de nitrato, *niaD*). Se obtuvieron 10 transformantes, de los cuales 5 integraron una única copia del plásmido por recombinación homóloga (Fig. C1.6C).

1.4. Búsqueda de mutantes *carB36* en el fondo genético silvestre

Se escogió uno de los transformantes (T5) para buscar estirpes derivadas de éste que posean el gen *carB* con la mutación y carezcan de la copia silvestre (Fig. C1.6B). Además del proceso representado en la Figura, resultados anteriores indican que se pueden producir mutantes con el alelo *carB36* por conversión génica del alelo silvestre (Fernández-Martín et al., 2000). En ese caso, el plásmido puede ser conservado por el mutante, que seguiría siendo por tanto resistente a higromicina y poseería dos copias mutadas del gen *carB*.

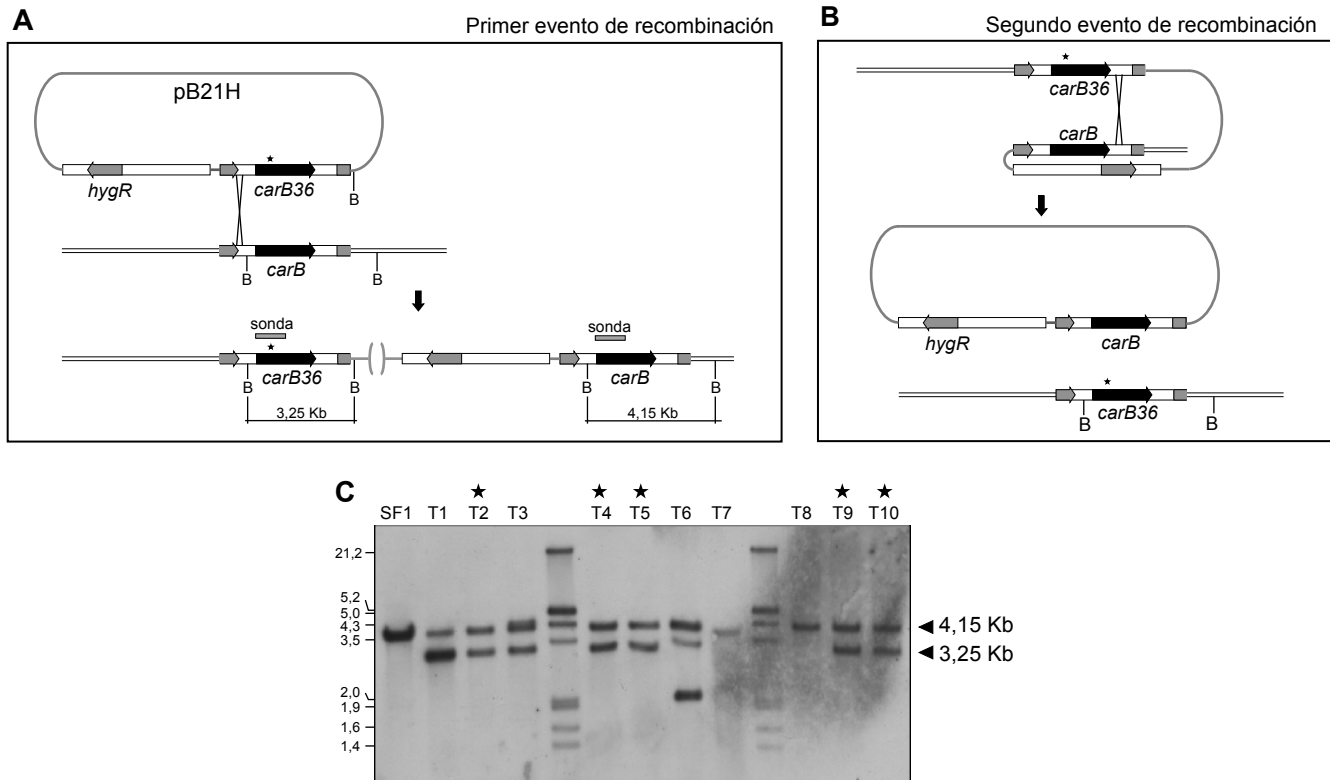


Fig. C1.6. Reemplazamiento alélico en dos pasos del gen *carB*. A. Integración del plásmido pB21H por recombinación homóloga en la estirpe SF1. B. Salto del plásmido por un segundo evento de recombinación homóloga entre las secuencias duplicadas. Se muestra el resultado de la recombinación por el lado contrario respecto a la mutación, de forma que el plásmido pB21H liberado contiene la copia silvestre del gen *carB*. La estirpe resultante contiene el alelo *carB36* y carece del gen de resistencia a higromicina. C. Southern blot de diez transformantes. Las muestras de ADN se digirieron con la enzima *Bam*HI, cuyas dianas relevantes se indican con la letra B en los esquemas superiores. Se empleó como sonda el segmento del gen *carB* indicado en el panel A. La recombinación homóloga simple debe dar dos bandas (3,25 y 4,15 kb). Se indican con estrellas los transformantes con el patrón esperado.

En un primer intento, se buscaron colonias amarillas entre miles de colonias obtenidas en agar a partir de conidios del transformante original. El escrutinio no permitió identificar ningún mutante con este fenotipo. Ante este resultado, se consideró la posibilidad de que la palidez de la pigmentación en la luz de la estirpe usada dificultara la detección del cambio de color. Por ello, en un segundo intento se buscaron estirpes sensibles a higromicina entre las colonias formadas. Se aprovechó que la mutación *carB36* produce la pérdida de una diana de restricción de la enzima *FokI* (Fig. C1.7) para escrutar a nivel molecular la presencia de la mutación en las estirpes sensibles a higromicina obtenidas. Se obtuvieron conidios del transformante incubado en diferentes condiciones de cultivo (medio sólido con distintas fuentes de nitrógeno, en luz o en oscuridad) y se sembraron en medio selectivo. El porcentaje de colonias sensibles a higromicina fue muy variable en función del lote de conidios, oscilando entre 0% y 40%. Se aisló ADN de 94 colonias sensibles, se obtuvo de ellas el fragmento relevante del gen *carB* por PCR y se digirió con *FokI*. Ninguna de las estirpes presentó el alelo mutante (Fig. C1.8). Este

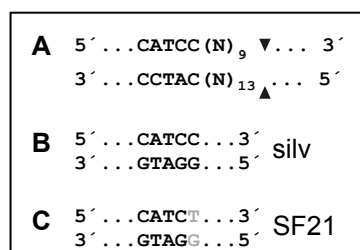


Fig. C1.7. A. Diana de restricción de la enzima *FokI*. B. Diana presente en el alelo *carB* silvestre (silv). C. Pérdida de la diana *FokI* en el alelo *carB36*.

resultado sugiere que en todas las estirpes sensibles a higromicina analizadas el plásmido saltó por recombinación por la misma región por donde se produjo la integración original. Este resultado sugiere la existencia de un punto caliente de recombinación en esa región del ADN.

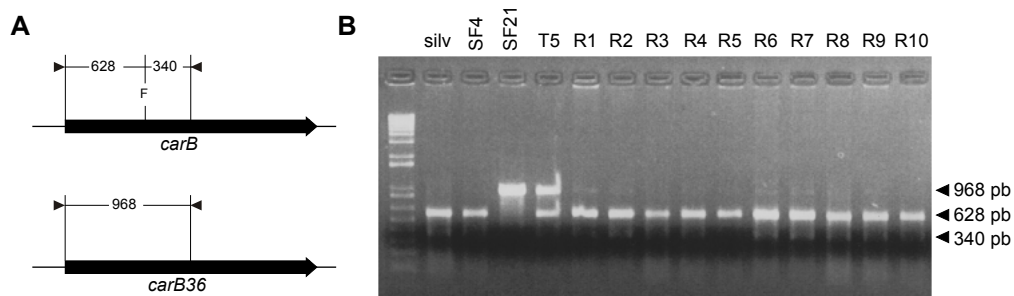


Fig. C1.8. Identificación mediante análisis de restricción con *FokI* del alelo *carB* presente en estirpes sensibles a higromicina derivadas de T5. A. Esquema de las bandas resultantes del producto de PCR digerido con *FokI*. La banda de 968 pb indica la presencia del alelo *carB36*. La banda de 628 pb indica la presencia del alelo *carB* silvestre. La existencia de ambas bandas delata la coexistencia de ambos alelos. B. Electroforesis en agarosa del producto de PCR digerido con *FokI* de 10 revertientes (R1-R10) y de las estirpes control: FKMC1995 (silv), SF4, SF21 y el transformante T5.

1.5. Generación de mutantes *carB36* en un fondo superproductor de carotenoides

Debido a que el mutante SF21 se obtuvo en un fondo superproductor de carotenoides, decidimos cambiar la estrategia para identificar la mutación por reemplazamiento génico. Asumimos que si el mutante *carB36* se generara con una frecuencia extremadamente baja, se podría identificar entre un número muy elevado de colonias en un fondo de alta concentración de carotenoides. Por ello, obtuvimos un mutante superproductor de carotenoides a partir del transformante T5 por tratamiento con N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina. La estirpe obtenida se designó SF191.

El proceso realizado con el transformante T5 se repitió con la estirpe SF191. Se obtuvo un elevado número de conidios a partir de esta estirpe incubada en diferentes condiciones de cultivo y se sembraron en medio mínimo en la oscuridad. Como resultado se identificaron dos colonias de color amarillo entre aproximadamente 8.500 colonias de color naranja escrutadas. Estas dos estirpes, que denominamos SF214 y SF215, fueron sensibles a higromicina y el análisis con la enzima de restricción *FokI* mostró que solo poseen el alelo mutante *carB36* (Fig. C1.9).

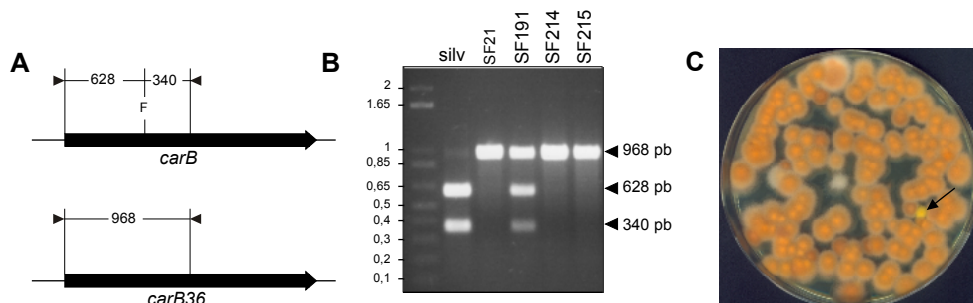


Fig. C1.9. Ausencia del alelo *carB* silvestre en las estirpes SF214 y SF215. A. Esquema de las bandas resultantes del producto de PCR digerido con *FokI*. B. Electroforesis del producto de PCR de SF214 y SF215, y de las estirpes control FKMC1995 (silv), SF4, y el transformante T5 digeridos con *FokI*. C. Caja de Petri con colonias derivadas de conidios de SF191 donde apareció el mutante SF214 (flecha).

1.6. Fenotipo de los mutantes *carB36* obtenidos por reemplazamiento alélico

El análisis de carotenoides de los mutantes SF214 y SF215 mostró que producen cuantitativa y cualitativamente los mismos carotenoides que SF21 (Fig. C1.10), con un predominio de β -caroteno y γ -caroteno, responsables de su color amarillo. Estos resultados demuestran que la mutación Ser173->Pro presente en el alelo *carB36* es la causante del fenotipo de la estirpe SF21.

Las tres estirpes presentan cantidades similares de carotenoides en la luz y en la oscuridad, mayores que las mostradas por las estirpes superproductoras de carotenoides como SF4, a partir de la cual se obtuvo SF21.

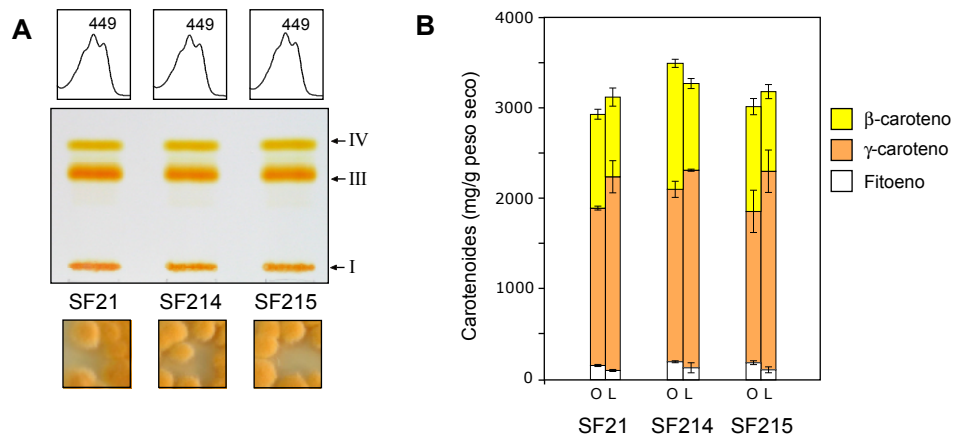


Fig. C1.10. Producción de carotenoides de la estirpe SF21 y de los mutantes SF214 y SF215. A. Separación por cromatografía en capa fina de silicagel (tolueno:éter de petróleo 5:95) de los carotenoides producidos por las estirpes SF21, SF214 y SF215. Las estirpes se cultivaron durante 9 días en DG con asparragina en la luz. Se muestra encima el espectro de absorción del extracto total de carotenoides (350-550 nm) de cada estirpe. Los números romanos identifican los diferentes carotenoides en los que se fraccionan los extractos (I, carotenoides polares; III, γ -caroteno y IV, β -caroteno; ver Fig. C1.3). B. Carotenoides acumulados en oscuridad (O) y luz (L) por las estirpes SF21, SF214 y SF215. Se representa la media y la desviación típica de al menos dos medidas.

1.7. Mutantes derivados de SF21

Las especiales características del mutante SF21 pueden facilitar la identificación de nuevas mutaciones cuyo fenotipo no sería fácilmente reconocible en el fondo pigmentado de la estirpe superproductora parental. Tal puede ser el caso, por ejemplo, de las mutaciones en la actividad ciclasa del gen *carRA*, o de nuevas mutaciones en el gen *carB* que afecten de forma diferente a la enzima. Por ese motivo, se realizaron experimentos de mutagénesis sobre SF21. Entre las colonias obtenidas a partir de las esporas mutagenizadas (21,5% de supervivencia), se encontró una proporción inusualmente elevada de mutantes albinos (aproximadamente 0,75% de las colonias supervivientes). De estas colonias se seleccionaron dos con una leve pigmentación verdosa. Bajo iluminación con "luz negra" (radiación UV de longitud de onda próxima al visible) no se detectó fluorescencia, indicando la ausencia de fitoflueno. Por tanto, por el color se dedujo que estos mutantes podrían contener cantidades apreciables de ζ -caroteno. El análisis por HPLC de los carotenoides acumulados por sus micelios confirmó esta predicción (Fig. C1.11). Los cromatogramas mostraron la

presencia de altas concentraciones de fitoeno, con diferencia el caroteno predominante, y pequeñas cantidades de carotenoides parcialmente desaturados, sugiriendo nuevas mutaciones en el gen *carB* (Fig. C1.5). Se secuenciaron los alelos *carB* de estos mutantes y se analizó su producción de carotenoides.

El análisis de las secuencias mostró la presencia en SF73 de una transición G1493->A, que da lugar a la conversión del codón Trp449 en un codón stop (Fig. C1.5). La proteína predicha carece por tanto del dominio de unión de carotenoides (Armstrong et al., 1989). Este dato contrasta con la acumulación de pequeñas cantidades de ζ -caroteno en el mutante, indicando la conservación de una cierta capacidad para realizar las primeras dos desaturaciones de la ruta (Fig. C1.11). La escasez de γ -caroteno indica la pérdida casi completa de actividad para el segundo par de desaturaciones.

El alelo *carB* de SF98 también contiene un cambio en la secuencia de bases cuando se compara con el alelo *carB36*. La mutación, en este caso una transversión G1657->T, reemplaza a la glicina 504, presente en el dominio de unión de carotenoides, por un residuo de ácido aspártico (Fig. C1.5). El análisis de carotenoides de este mutante muestra la acumulación de pequeñas cantidades de ζ -caroteno y γ -caroteno, es decir, los productos de las dos primeras parejas de desaturaciones. A diferencia del mutante SF73, las concentraciones de estos intermediarios en SF98 es significativamente mayor en la luz. Este efecto de la iluminación, patente en la estirpe silvestre y detectable aún en el mutante SF4, sorprende en este caso, ya que su estirpe parental (SF21) acumula cantidades similares de carotenoides en luz y en oscuridad.

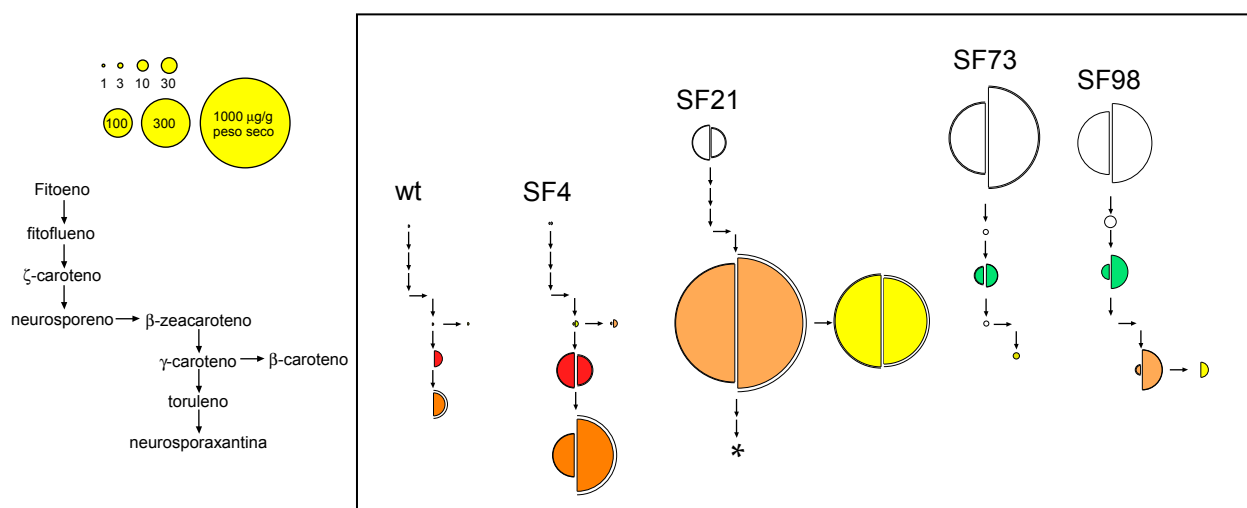


Fig. C1.11. Producción de carotenoides de las estirpes descritas en este capítulo. Los semicírculos indican la cantidad de carotenoides en $\mu\text{g/g}$ de peso seco; su superficie representa las concentraciones de carotenoides de acuerdo con la escala mostrada sobre la ruta, la cual permite identificar los distintos carotenoides en el esquema. La mitad izquierda indica las cantidades en la oscuridad, y la mitad derecha en la luz. La semicircunferencia que rodea a cada semicírculo indica la desviación típica de la media. El asterisco indica carotenoides no determinados (ver apartado 1.1).

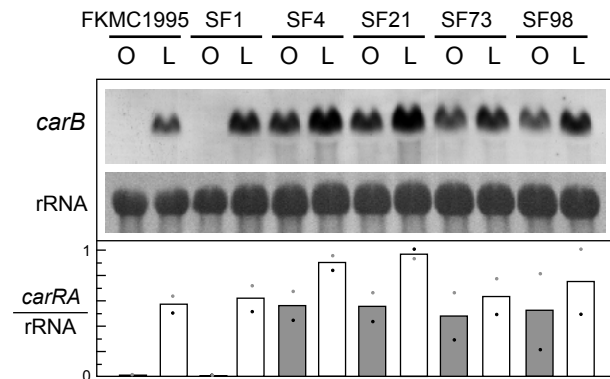
1.8. Expresión de los genes *car* en los mutantes del gen *carB*

Las diferencias en las cantidades de carotenoides acumuladas en los mutantes *carB* en relación a las estirpes parentales nos indujo a investigar los niveles de ARNm del gen *carB* en estas estirpes (Fig. C1.12). Como cabía esperar, no detectamos ARNm de *carB* en oscuridad en la estirpe silvestre o en el mutante SF1 (*niaD*), acumulándose altos niveles tras una hora de xxxxxxxx

exposición a la luz. La cantidad de ARNm de este gen en el mutante superproductor de carotenoides SF4 en la oscuridad fue similar a la detectada en la estirpe silvestre y SF1 expuestas a la luz. Se observó así mismo un sensible aumento de ARNm en SF4 en el cultivo iluminado.

Los niveles de ARNm de *carB* en las estirpes derivadas de SF4 fueron comparables a los mostrados por ésta, observándose en todas ellas un incremento moderado cuando se cultivan una hora en la luz. Este comportamiento en los mutantes superproductores provenientes de la estirpe silvestre FKMC1995 es comparable al observado en mutantes similares provenientes de la estirpe silvestre IMI58289 (Capítulo 5, Fig. C5.11). En conclusión, la expresión de *carB* en el mutante SF21 y en los mutantes derivados de éste son muy parecidos a los de SF4, lo que indica que la mayor producción de carotenoides en estas estirpes no es resultado de un aumento en la expresión de los genes responsables de la carotenogénesis.

Fig. C1.12. Expresión del gen *carB* en la estirpe silvestre FKMC1995 y en los mutantes indicados. Northern blot de muestras de ARN total de las estirpes cultivadas en la oscuridad (O) durante tres días, y expuestas 1 hora a 25 W/m² de luz blanca (L). Se muestran las señales de ARNr como control de carga. Las barras mostradas bajo las hibridaciones muestran el cociente entre la intensidad de cada señal de ARNm y la de ARNr (oscuridad: barras grises; luz: barras blancas). Los valores, estimados por análisis de densitometría de las hibridaciones, muestran la media de dos experimentos independientes referidos al valor más alto, tomado como 1; los puntos muestran los valores reales de cada experimento. La barra sombreada indica el valor más alto, tomado como 1.



1.9. Predicciones estructurales de CarB y ubicación de la mutación *carB36*

El análisis estructural de las desaturasas de carotenoides descrito en el apartado 1.2 se extendió a otras desaturasas, a la isomerasa de carotenoides de plantas y cianobacterias (CRTISO, Isaacson et al., 2002; Park et al., 2002; Breitenbach, 2001; Masamoto, 2001) y a la todo-*trans*-retinol:todo-*trans*-13,14-dihidroretinol saturasa (RetSat, Moise et al., 2004) (Fig. C1.13). A pesar de la baja similitud de secuencia entre las proteínas estudiadas (por ej. 12% de identidad entre CarB de *F. fujikuroi* y ZCD de *A. thaliana*), el programa predijo una estructura secundaria similar en todas ellas (Fig. C1.13).

Se han propuesto dos dominios para las desaturasas de carotenoides, el de unión del sustrato (Armstrong et al., 1989) y el de unión de dinucleótido (Armstrong et al., 1990; Bartley et al., 1990), el cual forma parte de uno mayor, el dominio de Rossmann (Rossmann et al., 1974). Estos dos dominios se establecieron a partir de las similitudes de secuencia de las desaturasas de carotenoides con la deshidrogenasa de lipoamida y la reductasa de glutatión por un lado (Bartley et al., 1990), y con la oxidasa de monoamina y la oxidasa de protoporfirinógeno por otro (Dailey and Dailey, 1998). El programa 3D-PSSM confirmó la conservación de ambos dominios en estas proteínas y un mayor parecido estructural de las desaturasas de carotenoides con la MAO (código de acceso de estructura mmdb Id: 18020; valor E dado por el programa 3D-PSSM al comparar con CarB: 4,8e-5), a la oxidasa de L-aminoácidos (mmdb Id: 14081; E: 2,9e-3) y a la oxidasa de poliaminas (mmdb Id: PAO, 15294; E: 3,2e-3).

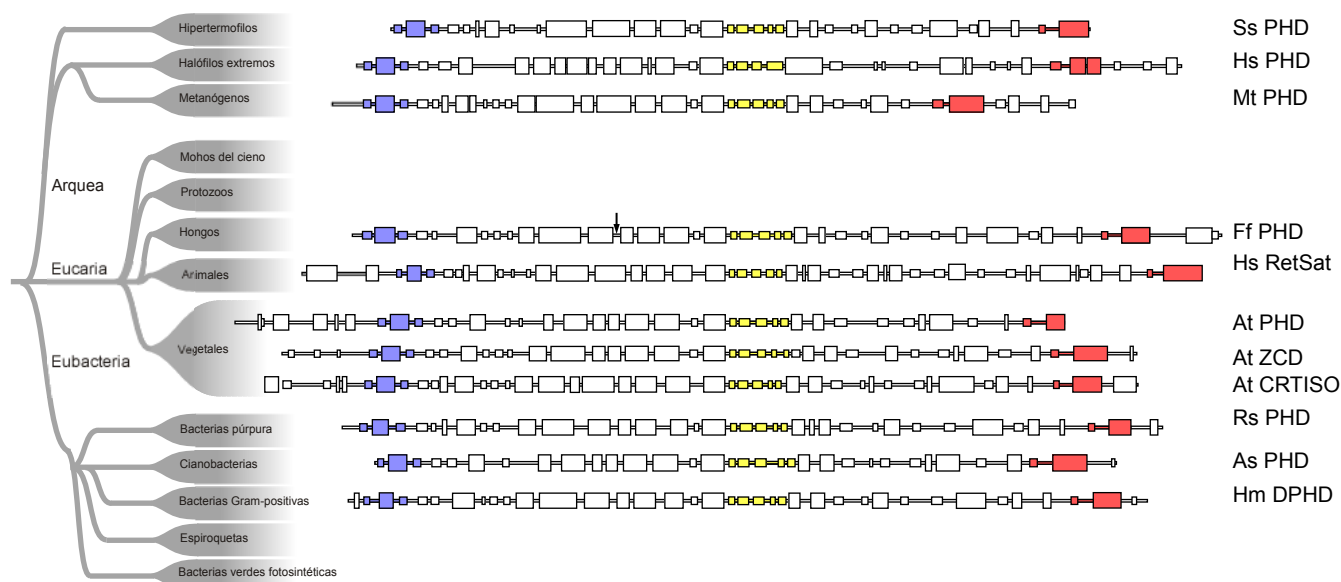


Fig. C1.13. Predicciones de estructura secundaria de enzimas de la familia de las desaturasas de carotenos. Las predicciones se realizaron con el programa 3D PSSM (Kelley et al., 2000). Se comparan la desaturasa de fitoeno (PHD), deshidrogenasa de diapofitoeno (DPDH), ó deshidrogenasa de ζ-caroteno (ZCD) de *Sulfolobus solfataricus* (Ss), *Halobacterium salinarum* (Hs), *Methanobacterium thermoautotrophicum* (Mt), *Fusarium fujikuroi* (Ff), *Arabidopsis thaliana* (At), *Rhodobacter sphaeroides* (Rs), *Anabaena* sp. (As) y *Heliobacillus mobilis* AAC84034.1 (Hm). Los rectángulos grandes indican hélices α, y los rectángulos pequeños indican láminas β. Los rectángulos coloreados forman parte del dominio de Rossmann. La flecha indica la posición de la mutación *carB36*.

Todas estas proteínas utilizan FAD como cofactor, unido supuestamente por medio del dominio de Rossmann. El análisis estructural realizado (Fig. C1.13) indica que dicho dominio está conservado en todas ellas. Lo forman tres regiones: la primera constituye el dominio de unión de dinucleotido, formado por dos láminas β y una hélice α (β1, α1 y β2, Fig. C1.14A y C1.15); la segunda abarca cinco láminas β adyacentes (β3, βa, βb, βc y β4, Fig. C1.14B y C1.15) y una sexta lámina β separada de éstas, no incluida en la Figura; la tercera comprende una lámina β y una hélice α próximas al extremo carboxilo (β5 y α2, Fig. C1.14C y C1.15). Se han identificado varios aminoácidos conservados en este último segmento para las proteínas que unen dinucleótidos como cofactor (Eggink et al., 1990), y se ha propuesto que una secuencia similar está presente en las desaturasas de carotenoides estructurada como una lámina β y una hélice α (Vallon et al., 2000). Esta secuencia conservada (TxxxxhφhhGD; donde "h" indica aminoácido hidrofóbico, "φ" aromático y "x" cualquier aminoácido) se encuentra dentro del dominio anteriormente propuesto de unión de caroteno. La mutación *carB36* se ubica fuera del dominio de Rossmann.

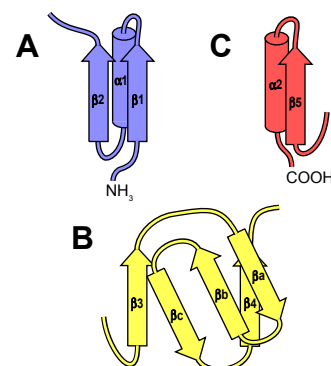
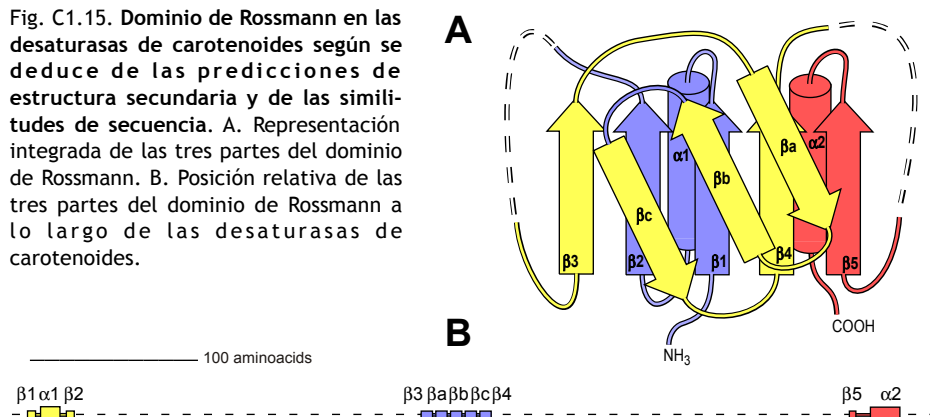


Fig. C1.14. Estructura predicha para las tres regiones que conforman el dominio de Rossmann en las proteínas descritas en el texto. A. dominio lámina β-hélice α-lámina β que contiene el dominio de unión de dinucleotido. B. láminas β contiguas que envuelven al dominio de unión de dinucleotido. C. Lámina β y hélice alfa que incluye el dominio de unión de caroteno.

Fig. C1.15. Dominio de Rossmann en las desaturasas de carotenoides según se deduce de las predicciones de estructura secundaria y de las similitudes de secuencia. A. Representación integrada de las tres partes del dominio de Rossmann. B. Posición relativa de las tres partes del dominio de Rossmann a lo largo de las desaturasas de carotenoides.



1.10. Discusión

Este capítulo describe un mutante de *F. fujikuroi*, SF21, que presenta una fuerte pigmentación amarilla debido a la acumulación de γ -caroteno y β -caroteno como productos mayoritarios de la carotenogénesis. Hemos comprobado que esta estirpe posee una mutación en el gen *carB* (alelo *carB36*) y hemos demostrado mediante la técnica de reemplazamiento alélico que esta mutación es la responsable del fenotipo. Las características del mutante indican que su desaturasa realiza las primeras cuatro desaturaciones de la ruta, pero ha perdido casi completamente la capacidad de catalizar la quinta. Se trata por tanto de una alteración muy sutil en la proteína, que explica la infrecuencia de este tipo de mutante. Anteriormente se habían descrito dos mutantes de *F. fujikuroi*, llamados SG45 y SG70, con incrementos en las cantidades relativas de β -caroteno y γ -caroteno, pero en ambos casos se detectaron también cantidades apreciables de toruleno y uno de ellos sintetiza tanta neurosporaxantina como la estirpe parental (Avalos y Cerdá-Olmedo, 1987). Se trata, por tanto, del primer mutante con un fenotipo nulo específico para la quinta desaturación en este organismo y en cualquier otro que posea una ruta similar. Así lo indican la ausencia de toruleno en su micelio y la cantidad extremadamente baja de neurosporaxantina detectable en los análisis.

El fenotipo de SF21 recuerda en su coloración al mutante *ylo* de *N. crassa*, aunque en este caso el patrón de acumulación de carotenoides no permite sacar conclusiones claras sobre el tipo de alteración sufrida (Goldie y Subden, 1973). Esto puede ser debido a que la estirpe silvestre de este hongo acumula mayores cantidades de carotenoides intermediarios que *F. fujikuroi* en las condiciones habituales de cultivo. Llama la atención que el fenotipo *ylo* de *N. crassa* no se debe a una alteración en la desaturasa (Al-1), sino en una supuesta deshidrogenasa de aldehído, cuyo gen no ha sido aún objeto de investigación. Este hecho sugiere una interpretación alternativa al fenotipo del mutante SF21: la mutación puede haber afectado al sitio de interacción de la desaturasa con otra proteína. Ese podría ser el caso, por ejemplo de una proteína dedicada a regenerar el poder reductor de su cofactor (ver Introducción, apartado 3.1.3). En contra de esta hipótesis, parece difícil que tal tipo de interacción solo sea necesaria para llevar a cabo una de las cinco desaturaciones.

Además de la diferencia en su composición, la concentración de carotenoides en el mutante SF21 cuadruplica al menos la mostrada por la estirpe superproductora de carotenoides de la que procede (SF4). Esta diferencia es especialmente acusada en la oscuridad, ya que la estirpe parental muestra un aumento en la concentración de carotenoides en la luz, resultado que tiene su reflejo en un sensible incremento en las cantidades de ARNm del gen *carB* tras una hora de iluminación. Los niveles de ARNm son muy similares en el mutante SF21, por lo que no parece que las diferencias en las concentraciones de carotenos acumulados sean debidas a diferencias de expresión o de estabilidad de dichos ARNm. Las diferencias observadas pueden tener su causa en que el γ -caroteno y β -caroteno sean más estables que la neurosporaxantina, pero esta hipótesis exigiría además una alta sensibilidad de la neurosporaxantina a la luz. En contra de esta predicción, los mutantes superproductores de neurosporaxantina derivados de IMI58289 contienen cantidades parecidas de esta xantofila en luz y en oscuridad (Avalos y Cerdá-Olmedo, 1987). Alternativamente, el alelo *carB36* puede conferir una mayor capacidad biosintética de carotenoides a la estirpe que lo alberga. Dicho aumento en la eficiencia afectaría también como

mínimo a la síntasa de fitoeno, como indica la mayor acumulación de fitoeno en SF21 en comparación con la estirpe parental SF4 (Fig. C1.11). Cabe especular que la desaturasa controle de alguna forma la actividad de la sintasa de fitoeno, y que tal mecanismo de control se haya perdido en la desaturasa determinada por el alelo *carB36*. Otra posible explicación la proporciona un trabajo en *M. circinelloides*, donde se ha descrito el gen *crgA*, que determina una proteína represora de la carotenogénesis. Se ha propuesto que CrgA lleva a cabo esta función colaborando con el mecanismo de ubiquitinación, promoviendo la degradación de las proteínas de la carotenogénesis (Lorca-Pascual et al., 2004). Si un mecanismo semejante actuara en *Fusarium*, la mutación *carB36* podría haber abolido la actuación de este mecanismo sobre la maquinaria carotenogénica, traducándose en un incremento en la producción de carotenoides en SF21.

Las predicciones de la estructura de las proteínas de la familia a la que pertenecen las desaturasas han mostrado que, aunque la similitud entre ellas a nivel de secuencia es relativamente baja, conservan en rasgos generales las mismas características estructurales, incluyendo la persistencia del dominio de Rossmann, presuntamente responsable de la unión del cofactor aceptor de protones (Fig. C1.13). Esta conservación en la estructura facilita las comparaciones de resultados obtenidos con desaturasas de diferentes orígenes. Un ejemplo particularmente relevante lo encontramos en una mutación descrita en la desaturasa de *Rhodobacter sphaeroides* (Wang et al., 2001) que presenta un curioso paralelismo con la alteración encontrada en la desaturasa de fitoeno del mutante SF21. La mutación de *R. sphaeroides* afecta también a un solo aminoácido situado en la misma región de la proteína. Sin embargo, en este caso la consecuencia es opuesta a la observada en el mutante de *F. fujikuroi*, pues la versión alterada de esta enzima bacteriana introduce una desaturación adicional en su sustrato (Wang et al., 2001). Tanto la mutación *carB36* de *F. fujikuroi*, como la de la desaturasa de *R. sphaeroides*, localizadas fuera del dominio de Rossmann, se encuentran en una zona compuesta por hélices α (Fig. C1.16), que presenta una alta variabilidad de secuencia incluso entre las desaturasas fúngicas (Fig. C1.5). A pesar de su bajo grado de conservación, dos de las hélices son siempre anfipáticas y ricas en aminoácidos básicos. Estas características son típicas del dominio de unión a membrana de ciertas proteínas monotópicas, que utilizan hélices α anfipáticas para embeberse parcialmente en la membrana lipídica y son particularmente ricas en aminoácidos básicos para interactuar con las cabezas oxigenadas de los fosfolípidos (Picot et al., 1994; Wendt et al., 1997). Este dominio estructural forma un poro a través del cual el sustrato, hidrofóbico y supuestamente ubicado en la membrana, entra en la enzima para ser metabolizado.

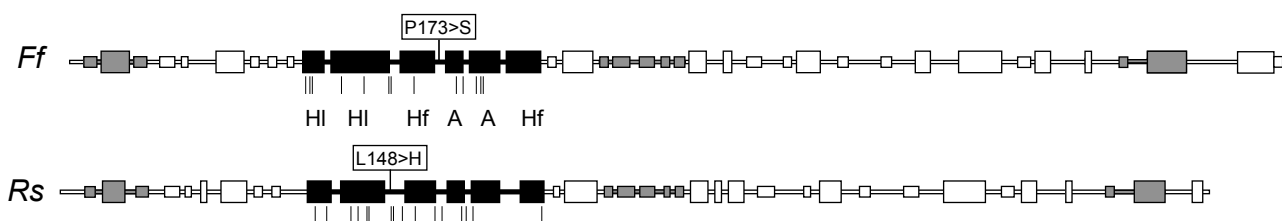


Fig. C1.16. Predicción del dominio de unión a membrana de la desaturasa de *F. fujikuroi* (Ff) y *R. sphaeroides* (Rs). Los rectángulos grandes representan hélices α , y los rectángulos pequeños representan láminas β . En negro se destaca la región de hélices α donde se encuentran las mutaciones descritas en el texto; las barras verticales indican posiciones donde se localizan aminoácidos básicos (lisina o arginina). Dentro de ese segmento, se indica el carácter hidrofílico (HI), hidrofóbico (Hf) o anfipático (A) de cada hélice α . En gris se indican las tres regiones de la proteína que forman el dominio de Rossmann (Fig. C1.13).

Las desaturasas de carotenoides son proteínas perimembranales (Sandmann, 1997), y los carotenoides son moléculas hidrofóbicas que encuentran acomodo en la bicapa lipídica. Se ha demostrado recientemente que otras enzimas que reconocen carotenoides como sustrato, las oxigenasas de carotenoides, los discriminan en el sitio de entrada a la enzima (Kloer et al., 2005; Schezinger et al., 2006). Como ocurre con las oxigenasas de carotenoides, las desaturasas son capaces de metabolizar *in vitro* muchos sustratos inexistentes en su entorno natural (Raisig y Sandmann, 2001; Tobias y Arnold, 2006). Este hecho sugiere un mecanismo de discriminación particularmente relajado, que tiene lugar a nivel de entrada de la molécula en el hueco hidrófobo de la enzima. El aminoácido sustituido en la proteína del alelo *carB36* está localizado en el giro previo a las dos hélices α anfipáticas (Fig. C1.15), y la de *R. sphaeroides* se encuentra en el giro precedente, previo a la hélice α hidrofóbica (Fig. C1.15). Parece probable que la sustitución de una leucina original por una histidina en la desaturasa de *R. sphaeroides* haya relajado el reconocimiento del sustrato de forma que permita la entrada de neurosporeno en la proteína. En el caso de CarB de *F. fujikuroi* el cambio de la serina original por una prolina, un aminoácido particularmente influyente en las estructuras proteicas, podría traer consigo un reordenamiento estructural de las hélices α adyacentes de forma que el γ -caroteno no pueda entrar en el sitio activo de la enzima. Curiosamente esta prolina está conservada en dos desaturasas capaces de llevar a cabo cinco desaturaciones, Al-1 de *N. crassa* (Hausmann y Sandmann, 2000) y CrtI de *X. dendrorhous* (An et al., 1999; Verdoes et al., 1999). En contraste, las desaturasas que llevan a cabo cuatro desaturaciones presentan un aminoácido alifático en esa posición. Ese es el caso de CarB de *P. blakesleeanus* (Ruiz-Hidalgo et al., 1997) y *M. circinelloides* (Velayos et al., 2000), que acumulan β -caroteno como producto final. Una excepción es la desaturasa de *C. nicotianae*, que conserva la prolina pero que produce también β -caroteno (Ehrenshaft y Daub, 1994).

A partir de la estirpe SF21 se obtuvieron dos nuevos mutantes con alteraciones sutiles en la desaturasa que afectan a la preferencia de sustrato. Ambos mutantes están afectados en el último segmento del dominio de Rossmann, que solapa con el dominio de unión de carotenoide, región donde se encuentran también varias mutaciones *carB* descritas en *P. blakesleeanus* (Sanz et al., 2002). Uno de nuestros mutantes, SF73, se espera que produzca una versión truncada de la desaturasa que carezca de toda esa región. A pesar de ello, el mutante acumula pequeñas cantidades de ζ -caroteno, lo que significa que la variante truncada de la proteína conserva una actividad residual para las dos primeras desaturaciones de la ruta, indicando que la región perdida no es absolutamente crítica para su funcionamiento. De acuerdo con nuestras predicciones estructurales, el dominio afectado se encarga de interactuar con el cofactor aceptor de electrones.

En el segundo mutante, SF98, la mutación produce el cambio de un solo aminoácido. Si bien el mutante es capaz de sintetizar cantidades modestas de γ -caroteno, acumula una cantidad inusualmente alta de ζ -caroteno, demostrando una disminución parcial en la capacidad de realizar la tercera y cuarta desaturación. En ambos casos se acumulan concentraciones elevadas de fitoeno, demostrando que se trata de desaturasas muy defectuosas. Debido a la simetría de las dos primeras parejas de reacciones, no sorprende que en ambos mutantes las desaturaciones se vean afectadas por pares. Este tipo de alteración de la desaturasa tiene un precedente en el hongo *P. blakesleeanus*, donde se ha descrito un mutante (S442) que acumula una mezcla de carotenos enriquecida en fitoeno

y ζ -caroteno. Su fenotipo indica una mutación rezumante que afecta sobre todo al segundo par de desaturaciones (Bejarano et al., 1987; Sanz et al., 2002).

Los resultados descritos en este capítulo corroboran la conclusión alcanzada por medios bioquímicos en *N. crassa* sobre el papel de la desaturasa como enzima responsable de las cinco desaturaciones de la ruta (Hausmann y Sandmann 2000). A la misma conclusión se llegó por métodos genéticos con la desaturasa de *P. blakesleeanus*, aunque en este caso la ruta solo incluye cuatro desaturaciones. En este organismo se ha propuesto que las desaturasas forman un tetrámero dentro del cual se transfieren los sustratos a medida que cada monómero realiza una reacción de desaturación (Aragón et al., 1976; Hausmann y Sandmann 2000; Sanz et al., 2002). Las predicciones estructurales ya discutidas parecen indicar que la desaturasa de *F. fujikuroi* ejerce su función individualmente como proteína monotópica, de forma que una misma enzima podría reconocer y desaturar uno a uno los diferentes sustratos. Este modelo se amoldaría también más fácilmente al peculiar fenotipo del mutante ya mencionado de *R. sphaeroides*, en el cual la enzima adquiere la capacidad de llevar a cabo una quinta desaturación inexistente en la enzima silvestre (Wang et al., 2000). Tobias y Arnold (2006) optaron por esta misma hipótesis tras conseguir que la desaturasa de *Erwinia uredovora* introduzca hasta dos desaturaciones adicionales en carotenoides de 45 y 50 carbonos. El modelo es compatible con que la desaturasa de *F. fujikuroi* forme dímeros u homopolímeros, siempre que cada subunidad ejerza su actividad individualmente a través del poro en su conexión con la membrana. Así, por ejemplo, la oxidasa de protoporfirinógeno (PPO) se organiza en dímeros, donde cada monómero introduce seis desaturaciones en el protoporfirinógeno IX (Poulson y Polglase, 1975).

La propiedad del alelo *carB36* de desviar la ruta hacia la síntesis de γ -caroteno y β -caroteno sugiere posibles aplicaciones biotecnológicas. Un ejemplo lo encontramos en el basidiomiceto *X. dendrorhous*, usado como fuente industrial de astaxantina. Esta xantofila, utilizada por la industria piscícola para proporcionar la pigmentación a salmones y crustáceos (Visser et al., 2003), deriva del β -caroteno y contiene grupos hidroxilo y ceto en los anillos de la molécula. En este hongo, la síntesis de astaxantina compite con una ruta paralela en la que la desaturasa (CrtI) introduce una quinta desaturación para producir toruleno, precursor de los productos finales 3-hidroxi-3',4'-didehidro- β - ψ -caroten-4-ona (HDCO) y 3,3'-dihidroxi- β , ψ -caroten-4,4'-diona (DCD) (An et al., 1999). El residuo de prolina afectado por la mutación del alelo *carB36* está conservado en el gen *crtI* de *X. dendrorhous*. La introducción de la misma mutación en el gen *crtI* silvestre podría bloquear la ruta paralela no deseada incrementando la cantidad y proporción de astaxantina. De no tener el mismo efecto la mutación en este hongo, cabe la alternativa de introducir el alelo *carB36* de *F. fujikuroi* bajo control de un promotor de *X. dendrorhous* en una estirpe de este basidiomiceto carente de actividad CrtI.

Otro ejemplo de sus posibles aplicaciones nos lo proporciona la especie *Fusarium venenatum*. Este hongo es la base del producto denominado micoproteína (Wiebe, 2002), usado como sustituto de la carne por la industria alimentaria en algunos países de la Unión Europea. *F. venenatum* posee la misma ruta biosintética que *F. fujikuroi* (L.R. Rodríguez-Ortiz, resultados no publicados). La introducción de la mutación *carB36* en *F. venenatum* daría lugar a la acumulación de pequeñas cantidades de γ -caroteno y β -caroteno en el micelio empleado para uso alimentario, incrementando por tanto el valor

nutritivo de la micoproteína por su contenido en provitamina A. Aunque la legislación actual es extremadamente restrictiva en cuanto al uso de organismos modificados genéticamente, el posible uso del alelo *carB36* para fines aplicados ha dado lugar a la solicitud de una patente (Prado-Cabrero y Avalos, 2003).

La baja similitud de secuencia entre las desaturasas de carotenoides de bacterias y plantas ha llevado a algunos autores a proponer para ellas un origen independiente (Pecker et al., 1992; Sandmann, 1994). El reciente descubrimiento de nuevos miembros de esta familia (CRTISO y RetSat) ha llevado a reconsiderar la evolución de esta familia. Ambas enzimas, a pesar de encontrarse en organismos fotosintéticos y vertebrados respectivamente, son más parecidas a las desaturasas bacterianas que a las vegetales (Park et al., 2002). Hemos comparado la estructura secundaria predicha para estas dos nuevas enzimas con ejemplos representativos de desaturasas de origen bacteriano y vegetal (Fig. C1.13). A pesar de la alta variabilidad en las secuencias comparadas (el grado de identidad de CarB de *F. fujikuroi* con ZCD de *A. thaliana* es del 12%, y con la desaturasa del hongo *C. nicotianae* del 60%), todas las enzimas analizadas comparten una estructura secundaria predicha similar, condicionada probablemente por la necesidad de conservar el dominio de Rossmann (Fig. C1.14 y C1.15). Estos resultados sugieren un origen evolutivo común para todas las enzimas de esta familia.

Capítulo 2.

Secuencia y regulación del gen *carO*, que determina una proteína de la familia de las opsinas

Uno de los puntos de arranque de esta Tesis es el conocimiento previo de la existencia a continuación de *carB* de un gen que se denominó *carO* (Fig. C2.1) y que determina una proteína de la familia de las opsinas. Su descubrimiento, a raíz de la secuenciación de un extremo de un segmento de ADN que contiene el gen *carB* (Fernández-Martín et al., 2000), dio lugar al análisis de su función por reemplazamiento génico y al estudio del efecto de la luz y de las mutaciones *carS* sobre sus niveles de ARNm. Estos experimentos, realizados por María del Mar Prado en el mismo grupo de investigación (Prado et al., 2004), revelaron que la pérdida de *carO* no produce sobre *F. fujikuroi* ninguna alteración fenotípica externa en las condiciones de cultivo de laboratorio, incluyendo la síntesis de carotenoides (Fig. C2.2). Además, los niveles de ARNm del gen *carO* muestran el mismo patrón de regulación que el de los genes *carB* y *carRA* en respuesta a la luz y a las mutaciones de superproducción de carotenoides, motivo de la denominación *car* del gen.

2.1. El gen *carO*

En este capítulo se ha determinado la secuencia del gen *carO*, tanto a partir de ADN genómico como a partir de ADN complementario. A continuación se ha analizado dicha secuencia y la de la correspondiente proteína, y se ha ampliado el conocimiento de su regulación mediante el estudio del efecto del choque térmico sobre los niveles de su ARNm.

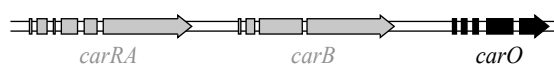


Fig. C2.1. Mapa del gen *carO* y genes vecinos.

El gen *carO* se extiende a lo largo de 1192 pb, incluyendo 4 intrones (54, 57, 97 y 50 pb), tres de los cuales se agrupan en la región 5' del gen (Fig. C2.1, apéndice 2.1). Con la excepción del intrón de 97 pb, el tamaño de los intrones concuerda con los de otros genes de *Fusarium* estudiados, habitualmente muy próximos a los 50 pb.

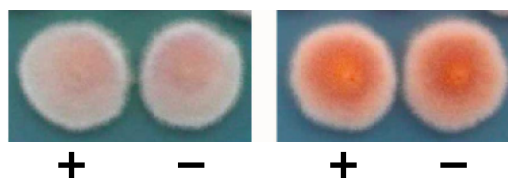


Fig. C2.2. Aspecto de colonias de un mutante *carO*⁻ (-) y su estirpe control (+) con el alelo *carO* funcional. Las estirpes fueron cultivadas durante 5 días en medio mínimo con asparragina como fuente de nitrógeno en oscuridad (panel izquierdo) o en luz (panel derecho).

La secuencia codificante, 924 pb, determina una proteína de 307 aminoácidos (apéndice 2.2) predominantemente hidrofóbica. El análisis de su secuencia polipeptídica con la herramienta TMHMM (CBS, Dinamarca) indica que se trata de una proteína membranal con siete dominios transmembrana.

2.2. Similitud de CarO con otras proteínas

La proteína CarO es muy similar a las proteínas de la familia de las opsinas. El parecido más elevado lo encontramos en dos proteínas del hongo *Coriolus versicolor*, Cvhs30/1 y Cvhs30/2, a las que se ha atribuido un papel en la respuesta al choque térmico (Iimura y Tatsumi, 2002). De los 307 aminoácidos de CarO, el 34% coinciden en las mismas posiciones en estas dos proteínas, las cuales difieren entre sí solo en tres posiciones. También se han encontrado grados significativos de identidad con la proteína de choque térmico HSP30 de *S. cerevisiae* (29%), las opsinas Ops de *L. maculans* (29%) y Nop-1 de *N. crassa* (26%) y la bacteriorrodopsina de *H. salinarum* (26%). En la Fig. C2.3 se comparan las secuencias de estas proteínas resaltando las posiciones coincidentes. Se incluye también en esta comparación una segunda presunta opsina de *N. crassa*, más parecida a CarO que Nop-1 (29% vs 26%). Al comparar CarO con otras opsinas de esta amplia familia (Zhai et al., 2001), los porcentajes de identidad son similares o ligeramente menores.

Se conoce la estructura tridimensional de la bacteriorrodopsina y se han determinado los aminoácidos implicados en su mecanismo de transporte de protones (Luecke et al., 1998), lo cual se ha utilizado como guía en el análisis

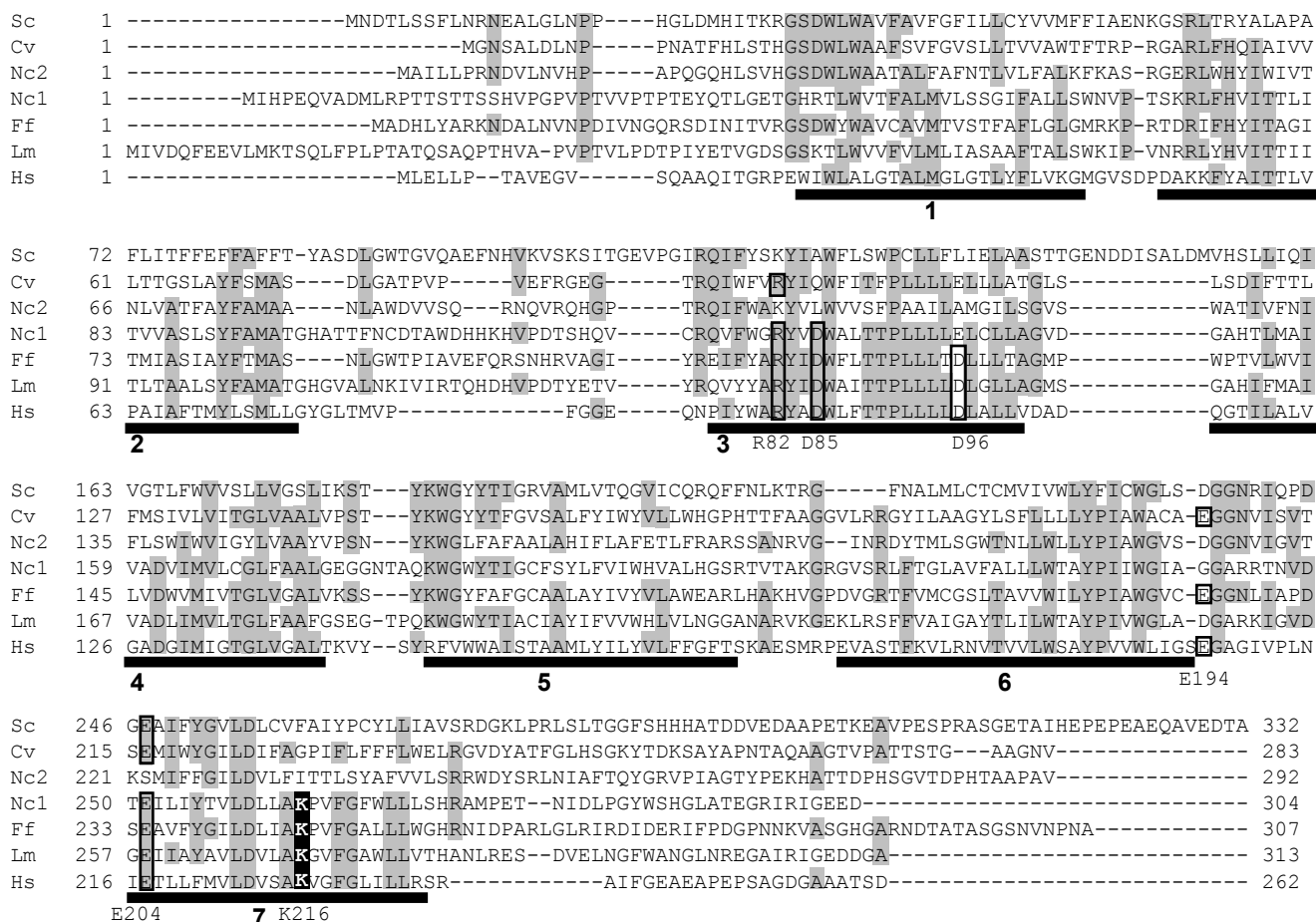


Fig. C2.3. Comparación de CarO con proteínas representativas de la familia de las opsinas. Las proteínas mostradas son HSP30 de *S. cerevisiae* (Sc, código de acceso NP_009950), Cvhsp30/1 de *C. versicolor* (Cv, 074631), Yro-2r de *N. crassa* (Nc2, CAB92637), Nop-1 del mismo hongo (Nc1, AAD45253), CarO (Ff, CAD97459), Ops de *L. maculans* (Lm, AAG01180) y la bacteriorrodopsina de *H. salinarum* (Hs AAG42454). Los aminoácidos coincidentes en la misma posición en al menos cuatro de las proteínas comparadas están sombreados en gris. Los aminoácidos relevantes conservados están indicados por el código de una letra y su posición en la bacteriorrodopsina. Las barras numeradas indican los siete dominios transmembrana.

estructural de nuevos miembros de la familia. La similitud de la secuencia de CarO con la de la bacteriorrodopsina sugiere una estructura tridimensional similar para la primera, organizada en siete hélices α transmembranales. Los segmentos correspondientes a cada una de estas hélices se destacan en la Fig. C2.3.

Una vez disponible la secuencia del genoma de *F. graminearum*, se llevó a cabo un análisis de la presencia de genes de presuntas opsinas en este hongo mediante la búsqueda de genes con similitud a *carO*. Los análisis mediante BLAST permitieron identificar tres genes de esta familia. Uno de ellos (XP_383240) es presumiblemente el ortólogo de *carO*, a juzgar por el alto porcentaje de identidad de la proteína determinada (77%) y su ligamiento al agrupamiento de los genes *car*. El segundo (XP_387730) determina una presunta proteína con un porcentaje de identidad con CarO del 36%. El correspondiente ortólogo de *F. fujikuroi* se ha denominado *opsA* y está siendo actualmente estudiado por Alejandro F. Estrada en el mismo grupo de investigación. El tercero (XP_381616) determina una proteína con un grado de identidad menor con CarO (25%). Como CarO, las presuntas proteínas determinadas por XP_387730 y OpsA poseen el residuo de lisina supuestamente responsable de la unión de retinal, pero no así la proteína determinada por XP_381616, por lo cual se está dando menos prioridad al estudio de esta última.

2.3. Predicciones sobre la estructura de CarO

Como ya se ha indicado, la información disponible sobre la estructura tridimensional de la bacteriorrodopsina incluye el conocimiento de los residuos involucrados en la transferencia de protones (Luecke et al., 1998). La comparación de las secuencias de las proteínas CarO, Nop-1 y Ops (respectivamente Ff, Nc1 y Lm en la Fig. C2.3) con la de la bacteriorrodopsina (Hs en la Fig. C2.3) muestra la conservación en las tres proteínas fúngicas de los aminoácidos críticos para la unión de retinal (Lys 216) y el bombeo de protones inducido por luz (Asp 96, donador intracelular; Asp85, aceptor extracelular; Arg82, Glu194, Glu204, complejo liberador). Este grado de conservación sugiere para CarO, al igual que para las otras dos proteínas, una posible actividad de bombeo de protones utilizando la luz como fuente de energía, similar a la llevada a cabo por la bacteriorrodopsina.

2.4. Regulación de *carO* a nivel de ARNm

Como ya se ha indicado, el patrón de regulación de los niveles de ARNm del gen *carO* coincide con el mostrado por los genes *carRA* y *carB*, tanto en la inducción por la luz como en la desregulación en los mutantes superproductores de carotenoides, indicando una regulación coordinada de los tres genes (Prado et al., 2004). Debido al alto grado de similitud de CarO con las proteínas Cvhsp30 de *C. versicolor* y HSP30 de *S. cerevisiae*, investigamos el posible efecto del choque térmico sobre la regulación del ARNm de este gen. Para ello adoptamos condiciones experimentales empleadas para *N. crassa*, hongo en el que se ha investigado en detalle la inducción a nivel de ARNm de varios genes asociados al choque térmico (Mohsenzadeh et al., 1998). Lo habitual es que los ARNm de estos genes muestren un elevado nivel de inducción tras una hora de incubación a alta temperatura.

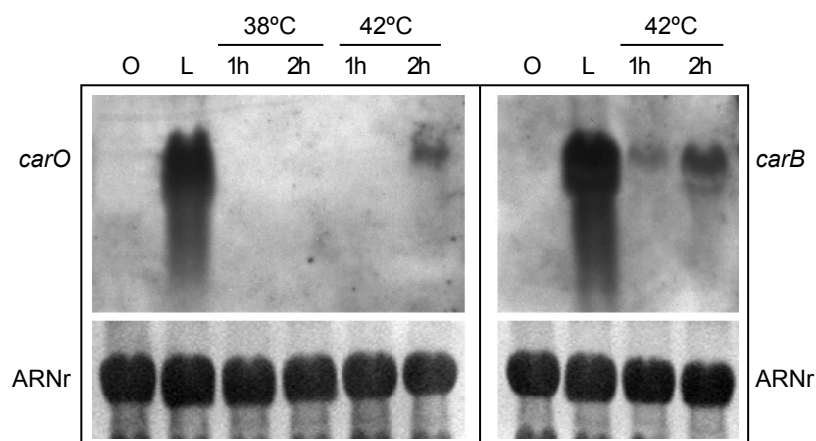


Fig. C2.4. Efecto del choque térmico sobre los niveles de ARNm de los genes *carO* y *carB*. Northern blot de ARN total de la estirpe silvestre FKMC1995 cultivada en la oscuridad (O) y expuestas durante los tiempos indicados a 38°C o 42°C. Como control de inducción se muestra el resultado de 1 hora de iluminación (L). Los ARNr se muestran bajo las hibridaciones como control de carga.

F. fujikuroi muestra un buen crecimiento entre 22°C y 30°C, con un óptimo próximo a los 26°C. Aunque no hay diferencias llamativas en la biomasa, se observan diferencias en la morfología externa y en la textura del micelio a diferentes temperaturas, siendo las colonias más compactas y los bordes más definidos a 30°C que a 22°C. A medida que superamos los 30°C aumenta la compactación y disminuye el tamaño de las colonias. El crecimiento es muy limitado a 37°C, y no se aprecia crecimiento alguno a 40°C.

Elegimos como temperaturas de estrés térmico en nuestros experimentos 38°C y 42°C. No detectamos inducción de los niveles de ARNm *carO* en la oscuridad después de la incubación de la estirpe silvestre FKMC1995 durante una hora a cualquiera de estas temperaturas (Fig. C2.4), pero se observó una ligera inducción tras 2 horas de incubación a 42°C. El análisis en el mismo experimento de los niveles de ARNm del gen *carB*, utilizado como control de gen estructural de la carotenogénesis, arrojó resultados similares, aunque en este caso sí pudimos observar una cierta inducción a 1 hora. En ambos casos, el aumento en los niveles de ARNm producido por la elevada temperatura fue muy inferior a la provocada por una hora de exposición a la luz.

Como ya se ha indicado, los mutantes *carO* mostraron una carotenogénesis indistinguible de la de la estirpe silvestre (Fig. C2.2). Esta observación se confirmó a nivel de los niveles de ARNm del gen *carB*, como representativo de la ruta, y del propio gen *carO* en un mutante *carO*⁻ y en su estirpe control (Fig. C2.5), que mostraron una regulación muy similar a las ya publicadas para el mismo gen en la estirpe silvestre (Prado et al., 2004).

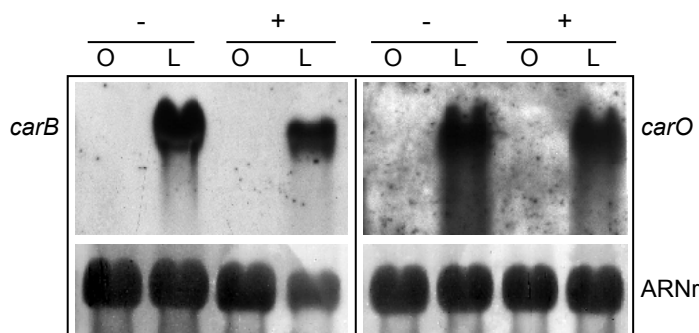


Fig. C2.5. Efecto de la luz sobre los niveles de ARNm de los genes *carB* y *carO* en un mutante *carO*⁻ (-) y su estirpe control (+) con el alelo *carO* funcional. Se muestra un Northern blot de ARN total de micelio cultivado en la oscuridad y expuesto a luz blanca durante 1 hora a 25 W/m². Los ARNr se muestran bajo las hibridaciones como controles de carga.

2.5. Discusión

La conservación de aminoácidos relevantes en la secuencia de la proteína CarO, puesta en evidencia por los alineamientos con proteínas de la familia de las bacteriorrodopsinas de arqueas, sugiere un posible papel como fotoproteína, posiblemente asociada a bombeo de protones. Sin embargo, los análisis mediante Clustal muestran una identidad ligeramente mayor con las proteínas Cvhs30/1 de *C. versicolor* (Iimura et al., 2002) y HSP30 de *S. cerevisiae* (Regnacq y Boucherie, 1993), ambas asociadas por sus descubridores al estrés resultante de la exposición a altas temperaturas (choque térmico). También muestra un elevado parecido con otras opsinas fúngicas, como Ops de *L. maculans* (Idnurm y Howlett 2001) y Nop-1 de *N. crassa* (Bieszke et al., 1999a). El parecido con las bacteriorrodopsinas es particularmente significativo, debido a la enorme distancia filogenética con las arqueas. Este parecido puede ser explicado también por un origen relativamente reciente de estos genes en hongos por transferencia horizontal a partir de arqueas, su presencia en grupos de hongos distantes sugieren más bien un origen antiguo, posiblemente a partir de un antepasado común previo a la aparición de los eucariotas. En ese caso, el parecido entre CarO y la bacteriorrodopsina se debería más bien a las limitaciones estructurales necesarias para el mantenimiento de la función de la proteína. A favor del origen evolutivo común apunta también la presencia de opsinas en animales, y en contra la ausencia de opsinas en plantas (Ruiz-González y Marín, 2004) y en los escasos genomas de hongos zigomicetos y oomicetos disponibles en el momento de redacción de esta memoria.

Las opsinas usan como cromóforo un apocarotenoide, el retinal (ver sección 4.2 de la Introducción). Recientemente se han distribuido las proteínas de la familia de las opsinas en dos grupos en base a su secuencia (Brown, 2004), uno formado por las opsinas propiamente dichas y otro por las llamadas ORP (*Opsin-Related Proteins* o proteínas relacionadas con opsinas), donde se incluyen las proteínas de choque térmico. El análisis detallado de la secuencia de CarO y su comparación con otras proteínas de estas familias identificadas en los genomas de otros hongos, incluyendo desde especies próximas a *F. fujikuroi* (*F. graminearum* y *F. solani*) a especies muy alejadas (basidiomicetos como *Ustilago maydis*, u oomicetos, como *Phytophthora* sp.), nos permite hacer conjeturas mejor fundamentadas sobre el grupo funcional al que puede pertenecer CarO.

El análisis de los genomas de hongos disponibles muestra que la presencia de genes de la familia de las opsinas no coincide siempre con la presencia de genes de la carotenogénesis. En la tabla 1 se distinguen dos tipos de opsinas en función de la presencia o ausencia de la lisina a la que se liga el retinal en las opsinas fotoreactivas (Tabla C2.1). El resultado muestra que dos hongos, *C. globosum* y *C. neoformans*, posee presuntas opsinas con esta característica pero carecen de genes de la carotenogénesis. Los cuatro hongos restantes que contienen genes para este tipo de opsinas poseen aparentemente la ruta carotenogénica. Es de notar, sin embargo, que las presumibles opsinas de *C. globosum* y *C. neoformans* no contienen algunos de los aminoácidos relevantes para el bombeo de protones. La supuesta incapacidad para sintetizar carotenoides por estos dos hongos sugiere que estas proteínas no dependen de retinal para cumplir su función.

La opsina mejor estudiada en hongos es Nop-1 de *N. crassa*, la única para la cual se ha demostrado a nivel bioquímico su unión a retinal. En su genoma se encuentra una segunda opsina (Yro-2r), cuya secuencia sugiere que es una ORP.

Tabla C2.1. Presencia de presuntos genes homólogos a *carRA*, *carB* y genes de la familia de las opsinas en hongos. Se indica el código de acceso del correspondiente proyecto de secuenciación en *C. globosum*, *C. neoformans* y *R. oryzae*. Para los demás hongos se indica el código SPTREMBL.

	<i>carRA</i> ^a	<i>carB</i> ^a	Opsinas ^b	ORPs ^c	total ^d
Ascomycetos					
<i>Fusarium graminearum</i>	XP_383242	XP_383241	XP_383240 XP_387730	XP_381616	3
<i>Fusarium solani</i> (<i>Nectria h.</i>)	56746	56757	104772 108757	57350	3
<i>Neurospora crassa</i>	AAA19428	AAA33555	AAD45253	CAB92637	2
<i>Magnaporthe grisea</i>	-	-	-	XP_364170	1
<i>Trichoderma harzianum</i>	-	-	-	-	-
<i>Aspergillus nidulans</i>	-	-	-	XP_660965	1
<i>Chaetomium globosum</i>	-	-	CHGG_10008.1	CHGG_10380.1	2
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	-	-	-	NP_009950 CAA84997 Z74329	3
Basidiomycetos					
<i>Ustilago maydis</i>	XP_762434	XP_760357	XP_760272 XP_756518	XP_758776	3
<i>Coprinus cinereus</i>	-	-	-	-	-
<i>Cryptococcus neoformans</i>	-	-	CNAG_03572.1	-	-
Zigomicetos					
<i>Rhizopus oryzae</i>	RO3G_01212.1	RO3G_16669.1	-	-	-
<i>Phycomyces blakesleeenanus</i>	CAB86388	CAA55197	-	-	-
Oomicetos					
<i>Phytophthora sojae</i>	-	-	-	-	-

^a Presuntos genes homólogos a *carRA* o *carB*

^b Presuntos genes para proteínas de la familia de las opsinas con la supuesta lisina que une retinal

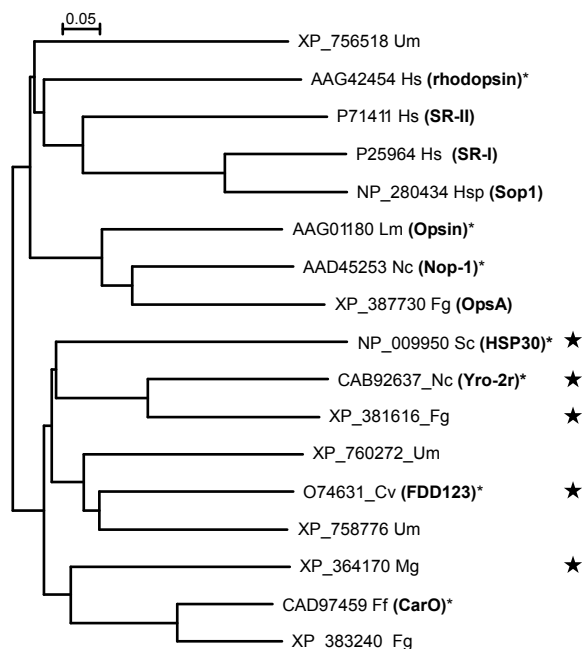
^c Presuntos genes para proteínas de la familia de las opsinas carentes de la supuesta lisina que une retinal

^d Número total de genes de presuntas opsinas

La proteína CarO es más parecida a Nop-1 que a Yro-2r, lo que motivó experimentos para confirmar si los mutantes *carO* muestran la alteración morfológica observada en el mutante Nop-1 en presencia de oligomicina (Bieszke et al., 1999a). El posterior hallazgo de un segundo gen más parecido a Nop-1 en *F. graminearum* y en *F. solani* hace pensar que el gen *carO* no tiene un auténtico ortólogo en *N. crassa*. No sorprende por tanto que no se encontrara ningún fenotipo asociable a la presencia de oligomicina en el mutante *carO* de *F. fujikuroi* (Prado et al., 2004).

Estas observaciones son reforzadas por los resultados del análisis filogenético de un número representativo de opsinas de hongos (Fig. C2.6). El árbol resultante muestra que la proteína XP_387730 de *F. graminearum* (denominada OpsA en *F. fujikuroi*) se agrupa con Nop-1 de *N. crassa* y Ops de *L. maculans*, y que la proteína de tipo ORP XP_381616 de *F. graminearum* se agrupa con otras proteínas de tipo ORP, incluyendo las asociadas al choque térmico. Estas proteínas carecen de la lisina que une covalentemente retinal, característica fundamental de las opsinas auténticas. La proteína CarO conserva esta lisina y presenta los aminoácidos clave para funcionar como bomba de protones. Esta asociación más a las ORP que a las auténticas opsinas sugiere un origen por tanto a partir de las primeras. Se puede conjeturar que XP_383240 (CarO en *F. fujikuroi*) proceda de una duplicación de una proteína de tipo ORP (XP_381616), de la cual evolucionó en la dirección de recuperar una función como fotoproteína. xxxxxxxx

Fig. C2.6. Árbol filogenético (método *neighbour joining*) de opsinas y ORPs representativas de hongos y arqueas. Cada proteína está nombrada con su código de acceso SPTREMBL y la abreviatura de la especie. Entre paréntesis se indica el nombre convencional. Um, *Ustilago maydis*; Hs, *Halobacterium salinarum*; Hsp, *Halobacterium sp*; Lm, *Laetiosphaeria maculans*; Nc, *Neurospora crassa*; Fg, *Fusarium graminearum*; Sc, *Saccharomyces cerevisiae*; Cv, *Coriolus versicolor*; Mg, *Magnaporthe grisea*; Ff, *Fusarium fujikuroi*. Se indican con asteriscos las proteínas incluidas en la comparación de secuencias de la Fig. C2.2. Se indican con estrellas las proteínas que no contienen la lisina conservada de unión a retinal.



Como ya se ha mencionado, el fenotipo del mutante nulo *carO*⁻ es indistinguible del fenotipo silvestre en las condiciones de laboratorio (Prado et al., 2004). Por tanto, el gen no parece jugar un papel relevante en el crecimiento vegetativo del hongo, al menos en las condiciones empleadas en el laboratorio.

De la correlación de *carO* con los genes estructurales *car* y de su estrecho ligamiento con ellos cabe deducir que la función de *carO* está relacionada con la luz, lo cual cuadra con su predecible función como fotorproteína, deducible de su estructura. Hay que tener en cuenta además que el presumible cromóforo de la opsina, el retinal, es un derivado de los carotenoides, lo cual da coherencia a la necesidad de una síntesis coordinada de la opsina y de las enzimas necesarias para las síntesis de su cromóforo. Este es el caso de la producción de bacteriorrodopsina en *H. salinarum*: la eliminación del gen *carY* en esta arquea, requerido para la síntesis de β -caroteno, da lugar a la pérdida simultánea de la producción de retinal y bacteriorrodopsina (Peck et al., 2002).

Los mutantes del gen *carO* no han proporcionado ninguna pista sobre la posible relación de esta opsina con la luz. Ninguna de las fotorrespuestas conocidas en *Fusarium*, como son la propia carotenogénesis o la esporulación (Prado et al., 2004), ni una fotorrespuesta recientemente identificada, la inhibición de la producción de fusarinas, se ven afectadas en estos mutantes (Prado et al., 2004). Se ha descrito también en *F. fujikuroi* una eficiente fotorreactivación tras daño por radiación UV (Avalos et al., 1985), pero esta fotorrespuesta no se ha investigado por ser de sobra conocida la proteína responsable (Jorns et al., 2002; Sancar et al., 2002a, 2002b).

La falta de papel del retinal, y por extensión de CarO en la fotoinducción de la carotenogénesis ya quedó patente al observar que los mutantes en el gen *carB* conservan su respuesta a la luz (Fernández-Martínez, 2000). El mismo argumento se empleó para descartar un papel del caroteno como cromóforo en el fototropismo en el zigomiceto *P. blakesleeanus*, una de las varias fotorrespuestas conocidas en este hongo (Corrochano y Cerda-Olmedo 1992). Esto no solo concuerda con la fotoinducción normal del gen *carB* a nivel de ARNm en los mutantes *carO*⁻ (Fig. C2.5), sino que además descarta a una eventual proteína con un retinoide de cofactor como responsable de la fotoinducción de la carotenogénesis en *F. fujikuroi*. Este dato concuerda con la probable función

función fotorreceptora de proteínas homólogas a las que forman el complejo White Collar en *N. crassa* (Froehlich et al., 2002; He et al., 2002), un papel recientemente confirmado en *P. blakesleeanus* para varias fotorrespuestas (Idnurm et al., 2006) y objeto de investigación actualmente en *F. fujikuroi* (A.F. Estrada, datos no publicados).

La similitud de CarO a proteínas de choque térmico (pertenecientes al grupo de las ORPs) nos llevó a sospechar un posible papel de esta proteína en la respuesta a este factor de estrés. Aunque los resultados muestran una cierta inducción a nivel de ARNm tanto de *carO* como de *carB* en respuesta a la subida de temperatura de 30°C a 42°C, el aumento es inferior al observado en genes de otros hongos asociados a esta respuesta (Mohsenzadeh et al., 1998). De hecho, el aumento es muy inferior al producido por la luz. Parece más lógico pensar que esta ligera inducción es un efecto indirecto. El efecto similar sobre *carO* y *carB* constituye una nueva evidencia de coregulación de *carO* con los genes estructurales de la carotenogénesis.

Una explicación a la ausencia de fenotipo de los mutantes *carO*⁻ puede ser la redundancia de función, una hipótesis tentadora por la existencia en *F. fujikuroi* de otra opsina (OpsA) cuya secuencia contiene la lisina presumiblemente encargada de unir retinal. Sin embargo, las dos opsinas de *F. fujikuroi* muestran considerables diferencias a nivel de secuencia, lo cual explica su ubicación en grupos separados en el árbol filogenético mostrado en la Fig. C2.6. Esta divergencia sugiere funciones diferentes para ambas proteínas, un hecho que solo podrá ser demostrado cuando se lleve a cabo la mutación dirigida de este segundo gen, *opsA*, por separado y en conjunción con la mutación *carO*⁻.

A la hora de hacer conjeturas sobre el posible papel biológico de CarO, debe someterse a consideración una eventual función tanto de CarO como de OpsA en otros aspectos del metabolismo de *F. fujikuroi*, como puede ser el mantenimiento del pH intra y extracelular. *Fusarium* es un hongo capaz de vivir en condiciones hipóxicas y anóxicas (Gunner y Alexander, 1964), bajo las cuales amonifica o denitrifica el medio alterando como consecuencia el equilibrio ácido-base. Ciertas ATPasas, bombas de protones activadas por ATP, juegan un papel importante en el control de este equilibrio. No descartamos que CarO u OpsA puedan jugar un papel en estos procesos en *Fusarium*, quizás también como bombas de protones.

Además de la neurosporaxantina, el producto final de la ruta, *F. fujikuroi* acumula pequeñas cantidades de β -caroteno (Avalos y Cerda-Olmedo, 1987), sustrato empleado por las enzimas conocidas capaces de sintetizar retinal. El descubrimiento de CarO y OpsA, y su presumible utilización de retinal como grupo prostético, implica la existencia de al menos una enzima responsable de su síntesis. El análisis de tal enzima y del gen responsable es objeto de atención en los capítulos 3 y 4.

Capítulo 3.

Caracterización del gen *carX*, que determina una proteína de la familia de las oxigenasas de carotenoides

Como ya se ha indicado en la introducción, los genes *carRA*, *carB* y *carO* se encuentran contiguos en el genoma de *F. fujikuroi* y comparten su regulación a nivel de ARNm (Prado et al., 2004). Puesto que predecimos la existencia de más genes asociados a esta ruta, parece probable que puedan estar ubicados en el entorno de esos tres genes, formando un agrupamiento génico de mayor tamaño. A fin de investigar esta posibilidad, se han analizado las secuencias adyacentes bajo la perspectiva de una posible conexión funcional con la ruta biosintética o el metabolismo de los carotenoides.

Resultados previos del grupo mostraron que en dirección 3' por detrás de *carO* se encuentra un marco abierto de lectura que determina una proteína similar a permeasas de amonio (Fernandez et al., 2000). El grupo de la Dra. Bettina Tudzynski, en la Universidad de Münster (Alemania), analizó la secuencia en dirección 5' por delante de *carRA* (Linnemanstöns et al., 2002), y encontró un marco abierto de lectura cuya similitud con otras proteínas nos ha permitido identificar sus extremos 5' y 3'. La secuencia de este gen, al cual llamamos *carX*, fue determinada en colaboración entre ambos laboratorios, a partir de ADN genómico en el laboratorio de Münster, y a partir de ADN complementario en esta Tesis. La secuencia fue depositada en las bases de datos bajo el código de acceso GenBank/EMBL AJ854252.

representativos en la Fig. C3.2. Varios miembros de esta familia catalizan reacciones de rotura oxidativa de diferentes carotenoides, dando lugar a apocarotenoides.

Hemos confeccionado un árbol filogenético con una colección representativa de proteínas de esta familia (Fig. C3.3). En este árbol se puede apreciar que CarX no se ubica en ninguno de los grupos de enzimas de función conocida, sugiriendo que se trata de una enzima perteneciente a una nueva subfamilia. El mayor parecido se encuentra en una enzima de *Streptomyces antibioticus*, probablemente implicada en la síntesis del antibiótico simociclinona (Galm et al., 2002).

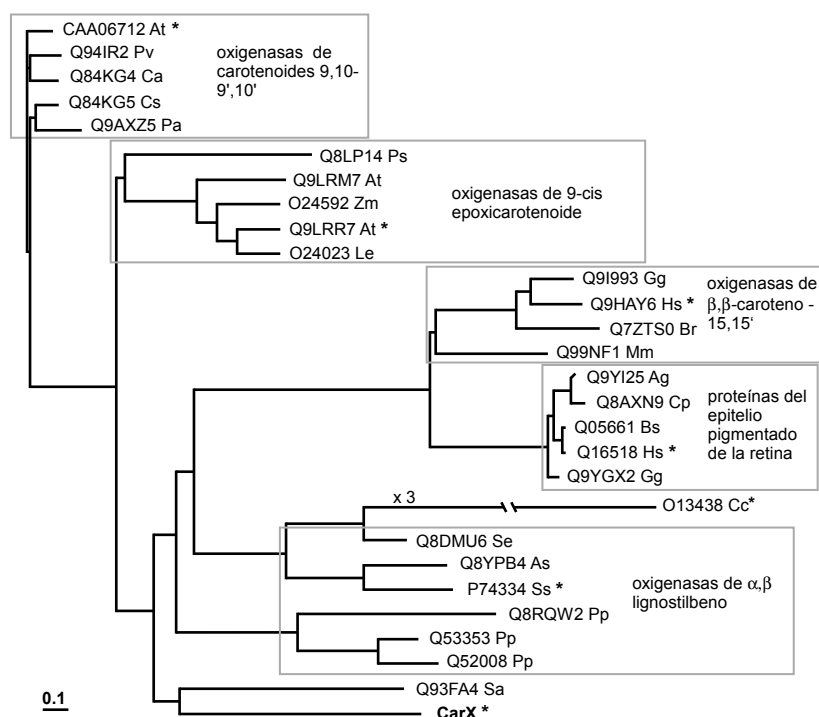


Fig. C3.3. Árbol filogenético (método *Neighbour joining*) de proteínas representativas de la familia de las oxigenasas de carotenoides. Cada proteína está nombrada con su código de acceso SPTREMBL y la abreviatura de la especie. Ag, *Ambystoma tigrinum*; As, *Anabaena sp.*; At, *Arabidopsis thaliana*; Br, *Brachydanio rerio*; Bs, *Bos taurus*; Ca, *Capsicum annuum*; Cc, *Coprinus cinereus*; Cp, *Cynops pyrrhogaster*; Cs, *Crocus sativus*; Gg, *Gallus gallus*; Hs, *Homo sapiens*; Le, *Lycopersicon esculentum*; Mm, *Mus musculus*; Pa, *Persea americana*; Pp, *Pseudomonas paucimobilis*; Ps, *Pisum sativum*; Pv, *Phaseolus vulgaris*; Sa, *Streptomyces antibioticus*; Se, *Synechococcus elongatus*; Ss, *Synechocystis sp.*; Zm, *Zea mays*. Los asteriscos indican las secuencias comparadas en la Fig. C2.3 La barra interrumpida es tres veces más larga de lo mostrado (marcada con "x3"). La barra de escala representa 0,1 sustituciones por sitio.

3.2. Transcripción de *carX*

La secuencia de *carX* y su ligamiento al agrupamiento génico sugiere una posible relación con la ruta biosintética de los carotenoides. Esta relación es reforzada por el análisis del efecto de la luz y las mutaciones de superproducción de carotenoides sobre los niveles de ARNm del gen *carX* (Thewes et al., 2005). El resultado (Fig. C3.4) mostró un claro paralelismo con los genes *carRA*, *carB* y *carO* en diferentes condiciones de cultivo y fondos genéticos (Prado et al., 2004), indicando la existencia de un mecanismo de regulación común para los cuatro genes. En particular, los niveles de ARNm de *carX* fueron casi indetectables en la estirpe silvestre incubada en la oscuridad y aparecieron en respuesta a la luz, alcanzando un máximo tras una hora de iluminación para disminuir en las horas siguientes, un proceso conocido como fotoadaptación, ya descrito en la Introducción. Aún más significativamente, los niveles de ARNm fueron elevados en la oscuridad en dos mutantes desregulados para la síntesis de carotenoides.

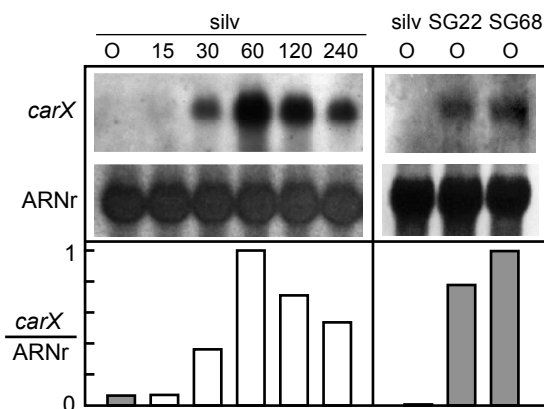


Fig. C3.4. Expresión de *carX*. Northern blot de ARN total de la estirpe silvestre IMI58289 (silv) y dos mutantes superproductores de carotenoides (SG22 y SG68) cultivados en oscuridad (O) o en luz durante el tiempo indicado (minutos). Se muestran las señales de ARNr como control de carga. Las barras mostradas bajo las hibridaciones muestran el cociente entre la intensidad de cada señal de ARNm y la de ARNr (Oscuridad: barras grises; luz: barras blancas). El valor más alto en cada hibridación se tomó como 1.

3.3. Función del gen *carX*

La clase de reacciones enzimáticas llevadas a cabo por las oxigenasas de carotenoides sugiere de inmediato una función para CarX en la ruta carotenogénica de *Fusarium*, ya que el último paso de esta ruta es la rotura oxidativa de toruleno para dar lugar a un apocarotenoide oxigenado, la neurosporaxantina. Aunque la naturaleza de esta reacción química difiere en sus detalles con las realizadas por otras enzimas de la misma familia (generación de un radical carboxilo en lugar de un radical aldehído), se decidió comprobar esta hipótesis investigando el efecto de la pérdida de función del gen *carX*.

Como parte de la colaboración ya citada, el grupo de la Dra. Tudzynski generó mutantes nulos del gen *carX* por reemplazamiento con un gen de resistencia a higromicina (*hygR*). Para ello transformaron la estirpe silvestre IMI58289 con un plásmido que contiene dicho gen rodeado por secuencias adyacentes a *carX* y seleccionaron transformantes que hubieran reemplazado el gen *carX* por el gen *hygR* mediante doble recombinación (Thewes et al., 2005).

3.4. Fenotipo de mutantes $\Delta carX$

El grupo de la Dra. Tudzynski proporcionó tres transformantes carentes del gen *carX*, que denominaron T2.1, T5.2 y T17.1, y cuyo fenotipo fue investigado en esta Tesis. Los tres mutantes mostraron un crecimiento y morfología similares a los de la estirpe silvestre (Fig. C3.5). Sin embargo, se apreciaron diferencias en la pigmentación, siendo ésta más intensa en la luz en los tres mutantes en comparación con la estirpe silvestre. También llamó la atención la presencia de una ligera pigmentación anaranjada en la oscuridad, ausente en la estirpe silvestre.

Se determinó la concentración de carotenoides en las cuatro estirpes, (tres mutantes y silvestre) cultivadas sobre agar en luz y oscuridad a dos temperaturas diferentes, 22°C y 30°C. Las diferencias de pigmentación se apreciaron externamente a ambas temperaturas, y correlacionaron con la acumulación de diferentes concentraciones de carotenoides en sus micelios,

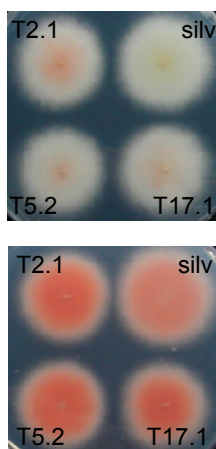


Fig. C3.5. Aspecto de la estirpe silvestre IMI58289 y tres mutantes $\Delta carX$. Las estirpes han sido cultivadas en oscuridad (panel superior) o en la luz (panel inferior) en medio mínimo durante 4 días a 30°C.

siendo éstas mayores en los mutantes en todas las condiciones de cultivo (Fig. C3.6). El incremento de la cantidad de carotenoides de los mutantes fue proporcionalmente más llamativo en oscuridad, donde se observó un incremento de unas 5 veces (T5.2 y T17.1) o 10 veces (T2.1) en relación a los valores en la estirpe silvestre. Cuando las estirpes se cultivaron en la luz, las diferencias fueron mayores a nivel de cantidad, pero no tanto en cociente, limitándose la diferencia a incrementos del 50% a 30°C y del doble a 22°C. El contenido de carotenoides de todas las estirpes fue mayor a 30°C que a 22°C en la oscuridad, un dato ya descrito anteriormente (Avalos y Cerdá-Olmedo., 1987). La mayor concentración de carotenoides en la luz a 30°C que a 22°C debe atribuirse a la mayor intensidad lumínica empleada a 30°C más que a la diferencia de temperatura. Para llevar a cabo un análisis más detallado de los carotenoides producidos por la estirpe silvestre y los mutantes, se escogieron las condiciones de iluminación por ser mayores las concentraciones de carotenoides y, por tanto, la fiabilidad del análisis. De forma análoga a la estirpe silvestre, los tres mutantes contienen una mezcla de carotenoides polares y no polares (Fig. C3.6A) tanto a 22°C como a 30°C. El espectro de la fracción polar de las cuatro estirpes es similar en forma y máximo de absorción, y coincide aproximadamente con el de la neurosporaxantina (Fig. C3.6B). El incremento en el contenido de carotenoides de los mutantes se debe principalmente a una mayor acumulación de carotenos neutros, correspondientes a los intermediarios de la ruta.

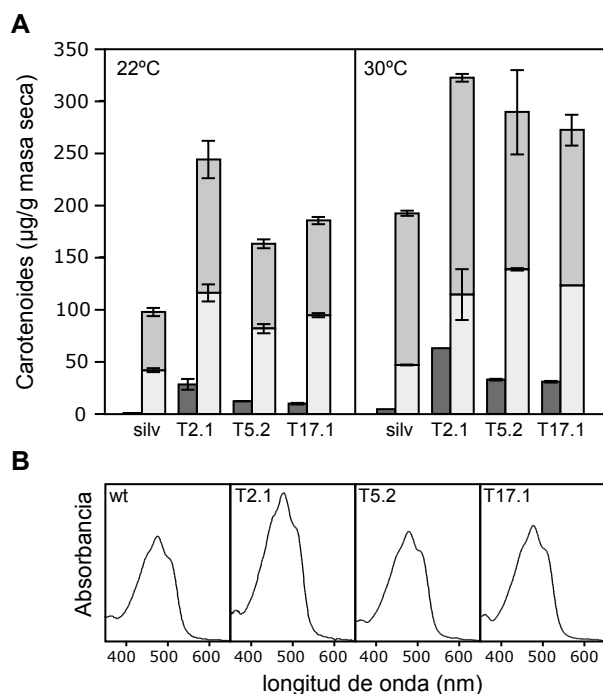
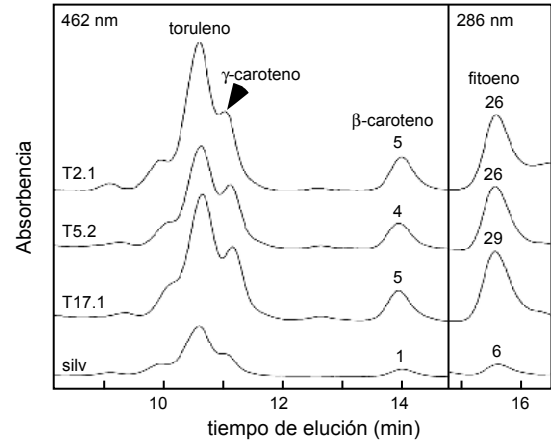


Fig. C3.6. Análisis de carotenoides de la estirpe silvestre IM158289 (silv) y tres mutantes *carX*. A. Contenido en carotenoides de las estirpes cultivadas en medio mínimo en oscuridad (barras gris oscuro) y luz (barras gris claro). Los datos de los cultivos iluminados representan la suma de los carotenos neutros (sección inferior de la barra) y los carotenos polares (sección superior de la barra). Cada barra representa la media de dos determinaciones. B. Espectro de absorción de la fracción polar de la estirpe silvestre y los tres mutantes cultivados en la luz a 30°C. La longitud de onda de absorción máxima de los cuatro espectros es aproximadamente 477 nm.

El análisis mediante HPLC de los carotenoides neutros acumulados por estas estirpes mostró un incremento de al menos cuatro veces en fitoeno y β -caroteno en los mutantes en relación a la estirpe silvestre (Fig. C3.7). Además, el pico de γ -caroteno fue más prominente en los cromatogramas de los mutantes, indicando un cociente mayor γ -caroteno/toruleno. La mayor proporción de fitoeno, β -caroteno y γ -caroteno sugiere una mayor actividad de sintasa de fitoeno y ciclasa, ambas actividades supuestamente determinadas por el gen bifuncional *carRA*.

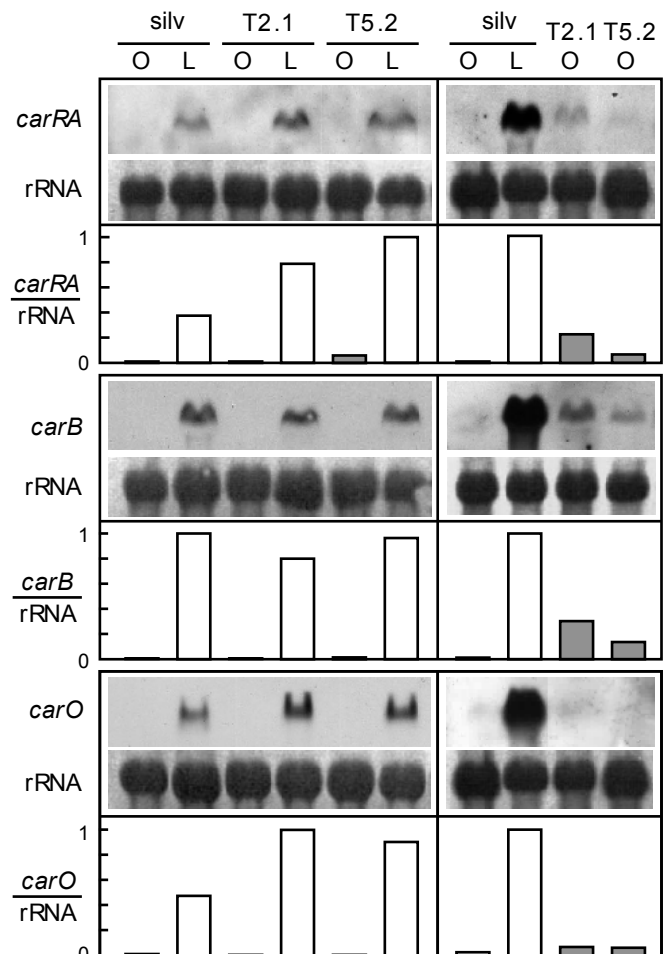
Fig. C3.7. Cromatogramas de HPLC de la fracción de carotenos neutros acumulados por la estirpe silvestre IMI58289 (silv) y los mutantes *carX*. Las estirpes se cultivaron a 30°C en la luz (absorción a 462 nm para los carotenos coloreados y 286 nm para el fitoeno).



3.5. Expresión de los genes *car* en los mutantes *carX*

Investigamos la expresión de los genes *carRA*, *carB* y *carO* en la estirpe silvestre y en dos de los mutantes $\Delta carX$ (Fig. C3.8). Las tres estirpes contuvieron cantidades muy bajas de ARNm de estos genes en la oscuridad, y cantidades mucho mayores tras una hora de iluminación. El análisis cuantitativo de las señales de los tres genes en las estirpes investigadas mostró mayores niveles para *carRA* y *carO* en los dos mutantes en la luz, pero no para *carB* (Fig. C3.8, recuadros de la izquierda). Aunque las diferencias observadas

Fig. C3.8. Expresión de los genes *carRA*, *carB* y *carO* en los mutantes *carX*. Los Northern blots mostrados están realizados con ARN total de la estirpe silvestre IMI58289 (silv) y dos mutantes $\Delta carX$, cultivados en la oscuridad (O) o expuestos a la luz (L) durante una hora. Los paneles a la izquierda muestran el resultado de exposiciones cortas para una mejor apreciación de las diferencias en expresión. Los paneles de la derecha muestran exposiciones largas de las señales en la oscuridad de la izquierda y la de la estirpe silvestre en la luz como control de sobreexposición. Las señales de ARNr se utilizan como control de carga. Las barras bajo los paneles muestran los cocientes entre las intensidades de las señales de los genes indicados y las señales de ARNm (oscuridad: barras grises; luz: barras blancas). Los valores se representan en relación al cociente máximo en cada panel, tomado como 1. La intensidad de las señales fue estimada mediante densitometría.



no fueron muy importantes, correlacionan con el incremento de fitoeno y carotenos ciclados en los cromatogramas de los mutantes (Fig. C3.7).

La sobreexposición de las membranas obtenidas en estos experimentos de *Northern* sobre las películas permitió detectar niveles apreciables de ARNm de *carRA* y *carB* en el micelio de los mutantes cultivados en la oscuridad, pero no en el de la estirpe silvestre (Fig. C3.8, paneles de la derecha). Este dato correlaciona con el incremento en carotenoides en la oscuridad observada en los mutantes $\Delta carX$. Esta diferencia no se apreció, sin embargo, para el gen *carO*, aunque los cambios de expresión de este gen no se espera que tengan consecuencias sobre la ruta carotenogénica.

3.6. Discusión

En este capítulo hemos descrito el gen *carX*, situado en la región 5' anterior al gen *carRA* y orientado de forma divergente a éste último. *carX* determina una proteína cuya secuencia la identifica como miembro de la familia de las oxigenasas de carotenoides. La mayoría de los miembros de esta familia llevan a cabo reacciones de corte oxidativo de carotenoides. La comparación de su secuencia con las de enzimas de esta familia investigadas en detalle a nivel bioquímico muestra que CarX conserva las cuatro histidinas que coordinan el átomo de Fe²⁺ del centro activo de este tipo de enzima. Por tanto, CarX presenta características que sugieren que se trata de una enzima funcional, capaz de llevar a cabo una reacción de corte oxidativo de un carotenoide.

El análisis filogenético no coloca a CarX dentro de ninguno de los grupos bien establecidos de oxigenasas de carotenoides, lo que dificulta hacer predicciones más concretas sobre la reacción enzimática que cataliza. Su pertenencia a una subfamilia diferente sería coherente con una actividad enzimática distinta a las descritas hasta la fecha, como podría ser el corte oxidativo del toruleno, cuya enzima responsable no ha sido identificada. Este hecho, unido al ligamiento de *carX* a los genes necesarios para producir toruleno desde pirofosfato de geranilgeranilo (*carRA* y *carB*), y a compartir con ellos una misma regulación a nivel de ARNm (Linnemanstöns et al., 2002; Prado et al., 2004), hacen que su función como enzima responsable de la conversión de toruleno en neurosporaxantina sea una hipótesis muy tentadora. La existencia de un gen responsable de este paso enzimático fue puesto en evidencia por la identificación de mutantes que acumulan toruleno (Avalos y Cerda-Olmedo., 1987). Uno de ellos, denominado SG68, fue tomado como referencia de este fenotipo y de base para la denominación genética del gen responsable, *carT*. En consecuencia, de ser cierta la citada hipótesis, los mutantes del gen *carX* deberían tener el fenotipo de SG68, visible externamente por una característica pigmentación rojiza resultante de la acumulación de toruleno en lugar de neurosporaxantina. Sin embargo, los mutantes *carX* descritos en este capítulo conservan la capacidad de sintetizar neurosporaxantina y su pigmentación, como en la estirpe silvestre, es anaranjada. El gen que denominamos *carX* no es, por tanto, *carT*. Esta conclusión fue reafirmada por la posterior identificación del auténtico gen *carT*, descrita en el Capítulo 5 de esta Tesis.

La información disponible sobre *carX*, su hipotética función como gen de una oxigenasa de carotenoides y su corregulación con los genes *carRA*, *carB* y *carO*, son aún pistas muy significativas sobre su posible papel biológico. Los genes *car* investigados proporcionan una segunda hipótesis tan sugerente como la anterior. Como ya se indicó en la Introducción, las opsinas utilizan retinal como grupo prostético. Las características de la hipotética opsina determinada por el gen *carO* sugiere que muy probablemente necesita retinal para llevar a cabo su función (Capítulo 2 de resultados; Prado et al., 2004). La capacidad para ligar retinal ha sido demostrada *in vitro* para la opsina determinada por un gen similar en *N. crassa*, *nop-1* (Bieszke et al., 1999a). Parece lógico pensar que si *carO* necesita retinal, esta molécula la sintetice una enzima cuyo gen comparta su regulación con la de *carO*. Por tanto, es plausible que la función de CarX sea producir retinal por rotura oxidativa de un carotenoide precursor. Son varias las enzimas conocidas de la familia de las oxigenasas de carotenoides responsables de la producción de retinal por rotura oxidativa de β-caroteno, precursor que se encuentra presente en *F. fujikuroi*.

De ser cierta esta hipótesis, el fenotipo de los mutantes $\Delta carX$ debería coincidir con el del mutante $carO$. Los mutantes de este gen no dan lugar a ninguna alteración fenotípica en condiciones de laboratorio (Prado et al., 2004). Sin embargo, la pérdida del gen $carX$ produce un sensible incremento en los niveles de carotenoides, una alteración detectable externamente y reflejada en cambios en los niveles de ARNm. Concluimos que la mutación $carX$ tiene consecuencias en la regulación de la ruta biosintética en su conjunto. En el contexto de la hipótesis planteada, este hecho puede tener al menos dos causas: (1) el retinal es una señal reguladora y su ausencia induce la ruta, y (2) el retinal es usado como grupo prostético por al menos una segunda proteína, que pierde su función en su ausencia y da lugar al fenotipo observado. En apoyo de la segunda opción, ya se hizo mención en el Capítulo anterior de la existencia en *F. fujikuroi* al menos un segundo gen para una supuesta opsina potencialmente capaz de ligar retinal (Alejandro F. Estrada, datos no publicados). Cabe pensar, por tanto, que el fenotipo de la mutación $carX$ se deba a la pérdida de función de esta segunda opsina, actualmente en estudio en el mismo grupo de investigación.

El fenotipo manifestado por los mutantes $\Delta carX$ puede tener su causa también en un posible papel regulador de la propia proteína CarX. Hasta ahora se han descrito tres agentes causantes de incremento de la producción de carotenoides en *F. fujikuroi*: la luz (Avalos y Cerdá-Olmedo, 1987; Avalos y Schrott, 1990), las mutaciones en el gen $carS$ (Avalos y Cerdá-Olmedo, 1987) y la pérdida del gen $carB$ (Fernández-Martín et al., 2000). El tercero de ellos, interpretado como resultado de un mecanismo de retroinhibición por producto final, se caracteriza por un incremento de cinco veces en el contenido de carotenoides y solo se manifiesta en la luz (Fernández-Martín et al., 2000; A. F. Estrada, datos no publicados). Ninguno de estos tres fenómenos regulatorios es aparentemente asociable al fenotipo mostrado por los mutantes $carX$, que produce un incremento moderado de la carotenogénesis, tanto en luz como en oscuridad.

El análisis químico de los carotenoides acumulados en la luz por las estirpes estudiadas muestra un enriquecimiento en fitoeno, β -caroteno y γ -caroteno en los mutantes $\Delta carX$, lo que sugiere un incremento relativo de las actividades sintasa de fitoeno y ciclasa de caroteno (dependientes de CarRA) respecto a la actividad desaturasa (CarB). Es interesante resaltar que este resultado concuerda con el sensible incremento observado en los niveles de ARNm de $carRA$ pero no de $carB$ en los mutantes $carX$ en la luz. Es también un hecho a resaltar que la mutación $carX$ en la luz aparentemente solo afecta a $carRA$, mientras que en la oscuridad se observa que la mutación $\Delta carX$ afecta también a la expresión de $carB$. Aunque no tiene aparentes consecuencias sobre la ruta biosintética, también parece haber diferencias en el efecto de la mutación $carX$ sobre los niveles de ARNm del gen $carO$ en la luz y en la oscuridad. La falta de información sobre los mecanismos de regulación a nivel molecular de la carotenogénesis por la luz nos impiden proponer explicaciones a estas diferencias.

Si la función de $carX$ fuera sintetizar retinal, cabría esperar que la regulación de dicha síntesis mostrara peculiaridades independientes de las necesidades de regulación de la síntesis de neurosporaxantina. Así, en oscuridad, un nivel bajo de expresión de los genes car debe dar lugar a un nivel bajo de opsina, que necesitará un nivel bajo de retinal. La pérdida de $carX$ daría lugar a la pérdida completa de retinal; en ese caso, el incremento en la síntesis de carotenoides en

la oscuridad podría ser el resultado de una respuesta regulatoria encaminada a intentar suplir la ausencia de retinal en la célula. De acuerdo con dicha hipótesis, existiría por tanto un mecanismo de retroinhibición en el que el retinal actuaría de señal represora una vez que todas las opsinas dispongan de retinal y se empiece a acumular retinal libre en la célula.

Cabe concebir, finalmente, una hipótesis alternativa: el aumento de carotenoides en el mutante *carX* podría ser una consecuencia indirecta de su no conversión en retinal. Ello implicaría que la fuente de retinal no sería solo el β -caroteno, sino también el γ -caroteno u otro intermediario de la ruta, ya que el primero constituye una rama lateral en la ruta biosintética de neurospora-xantina. En contra de esta hipótesis, (1) no se esperaría que este efecto tuviera consecuencias a nivel de regulación de ARNm (2) el aumento de carotenoides en la luz no debería incluir el fitoeno. Sin embargo, no podemos descartar que este efecto sea parcialmente responsable de la mayor acumulación de carotenoides en los mutantes $\Delta carX$.

Algunas de las hipótesis planteadas se basan en atribuir a *carX* una actividad enzimática de síntesis de retinal. Para establecer si ésta hipótesis es correcta, se decidió investigar la actividad de la proteína CarX a nivel bioquímico. Los resultados se muestran en el siguiente capítulo.

Capítulo 4.

Determinación de la actividad enzimática de la proteína CarX: síntesis de retinal

Como ya se ha descrito en el capítulo anterior, la similitud de la proteína determinada por el gen *carX* con enzimas de la familia de las oxigenasas de carotenoides sugiere una posible actividad de corte oxidativo de un carotenoide de la ruta de *F. fujikuroi*. Para comprobar esta posible función, se siguieron dos estrategias: por un lado se expresó una copia de ADNc de *carX* en células de *E. coli* productoras de licopeno o β -caroteno para analizar su comportamiento *in vivo*; por otro lado se expresó y purificó la proteína CarX para realizar ensayos *in vitro*. Los resultados indican que CarX corta β -caroteno para producir retinal.

4.1. La expresión de *carX* en células de *E. coli* altera el fenotipo cuando estas acumulan β -caroteno

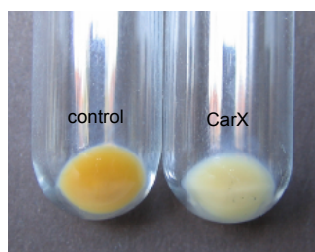


Fig. C4.1. Aspecto de los precipitados de dos cultivos de *E. coli* que contienen los genes de la síntesis de β -caroteno y el gen *carX* de *F. fujikuroi*. A la derecha, el gen *carX* se expresó en la orientación correcta. A la izquierda, se empleó una construcción con el gen *carX* en sentido contrario al promotor.

Los experimentos de expresión de *carX* *in vivo* no permitieron detectar ningún producto de corte en células de *E. coli* productoras de licopeno, pero sí mostraron la formación de un producto nuevo en células productoras de β -caroteno. El resultado fue patente a simple vista, ya que se apreció una fuerte decoloración del cultivo (Fig. C4.1) que delató la desaparición de una elevada proporción del β -caroteno presente en las células. El consiguiente análisis químico de los carotenoides acumulados (Fig. C4.2) confirmó el descenso en β -caroteno y la aparición de dos nuevos productos. Tanto el pico “b” como el “c” mostraron un espectro de absorción muy similar al del retinol (máxima absorción a 325 nm). Sin embargo, mientras que el pico “b” mostró el mismo tiempo de retención en la columna que retinol comercial, la fracción correspondiente al pico “c” mostró un tiempo de retención mayor. Esta fracción es muy posiblemente un producto de esterificación del primero, modificación química que no alteraría de forma significativa el espectro de absorción, pero sí sus propiedades químicas en relación a su comportamiento en la columna.

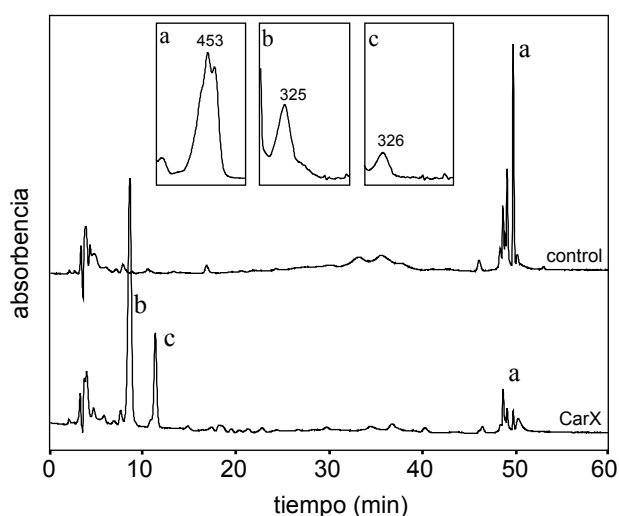


Fig. C4.2. Análisis de los carotenoides presentes en cultivos de *E. coli* que contienen los genes de la síntesis de β -caroteno y el gen *carX* de *F. fujikuroi*. A. Se muestran los cromatogramas a 325 nm de los productos separados por HPLC tras su extracción de un cultivo que expresa el gen *carX* en la dirección correcta (cromatograma inferior) o en dirección contraria (cromatograma superior). Los espectros (300-550 nm) y longitud de onda de absorción máxima de los picos relevantes se muestran en los recuadros internos.

4.2. Los cultivos de *E. coli* productores de β -caroteno que expresan *carX* contienen retinal

Los resultados descritos en el apartado anterior sugieren que la enzima CarX corta el β -caroteno para producir dos moléculas de retinol, el cual es posiblemente esterificado. El β -caroteno, por tanto, sería cortado en el doble enlace 15,15', de forma similar a como actúan otras enzimas de esta familia. Sin embargo, el retinol y su subproducto son apocarotenoles, mientras que los productos de las oxigenasas de carotenoides conocidas son apocarotenales, retinal en el caso de que el sustrato sea el β -caroteno. Una explicación a esta diferencia es que el radical alcohol sea el resultado de una modificación

posterior del radical aldehído, de forma que el retinal sea el verdadero producto de la actividad de CarX y que el retinol detectado sea resultado del metabolismo de *E. coli*. De esta forma, el grupo aldehído del retinal sería primero oxidado y luego esterificado, según se ha descrito anteriormente (von Lintig y Vogt, 2002).

Para comprobar esta hipótesis, se extrajeron con hidroxilamina los carotenoides producidos en el ensayo *in vivo* (Landers et al., 1988; Kiefer et al., 2001). Este compuesto nitrogenado reacciona con los grupos aldehído libres (Fig. C4.3), como el presente en un apocarotenal, dando lugar a un incremento en la longitud de onda de máxima absorción por agrandamiento del cromóforo. Una consecuencia adicional esperable de esta modificación química es un aumento en el tiempo de retención en la separación en HPLC.

En el caso del retinal, se espera que la reacción con hidroxilamina de lugar a retinil oxima (Fig. C4.3). La longitud de onda de máxima absorción y el tiempo de retención en HPLC de este compuesto son conocidos, y como ya se adelantado, mayores que los mostrados por el retinal. El análisis por HPLC tras tratamiento con hidroxilamina de los carotenoides producidos en el ensayo *in vivo* de expresión de *carX* en células de *E. coli* productoras de β -caroteno mostró la aparición de un nuevo pico con las características esperadas de la retinil oxima (pico "c", Fig. C4.4), indicando que además de retinol había cantidades apreciables de retinal en el cultivo.

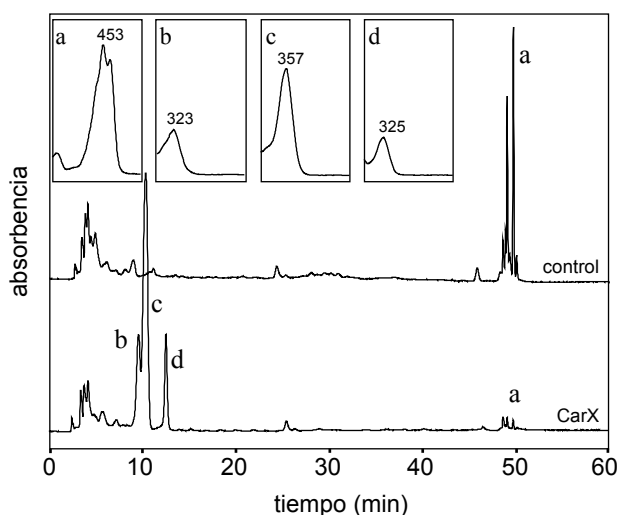


Fig. C4.4. Tratamiento con hidroxilamina de los carotenoides presentes en los cultivos de *E. coli* productoras de β -caroteno que expresan el gen *carX* de *F. fujikuroi*. Se muestran los cromatogramas a 325 nm de los productos separados por HPLC tras su extracción de un cultivo que expresa el gen *carX* en la dirección correcta (cromatograma inferior) o en dirección contraria (cromatograma superior) y su tratamiento con hidroxilamina. Los espectros (300-550 nm) y longitud de onda de absorción máxima de los picos relevantes se muestran en los recuadros internos.

El bajo contenido en retinal del cultivo de *E. coli* analizado puede tener también su causa en la interacción del primero con proteínas bacterianas, con las cuales puede formar enlaces covalentes, impidiendo su accesibilidad en el proceso de extracción y su posterior visualización en HPLC. El retinal ligado covalentemente a proteínas es liberado en presencia de formaldehído (Fig. C4.5). El análisis por HPLC de las muestras de carotenoides extraídas en presencia de formaldehído mostró dos picos (Fig. C4.6), ambos con el máximo de absorción correspondiente al retinal. El espectro del pico "b" mostró un hombro (indicado con una flecha) a una longitud de onda que coincide aproximadamente con la

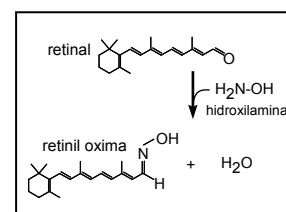


Fig C4.3. Reacción química del retinal con hidroxilamina.

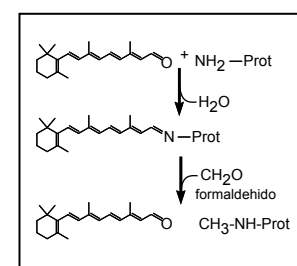


Fig. C4.5. Formación y destrucción del enlace llamado "base de Schiff" entre el retinal y el grupo amino de una lisina perteneciente a una proteína. La rotura del enlace se produce por la adición de formaldehído. Nótese que el retinal no es modificado por la adición de este compuesto.

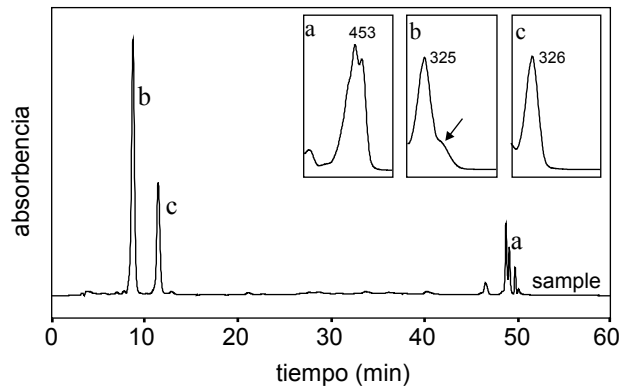


Fig. C4.6. Tratamiento con formaldehído de los carotenoides presentes en los cultivos de *E. coli* productores de β -caroteno que expresan el gen *carX* de *F. fujikuroi*. Se muestra el cromatograma a 325 nm de los productos separados por HPLC tras el tratamiento. Los espectros (300-550 nm) y longitud de onda de absorción máxima de los picos relevantes se muestran en los recuadros internos. La flecha en el recuadro b señala el hombro citado en el texto.

longitud de onda de máxima absorción del retinal. Es plausible que se trate de este compuesto, ya que el retinal y el retinol presentan el mismo tiempo de retención. De nuevo, el pico "c" puede corresponder a una fracción de retinol esterificado.

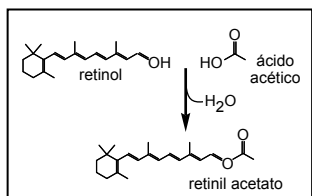


Fig. C4.7. Reacción de acetilación del retinol.

Los resultados descritos sugieren que la expresión de *carX* en la estirpe de *E. coli* productora de β -caroteno da lugar a la formación de retinal, el cual es posteriormente oxidado a retinol. La identificación como retinol del compuesto correspondiente al pico "b" en las Fig. C4.2, C4.4 y C4.6 se basó en sus propiedades cromatográficas. En busca de nuevos apoyos a esta identificación, se llevaron a cabo ensayos químicos adicionales. Una prueba muy sencilla se basa precisamente en la posibilidad de esterificar el grupo alcohol. De ser retinol, podrá reaccionar con ácido acético y formar acetato de retinol, (Fig. C4.7), el cual mostraría un tiempo de retención diferente en la separación por HPLC. En ese caso, el hombro interpretado como retinal en la Fig. C4.6 (espectro del pico "b", indicado por una flecha) quedaría libre, ya que éste no es susceptible de sufrir esta reacción.

El análisis por HPLC de los carotenoides presentes en el cultivo que expresa *carX* y sometidos a la reacción de acetilación (Fig. C4.8) confirmó estas predicciones. Efectivamente, se observa que el pico arriba mencionado se retrasa, pasando a tener un espectro y un tiempo de retención igual al pico "c" de las Fig. C4.2 y C4.6 y al pico "d" de la Fig. C4.4. Esta identidad entre

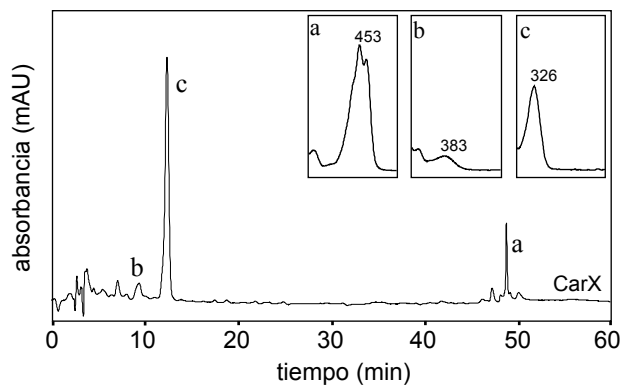


Fig. C4.8. Tratamiento con ácido acético de los carotenoides presentes en los cultivos de *E. coli* productores de β -caroteno que expresan el gen *carX* de *F. fujikuroi*. Se muestra el cromatograma a 325 nm de los productos separados por HPLC tras el tratamiento. Los espectros (300-550 nm) y longitud de onda de absorción máxima de los picos relevantes se muestran en los recuadros internos.

espectros y tiempo de retención no solo apoya la identidad del retinol, sino que indica además que el compuesto interpretado más arriba como un producto de esterificación del retinol es acetato de retinol. Como cabía esperar, fue visible en este caso un pequeño pico atribuible a retinal (pico "b", Fig. C4.8), que en el apartado anterior podía solo intuirse por un hombro en el espectro del pico "b" (Fig. C4.6).

4.3. Producción de retinal libre *in vivo*

Dos líneas de evidencia diferentes permitieron demostrar la presencia de retinal en el cultivo de *E. coli* productor de β -caroteno que expresa *carX*, sugiriendo que este compuesto es el origen del retinol detectado en las muestras. Por un lado, como ya se mencionó en el apartado 4.2, la repetición de experimentos como el representado en la Fig. C4.2 mostró una variabilidad en las proporciones de los apocarotenoides producidos. En algunos casos, como el mostrado en la Fig. C4.9, el espectro de absorción del pico con 10 min de retención (pico b) corresponde básicamente a retinal y no a retinol. La interpretación de este resultado es que algunas de las muestras obtenidas en el experimento contuvieron una cantidad proporcionalmente más elevada de retinal que de retinol, ya sea por una menor oxidación de retinal o por una esterificación más eficiente del retinol producido (pico c). Desconocemos las razones de esta variabilidad en la proporción retinal/retinol, inesperada al tratarse de la misma estirpe, condiciones cultivo y proceso analítico. La segunda evidencia se describe en el apartado siguiente.

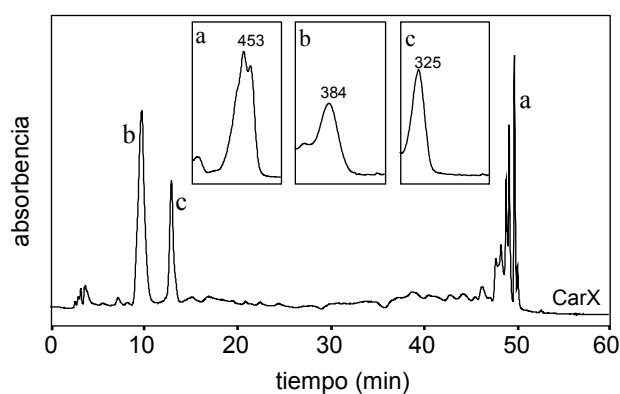


Fig. C4.9. Ejemplo de repetición del experimento mostrado en la Fig. C4.2. Se muestran el resultado del mismo análisis de HPLC. En este caso, el pico "b" posee una longitud de onda de absorción máxima atribuible a retinal.

4.4. Espectrometría de masas del producto de *CarX in vivo*

Para confirmar la identidad química del retinal, los carotenoides producidos en el experimento descrito en la Fig. C4.9 se separaron en cromatografía de capa fina (TLC) y la fracción correspondiente al retinal se purificó y se sometió a análisis mediante cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS), utilizando retinal comercial como control.

El producto aislado del cultivo de *E. coli* y el retinal mostraron los mismos tiempos de retención y, como puede verse en la Fig. C4.10, espectros de masas equivalentes, que coincidieron además con el espectro del retinal de la base de datos NIST Mass Spectral Search Program Version 2.0 (National Institute of Standards and Technology, EE.UU) y con espectros ya publicados (Ruch et al.,

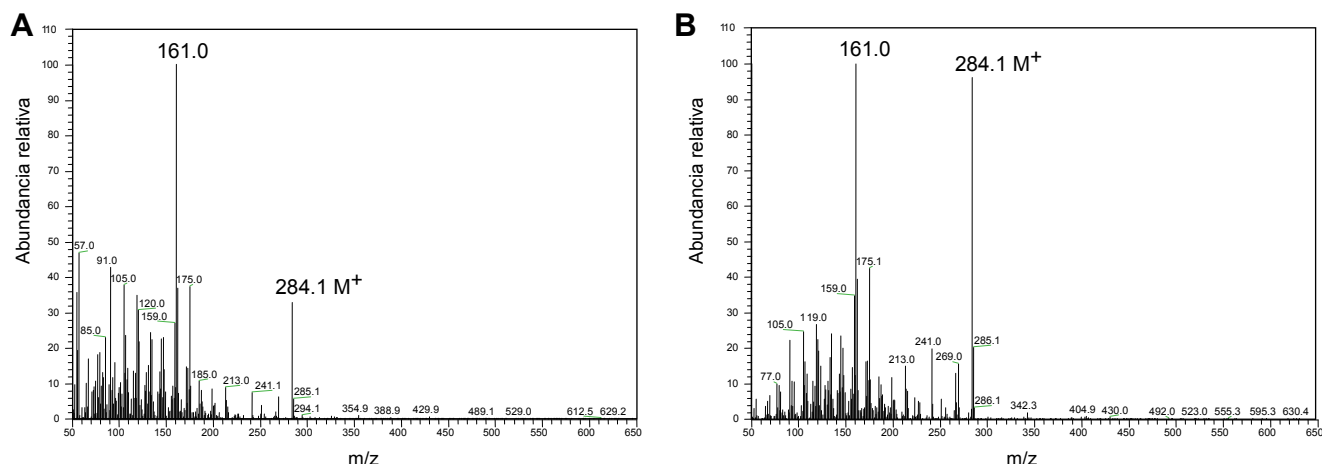


Fig. C4.10. Cromatograma CG/EM de la muestra de presunto retinal presente en el cultivo de *E. coli* que expresa el gen *carX*. A. Espectro del compuesto correspondiente al pico "b" en la Fig. C4.9. B. Espectro del retinal.

2005; Scherzinger et al., 2006). El espectro incluye la presencia del ion característico de $m/z = 284$ y el fragmento típico de $m/z = 161$, indicativo de la pérdida del anillo de ionona del ion parental. Los datos descritos sugieren fuertemente que las células de *E. coli* que expresan el gen *carX* cortan β -caroteno para producir retinal.

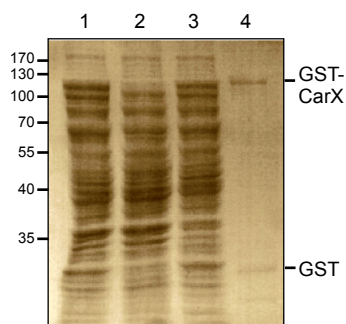


Fig. C4.11. Expresión y purificación de la proteína CarX. SDS-PAGE del extracto total de *E. coli* expresando GST-CarX (carril 1), el correspondiente control, expresando GST (carril 2), proteínas solubilizadas conteniendo GST-CarX (carril 3) y GST-CarX purificada por glutatión-sefarosa y eluida con glutatión (carril 4).

4.5. Actividad *in vitro* de la proteína CarX

Para investigar la actividad enzimática de la proteína CarX, se expresó el gen *carX* fusionado a un gen de transferasa de S-glutatión (GST) en una estirpe apropiada de *E. coli*. La correspondiente proteína de fusión CarX-GST producida por la bacteria se purificó (Fig. C4.11) y se utilizó en ensayos *in vitro* con β -caroteno como sustrato. El análisis mediante HPLC mostró que dicha incubación da lugar a la aparición de cantidades significativas de retinal, ausente en incubaciones control (Fig. C4.12). Experimentos hechos en paralelo en presencia de licopeno no permitieron detectar ningún producto, indicando la

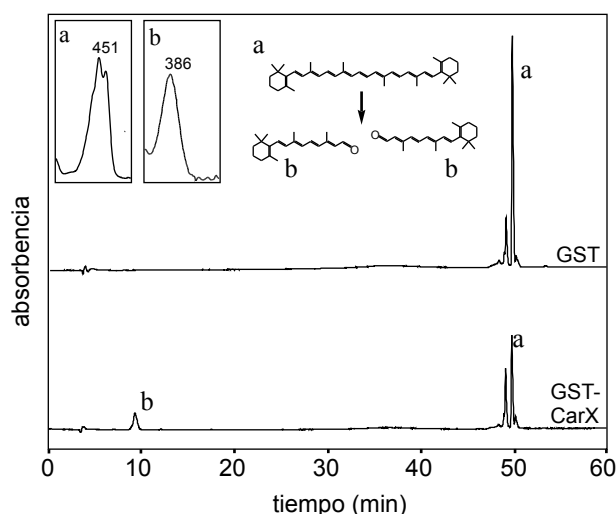


Fig. C4.12. Actividad *in vitro* de CarX sobre β -caroteno. Análisis por HPLC de los productos resultantes de la incubación de β -caroteno en ausencia de CarX (GST) o en presencia de 1,1 $\mu\text{g/ml}$ de CarX (GST-CarX). Los recuadros interiores muestran el espectro de los picos relevantes y su interpretación: β -caroteno (a); retinal (b). La longitud de onda (nm) de absorción máxima de cada carotenoide se indica en el espectro (350-550 nm). Se muestra en el recuadro superior la reacción de corte propuesta.

necesidad de un anillo β -ionona en el sustrato.

Recientemente se ha descrito que la enzima SynACO (ver apartado 3.3.1 en Introducción) corta apocarotenoides de diferente longitud de cadena en el doble enlace central 15,15', produciendo en todos los casos una molécula de retinal y un supuesto fragmento de tamaño variable (Ruch et al., 2005). Para investigar la capacidad de CarX de producir retinal a partir de apocarotenales, se hicieron ensayos *in vitro* con β -apo-8'-carotenal (C30) como sustrato. El análisis mediante HPLC de los carotenoides resultantes de esta incubación muestran de nuevo la aparición de retinal, indicando la capacidad de CarX para reconocer también este sustrato (Fig. C4.13).

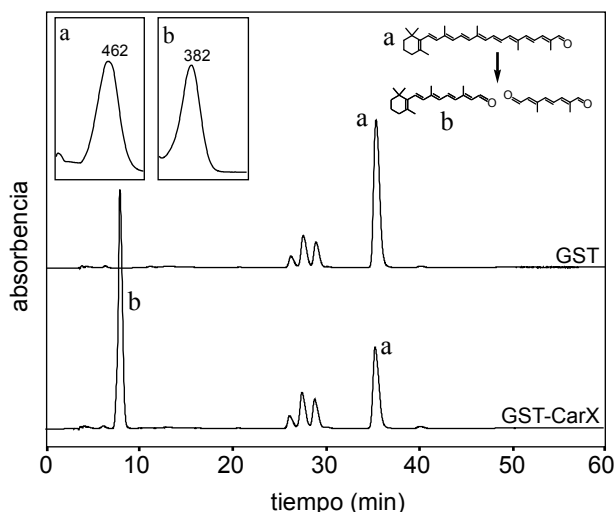


Fig. C4.13. Actividad *in vitro* de CarX sobre β -apo-8'-carotenal. Análisis por HPLC de los productos resultantes de la incubación de β -apo-8'-carotenal en ausencia de CarX (GST) o en presencia de 1,1 μ g/ml de CarX (GST-CarX). Los recuadros interiores muestran el espectro de los picos principales y su interpretación: β -apo-8'-carotenal (a); retinal (b). La longitud de onda (nm) de absorción máxima de cada carenoide se indica en el espectro (350-550 nm). Se muestra a la derecha la reacción de corte propuesta.

4.6. Relación entre la producción de retinal y el fenotipo de los mutantes *carX*

Como ya se ha descrito, los mutantes *carX* acumulan más carotenoides que la estirpe silvestre tanto en luz como en oscuridad (Capítulo 3; Thewes et al., 2005). Se ha propuesto en la discusión del capítulo anterior que este fenotipo, presuntamente regulatorio, puede ser causado por la falta de retinal, que podría ejercer así de señal regulatoria. Para comprobar esta hipótesis, se cultivó la estirpe silvestre y un mutante $\Delta carX$ en medio mínimo suplementado con retinal y ácido retinoico (ambos a 0,75 mM). Para facilitar el acceso de estos retinoides a la célula, se añadieron al medio disueltos en etanol y emulsionados con un detergente (tween-80), condiciones empleadas previamente para investigar el efecto de la vitamina A (en forma de acetato de retinol) o la β -ionona (apocarotenoides) en la estirpe silvestre (Avalos y Cerdá-Olmedo, 1986). El experimento se realizó a 22°C en oscuridad, condiciones en las que la diferencia en la producción de carotenoides entre la estirpe silvestre y los mutantes *carX* es proporcionalmente mayor.

Los resultados de este experimento (Fig. C4.14) muestran un aumento en las concentraciones de carotenoides tanto en la estirpe silvestre como en el mutante $\Delta carX$ en presencia de retinal o de ácido retinoico, pero también en presencia de

las mismas concentraciones de etanol y detergente empleados para su solubilización. El resultado del experimento sugiere que la presencia de estos retinoides no tiene consecuencias relevantes sobre la regulación de la síntesis de carotenoides en *F. fujikuroi*, tanto en la estirpe silvestre como en el mutante carente de actividad CarX.

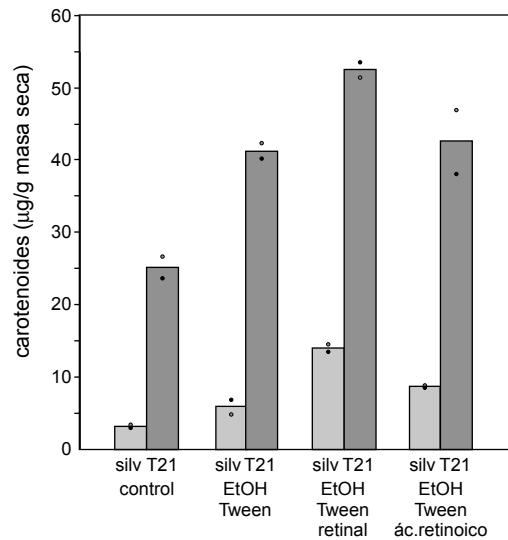


Fig. C4.14. Concentraciones de carotenoides en el micelio de la estirpe silvestre IMI58289 (silv) y el mutante $\Delta carX$ T2.1. Las estirpes se incubaron siete días en la oscuridad a 22°C en medio mínimo en presencia de los compuestos que se indican. Se representa la media de dos medidas, indicadas por puntos.

4.6. Discusión

En este capítulo se han empleado varias estrategias experimentales para demostrar que la proteína CarX es una oxigenasa de carotenoides que cataliza la reacción de corte de β -caroteno para producir retinal. Aunque los cultivos de *E. coli* productores de β -caroteno no mostraron una coloración muy intensa, la expresión del gen *carX* en estas células dio lugar a la pérdida de la pigmentación amarilla característica del β -caroteno, un cambio particularmente visible cuando las células se precipitan por centrifugación. Tal pérdida de color no fue resultado de la desaparición de los carotenoides, sino de su conversión en carotenoides de menor tamaño que absorben a longitudes de onda fuera del visible. Tal es el caso del retinol, retinil ester y retinal, detectados a concentraciones variables en estos experimentos, pero cuyos máximos de absorción por debajo de 400 nm les impiden dar color al cultivo.

Especialmente relevante fue la confirmación de la presencia de retinal en este cultivo de *E. coli*. Su naturaleza química quedó sólidamente demostrada mediante la comparación con retinal comercial por varias técnicas diferentes, incluyendo su patrón de separación en HPLC, su espectro de absorción y su cromatograma CG-EM. La presencia de retinol y retinil ester fue verificada también por su patrón de elución en HPLC y su espectro. En el caso del retinol, se confirmó además la naturaleza química del grupo alcohol mediante esterificación.

En contraste con la decoloración producida en células de *E. coli* productoras de β -caroteno, no se observó cambio de color como resultado de la expresión de *carX* en un cultivo productor de licopeno. Una actividad baja de la enzima sobre este sustrato posiblemente no se vería reflejada en el color del cultivo, pero en los cromatogramas de HPLC no se detecta la menor traza de ningún carotenoide nuevo, sugiriendo muy baja o nula eficiencia de CarX para cortar licopeno. Resultados similares se obtuvieron con la enzima BCO-I humana, que corta β -caroteno pero no licopeno (Lindqvist y Andersson, 2002). Este resultado indica que CarX necesita que su sustrato posea un extremo ciclado. Esta conclusión fue reafirmada por la ausencia de actividad sobre licopeno en ensayos *in vitro* con la enzima CarX purificada.

La presencia de retinol además de retinal en los experimentos *in vivo* puede levantar dudas sobre la identidad del auténtico producto generado por la enzima CarX a partir del β -caroteno. Esta duda quedó despejada mediante el análisis de la actividad *in vitro* de la enzima. Bajo estas condiciones, la incubación de CarX con β -caroteno dio lugar exclusivamente a retinal, demostrando que la actividad de la enzima es la reacción de corte en el doble enlace 15,15' del sustrato dejando grupos aldehído en los dos extremos. La existencia de retinol y acetato de retinol en las muestras solo puede ser explicada por la oxidación del radical aldehído del retinal y la posterior acetilación del grupo alcohol, reacciones que tienen lugar presuntamente en la propia bacteria (Fig. C4.15). Existen ya precedentes de la capacidad de *E. coli* para oxidar retinal a retinol (von Lintig y Vogt, 2002).

La enzima CarX fue capaz de cortar también un sustrato monocíclico, el β -apo-8'-apocarotenal, dando lugar igualmente a retinal. Este experimento nos dice que el reconocimiento del doble enlace 15,15' es determinado por la distancia desde un anillo de β -ionona, siendo la naturaleza química del otro extremo mucho menos relevante. Este mismo mecanismo de selección de sitio se observó en las enzimas SynACO (Ruch et al., 2005; Kloer et al., 2005) y

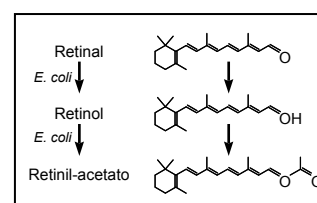


Fig. C4.15. Probables modificaciones químicas del retinal en *E. coli*.

NosACO (Scherzinger et al., 2006).

Desconocemos si las modificaciones sufridas por el retinal en *E. coli* tienen lugar también en *F. fujikuroi*. El grupo aldehído de los apocarotenales tiende a reaccionar de forma espontánea con los grupos amino de los aminoácidos de proteínas de *E. coli*, formando enlaces de base de Schiff similares a los que forma con las opsinas. Puesto que la presencia de retinal en *E. coli* es una situación artificial para la bacteria, las reacciones químicas sufridas (oxidación, esterificación y unión a proteínas) pueden ser consecuencia de su acumulación en ausencia de procesos naturales que controlen su destino. No debe ser ese el caso del hongo, que se espera que posea mecanismos de captación del retinal para ser incorporado a las opsinas, bien de forma directa o por mediación de algún tipo de proteína transportadora. La primera posibilidad es plausible, ya que el retinal es una molécula básicamente apolar que se ubica con facilidad en el entorno hidrofóbico de las membranas lipídicas, lugar donde se encuentran también las opsinas. La segunda posibilidad sería necesaria si el lugar de síntesis de carotenoides estuviera físicamente separado de las membranas donde ejerzan su función las opsinas. Ese podría ser fácilmente el caso si las opsinas fueran proteínas mitocondriales.

La demostración del papel de CarX como enzima suministradora de retinal permite reconsiderar el fenotipo parcialmente desregulado de los mutantes carentes de la enzima (capítulo 3). Estrictamente hablando, podemos considerar a *carX* como un nuevo gen estructural de la ruta, y el retinal como uno de sus presumibles productos finales. Parece razonable pensar por tanto que la célula emplee el retinal como señal reguladora, y que la ausencia de retinal provoque una estimulación de la ruta, por ej. a través de un mecanismo de retroinhibición. Nuestros resultados contradicen esta hipótesis, ya que el mutante *carX* sigue mostrando una síntesis elevada de carotenoides cuando se le suministra retinal en el medio de cultivo. Sin embargo, no la descartan, ya que no se puede demostrar que el retinal acceda al sitio adecuado en la célula. En experimentos similares en el hongo *P. blakesleeanus*, la adición al medio de acetato de retinol u otros retinoides, emulsionados de la misma forma que en nuestro experimento, da lugar a una fuerte activación de la carotenogénesis, resultado que es interpretado por la interferencia ejercida por estos compuestos sobre el mecanismo de retroinhibición por β -caroteno (Eslava et al., 1974). En *F. fujikuroi* ya se conocía con anterioridad la falta de efecto de la adición de acetato de retinol o β -ionona a la estirpe silvestre (Avalos y Cerdá-Olmedo., 1986). Estos mismos experimentos describieron sin embargo un modesto efecto inductor del etanol, que explica la ligera activación encontrada en los experimentos descritos en la Fig. C4.14.

Si el retinal no ejerce un papel como señal reguladora, la desregulación observada en los mutantes *carX* puede ser debida a la ausencia de la propia enzima o a la pérdida de función de una proteína que requiera retinal, como es el caso de las opsinas (Capítulo 1 de resultados). La primera hipótesis parece improbable, ya que no hay precedentes que nos permitan atribuir a una oxigenasa de carotenoides una función regulatoria a sumar a la de su propia actividad enzimática. Como ya se indicó en el Capítulo 2 de resultados, los mutantes nulos *carO* carecen de fenotipo sobre la carotenogénesis, pero existe un segundo gen de opsina, *opsA*, cuya pérdida de función pudiera ser la desencadenante de la desregulación. Ese sería el caso, por ej., si como consecuencia de la pérdida de las opsinas se produjera un aumento del estrés oxidativo en la célula, señal capaz de incrementar la síntesis de carotenoides en

otros hongos (Gessler et al., 2002; Yoshida y Hasunuma, 2004).

Los resultados descritos en este capítulo constituyen la primera demostración de síntesis de retinal en hongos. El descubrimiento en los últimos años de la existencia de opsinas en este Reino, y la demostración en el caso particular de una de ellas (Nop-1 de *N. crassa*) de la utilización de retinal como grupo prostético, dirige la atención a la existencia de enzimas similares con la misma función que *carX* en otros hongos. Nuestros resultados abren la puerta a estos estudios.

Capítulo 5.

Identificación del gen *carT*, que determina la oxigenasa de carotenoides responsable del corte oxidativo de toruleno

Los resultados del capítulo anterior muestran que el gen *carX* determina una oxigenasa de carotenoides, confirmando por tanto su relación con la carotenogénesis y extendiendo el regulón *car* a cuatro genes. Puesto que tanto la mutación dirigida del gen *carX* (Capítulo 3; Thewes et al., 2005) como el análisis de la actividad de la proteína CarX (Capítulo 4) indican que no guardan relación con la reacción de rotura oxidativa del toruleno, se procedió a buscar otros genes de la misma familia en el genoma de *F. graminearum*. El análisis mediante *Blast* reveló la presencia de un nuevo gen con similitud significativa a la oxigenasa de β -caroteno humana I (BCO I; código de acceso NP_059125). A la luz de los resultados descritos en este capítulo, hemos identificado este gen como *carT*, anteriormente definido por mutación (Avalos y Cerdá-Olmedo, 1987). En contraste con *carX*, *carT* no está ligado a los genes estructurales de la ruta en el genoma de *F. graminearum*, sino que se encuentra a 1,2 megabases de distancia en el mismo cromosoma.

5.1. Clonación del gen *carT*

La supuesta proteína con similitud a BCO I identificada en *F. graminearum* es XM_382801. Aprovechando la similitud de secuencia entre *F. graminearum* y *F. fujikuroi*, se escogieron segmentos altamente conservados de dicha proteína y se diseñaron cebadores adecuados con los que se hicieron experimentos de PCR para obtener un fragmento interno del mismo gen de *F. fujikuroi* (Fig. C5.1). De esta forma se obtuvo un fragmento de 657 pb a partir de la estirpe silvestre FKMC1995. A continuación se emplearon nuevos cebadores basados en dicha secuencia para obtener los extremos 5' y 3' del gen mediante la técnica de *Rapid Amplification of cDNA Ends* (RACE). Finalmente, se clonó el gen completo de las estirpes silvestres FKMC1995 e IMI58289 a partir de ADN genómico y ADN complementario, y se determinó su secuencia.

Fig C5.1. Proceso de clonación del gen *carT* de *F. fujikuroi*. En un primer paso se obtuvo un segmento interno mediante PCR. En un segundo paso se obtuvieron los extremos 5' y 3' mediante la técnica de RACE.

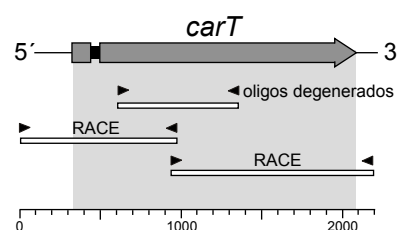


Fig C5.2. Diferencias de secuencia de la proteína CarT en las estirpes silvestres IMI58289 y FKMC1995. Las barras indican sobre el mapa del gen las posiciones donde el aminoácido es distinto en ambas estirpes.

En ambas estirpes silvestres se identificó un marco de lectura de 1781 pb (apéndices 5.1 y 5.2), interrumpidos por un solo intrón de 47 pb, que determina una presumible proteína de 577 aminoácidos (apéndices 5.3 y 5.4). La secuencia del gen *carT* de FKMC1995 difiere de la de IMI58289 en 11 bases, que da lugar a siete aminoácidos diferentes en las correspondientes proteínas (Fig. C5.2). Esta divergencia es inesperadamente alta al tratarse de dos estirpes silvestres de la misma especie, y contrasta con la ausencia de diferencias entre otras parejas de genes ortólogos, tales como *carRA* o *carO*.

La proteína CarT tiene el mismo tamaño que la de *F. graminearum*, y ambas comparten un 82% de identidad. Como cabe esperar, la identidad es mucho menor si se compara con enzimas de la misma familia de otras especies. Así, por ej., solo un 27% de los aminoácidos están conservados entre CarT y BCO I (Fig. C5.3). Sorprendentemente, BCOI muestra menor similitud con la otra oxigenasa de carotenoides de *F. fujikuroi* (20%), CarX, aunque ambas enzimas catalizan la misma reacción, la rotura central del β -caroteno para dar retinal (Capítulo 4). Además, las proteínas CarX y CarT de *F. fujikuroi* son tan diferentes entre sí como cada una de ellas con BCOI, (28% de identidad). Ambos genes contienen un solo intrón en el dominio 5', aunque no está localizado en posiciones idénticas (Fig. C5.3).

5.2. El gen *carT* está mutado en la estirpe productora de toruleno SG68

Se ha descrito previamente un mutante de *F. fujikuroi* que acumula toruleno en lugar del producto final neurosporaxantina (Avalos y Cerda-Olmedo, 1987). Este mutante (SG68) presenta un color rojizo, distinguible del color naranja de la estirpe de la que proviene, SG22 (Fig. C5.4). El análisis por HPLC de los carotenoides de ambas estirpes confirmó la abundancia de toruleno y la inexistencia de neurosporaxantina en el mutante SG68 en comparación con SG22.

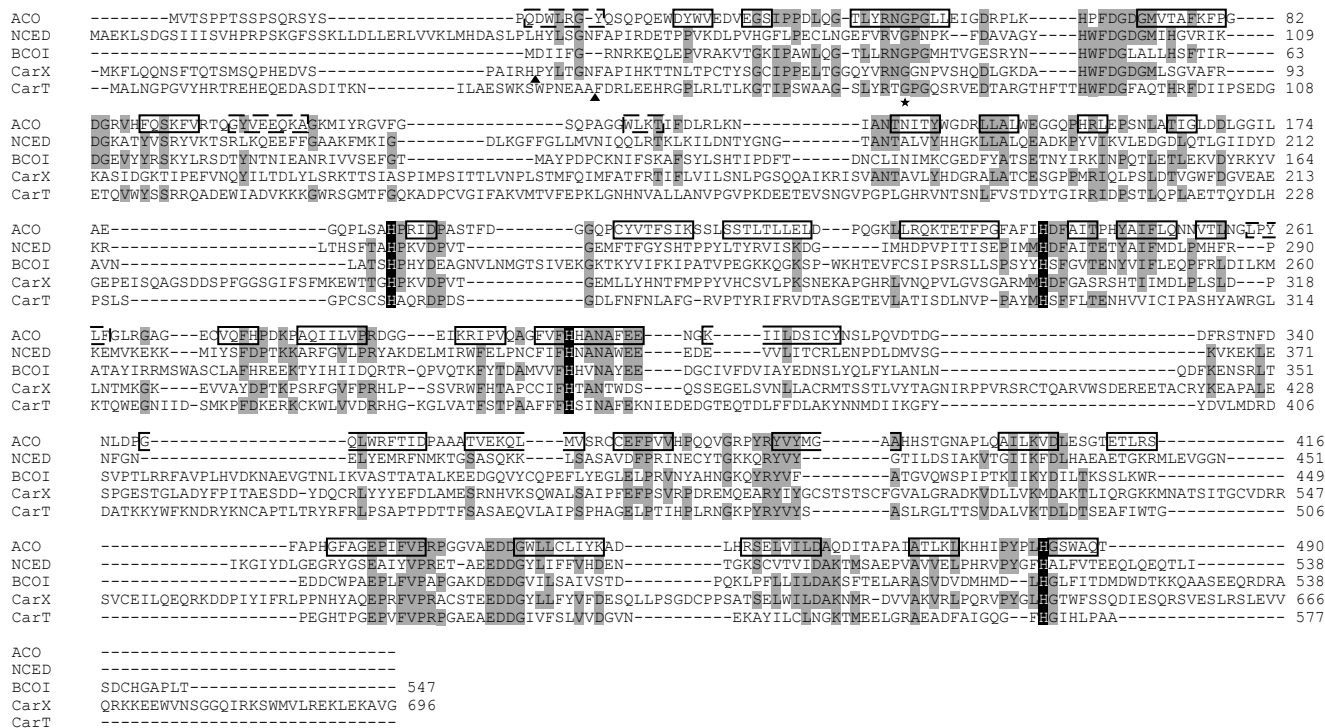


Fig. C5.3. Comparación mediante *Clustal* de CarT, CarX y tres proteínas representativas de la familia de las dioxigenasas de carotenoides. Se han sombreado en gris los aminoácidos presentes en la misma posición en al menos tres de las proteínas. Se destacan en negro las cuatro histidinas que coordinan el átomo de Fe²⁺. Los recuadros de trazo continuo enmarcan láminas β y los de trazo discontinuo hélices α (Kloer et al., 2005). La estrella bajo la secuencia de CarT muestra el residuo afectado por la mutación en la estirpe SG68. Los triángulos muestran la posición del intrón en *carX* y *carT*. ACO: oxigenasa de apocarotenoides de *Synechocystis* sp, código de acceso NP_441748; BCO-1: dioxigenasa de β-caroteno 1 de *H. sapiens*, Q9HAY6; NCDE: oxigenasa de carotenoides 1 de *A. thaliana*, CAA06712.

Como primera aproximación para elucidar el posible papel del gen *carT* en la conversión enzimática de toruleno en neurosporaxantina, se secuenció el alelo de este gen en SG68 y se comparó con la secuencia de la estirpe parental. El alelo *carT* de SG68 contiene una transición G259>A, que se espera provoque la sustitución de una glicina por un residuo de aspartato en la posición 71 de la proteína (Fig. C5.3). Este aminoácido neutro está muy conservado en diferentes enzimas de esta familia, lo cual sugiere que su sustitución por un aminoácido altamente polar puede alterar severamente a la actividad de la enzima. Este resultado nos lleva a proponer que CarT es la oxigenasa de carotenoides que media el corte oxidativo del toruleno para producir neurosporaxantina en *F. fujikuroi*.

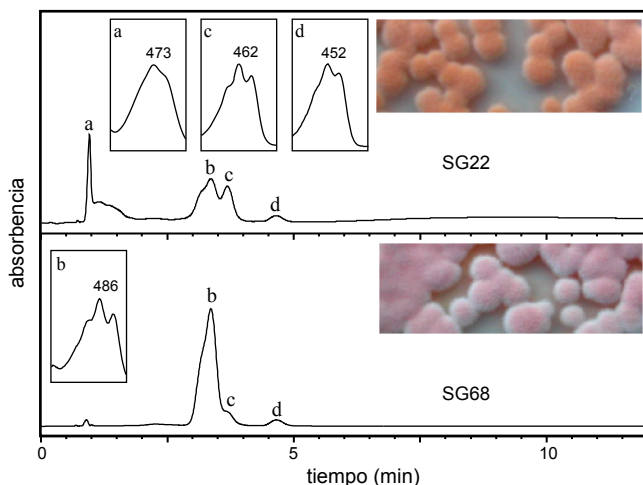


Fig. C5.4. Pigmentación y análisis de carotenoides de las estirpes SG22 y SG68. Las fotos muestran colonias de 3 días de edad cultivadas a 30°C en medio mínimo en la oscuridad. Los carotenoides acumulados por estas colonias fueron analizados por HPLC. Se muestran los cromatogramas obtenidos a la longitud de onda de 462 nm. Los espectros (350-550 nm) y longitud de onda de absorción máxima de los picos relevantes, correspondientes a neurosporaxantina (a), toruleno (b), γ-caroteno (c) y β-caroteno (d), se muestran en los recuadros internos.

5.3. CarT es una oxigenasa de carotenoides que corta licopeno *in vivo*

La familia de las oxigenasas de carotenoides incluye miembros que cortan sustratos no carotenoides, como el lignostilbeno, reconocido por la dioxigenasa α - β de *Pseudomonas paucimobilis* (Kamoda and Saburi, 1993), o que no cortan su sustrato, como la RPE65 humana (Xue et al., 2004). Para determinar si CarT es una oxigenasa de carotenoides enzimáticamente activa, expresamos la enzima en estirpes de *E. coli* productoras de β -caroteno y licopeno, y analizamos el contenido de carotenoides mediante HPLC.

En el caso de su expresión en la estirpe productora de licopeno se detectaron pequeñas cantidades de nuevos carotenoides, ausentes en los cultivos control (Fig. C5.5). El espectro y máximo de absorción del producto mayoritario (Fig. C5.5, pico "b") es consistente con el esperado para un apocarotenoide producido a partir del licopeno, lo cual apoya la hipótesis que propone a CarT como una proteína que rompe caroteno. Aunque no se ha establecido la naturaleza química de los productos de corte, su espectro de absorción sugiere que el punto de rotura se localiza cerca del extremo del licopeno. Por otro lado, al contrario de lo observado anteriormente para CarX (Capítulo 4), no se detectó ningún producto cuando CarT se expresó en células de *E. coli* productoras de β -caroteno, sugiriendo que la enzima no corta carotenos bicíclicos.

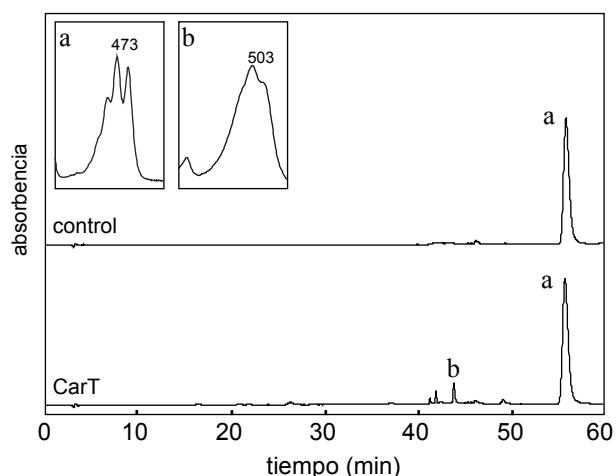


Fig. C5.5. Análisis de los carotenoides presentes en cultivos de *E. coli* que contienen los genes de la síntesis de licopeno y el gen *carT* de *F. fujikuroi*. Se muestran los cromatogramas a 520 nm de los productos separados por HPLC tras su extracción de un cultivo que expresa el gen *carT* en la dirección correcta (cromatograma inferior) o en dirección contraria (cromatograma superior). Los espectros (350-550 nm) y longitud de onda de absorción máxima de los picos relevantes se muestran en los recuadros internos (a: licopeno; b: producto principal).

5.4. CarT convierte el toruleno en β -apo-4'-carotenal (C35) *in vitro*

Para comprobar la actividad enzimática de CarT sobre otros carotenoides, la enzima se expresó como proteína de fusión en células de *E. coli* de forma análoga a los experimentos anteriormente realizados con la proteína CarX en el Capítulo 4. Una vez purificada y separada de la GST mediante tratamiento con trombina, la proteína se detectó en cantidades apreciables en el extracto soluble (Fig. C5.6), haciendo posible ensayos de su actividad enzimática *in vitro*. Para probar la presumible actividad de CarT sobre toruleno, se obtuvieron

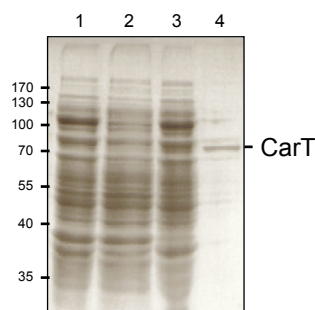


Fig. C5.6. Expresión y purificación de la proteína CarT. SDS-PAGE del extracto total de *E. coli* expresando GST-CarT (carril 1), el correspondiente control, expresando GST-carT en la dirección opuesta (carril 2), proteínas solubilizadas conteniendo CarT (carril 3) y CarT purificada por glutatión-sefarosa y eluida con trombina (carril 4).

cantidades elevadas de este caroteno a partir de la estirpe SG68. La incubación de la enzima con toruleno dio lugar a la síntesis de un nuevo carotenoide (Fig. C5.7). Los cromatogramas del HPLC no permitieron detectar otros productos, lo que indica que la enzima cataliza una única reacción. El espectro y el patrón de elución del producto de la reacción mediada por CarT sobre el toruleno es idéntico al β -apo-4'-carotenal. Este compuesto fue analizado como patrón ya que la información previa sobre otras oxigenasas de carotenoides indica que los productos de sus reacciones de corte poseen habitualmente un radical aldehído en el extremo. Por tanto, este compuesto es el que se esperaría que se formara si la enzima rompiera el toruleno en el lugar necesario para producir neurospora-xantina. Los resultados indican por tanto que CarT cataliza la reacción de corte del toruleno como primer paso para la producción de dicha xantofila. Posteriormente cabe esperar una nueva reacción química para generar el extremo ácido característico de la neurospora-xantina.

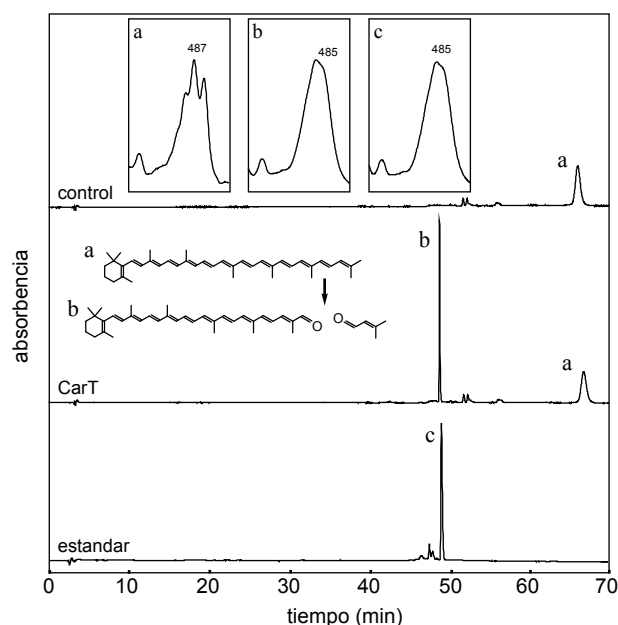


Fig. C5.7. Actividad *in vitro* de CarT sobre toruleno. Análisis por HPLC de los productos resultantes de la incubación de toruleno (20 μ M) en ausencia de CarT (control) o en presencia de 0,3 μ g/ml de CarT (ensayo). Los recuadros interiores muestran el espectro de los picos relevantes y su interpretación: toruleno (a); β -apo-4'-carotenal (b: producido a partir de toruleno); c: patrón). La longitud de onda de absorción máxima de cada carotenoide se indica en el espectro (350-550 nm). Se muestra en el recuadro central la reacción de corte propuesta.

5.5. El lugar de rotura de CarT está determinado por la distancia al extremo no ciclado

A diferencia de CarX, la reacción de corte llevada a cabo por CarT es excéntrica, ya que actúa sobre el doble enlace 4', 5' del toruleno para generar un apocarotenoide de 35 átomos de carbono y un fragmento predecible de 5 átomos de carbono, del que no cabe esperar capacidad de absorción suficiente

para ser detectado en los cromatogramas. A la luz de estos resultados, nos planteamos la pregunta de cual es el mecanismo empleado por la enzima para determinar el lugar de corte, es decir, si éste viene determinado por la distancia al anillo de β -ionona o al extremo no ciclado de la molécula. Para averiguarlo, se llevaron a cabo ensayos *in vitro* de *carT* sobre apocarotenoides monocíclicos sintéticos con diferentes longitudes de cadena. Como se muestra en la Fig. C5.8, la enzima convirtió β -apo-8'-carotenal, de 30 átomos de carbono (C30, Fig. C5.8A) y β -apo-10'-carotenal (C27, Fig. C5.8B) en β -apo-14'-carotenal (C22) y retinal (β -apo-15'-carotenal; C20) respectivamente. Ambos productos fueron identificados por la comparación de su espectro de absorción y tiempo de elución en HPLC con los correspondientes patrones.

La formación de β -apo-14'-carotenal y retinal indican que el corte se produjo en el tercer doble enlace (13',14' y 15',15; respectivamente) a partir del extremo no ciclado. Este dato contrasta con la reacción de corte sobre el toruleno, que se produce en el segundo doble enlace. Esta diferencia se debe probablemente a la distinta naturaleza química de los extremos de estas moléculas, con un grupo aldehído en los apocarotenales ausente en el toruleno. Parece probable que la presencia de este grupo pueda alterar la disposición del sustrato en el sitio activo de la enzima y provocar la exposición de un doble enlace diferente al átomo de Fe^{2+} en el sitio activo. De cualquier manera, los resultados indican de forma contundente que CarT reconoce su punto de corte a partir de la distancia al extremo no ciclado del carotenoide.

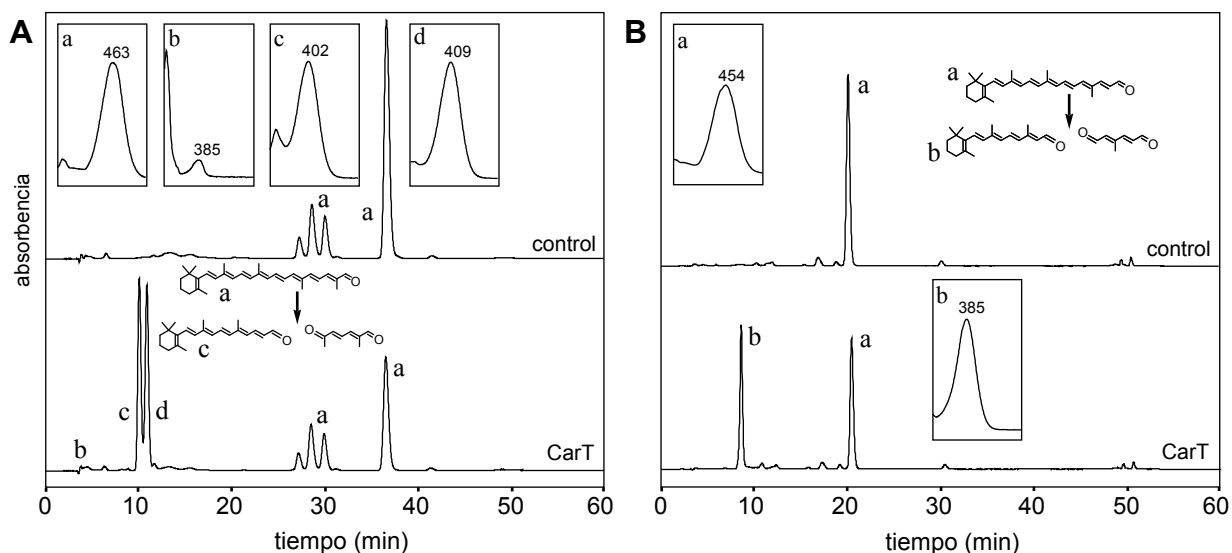


Fig. C5.8. Actividad *in vitro* de CarT sobre β -apo-8'-carotenal (A) y β -apo-10'-carotenal (B). Análisis por HPLC de los productos resultantes de la incubación de los dos apocarotenales (40 μM) en ausencia de CarT (control) o en presencia de 300 ng/ μl de CarT. Los recuadros interiores muestran el espectro de los picos relevantes y su interpretación: β -apo-8'-carotenal (a), retinal (b), y β -apo-14'-carotenal (dos isómeros, c y d). La longitud de onda (nm) de absorción máxima de cada carotenoide se indica en el espectro (350-550 nm). Se muestran también las reacciones de corte propuestas.

5.6. CarT muestra preferencia de corte por extremos no oxigenados frente a extremos oxigenados

Los experimentos mostrados en el apartado anterior conllevan además dos conclusiones interesantes: (1) CarT es capaz de cortar carotenoides más cortos que el toruleno, y (2) lo puede hacer también si el extremo está oxigenado. Nada impide por tanto que la enzima pueda actuar sobre su propio producto, el β -apo-4'-carotenal. Es posible, sin embargo, que esta reacción posea una eficacia

menor en comparación con la presentada sobre su sustrato habitual, el toruleno. Para comparar las eficiencias relativas de CarT sobre un extremo oxigenado y otro no oxigenado, llevamos a cabo un ensayo *in vitro* con apo-8'-licopenal. Este sustrato contiene un extremo idéntico al extremo no ciclado del toruleno, y el otro extremo oxigenado en forma de grupo aldehído. Debido a la asimetría del corte producido por CarT, los productos resultantes de la reacción serían diferentes en función del extremo donde se produce el corte. Como puede apreciarse en la Fig. C5.9, el producto mayoritario de la incubación de CarT con licopenal fue el dialdehído crocetin-dial (C20). La naturaleza química de este producto, confirmada por su espectro de absorción y su patrón de elución en HPLC, indica que CarT corta preferentemente en el extremo no oxigenado. En menor cantidad se detectaron también otros dos productos, probablemente originados por una actividad de corte residual en el extremo oxigenado de la molécula.

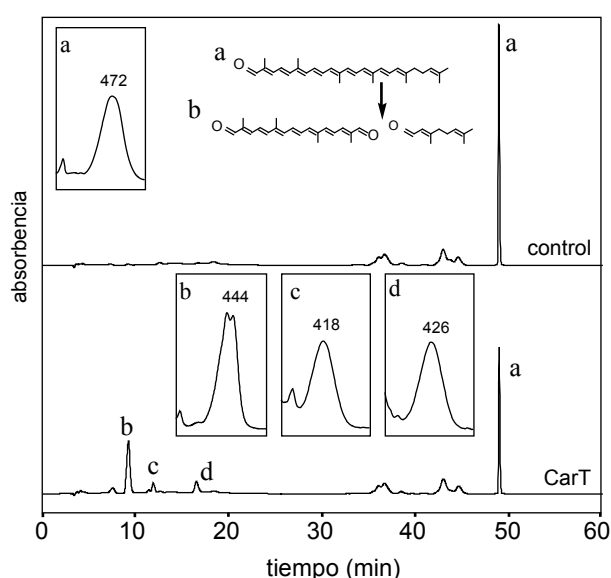
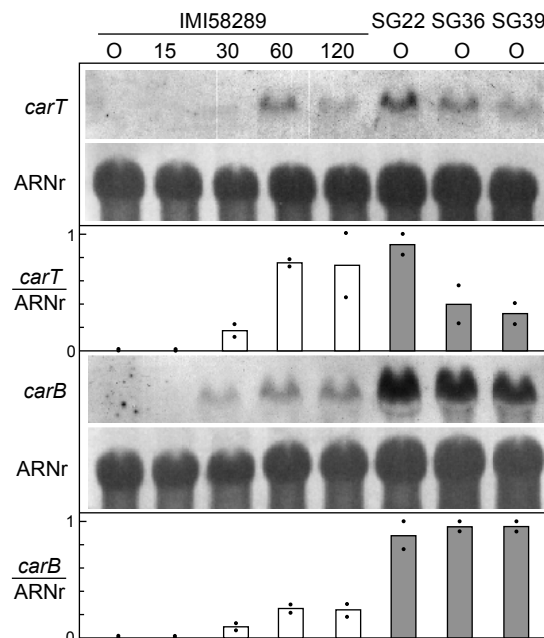


Fig. C5.9. Actividad *in vitro* de CarT sobre apo-8'-licopenal. Análisis por HPLC de los productos resultantes de la incubación en ausencia de CarT (control) o en presencia de 0,3 µg/µl de CarT. Los recuadros interiores muestran el espectro de los picos relevantes y su interpretación: crocetin-dial (b) y dos carotenoides no identificados (c y d). La longitud de onda de absorción máxima de cada carotenoide se indica en el espectro (350-550 nm). Se muestra la reacción de corte propuesta.

5.7. El gen *carT* muestra una regulación común con los otros genes *car* de *F. fujikuroi*

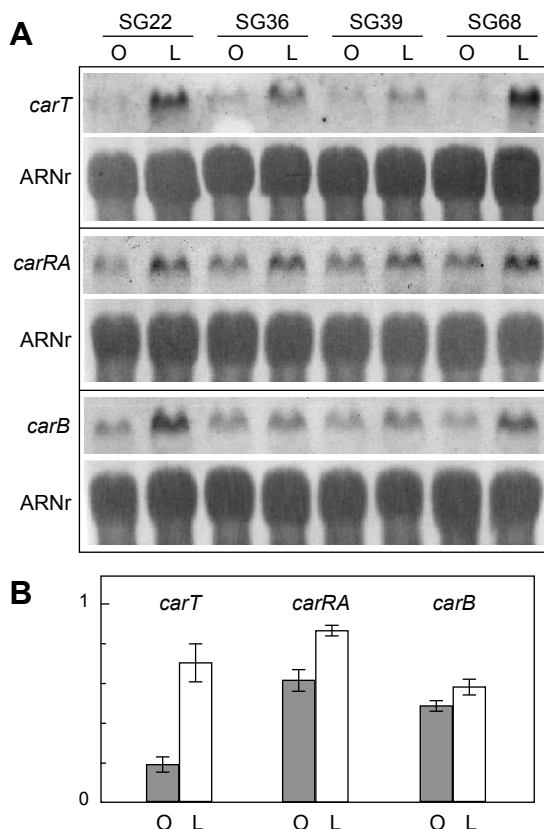
Los genes estructurales *carRA*, *carB* y *carX* y el gen ligado a ellos *carO* están sujetos a una regulación común. Sus niveles de ARNm, muy bajos en la oscuridad, aumentan transitoriamente al ser iluminado el cultivo, y son constitutivamente altos en mutantes superproductores de carotenoides (Fig. C3.4) (Prado et al., 2004; Thewes et al., 2005). Experimentos de *Northern* usando como sonda un fragmento del gen *carT* mostraron una regulación muy similar: no se apreció ARNm de *carT* en oscuridad en la estirpe silvestre, comenzó a acumularse tras exponer el hongo a la luz para alcanzar su máximo después de una hora de iluminación (Fig. C5.10). Adicionalmente, tal como se observa en los otros genes *car*, se aprecia un incremento significativo de los niveles de ARNm de *carT* en oscuridad en tres estirpes superproductoras independientes (SG22, SG36 y SG39, Avalos y Cerdá-Olmedo, 1987) en comparación con la estirpe silvestre (Fig. C5.10). Por tanto, las mismas proteínas reguladoras que controlan la expresión de los genes *car* anteriormente estudiados parecen controlar los niveles de ARNm de *carT*, presumiblemente a nivel del inicio de la transcripción. Los cinco genes forman parte por tanto de un mismo regulón.

Fig. C5.10. Expresión de *carT*. Northern blot de ARN total de la estirpe silvestre IMI58289 y tres mutantes superproductores de carotenoides (SG22, SG36 y SG39) cultivados en oscuridad (O) o en luz durante el tiempo indicado (minutos). Se muestran las señales de ARNr como control de carga. Las barras mostradas bajo las hibridaciones muestran el cociente entre la intensidad de cada señal de ARNm y la de ARNr. Los valores, estimados por análisis de densitometría de las hibridaciones, muestran la media de dos experimentos independientes; los puntos muestran los valores reales de cada experimento (oscuridad: barras grises; luz: barras blancas). Se hibridaron muestras equivalentes de ARN con una sonda de *carB*, como control de un gen estructural de la carotenogénesis. El valor más alto en cada hibridación se tomó como 1.



Se investigó además el efecto de la luz sobre los niveles de ARNm de los genes *car* en las tres estirpes superproductoras mencionadas, así como en la estirpe superproductora de toruleno SG68, derivada de SG22. A pesar de los elevados niveles de ARNm en la oscuridad de estos mutantes, en todos los casos se observó una tendencia a acumular más ARNm de los tres genes *car* analizados en la luz (Fig. C5.11). Este efecto fue especialmente pronunciado en el caso del gen *carT*, el cual alcanzó tras la iluminación los mismos niveles que los otros dos genes *car*. Tal como se encontró previamente para los genes *carRA*

Fig. C5.11. Efecto de la luz en la expresión de los genes *carT*, *carRA* y *carB* en mutantes superproductores de carotenoides. A. Northern blot de ARN total de los mutantes superproductores de neurosporaxantina (SG22, SG36 y SG39) y la estirpe superproductora de toruleno SG68, derivada de SG22, cultivados en oscuridad (O) o tras una hora de iluminación (L). Se muestran las señales de ARNr como control de carga. B. media y desviación estándar de los valores de densitometría de la señal de cada gen referidos a la señal de ARNr, obtenidos con las tres estirpes superproductoras de neurosporaxantina en dos experimentos distintos. Cada dato es por tanto la media de 6 señales.



y *carB* (Thewes et al., 2005) y *carX* (Capítulo 3), no detectamos ninguna diferencia en los niveles de ARNm de *carT* entre la estirpe superproductora de toruleno SG68 y su estirpe parental SG22, superproductora de neurospora-xantina.

5.8 Elementos reguladores en los genes *car*

La regulación coordinada del gen *carT* con los genes del agrupamiento génico *carX*, *carRA*, *carB* y *carO*, sugiere un control mediado por los mismos factores de transcripción. De ser así, cabe esperar que los promotores de estos genes compartan elementos de regulación. Con el objetivo de identificar estos potenciales elementos reguladores, se han comparado las secuencias de las regiones 5' por delante de estos cinco genes en *F. graminearum* (datos de la secuencia del genoma) y de los cuatro primeros de *F. fujikuroi*, ya que no se llegó a clonar la secuencia reguladora de *carT* en esta última estirpe.

La comparación permite identificar secuencias conservadas en ambos hongos para los cuatro promotores. El programa MatInspector (Cartharius et al., 2005) encuentra numerosos sitios potenciales para la unión de factores de transcripción. De ellos solo se encuentran presentes en las cuatro secuencias reguladoras analizadas sitios de unión para los factores HAP2/3/5 (McNabb y Pinto, 2005), GCN4 (Hill et al., 1986; Arndt y Fink, 1986) y factores GATA (Ravagnani et al., 1997).

Contiguo al gen *carX* se encuentra en el genoma de *F. fujikuroi* un gen (XP_383244, Fig. C5.12) que determina una proteína con un dedo de zinc de la familia GAL4 de *S. cerevisiae* (Schjerling y Holmberg, 1996). La posible relación de este gen con la regulación de la carotenogénesis de *F. fujikuroi* es actualmente objeto de atención en el grupo de investigación. El análisis manual de las cuatro secuencias reguladoras permite detectar posibles sitios de unión para este tipo de factor de transcripción, caracterizados por la presencia de la secuencia CGG(N)₆CGG en las cuatro secuencias reguladoras en *F. graminearum* y en las tres secuencias disponibles en *F. fujikuroi* (Fig. C5.12B).

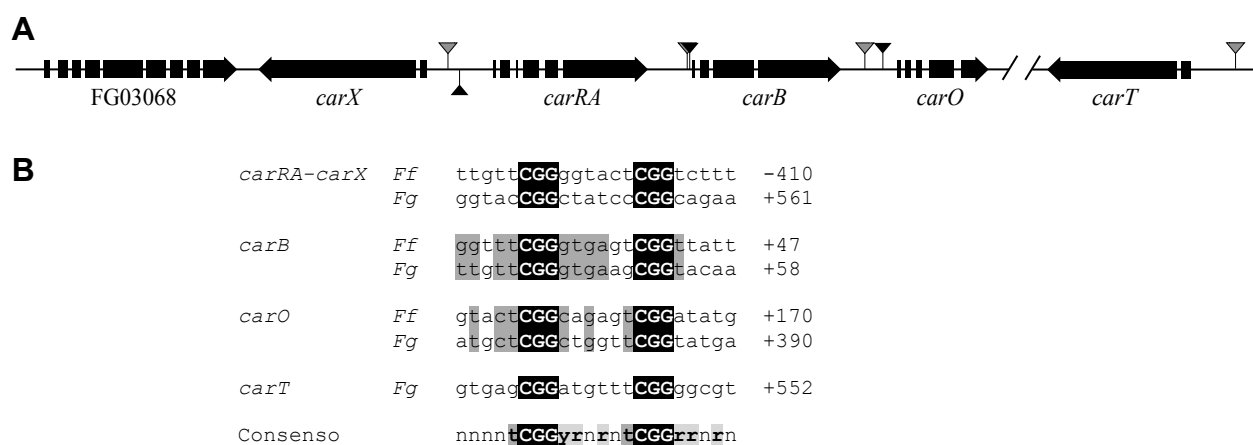


Fig. C5.12. Posibles elementos reguladores compartidos por los cinco genes *car*. A. Ubicación del gen FG03068 de *F. graminearum* junto al agrupamiento de genes *car*. El mapa es el mismo en *F. fujikuroi*. Se indican con triángulos la ubicación de las secuencias mostradas en la parte inferior de la Figura, en negro las correspondientes a las secuencias de *F. fujikuroi*, y en gris las correspondientes a *F. graminearum*. B. Posibles secuencias reconocibles por proteínas de la familia GAL4 en las secuencias reguladoras de los genes *car* en *F. fujikuroi* (*Ff*) y *F. graminearum* (*Fg*). Las secuencias se identificaron por la presencia del núcleo CGG(N)₆CGG, reconocido por los factores de transcripción de esta familia. Los números indican la distancia de la primera base de la secuencia a la primera base del codón de comienzo de la transcripción. El signo (+) indica la hebra sentido y el signo (-) la hebra antisentido.

5.9. Discusión

En este capítulo se describe un gen de *F. fujikuroi* que determina una nueva enzima de la familia de las oxigenasas de carotenoides. Hemos demostrado que dicha enzima lleva a cabo una reacción de corte sobre el toruleno para producir β -apo-4'-carotenal (C35), la forma aldehído del carotenoide ácido neurosporaxantina. Es la primera vez que se describe esta actividad enzimática, tanto en hongos como en cualquier ser vivo. Además, hemos encontrado que un mutante descrito anteriormente como bloqueado en la reacción de corte del toruleno, denominado SG68, presenta una mutación en este gen. Nuestros resultados rellenan un hueco muy significativo en el conocimiento de la ruta biosintética de la neurosporaxantina. Esta ruta no solo está presente en *Fusarium* (Avalos y Cerdá-Olmedo, 1987) sino también en *Verticillium* sp. (Valadon y Mummery, 1976) y *N. crassa*, el primer organismo en el que este carotenoide fue descrito (Aasen y Jensen, 1965). Siguiendo una estrategia complementaria a este trabajo, se ha comprobado que la mutación dirigida del ortólogo de *carT* en *N. crassa* (llamado *cao-2*) da lugar al bloqueo de la síntesis de neurosporaxantina y a la consiguiente acumulación de toruleno (Saelices et al., manuscrito en preparación).

La enzima CarT muestra similitud significativa con la enzima SynACO de la cianobacteria *Synechocystis* sp. (Ruch et al., 2005), cuya estructura tridimensional ha sido determinada recientemente (Kloer et al., 2005). Además de las cuatro histidinas esenciales que coordinan el cofactor Fe^{2+} , muchos otros aminoácidos importantes están conservados en CarT, incluyendo los implicados en la formación del centro activo. Así, esta enzima parece conservar la estructura básica de SynACO, la cual se presume que se conserva en otros miembros de esta familia. La disparidad en la longitud del polipéptido predicho para CarT en comparación con otros miembros de la familia (87 residuos más que en SynACO) se debe básicamente a diferencias en la longitud de los dominios que constituyen los lazos que unen las diferentes hojas β , y afectan mínimamente a los dominios importantes. La mutación encontrada en la estirpe SG68, localizada muy cerca de la cuarta histidina que coordina el Fe^{2+} , afecta a un residuo de glicina altamente conservado. Es presumible que su reemplazamiento por un residuo de ácido aspártico, diferente tanto en tamaño como en carga eléctrica, altere la estructura del centro activo y de lugar a una proteína no funcional.

Las pruebas más consistentes del papel de CarT como enzima responsable de la reacción de corte del toruleno para producir neurosporaxantina provienen del estudio de su actividad enzimática. Tanto su expresión en células de *E. coli* productoras de carotenos como su purificación y posteriores ensayos *in vitro* con diferentes sustratos apuntan a una actividad como oxigenasa de carotenoides capaz de cortar de forma asimétrica diferentes sustratos para producir apocarotenoides con un extremo aldehído. Se trata de una enzima que requiere sustratos con al menos un extremo no ciclado. Así, la enzima carece de actividad sobre el β -caroteno, un rasgo que la diferencia del producto del gen parálogo *carX*.

Los experimentos *in vitro* fueron facilitados por la solubilidad y estabilidad de la proteína CarT purificada, que permitieron hacer los ensayos sobre carotenoides no disponibles en *E. coli*. De esta forma, la incubación con su sustrato natural predecible, el toruleno, solo se pudo realizar *in vitro*, ya que nuestros intentos para obtener una estirpe productora de toruleno de *E. coli*

fracasaron. Los ensayos *in vitro*, sin embargo, fueron particularmente eficaces cuando se empleó toruleno. CarT cortó este sustrato con gran eficiencia para producir β -apo-4'-carotenal como único producto. Esta molécula es idéntica a la neurosporaxantina, salvo que posee en su extremo un grupo aldehído en lugar de un grupo ácido. Estos datos sugieren que el papel biológico de CarT en la carotenogénesis de *F. fujikuroi* es producir una primera reacción de corte oxidativo sobre el toruleno.

Dadas las singulares características de esta reacción, se llevaron a cabo ensayos *in vitro* con diferentes carotenoides para obtener información sobre los requisitos de reconocimiento del sustrato. Para ello se utilizaron carotenoides sintéticos, como el β -apo-8'-carotenal, el β -apo-10'-carotenal y el apo-8'-licopenal. Ninguno de estos sustratos se espera que sean sustratos naturales de CarT en el hongo; sin embargo, fueron reconocidos por la enzima para dar lugar con diferentes grados de eficiencia a otros apocarotenoides. La incubación con β -apo-8'-carotenal (C30) y β -apo-10'-carotenal (C27) dió lugar a la producción principalmente de dos isómeros de un aldehído de 22 carbonos y retinal, respectivamente. Aunque se obtuvieron trazas de retinal en el ensayo con β -apo-8'-carotenal (C30), estos resultados sugieren que el sitio de corte lo determina la distancia al extremo no ciclado, no la distancia al extremo ciclado. De ser la distancia al anillo la que determinara el punto de reacción, se esperaría un solo producto de ambos sustratos, sin importar que ambos tengan diferente longitud de cadena. Este es el caso de la enzima SynACO, la cual produce retinal a partir de apo-carotenales de diferente tamaño (Ruch et al., 2005; Kloer et al., 2005).

Respecto a la naturaleza química del extremo reconocido por la enzima, los dos apocarotenales utilizados poseen un grupo aldehído, mientras que el toruleno carece de oxígeno en la molécula. Para investigar el efecto de la presencia de este radical, se incubó la enzima con apo-8'-licopenal, sustrato que presenta dos extremos que se diferencian en la presencia o ausencia de un grupo aldehído. De hecho, el extremo no oxigenado de este carotenoide es idéntico al extremo no ciclado del toruleno. El resultado de este ensayo es la formación preferente de un dialdehído, lo que nos permite concluir que CarT reconoce más eficientemente un extremo como el presente en el toruleno. Aún así, el reconocimiento de los diferentes sustratos ensayados implica que CarT reconoce el extremo de la molécula de forma relativamente relajada, siendo irrelevante la longitud de ésta o la naturaleza química del otro extremo. Por tanto, aunque posiblemente con menor eficiencia, el producto de corte del toruleno, el β -apo-4'-carotenal, puede teóricamente ser reconocido también por la enzima. En tal caso se generaría un nuevo apocarotenoide de cadena más corta, que aún podría seguir siendo sustrato de CarT para sufrir nuevos recortes. *In vivo* no se detectan tales productos, probablemente porque la reacción predominante sobre el β -apo-4'-carotenal sea su oxidación para generar un grupo carboxilo y dar lugar a la neurosporaxantina.

La generación por CarT de un producto con un extremo aldehído era predecible, ya que esta es una característica típica de las enzimas pertenecientes a la familia de las oxigenasas de carotenoides (Wyss, 2004). Como ya se ha indicado arriba, nuestros resultados no cierran los genes de la ruta sino que los extiende a otro más, ya que cabe esperar la existencia de una enzima que reconozca β -apo-4'-carotenal para producir neurosporaxantina. Los mutantes carentes de esta actividad enzimática acumularían presumiblemente β -apo-4'-carotenal, y deberían por tanto presentar una pigmentación rojiza, presumiblemente fácil de distinguir en el fondo anaranjado que caracteriza la acumulación de neuros-

poraxantina. Cabe esperar sin embargo que en ausencia de competencia, el β -apo-4'-carotenal acumulado sea degradado por la propia enzima *carT*, en cuyo caso no está claro la pigmentación que tendría tal mutante. Hasta la fecha, no se han identificado mutantes que permitan sospechar la acumulación de β -apo-4'-carotenal, pero tampoco se han hecho búsquedas sistemáticas. Nuestros resultados invitan a ver con nuevos ojos los escrutinios de los experimentos de mutagénesis.

El patrón de expresión del gen *carT* proporciona pruebas adicionales sobre su papel en la ruta de síntesis de carotenoides en *F. fujikuroi*. Este es el primero de los genes estructurales que no se encuentra ligado al agrupamiento de los genes *car*, formado por cuatro genes coregulados: *carX*, *carRA*, *carB* y *carO*. El gen *carT* comparte con éstos la regulación por la luz de los niveles de ARNm incluyendo la fotoadaptación, y el incremento en la oscuridad en los mutantes superproductores de carotenoides. Esta es la regulación esperada para un gen estructural de la ruta biosintética de la neurosporaxantina. Como cabía esperar, los promotores de estos genes en *F. graminearum* comparten secuencias candidatas a facilitar la unión de proteínas reguladoras. Es interesante resaltar, sin embargo, que la desregulación manifestada por los mutantes superproductores de carotenoides afecta menos al gen *carT* que a los otros genes *car* en la oscuridad, mientras que en la luz no muestra diferencias. Esto se ve reflejado en una menor producción de neurosporaxantina en oscuridad en mutantes *carS* (ver estirpe SF4 en la Fig. C1.11). Este resultado sugiere que la luz interfiere sobre el mecanismo represor alterado en estos mutantes.

Aunque CarT y CarX pertenecen a la misma familia y se encuentran en el mismo organismo, la comparación de sus secuencias muestra una alta divergencia de secuencia. De hecho, son tan diferentes entre sí como cada una de ellas respecto a la enzima humana BCO1, encargada de producir retinal a partir de β -caroteno. Parece probable que *carX* y *carT* provengan de un gen común ancestral a raíz de una duplicación que, a juzgar por la alta divergencia, debió haber ocurrido muy temprano en la evolución.

Discusión general

Discusión general

Los hongos filamentosos han sido extensamente usados como modelos de investigación de la biosíntesis de carotenoides y su regulación (Sandmann y Misawa, 2002). Entre ellos destacan los zigomicetos *P. blakesleanus*, *M. circinelloides* y *B. trispora* para la producción de β -caroteno, el basidiomiceto *X. dendrorhous* para la producción de astaxantina, y los ascomicetos *N. crassa* y *F. fujikuroi* con la neurosporaxantina como producto mayoritario (revisado por Avalos y Cerda-Olmedo, 2004). En los casos de producción de β -caroteno y astaxantina, las investigaciones han estado justificadas por el interés aplicado de dichos carotenos, utilizándose actualmente *B. trispora* y *X. dendrorhous* para su producción industrial. Los genes responsables de las enzimas específicas de la carotenogénesis a partir de GGPP han sido identificados en los cuatro organismos citados (Ruiz-Hidalgo et al., 1997; Arrach et al., 2001; Velayos et al., 2000a, 2000b; Rodríguez-Saiz et al., 2004; Verdoes et al., 1999a; 1999b), incluyendo el reciente descubrimiento del gen responsable de la conversión de β -caroteno en astaxantina en *X. dendrorhous* (Ojima et al., 2006).

La situación es distinta en *N. crassa* y *F. fujikuroi*. Las dos especies poseen una ruta carotenogénica muy similar que culmina con la síntesis de neurospora-xantina, una xantofila para la que de momento no se han encontrado aplicaciones comerciales. Los motivos de estudio de su carotenogénesis difieren en ambos hongos. En el caso de *N. crassa* las investigaciones tienen su origen en el aislamiento de mutantes albinos y en su utilización como marcadores en numerosos trabajos genéticos. En el caso de *F. fujikuroi*, el interés proviene de su uso como modelo en la producción de diferentes terpenoides además de los carotenoides, especialmente las giberelinas, así como otros metabolitos secundarios de la familia de los policétidos. Los resultados obtenidos abren nuevas perspectivas biotecnológicas en estos hongos ya que demuestran que sus rutas biosintéticas pueden desviarse hacia β -caroteno. Las concentraciones de carotenoides en *F. fujikuroi*, incluyendo el mutante SF21 (Capítulo 1 de Resultados), no compiten con los elevados niveles de producción descritos en *P. blakesleanus* (Murillo et al., 1978) o *B. trispora* (Mehta et al., 2003), pero representan un punto de partida para futuras mejoras de la producción. En el caso de *F. fujikuroi*, las concentraciones actuales podrían tener ya interés aplicado si se tiene en cuenta que la biomasa del hongo es un subproducto obligado en la fermentaciones de producción de giberelinas, ya que éstas son escretadas al medio. Desconocemos el destino de las masas de micelio derivadas de esta industria. Si se reutilizan para alimentación animal, el incremento de β -caroteno puede representar una ventaja nutricional. También existen aplicaciones evidentes aún a bajas concentraciones de caroteno en el caso del uso de micelio de *Fusarium* para consumo humano (Wiebe, 2002), aunque en este caso la introducción de la mutación en la estirpe empleada por esta industria biotecnológica chocaría con la rigidez de la legislación en lo referente al uso de organismos modificados genéticamente.

El peculiar fenotipo del mutante SF21 proporciona nuevas perspectivas en el conocimiento no solo de la desaturasa de *F. fujikuroi* sino de las desaturasas de carotenos en general. La visión rígida que se tenía de esta enzima está cambiando a medida que aparecen en la bibliografía nuevos ejemplos sobre su versatilidad. Así, por ejemplo, desaturasas que ejercen su función sobre sustratos de 40 átomos de carbono son también capaces de ejercer su acción sobre sustratos de 35 átomos de carbono (Umeno y Arnold, 2003) o de

45 o 50 átomos de carbono (Tobias y Arnold, 2006). El único precedente de cambio en la especificidad de los sitios de reconocimiento dentro de un mismo sustrato se ha encontrado en *R. sphaeroides* (Wang et al, 2001). Es especialmente interesante que el efecto de la mutación es justamente el contrario que el observado en SF21, es decir, la adquisición de una nueva reacción de desaturación en un punto de la molécula donde antes no era capaz de actuar. En ambos casos se debe al cambio de un aminoácido en la misma región de la proteína. La versatilidad en el reconocimiento de sustratos y en la capacidad de hacer cuatro o más desaturaciones no parece fácil de reconciliar con la supuesta rigidez que impone la organización de la enzima en un complejo multimérico en el que cada monómero realiza una sola desaturación, descrito anteriormente para *P. blakesleeanus* (Aragón et al., 1976).

En el momento de iniciar esta Tesis, tanto en *N. crassa* como en *F. fujikuroi* se habían identificado los genes necesarios para la síntesis de toruleno a partir de GGPP, *al-1* y *al-2* en un caso, *carB* y *carRA* en el otro. Sin embargo, se desconocían los genes del resto de la ruta, presumiblemente un solo gen responsable de la síntesis de neurosporaxantina a partir de toruleno, cuya pérdida de función da lugar al fenotipo rojo mostrado por un mutante denominado *carT* (Avalos y Cerdá-Olmedo, 1987). Esta laguna de información es particularmente llamativa en *N. crassa* debido a la enorme atención prestada a la genética de este organismo, incluyendo el análisis de su genoma y su proteoma. Los resultados mostrados en esta Tesis han supuesto un avance considerable en el conocimiento de la genética y bioquímica de la síntesis de carotenoides en estos hongos, identificando a CarT, una enzima capaz de introducir un corte oxidativo en el toruleno en una posición asimétrica. Esta proteína representa una nueva subfamilia dentro de las oxigenasas de carotenoides, y abre la puerta a la identificación de genes homólogos en otros hongos. Se espera, por ejemplo, que esté presente también en otras especies de *Fusarium* cuyos genomas serán pronto secuenciados, como es el caso de *F. oxysporum*. Además, su descubrimiento ha facilitado la identificación del gen homólogo en *N. crassa* en un trabajo realizado en el mismo grupo, próximo a ser publicado (L. Saelices et al., manuscrito en preparación). De forma inesperada, los resultados no cierran la ruta, sino que descubren una complejidad en sus últimas reacciones mayor de lo que cabía anticipar, ya que el producto de rotura del toruleno no es la neurosporaxantina, sino su versión aldehído. Parece por tanto probable la existencia de otro gen necesario para la síntesis de la xantofila ácida. Además, datos mostrados en el Capítulo 1 de esta Tesis (Fig. C1.4, estirpe SF4) señalan que *F. fujikuroi* posee diferentes variantes de la neurosporaxantina, como lo indican la similitud del espectro y las diferencias en su comportamiento cromatográfico de las diferentes fracciones de carotenoides polares identificadas. Aunque es posible que tales variantes sean el resultado de alteraciones químicas producidas en el proceso de extracción o en la manipulación de las muestras, es probable que tales modificaciones sean introducidas por el hongo sobre la neurosporaxantina de forma controlada, como ocurre al menos en otra especie de *Fusarium* (Sakaki et al., 2002) y que diferentes productos puedan cumplir distintas funciones. En tal caso cabe predecir actividades enzimáticas directa o indirectamente asociadas a la ruta. Como primer paso para abordar este problema, será necesario llevar a cabo un análisis químico de las diferentes fracciones mostradas en la Fig. C1.4, estudio no abordado en esta Tesis por limitaciones de tiempo.

Una aportación particularmente relevante es la demostración de que *F.*

fujikuroi posee una enzima, que hemos denominado CarX, capaz de sintetizar retinal. Una enzima similar debe estar presente en todos los hongos que posean opsinas fotorreactivas. La necesidad de producción de retinal quedó en evidencia por primera vez en *N. crassa* con la demostración de la unión de este retinoide a la opsina Nop-1 (Bieszke et al., 1999b), pero este trabajo no fue acompañado por esfuerzos para demostrar la existencia de genes o enzimas involucrados en su síntesis. La comparación de los genomas fúngicos disponibles ha mostrado que no todos los hongos que poseen genes de presuntas opsinas poseen los genes necesarios para sintetizar caro-tenoides. Aunque en principio la existencia de opsinas con retinal no exige la capacidad de sintetizar este compuesto, como lo demuestran las opsinas visuales de los animales, es improbable que los hongos carentes de caroteno-génesis puedan incorporar carotenoides externos para utilizarlos como fuente de retinal. Por un lado los carotenoides son compuestos muy insolubles, y por otro lado no se conoce ningún mecanismo molecular de incorporación de carotenoides por microorganismos a partir del medio. Parece lógico por tanto que la presencia de opsinas que utilicen retinal como grupo prostético vaya siempre acompañado por la capacidad de sintetizar carotenoides y de cortarlos para producir el correspondiente apocarotenoide.

El descubrimiento del gen *carX* tiene su origen en su ligamiento con otros genes estructurales de la carotenogénesis de *F. fujikuroi* así como con el gen de la opsina CarO. El único precedente de tal relación de ligamiento se ha encontrado recientemente en ciertas bacterias marinas fototróficas, cuyos operones para síntesis de carotenoides incluyen un gen de síntesis de retinal y otro gen para la proteorrodopsina, que utiliza como bomba de protones dependiente de la luz (Sabehi et al., 2005). Como en estas bacterias, la existencia del agrupamiento en *F. fujikuroi* cobra especial sentido desde la perspectiva de un regulón enfocado a la producción de una opsina fotoactiva, en el que *carRA*, *carB* y *carX* acompañarían a *carO* como genes auxiliares necesarios para la síntesis de su grupo prostético. La necesidad de iluminación para la expresión del agrupamiento génico puede guardar relación con que la unidad CarO-retinal sea solo funcional en la luz. Desde el punto de vista de la función de los carotenoides, la provisión de retinal a la célula para su uso como cromóforo de ciertas proteínas puede representar su papel biológico más importante en el hongo.

A la luz de estas consideraciones, cobra especial relevancia la asignación de función a la opsina CarO. La ausencia de fenotipo detectable del mutante carente de la versión funcional de la proteína (Prado et al., 2004) sugiere que CarO juega un papel secundario en la biología del hongo. Posiblemente su función es relevante solo bajo circunstancias ambientales o de ciclo de vida ausentes en las condiciones experimentales usadas en el laboratorio, como pueden ser el ciclo sexual o la patogénesis. Su secuencia polipeptídica muestra características que la acercan a ciertas proteínas de choque térmico, pero al contrario que éstas, posee los aminoácidos necesarios para la utilización de retinal y para el bombeo de protones; este dato, unido a su regulación por la luz y a su estrecha relación con los genes de la carotenogénesis, apoyan fuertemente que se trata de una fotoproteína. Pertenece, sin embargo, a una subfamilia de opsinas que se encuentra en hongos patógenos, como *Fusarium* y *Ustilago*, lo cual podría sugerir alguna conexión con su capacidad infectiva. A raíz de ciertas diferencias de CarO con la bacteriorrodopsina, se ha sugerido que esta subfamilia podría haberse especializado en captar una longitud de onda distinta de la

que captan las opsinas más comunes, como Ops o Nop-1, (Brown, 2004). Se desconocen las implicaciones que este hecho pueda tener sobre la función biológica de CarO. Actualmente se investiga el posible papel de esta proteína en el ciclo sexual del hongo (A. F. Estrada, datos no publicados).

El retinal es el primer producto de la carotenogénesis al que se puede asignar una función biológica explícita en ascomicetos. No es el caso de la neurosporaxantina o sus precursores, cuya función se desconoce, y que es probable que jueguen un papel secundario o menos determinante. De los genes necesarios para la síntesis de neurosporaxantina, ajenos a la producción de retinal, solo se conoce *carT*, pero cabe esperar la existencia de otro gen para la generación del extremo carboxilo, y posiblemente alguno más implicado en modificaciones posteriores de la molécula. Parece probable que tales genes hayan sido adquisiciones posteriores a la de los genes necesarios para producir retinal. La escasa presencia de neurosporaxantina en hongos sugiere que los genes para su síntesis debieron aparecer en un antepasado relativamente reciente de *Fusarium*, aunque anterior a su separación de la línea que dio lugar a *N. crassa*. La incorporación tardía de la capacidad de sintetizar este carotenoide es coherente con la presencia del gen *carT* en un lugar independiente del agrupamiento génico de los restantes genes *car*. No descartamos la posibilidad de que los genes asociados a la síntesis o metabolismo de esta xantofila formen un segundo agrupamiento génico. Tal posibilidad no ha sido investigada en *F. fujikuroi*, pero en el genoma de *F. graminearum* *carT* está rodeado por genes de función desconocida. Uno de ellos se transcribe en orientación divergente y podría compartir por tanto elementos reguladores con *carT*. La comprobación de esta hipótesis requeriría nuevos experimentos, que podrían empezar por el análisis del efecto de la luz o la mutación *carS* sobre la expresión de estos genes.

La existencia de proteínas que emplean retinal como grupo prostético no excluye otros usos de este carotenoide. El importante papel del ácido retinoico como señal reguladora en animales nos lleva a plantearnos un posible papel biológico de este compuesto en hongos. Aunque no existen datos de la presencia de este retinoide en este grupo taxonómico, el análisis del genoma de *F. graminearum* revela la existencia de un marco abierto de lectura (XP_391210) para una proteína con una elevada similitud con la deshidrogenasa de retinal de *Gallus gallus* (NP_990326), enzima responsable de la conversión de retinal en ácido retinoico. Futuros experimentos como los descritos en esta Tesis para CarT y CarX permitirán confirmar la actividad de esta supuesta enzima. En cualquier caso, como ya ocurre con el retinal o las opsinas, la información disponible permite descartar un posible papel del ácido retinoico sobre el desarrollo asexual de *F. fujikuroi* en las condiciones habituales de laboratorio. Así lo demuestra el fenotipo silvestre (excluyendo la pigmentación) de los mutantes nulos *carB*, totalmente bloqueados en la ruta carotenogénica y, por tanto, incapaces de sintetizar retinal y, en su caso, ácido retinoico. A este respecto, es interesante resaltar que no se ha investigado el papel de la síntesis de carotenoides (y de retinoides por extensión) en aspectos de la biología de *F. fujikuroi* que implican el reconocimiento entre estirpes, como puede ser el ciclo sexual. De encontrarse un fenotipo asociable a la pérdida de función de la supuesta deshidrogenasa de retinal, la sencillez de *F. fujikuroi* como modelo de estudio facilitaría la búsqueda de posibles proteínas receptoras de ácido retinoico como señal.

La purificación de las enzimas CarT y CarX descrita en esta Tesis, además de permitir el análisis de sus actividades enzimáticas *in vitro*, ha confirmado que se

trata de enzimas razonablemente solubles y estables, propiedades que han facilitado la ejecución de los experimentos. A juzgar por su parecido estructural con enzimas de la misma familia para las que se ha determinado la estructura tridimensional (Kloer et al. 2005; Schezinger et al., 2006), tanto CarT como CarX parecen ser proteínas perimembranales. Sus sustratos predecibles, toruleno en un caso y probablemente β -caroteno o γ -caroteno en el otro, son altamente insolubles y se encuentran posiblemente asociados a membranas. La interacción de CarX y CarT con la membrana celular donde tienen lugar los pasos anteriores de la ruta debe facilitar su acceso a los sustratos a las bajas concentraciones presentes en la estirpe silvestre. Se desconoce si se trata de cualquier membrana en la célula, de la membrana plasmática o de la membrana de algún orgánulo celular especializado, tal como el denominado *carotenosoma* de ciertas bacterias fotosintéticas (Frigaard et al., 2005).

El análisis de las secuencias disponibles de genomas fúngicos revela la existencia de marcos de lectura para supuestas oxigenasas de carotenoides en al menos un zigomiceto, *Rhizopus oryzae*, y un basidiomiceto, *Ustilago maydis*. La considerable distancia evolutiva de ascomicetos con basidiomicetos y sobre todo con zigomicetos, sugiere que los genes para oxigenasas de carotenoides ya estaban presentes en estadíos muy tempranos de la evolución, en antepasados comunes a los ascomicetos, basidiomicetos y ascomicetos.

Conclusiones

1. Se ha descubierto un mutante de *F. fujikuroi* con intensa coloración amarilla (SF21). Se ha demostrado por secuenciación y reemplazamiento alélico que su fenotipo es debido a una mutación en el gen *carB* consistente en una transición C608->T que da lugar a un cambio Pro173->Ser. Hemos denominado a este alelo *carB36*.

2. El alelo *carB36* provoca la acumulación de grandes cantidades de γ -caroteno y β -caroteno y una drástica disminución en la acumulación de neurosporaxantina, indicando la pérdida casi total de la capacidad para realizar la quinta desaturación de la ruta sobre γ -caroteno. Las predicciones de la estructura secundaria de la proteína sugieren que la mutación afecta al dominio de entrada y reconocimiento de este sustrato.

3. Se ha caracterizado la secuencia del gen *carO*, que determina una proteína de la familia de las opsinas con similitud a proteínas de choque térmico. Un mutante *carO* no muestra alteraciones fenotípicas en las condiciones de cultivo de laboratorio, y la expresión del gen no se ve afectada de forma llamativa por choque térmico.

4. Se ha determinado la secuencia del gen *carX*, que da lugar a una proteína perteneciente a la familia de las oxigenasas de carotenoides. Sus niveles de ARNm muestran una regulación similar por luz y por el producto del gen *carS* a la mostrada por los genes estructurales de la carotenogénesis *carRA* y *carB*, y por el gen *carO*, con los que forma un agrupamiento génico.

5. La pérdida de función del gen *carX* produce una moderada desrepresión de la carotenogénesis en luz o en oscuridad, que tiene reflejo en cambios apreciables en los niveles de ARNm de los genes estructurales de la ruta.

6. Se ha purificado la proteína CarX y se ha analizado su actividad enzimática *in vitro*. Los ensayos muestran que CarX corta β -caroteno para producir retinal. Se ha determinado que el mecanismo de reconocimiento de sustrato requiere la presencia de un anillo de β -ionona en la molécula.

7. Se ha clonado y determinado la secuencia del gen *carT*, responsable una segunda proteína de *F. fujikuroi* perteneciente a la familia de las oxigenasas de carotenoides. Sus niveles de ARNm cambian de forma similar a los niveles de ARNm del agrupamiento génico formado por los genes *carX*, *carRA*, *carB* y *carO* bajo diferentes condiciones de regulación.

8. El alelo *carT* del mutante SG68, que acumula toruleno en lugar de neurosporaxantina, contiene una transición G71->A, que provoca la sustitución de una glicina por un residuo de aspartato en la posición 24 de la proteína. El aminoácido sustituido está conservado en otras oxigenasas de carotenoides y se localiza muy cerca del centro activo de la proteína.

9. Se ha purificado la proteína CarT y se ha analizado su actividad enzimática *in vitro*. La enzima corta toruleno para producir β -apo-8'-carotenal, molécula idéntica a la neurosporaxantina pero con un radical aldehído en su extremo. Por tanto, el gen *carT* determina la enzima responsable del corte oxidativo del toruleno en la carotenogénesis de *F. fujikuroi*.

Apéndices

Materiales y Métodos

1. Estirpes

Las estirpes de *Fusarium* utilizadas en este trabajo, así como su fenotipo y origen, se describen en las Tablas 1 y 2. La estirpe silvestre IMI58289 procede del Imperial Mycological Institute (Kew, Surrey, Inglaterra). La estirpe FKMC1995 fue cedida por el Dr. J.F. Leslie (Universidad del Estado de Kansas, EE.UU.). La estirpe de *Fusarium graminearum* NRRL31084 fue cedida por el Dr. Kerry O'Donnell (Servicio de Investigación Agrícola, Illinois, EE.UU.).

Tabla 1. Estirpes silvestres de *Fusarium* empleadas en este trabajo

estirpe	especie	procedencia
IMI58289	<i>F. fujikuroi</i>	Imperial Mycological Institute, Kew, Surrey, Reino Unido
FKMCC1995	<i>F. fujikuroi</i>	Dr. John F. Leslie, Universidad del Estado de Kansas Manhattan, Kansas, EE.UU.
m567	<i>F. fujikuroi</i>	Dra. Bettina Tudzynski, Instituto Botánico, Universidad de Münster, Alemania
NRRL31084	<i>F. graminearum</i>	Dr. Kerry O'Donnell, Servicio de Investigación Agrícola, Peoria, Illinois, EE.UU.

Tabla 2. Estirpes mutantes de *F. fujikuroi* empleadas en esta Tesis

estirpe	origen	genotipo	referencia
SF1	FKMCC1995	<i>niaD4</i>	(Prado et al., 2004)
SF4	SF1	<i>carS35 niaD4</i>	
SF21	SF4	<i>niaD4 carS35 carB36</i>	
SF73	SF21	<i>niaD4 carS35 carB36 carB37</i>	
SF98	SF21	<i>niaD1 carS35 carB36 carB38</i>	
SF100	SF1	<i>niaD1 carO1</i>	(Prado et al., 2004)
SF101	SF1	<i>niaD1 carO2</i>	(Prado et al., 2004)
SF188	SF1	<i>niaD4 carB36</i>	
SF191	SF189	<i>niaD4 carS- carB36 carB</i>	
SF214	SF191	<i>niaD4 carS- carB36</i>	
SF215	SF191	<i>niaD4 carS- carB36</i>	
SG22	IMI58289	<i>carS</i>	(Avalos y Cerda-Olmedo, 1987)
SG36	IMI58289	<i>carS</i>	(Avalos y Cerda-Olmedo, 1987)
SG39	IMI58289	<i>carS</i>	(Avalos y Cerda-Olmedo, 1987)
SG68	IMI58289	<i>carS carT</i>	(Avalos y Cerda-Olmedo, 1987)
T2.1	IMI58289	$\Delta carX$	(Thewes et al., 2005)
T5.2	IMI58289	$\Delta carX$	(Thewes et al., 2005)
T17.1	IMI58289	$\Delta carX$	(Thewes et al., 2005)

La estirpe de *Escherichia coli* utilizada rutinariamente fue DH5 α , cuyo genotipo es: *F- endA1 hsdR17 (rK⁺ mK⁻) supE44 thi-1 gyrA96 recA1 relA1 DlacU169 [F80cl lacZDM15] l⁻* (Hanahan, 1983).

La estirpe de *E. coli* utilizada en los experimentos en la Universidad de Friburgo fue la XL1-Blue strain *a,b recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacIqZM15 Tn10 (Tet^R)]*, excepto para la producción de proteínas, que se utilizó la estirpe de BL21(DE3) *F- ompT hsdSB (rB⁻, mB⁻) dcm gal ë(DE3)* (Invitrogen, Carlsbad, California, EE.UU.).

2. Vectores de clonación y plásmidos auxiliares

A continuación se describen los plásmidos comerciales (se indica la casa proveedora) o cedidos por otros investigadores (se indica la referencia) que se han utilizado en esta Tesis.

pBluescript II KS + (Stratagene, La Jolla, California, EE.UU.)

Vector derivado de pUC19, con el gen de resistencia a ampicilina. Contiene un sitio de clonación múltiple que interrumpe el gen de la β -galactosidasa y permite la selección de plásmidos recombinantes por color con Xgal e IPTG.

pGEM-T Easy (Promega Madison, Wisconsin, EE.UU.)

Molécula plásmidica lineal con el gen de resistencia a ampicilina, digerido con *EcoRV* y con una timina añadida en cada extremo 3' para facilitar la clonación de productos de PCR. El lugar de clonación interrumpe el gen de la β -galactosidasa y permite por tanto la selección de plásmidos recombinantes por color con Xgal e IPTG.

pCR 2.1-TOPO (Invitrogen)

Molécula plásmidica lineal con el gen de resistencia a ampicilina y con una timina añadida a cada extremo 3' para la inserción directa de fragmentos de PCR. La ligación es facilitada por el sistema "TOPO Cloning", de la misma casa comercial. El lugar de clonación interrumpe el gen de la β -galactosidasa y permite la selección de plásmidos recombinantes por color con Xgal e IPTG.

pBAD-TOPO TA (Invitrogen)

Molécula plásmidica lineal diseñada para producción heteróloga de proteína en *E. coli* y su posterior purificación y análisis de actividad *in vivo*. La molécula posee una timina añadida a cada extremo 3' para la inserción directa de fragmentos de PCR en fase con el promotor regulable *araBAD* (*pBAD*). Contiene además el gen *araC* que regula positivamente este promotor, transcribiendo la secuencia insertada en presencia de L-arabinosa.

pGEX-4T (Amersham Biosciences, Little Chalfont, Inglaterra)

Plásmido diseñado para producción heteróloga de proteína en *E. coli* y su posterior purificación por el sistema de la Glutación-S-transferasa, que precede a un lugar de clonación múltiple donde se inserta la secuencia objeto de análisis. El promotor se activa por el gen *lacI* (también presente en el plásmido), el cual se induce con IPTG.

pHJA2 (Fernández-Martín et al., 2000)

Plásmido derivado de pAN7-1 (Punt et al., 1987) y pBluescript® II KS +. que contiene el gen de resistencia a higromicina del primero y el sitio de clonación múltiple del segundo. Un segmento de ADN de 4 kb, conteniendo el gen de resistencia a higromicina y sus señales reguladoras, se obtuvo por digestión total de pAN7-1 con *XbaI* y parcial con *EcoRI*, se trató con la polimerasa Klenow para volver sus extremos romos y se clonó en la diana *NaeI* de pBluescript® II KS +.

3. Plásmidos construidos

A continuación se describen los plásmidos construidos en esta Tesis, derivados de los arriba descritos. Las secuencias de los cebadores se describen en el apartado 9.2.

pB21H

El alelo *carB* del mutante SF21 se obtuvo por PCR con los cebadores CarRAG-3F y Ops-4R sobre ADN genómico de esta estirpe. El producto de la reacción, de 4,5 Kb, se introdujo en pGEM-T Easy, se escindió posteriormente mediante digestión con *NotI* y se clonó en pHJA2 tratado con la misma enzima de restricción, dando lugar a pB21H.

pCRcarT

El gen *carT* se obtuvo por PCR con los cebadores carT-8F y carT-8R sobre una muestra de ADNc de la estirpe SF1 obtenida mediante una reacción de retrotranscripción de ARN total de dicha estirpe. El producto de la reacción de PCR se clonó en pCR 2.1-TOPO y posteriormente se secuenció para confirmar la ausencia de intrones o mutaciones.

pBADcarTs y pBADcarTa

Se obtuvo la secuencia codificadora del gen *carT* mediante PCR con los cebadores carT-1 y carT-2 sobre el plásmido pCRcarT. El producto de la reacción se clonó en pBAD-TOPO TA. Como resultado se obtuvo una mezcla de plásmidos con las dos orientaciones del gen respecto al promotor en el vector. El plásmido con la orientación correcta de *carT* se denominó pBADcarTs, y el plásmido con la orientación inversa se denominó pBADcarTa, utilizado como control negativo en los experimentos de expresión del gen en *E. coli*.

pGEXTs y pGEXTas

El gen *carT* se escindió de pCRcarT mediante digestión con *EcoRI* y se clonó en el vector pGEX-4T cortado con la misma enzima de restricción. De forma análoga al apartado anterior, se obtuvo una mezcla de plásmidos con las dos orientaciones del gen respecto al promotor en el vector. El plásmido con la orientación correcta de *carT* se denominó pGEXTs, y el plásmido con la orientación inversa se denominó pGEXTas, utilizado como control negativo.

pCRcarX

El gen *carX* se obtuvo por PCR con los cebadores CLU-4R y CLU-5F sobre una muestra de ADNc de la estirpe SF1 obtenida mediante una reacción de retrotranscripción de ARN total de dicha estirpe. El producto de la reacción de PCR se clonó en pCR 2.1-TOPO y posteriormente se secuenció para confirmar la ausencia de intrones o mutaciones.

pBADcarXs y pBADcarXa

Se obtuvo la secuencia codificadora del gen *carX* mediante PCR con los cebadores CarX-1 y CarX-2 sobre el plásmido pCRcarX. El producto de la reacción se clonó en pBAD-TOPO TA. Como resultado se obtuvo una mezcla de plásmidos con las dos orientaciones del gen respecto al promotor en el vector. El plásmido con la orientación correcta de *carX* se denominó pBADcarXs, y el plásmido con la orientación inversa se denominó pBADcarXa, utilizado

como control negativo.

pGEXs y pGEXAs

El gen *carX* se escindió de pCR*carX* mediante digestión con *NotI* y el fragmento de ADN resultante se trató con polimerasa T4 y con *Ecl39II* para conseguir extremos romos. A continuación se clonó en el vector pGEX-4T-1 previamente digerido con *SmaI* y tratado con fosfatasa alcalina. Como resultado de la ligación se obtuvo una mezcla de plásmidos con las dos orientaciones del gen respecto al promotor en el vector. El plásmido con la orientación correcta de *carX* se denominó pGEXs, y el plásmido con la orientación inversa se denominó pGEXAs, utilizado como control negativo.

4. Medios, soluciones y condiciones de cultivo

4.1 *Fusarium fujikuroi*

Todos los medios sólidos utilizados en esta Tesis contienen 16 g/l de agar (Adsa Micro, Barcelona).

4.1.1. Medios de cultivo para *F. fujikuroi*

Medio mínimo (DG)

Su composición por litro es: 30 g de glucosa, 3 g de NaNO_3 , 1 g de KH_2PO_4 , 0,5 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,5 g de KCl y 2 ml de una solución de microelementos que contienen 10 mg de H_3BO_3 , 10 mg de CuSO_4 , 20 mg de FeCl_3 , 20 mg de MnCl_2 , 20 mg de NaMoO_4 y 2 mg de ZnSO_4 (Avalos et al., 1985).

Medio DG asn

Medio DG con 3 g/l de asparragina en lugar de NaNO_3 .

Medio NG

Medio DG con 4 g/l de extracto de levadura, 8 g/l de peptona y sin microelementos (Avalos et al., 1985).

Medio de esporulación

Su composición por litro es: 1 g de glucosa, 1 g de NH_4NO_3 , 1 g de KH_2PO_4 , 0,5 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,5 g de KCl, y 1 g de extracto de levadura (Avalos et al., 1985).

DG osmoestabilizado

Medio DG con 90 g/l de KCl. Para hacer medio DG osmoestabilizado de cobertera se utilizaron 4 g/l de agar.

Medios selectivos

Para seleccionar transformantes resistentes a higromicina se añadió al medio higromicina B (Roche Diagnostics GmbH, Penzberg, Alemania) a una concentración de 0,1 g/l.

DG clorato

Medio DG asn con 30 g/l de KClO_3 .

4.1.2. Condiciones de cultivo

Condiciones de iluminación

Los cultivos se iluminaron con 5 W/m² de luz blanca procedente de una batería de cinco lámparas fluorescentes (Sylvania Standard F36/154-t8) instaladas sobre una lámina de vidrio difusora. En los casos de iluminación a 30°C la intensidad luminosa fue 25 W/m².

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

Extracción de ARN

Para extraer ARN de FKMC1995 o de estirpes derivadas, éstas se cultivaron durante 3 días en oscuridad a 30°C. El inóculo se hizo con 10⁶ esporas en medio líquido DGasn, en cajas de Petri de 9 cm de diámetro. En su caso, a los tres días de cultivo las cajas se expusieron a la luz el tiempo deseado.

Para extraer ARN de IMI58289 o de estirpes derivadas, se cultivaron 10⁶ esporas de la estirpe en un matraz con 250 ml de medio DG líquido. A los 3 días de crecimiento se separó el micelio por filtración al vacío. En su caso, se expuso a la luz el tiempo deseado.

Manipulación de protoplastos de *F. fujikuroi*

Los protoplastos se inocularon en agar de cobertera (8 g/l) osmoestabilizado (90 g/l de CIK) sobre medio de cultivo igualmente osmoestabilizado. Las diluciones de protoplastos se realizaron en SO₄Mg 0,9 M.

4.2. *Escherichia coli*

Medio nutritivo LB

Su composición por litro es: 5 g de extracto de levadura, 10 g de peptona hidrolizada enzimáticamente ("bacto-tryptone" Difco BD, Frankling Lakes, New Jersey, EE.UU.) y 5 g de NaCl (Sambrook et al., 1989).

Medio SOC

Para preparar un litro, se autoclavan 960 ml con 20 g de Triptona, 5 g de Extracto de levadura, 0,6 g de NaCl y 0,19 g de KCl. Después se añaden 10 ml de MgCl₂ 1M, 10 ml de MgSO₄ 1M y 20 ml de glucosa 20% (p/v).

Suplementos

En su caso, el medio LB se suplementó con ampicilina a una concentración final de 100 mg/l.

Para detección de actividad β-galactosidasa, el medio se suplementó con Xgal e IPTG a concentraciones finales de 40 mg/l y 20 mg/l respectivamente.

5. Mutagénesis de *F. fujikuroi* con N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina

Se obtuvieron 10^7 esporas de la estirpe correspondiente, se resuspendieron en 100 ml de N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina a una concentración de 2 mg/ml y se incubaron 30 min en oscuridad (Avalos et al., 1985). El mutágeno se eliminó mediante dos lavados de las esporas con agua estéril. Finalmente, las esporas mutagenizadas se resuspendieron en glicerol 15% y se almacenaron a -20°C . Los restos de agua y las puntas que entraron en contacto con el mutágeno se trataron con tiosulfato 2% (p/v). Para el escrutinio de mutantes de la carotenogénesis las esporas se sembraron sobre medio DG asn y se incubaron 4 días en luz o en oscuridad en función del fenotipo buscado.

6. Transformación

6.1. Transformación de *F. fujikuroi*

6.1.1. Preparación de protoplastos

Se inocularon 5×10^8 esporas en 200 ml NG y se incubaron a 28°C durante 14 h a 150 rpm en un matraz de 500 ml. Se miró una alícuota al microscopio para confirmar una tasa de germinación superior al 95%, se filtraron las germínulas a través de dos filtros *Monodur* y se lavaron dos veces con solución OM (MgSO_4 1,2 M, NaH_2PO_4 2mM) para eliminar el PDB residual y esporas no germinadas. Para la lisis de las paredes celulares se disolvió 1 g de enzimas líticas en 18 ml OM en un tubo *Falcon*, y se añadieron con cuidado las germínulas lavadas. Se incubó el tubo horizontalmente aproximadamente 50 min a 30°C con agitación suave. Durante la incubación se controló la aparición de los protoplastos por observación al microscopio. Una vez terminado el proceso de lisis se pasaron los protoplastos por dos filtros *monodur* y se lavaron con STC (sorbitol 14,5%, Tris HCl 10 mM pH 7,5, CaCl_2 50 mM). La suspensión de protoplastos se centrifugó a 4°C durante 15 min a 3000 rpm en una centrífuga con rotor vasculante. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el precipitado en 1 ml de STC. La concentración se ajustó a 2×10^8 protoplastos por ml y se guardaron en alícuotas de 100 μl a -80°C .

6.1.2. Transformación

Se descongeló lentamente en hielo una alícuota de protoplastos (2×10^7). Se mezcló la cantidad apropiada de plásmido (1-10 μg) en un volumen no superior a 10 μl con 12,5 μl de PEG (PEG 4000 60% (p/v), MOPS 12,5% (p/v)). Se añadió la mezcla a los protoplastos y se incubaron 20 min en hielo. A continuación se añadió lentamente 1 ml de PEG, se mezcló suavemente y se incubó durante 15 min a temperatura ambiente. La mezcla se volcó en un tubo de 10 ml con 2 ml de STC y se centrifugó durante 10 min a 3.500 rpm. Tras eliminar el sobrenadante, el precipitado se resuspendió en 500 μl de medio NG líquido osmoestabilizado y se incubó a 30°C durante 12-15 h para permitir la regeneración de la pared celular de los protoplastos. A continuación se añadieron a la muestra 3 ml de NG osmoestabilizado de cobertera a 48°C y la mezcla se extendió inmediatamente en una caja de Petri de medio DG suplementado con 1 g/l de extracto de levadura y 0,1 mg/l de higromicina. Los transformantes comienzan a aparecer a partir del cuarto ó quinto día de incubación a 30°C .

6.2. Transformación de *E. coli*

6.2.1. Preparación de células competentes

Este método, basado en el descrito por Inoue y colaboradores (Inoue et al., 1990), se empleó para transformar con mezclas de ligaciones. Se añadió 1 ml de un cultivo en fase estacionaria de *E. coli* a 200 ml de medio SOC en un matraz de 1 litro. Se incubó en agitación a 22°C hasta alcanzar una densidad óptica de 0,5 a 600 nm, y se enfrió en hielo durante 10 min. Manteniendo las células en todo momento en frío, se centrifugaron a 2.500 rpm durante 10 min, se resuspendieron en 80 ml de tampón TB (PIPES 0,38%, CaCl₂*2H₂O 2,2%, KCl 18,6% y MnCl₂*6H₂O 11,2%, pH 6,7) preenfriado y se incubaron 10 min en hielo. Las células se centrifugaron de nuevo repitiendo el proceso ya descrito y se resuspendieron en 20 ml de tampón TB enfriado en hielo. Finalmente se añadieron 1,5 ml de DMSO, se incubaron 10 min en hielo, se separaron en alícuotas de 0,5 ml, se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C hasta su uso.

6.2.2 Transformación

Se añadieron de 1 a 20 µl de la solución de ADN a un tubo de plástico de 10 ml y se mantuvo en hielo. Se añadieron 100-200 µl de células competentes de *E. coli* previamente descongeladas (evitando que el volumen de solución de ADN superara el 10% del volumen de células), se incubó la mezcla en hielo durante 30 min, se sometió a un choque térmico de 42°C durante 45 s y se enfrió en hielo durante 2 min. A continuación se añadió 1 ml de medio LB y se incubó a 37°C 45 min. Por último se concentraron las células por centrifugación y se sembraron en medio LB suplementado con ampicilina.

7. Extracción y manipulación de ácidos nucleicos

7.1. Extracción de ácidos nucleicos

7.1.1. Extracción de ADN plasmídico de *E. coli*

Para la obtención de pequeñas cantidades de ADN (menos de 10 µg, *miniprep*) se utilizaron dos métodos.

El primero (Stephen et al., 1990) es una variante de método de lisis alcalina de Sambrook et al. (1989). Se inocularon 3 ml de LB adecuadamente suplementado con una colonia de la estirpe correspondiente de *E. coli* y se incubaron a 37°C durante 8-12 horas. Se centrifugó 1,5 ml del cultivo (13.000 rpm, la misma velocidad empleada en el resto de centrifugaciones del protocolo) durante 20 s, se eliminó el sobrenadante y se resuspendieron las células en 150 ml de una solución de Tris 50 mM pH 7,5, EDTA 10 mM y 10 mg/l ARNasa, previamente enfriada en hielo. Las células se lisaron mediante la adición de 150 ml de una solución de NaOH 0,2 M y 10 g/l SDS. Se agitó con suavidad hasta aclaramiento de la mezcla y se mantuvo en hielo. Finalmente se neutralizó la mezcla de lisis mediante adición de 150 ml de acetato potásico 1.32 M pH 4,8. Tras una nueva centrifugación de 5 min, el sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo Eppendorf. Para precipitar el ADN se añadieron 450 µl de isopropanol, se

mezcló y se centrifugó 5 min. El precipitado de ADN se lavó por adición de 200 ml de etanol 70% y 5 min de centrifugación. Finalmente se eliminó el sobrenadante, se secó el precipitado y se resuspendió en 20 ml de tampón TE.

El segundo método consiste en el empleo de los materiales y soluciones proporcionados por el juego GFX™ Micro Plasmid Prep Kit (Amersham Biosciences) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Para la obtención de cantidades elevadas de ADN plasmídico se utilizó el juego Midiprep Jetstar Plasmid MIDI Kit 50 2.0 (Genomed, Löhne, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante.

7.1.2. Extracción de ADN genómico de *F. fujikuroi*

Para extraer ADN genómico del hongo se utilizó el juego Gen Elute Plant Genomic DNA miniprep (Sigma) siguiendo las instrucciones del fabricante.

7.1.3. Extracción de ADN genómico de *F. fujikuroi* a pequeña escala

Para su uso como sustrato en reacciones de PCR, se hicieron extracciones de ADN genómico de *F. fujikuroi* a partir de pequeños fragmentos de micelio. En un tubo Eppendorf se mezclaron aproximadamente 1 mg de micelio, 300 mg de perlas de vidrio (0.5 μm), 200 μl de una solución de 20 g/l de tritón, 10 g/l de SDS, ClNa 100 mM, EDTA 1 mM y Tris HCl 10 mM pH 8, y 200 ml de fenol/cloroformo (1:1). La mezcla se agitó vigorosamente en Vortex durante 4 min, se centrifugó 5 min a 13.000 rpm y se transfirió la epifase a un tubo Eppendorf limpio. Posteriormente se añadió 1 ml de etanol 96%, se mezcló y se volvió a centrifugar. El precipitado se secó por vacío y se resuspendió en 400 μl de tampón TE. Para eliminar el ARN, se añadieron 3 ml de ARNasa (10 mg/ml), se incubó la mezcla 10-15 min a 37°C y se precipitó el ADN añadiendo 10 μl de acetato amónico 4 M y 1 ml de etanol 96%. La mezcla se centrifugó 5 min en una microcentrífuga a 13.000 rpm, se eliminó el sobrenadante, se secó el precipitado y se resuspendió en 50 μl de tampón TE. Con este tratamiento se obtuvieron típicamente muestras de ADN con una concentración de 20 ng/ μl .

7.1.4. Extracción de ARN total de *F. fujikuroi*

Las muestras de ARN se extrajeron con el juego Eukaryotic mini (Eppendorf, Hamburgo, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante.

7.2. Cuantificación de la concentración de ácidos nucleicos

Para cuantificar las concentraciones de cebadores, plásmidos, ADN genómico y ARN total, se siguió a Ausubel et al. (1995). las concentraciones en mg/l de ADN y ARN se obtuvieron calculando la absorbencia a 260 nm en agua en cubetas de cuarzo de 1 cm de paso, utilizando los coeficientes de extinción 0,027 (ADN unicatenario), 0,02 (ADN bicatenario) y 0,025 (ARN unicatenario).

Cuando estuvo disponible, las medidas espectrofotométricas se hicieron con un equipo Nanodrop 3.0.1 (Coleman Technologies Inc., Orlando, Florida, EE.UU.).

Las concentraciones de fragmentos de ADN disueltos en pequeños volúmenes se estimaron mediante electroforesis en gel de agarosa y tinción con bromuro de etidio (Sambrook et al., 2001). La fluorescencia de las bandas de ADN, separadas en el gel, se comparó con la de marcadores de tamaño a concentraciones conocidas. Para este fin,

se usaron habitualmente muestras del fago lambda digerido con *HindIII*.

7.3. Manipulación enzimática del ADN

Las enzimas empleadas para digerir muestras de ADN, rellenar los extremos de fragmentos lineales o ligarlos, se adquirieron a las compañías Amersham Biosciences, New England Biolabs (Ipswich, Massachusetts, EE.UU.), Fermentas GMBH (Leon-Rot, Alemania) o Roche (Basilea, Suiza).

7.3.1. Digestiones con enzimas de restricción

Las enzimas de restricción se usaron siguiendo las recomendaciones y tampones proporcionados por el propio fabricante, o bien siguiendo a Sambrook et al. (1989).

Las digestiones de ADN plasmídico se realizaron en volúmenes de 20 a 50 μ l durante al menos dos horas a la temperatura recomendada.

Para las hibridaciones en *Southern* se digirieron muestras de 5-10 μ g de ADN genómico con 20 unidades de enzima durante una noche en un volumen final de 450 μ l. Antes de su separación en electroforesis, las muestras se precipitaron con 50 μ l de acetato sódico 3 M pH 5.2 y 1 ml de etanol 96%. Posteriormente se centrifugaron a en una microcentrífuga a 13.000 rpm, se lavaron con 1 ml de etanol 70%, se secaron y se resuspendieron en los volúmenes adecuados de tampón TE.

7.3.2. Relleno de extremos de moléculas de ADN

A fin de obtener moléculas con extremos romos, los fragmentos de restricción con extremos 3' uncatenarios salientes y los productos de las reacciones de PCR se trataron con el fragmento Klenow de la polimerasa del ADN (Roche). En el caso de los fragmentos con extremos 5' uncatenarios salientes se utilizó la polimerasa del ADN de T4 (Roche). En ambos casos se siguieron las instrucciones del fabricante.

7.3.3. Ligaciones

Las ligaciones de fragmentos de ADN se realizaron en volúmenes de 10 μ l utilizando 1 unidad de ligasa de T4 (Roche). Las incubaciones se llevaron a cabo durante una noche a 16°C.

7.4. Electroforesis de ácidos nucleicos

7.4.1. Electroforesis de ADN

Las electroforesis de ADN se hicieron en geles de agarosa de baja electroendo-ósmosis (Agarosa D1 baja EEO, Pronadisa, Madrid) a una concentración de 8 g/l o a otra concentración cuando los tamaños de los fragmentos relevantes a separar así lo requirieron. Para las electroforesis se empleó tampón TAE (Sambrook et al., 2001).

Las electroforesis se llevaron a cabo en cubetas de las casas Lagoplast (Madrid) o Ecogen (Barcelona), conectadas a una fuente de alimentación Pharmacia, modelo LKB. Como marcadores del tamaño de los fragmentos de ADN se utilizó ADN del fago Lambda digerido con *Hind*III o marcadores comerciales (escalera de 1 Kb, Techline, Aberdeen, Washington, EE.UU.). Para las hibridaciones en *Southern*, en caso de detección no radiactiva se empleó el marcador Molecular III (Roche), que contiene fragmentos de tamaño conocido marcados con digoxigenina.

Las bandas de ADN se visualizaron con bromuro de etidio presente en el propio gel de agarosa o, en algunos casos, sumergiendo el gel en una solución de bromuro de etidio a una concentración de 5 mg/l. Los geles teñidos se expusieron a radiación ultravioleta en un transiluminador Fotodyne (Hartland, Wisconsin, EE.UU.) y se fotografiaron mediante un equipo de análisis de imagen ImageStore 5000, UVP. Los fragmentos destinados a la secuenciación o a la construcción de vectores de expresión se visualizaron con una fuente de mano de radiación ultravioleta de longitud de onda larga (312 nm).

7.4.2. Electroforesis de ARN

Para las electroforesis de ARN se emplearon cubetas, peines y bandejas tratadas previamente con NaOH 0,4 N durante 12 h y lavadas con agua tratada con DEPC. Se emplearon geles de 100 ml con 12 g/l de agarosa, incluyendo 10 ml de tampón MOPS 40 mM pH 7, acetato sódico 10 mM, EDTA 1 mM y 5,3 ml de formaldehído añadidos a 65°C, antes de la coagulación de la agarosa.

Las muestras a cargar en los geles contienen 15 µg de ARN en 10 µl de formamida, 3 µl de tampón MOPS, 3,5 µl de formaldehído 12,3 M y 4,5 µl de agua tratada con DEPC. Las muestras se calentaron a 65°C durante 15 min, se incubaron varios min en hielo y se mezclaron con 3 µl del tampón de carga usado habitualmente en las electroforesis de ADN previamente tratado con DEPC. Una vez cargadas, se separaron en el gel de electroforesis a 75 V.

7.5. Aislamiento de fragmentos de ADN de geles de agarosa

Los fragmentos de ADN de interés se visualizaron en el gel con la fuente de mano de radiación ultravioleta y se separaron cortando pequeños bloques de agarosa, de los cuales se extrajeron con dos métodos diferentes. El primero, basado en el uso de las columnas Wizard Minicolumns (Promega), consiste en meter el fragmento de agarosa en la columna y centrifugar durante 10 minutos a 13.000 rpm. El ADN, presente en el eluyente, se precipitó y se resuspendió en un volumen adecuado de TE.

El segundo método se basó en el empleo de columnas GFX™ PCR DNA, disponibles en el juego Gel Band Purification Kit (Amersham Biosciences), utilizadas según las instrucciones del fabricante.

8. Detección de secuencias de ADN y ARN con el sistema DIG

8.1. Detección de secuencias de ADN (*Southern blot*)

8.1.1. Marcaje de sonda de ADN con DIG-dUTP

La sonda para el gen *carB* se obtuvo mediante PCR sobre ADN genómico de FKMC1995 utilizando los cebadores CarBG-2F y CarBG-3R. El marcaje se llevó a cabo

sobre una muestra de al menos 100 ng del producto de la reacción de PCR aislado de un gel de agarosa. La muestra se marcó con digoxigenina-dUTP (DIG dUTP, Roche) siguiendo el protocolo descrito por el fabricante en el manual de marcaje "The DIG system user's guide for filter hybridization". La técnica empleada es la de cebado aleatorio *random priming* con una mezcla de deoxinucleótidos (dATP 1 mM, dCTP 1 mM, dGTP 1 mM, dTTP 0,65 mM y DIG dUTP 0,35 mM) y hexanucleótidos aleatorios proporcionados por el fabricante.

8.1.2. Transferencia de ADN a la membrana de hibridación

Una vez concluida la separación de los fragmentos de ADN en electroforesis, el gel de agarosa se sumergió sucesivamente 10 min en CIH 250 mM para despurinizar el ADN, dos veces 15 min en una solución desnaturalizante (NaOH 0,5 M, NaCl 1,5 M) y una vez 15 min en una solución neutralizante (Tris 1 M pH 8, NaCl 1,5 M). Finalmente, el ADN se transfirió a un filtro de nailon Hybond (Amersham Biosciences) por capilaridad empleando como solución de transferencia SSC 20x (SSC con una concentración veinte veces mayor) siguiendo Sambrook et al. (2001). La composición del SSC es NaCl 150 mM y citrato sódico 15 mM pH 7 (Sambrook et al., 2001).

Una vez transferido el ADN, se fijó a la membrana irradiando su superficie con 700 J/m² de radiación ultravioleta con un equipo *cross-linker* RPN 2500 (Amersham Biosciences). A continuación, se lavó la membrana con tampón SSC 2x.

8.1.3. Hibridación de ADN transferido a la membrana

El filtro de nailon se prehibridó durante 2 horas en una solución de 1 g/l de N-lauroilsarcosina, 0.2 g/l de SDS y 10 g/l de reactivo de bloqueo (Roche) en SSC 5x y se hibridó en la misma solución con la sonda en condiciones de alta exigencia (42°C). La hibridación se realizó en un horno Hybridizer HB-1D (Techne Ltd., Cambridge, Reino Unido) siguiendo los protocolos y recomendaciones del manual de Roche. Tras la hibridación, el filtro se lavó sumergiéndolo dos veces 5 min en una solución de 1 g/l de SDS en SSC 2x a temperatura ambiente y otras dos veces 15 min en una solución de 1 g/l de SDS en SSC 1x en un baño con agitación a 68°C.

8.1.4. Detección

La hibridación se detectó mediante el reconocimiento de la digoxigenina de la sonda por un anticuerpo conjugado con fosfatasa alcalina. Para ello se incubó el filtro con el anticuerpo, se lavó para eliminar el anticuerpo sobrante, y se detectó la actividad fosfatasa alcalina mediante incubación con un sustrato quimioluminiscente (CSPD®, Roche) y exposición sobre una película X OMAT S de Kodak (Rochester, New York, EE.UU.) a temperatura ambiente.

8.2. Detección de secuencias de ARN con el sistema DIG

8.2.1. Obtención y marcaje de sondas

genómico de la estirpe silvestre FKMC1995. Para cada sonda se emplearon los cebadores indicados entre paréntesis, seguidos por el tamaño del correspondiente producto: *carRA* (CarPG-1F y CarPG-1R; 0,7 Kb), *carB* (CarBG-3F y CarBG-4R; 0,7 Kb), *carX* (CarxG-1F y CarxG-1R; 0,4 Kb), *carO* (Ops-1F y Ops-1R; 1,4 Kb) y *carT* (CarT-1F y CarT-1R; 1,5 Kb).

Para el marcaje se obtuvieron inicialmente hasta 5 µg del producto de PCR, sobre la cual se llevó a cabo una PCR asimétrica utilizando solamente el cebador reverso. En esta reacción se utilizó una mezcla de deoxinucleótidos con DIG dUTP (dATP 1 mM, dCTP 1 mM, dGTP 1 mM, dTTP 0,65 mM y DIG dUTP 0,35 mM). El resultado es una muestra enriquecida en la cadena marcada, complementaria con el ARN diana.

8.2.2. Transferencia de ARN a membranas de hibridación

Los geles de agarosa con ARN se lavaron dos veces con agua destilada 5 minutos y el ARN se transfirió a filtros de nailon Hybond (Amersham Biosciences) por capilaridad empleando SSC 10x. El ARN ribosómico transferido a las membranas de nylon se visualizó mediante 10 min de tinción con una solución de 0,02% (p/v) de azul de metileno en acetato sódico 0,3 M pH 5,5 (Di Pietro y Roncero, 1998).

8.2.3. Hibridación y detección de ARN transferido a membranas

Las condiciones y soluciones utilizadas para hibridar membranas de ARN fueron las mismas que las empleadas con membranas de ADN (apartado 8.2.3), excepto que la temperatura de hibridación fue 50°C en lugar de 42°C. Igualmente, el protocolo de detección fue equivalente al descrito en el apartado 8.2.4. para la hibridación sobre ADN.

9. Reacciones de PCR

9.1. Enzimas utilizadas

Para multiplicar ADN genómico, plasmídico o complementario mediante PCR se utilizaron varias polimerasas de ADN termorresistentes dependiendo del fin de cada reacción. Para las reacciones que exigen la mayor fidelidad de replicación, se empleó la enzima "TripleMaster" (Eppendorf) o "Pwo DNA Polymerase" (Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Alemania), y para el resto de las reacciones se utilizaron la polimerasa "EcoTaq" (Ecogen, Barcelona) o "Biotools DNA polimerasa" (Biotools B & M labs, Madrid).

Para obtener ADNc a partir de ARN total se utilizó el juego de RT-PCR "SuperScript III First-Strand Synthesis System" (Invitrogen), y el sistema de enzimas "BD Advantage™ 2 PCR" (BD Biosciences, Erembodegem, Bélgica) para obtener ADN bicatenario a partir de ADNc.

Para obtener las regiones 5' y 3' del gen *carT* se utilizó el juego Smart-RACE (BD Biosciences) siguiendo las instrucciones del fabricante.

9.2. Condiciones de la reacción

Las cantidades de ADN, cebadores, dNTPs y polimerasa utilizados fueron los recomendados por la casa comercial de la polimerasa, al igual que las temperaturas de desnaturalización, hibridación y replicación.

Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador GeneAmp 2400 PCR System

(Perkin Elmer Cetus, Branchburg, Nueva Jersey, EE.UU.). Los cebadores utilizados en la Tesis se describen en la Tabla 3 ordenados por sus usos.

Tabla 3. Cebadores utilizados en las reacciones de PCR

Nombre	Secuencia 5'->3'
Cebadores universales	
T3	ATTAACCCCTCACTAAAG
T7	AATACGACTCACTATAG
SP6	CATACGATTTAGGTGACACTATAG
Reverse	AACAGCTATGACCATG
Forward	GTAAAACGACGGCCAGT
Secuenciación de <i>carB</i>	
CarBG-2F	TGGGCGAGCTCATGAGCGACATTAAGAAATCTG
CarBG-3R	CGCTCAGAACGACACCGTTTG
CarBG-4F	CGTTGAGGCACTGGTTAACG
CarBG-6R	CGAGAATCATGGACATAGAC
Secuenciación de <i>carO</i>	
Ops-1F	GGAAAATGTGGGATTGAAGC
Ops-3F	CTAACTGTTCTCAGGTCATG
Ops-4R	CTCATTTCCAAGCCCGAGAAAC
Secuenciación de <i>carX</i>	
CarxG-1F	CACAGATATCTTACCGGCAAC
CarxG-1R	GGTAGGTTTCGAGAGAATGACG
CarRAF-2F	GCCGGTAAGATATCTGTGAC
CarRAF-2R	GGCAGGATCCCAGCCCATTTTGACAAAG
CarX-Seq1	CCATACGTGCACTGCTCAGT
CarX-Seq2	ATACTTGGGATTCTCAGTCC
Obtención de sondas	
CarRAG-3F	CAGCTTGCTCACAATCATCC
CarRAG-3R	TTGTTCAATGCAGACCATGC
CarT-1F	GTCTCTCCGTCTGACTCTC
CarT-1R	TCCCCAGCTCCTCCATAGTC
Clonación y expresión de <i>carT</i>	
CarT-5F	CACTGGTTTGATGGGTTTCGC
CarT-4R	GTTACCCCTCCATTGTGTCTT
CarT-5R	CCCATTCTTCCATCGTCTT
CarT-6R	GCATCGACCCCTTCAACGCTCCAACCCCTGGCCG
CarT-6F	CGGCCAGGGGTTGGAGCGTTGAAGGGTCGATGC
CarT-7R	CACACTTGTGTCTCGCCATC
CarT-7F	GGAGAAACAGAGGTACTCGC
Secuenciación de <i>carT</i>	
CarT-seq	ATCTTCAGAGTCGACGCT
CarT-8F	GAGACACTTTGAGCAAGCGAC
CarT-8R	ACGTCCGCTCCTGGTAAATC
Expresión de genes <i>carX</i> y <i>carT</i> en <i>E. coli</i>	
CarT-1	ATGGCGCTCAACGGCCCGGGCGTC
CarT-2	TTAAGCAGCTGGCAAATGAATGCC
CarX-1	ATGAAGTTTCTGCAACAAAATTCC
CarX-2	TCATCCAACAGCTTTCTCCAACCTTC

10. Análisis de proteínas

10.1. Extracción y purificación de proteínas expresadas en *E. coli*

10.1.1. Preparación e inducción del cultivo

La estirpe de *E. coli* con el plásmido adecuado se incubó en 3 ml de LB suplementado con ampicilina durante una noche a 37°C. Se inocularon 50 ml del mismo medio de cultivo con 0,5 ml del cultivo anterior y se incubó a 28°C hasta alcanzar una densidad óptica 0.5 a 600 nm. A continuación se añadieron 50 µl de IPTG 0,1 M, y se incubó 16 horas a 18°C en prevención de la posible formación de cuerpos de inclusión insolubles de proteína.

10.1.2. Extracción de proteínas y purificación

El cultivo se centrifugó a 10.000 rpm durante 10 min, y se resuspendió el precipitado en 3 ml de PBS pH 7.3 (140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄) previamente enfriado en hielo. A continuación se pasaron las bacterias resuspendidas por una prensa francesa dos veces para lisarlas. Se tomó una alícuota de 100 µl para la cromatografía en SDS-PAGE (muestra de extracto total), se añadió al resto 1 ml de Triton-X100 10% y se incubó durante 30 min a temperatura ambiente bajo agitación orbital lenta.

Durante estos 30 min se preparó una muestra de sefarosa unida a glutatión. Para ello se partió de una solución comercial "Glutathione Sepharose™ 4B" (Amersham Biosciences). Se agitó vigorosamente, se tomaron 240 µl y se centrifugaron a 500 g durante 5 min a 4°C. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el precipitado en 1,5 ml de PBS pH 7.3. Se repitió la centrifugación, se descartó el sobrenadante, se resuspendió el precipitado en 210 µl de PBS pH 7.3 y se mantuvo en hielo.

A continuación se centrifugó el extracto de proteínas solubilizadas a 12.000 g durante 10 min a 4°C. De nuevo se tomó una alícuota de 100 µl para la cromatografía en SDS-PAGE (muestra de proteínas solubles) y se incubó el resto del sobrenadante con la muestra de sefarosa-glutatión durante 30 min a temperatura ambiente en agitación orbital lenta. A continuación se centrifugó a 500 g durante 5 min a 4°C y se tomó del sobrenadante una nueva alícuota de 100 µl para la cromatografía en SDS-PAGE (muestra de proteínas no unidas a sefarosa). Finalmente se lavó el precipitado tres veces resuspendiéndolo en 1,6 ml de PBS pH 7.3 y centrifugando a 500 g 5 min a 4°C.

10.1.3. Tratamiento con Trombina

Para separar la proteína purificada de la Glutatión-S-transferasa se hizo un tratamiento con trombina. Se añadieron 10 µl de solución 1 U/µl de trombina a 200 µl de PBS pH 7.3, se mezcló con el precipitado de proteína y sefarosa y se incubó a temperatura ambiente durante toda la noche en agitación orbital. Después se centrifugó la mezcla a 500 g durante 5 min a 4°C y se recogió el sobrenadante, del cual se tomaron 5 ml para la cromatografía en SDS-PAGE (proteína purificada). A continuación se hicieron dos eluciones añadiendo al precipitado 100 µl de tampón de elución (50 mM Tris HCl pH 8.0, 140 mM NaCl, 0,2% Triton X-100) y centrifugando cada vez durante 5 minutos a 500 g a 4°C. Finalmente se tomaron 5 µl de cada elución y de la sefarosa para la cromatografía en SDS-PAGE. La fracción de proteína purificada se conservó a 4°C.

Ante la posibilidad de que la trombina encuentre dianas de corte dentro de la proteína a purificar, se llevó a cabo un protocolo alternativo al descrito con

sefarosa. La proteína unida a Glutación-S-transferasa se eluyó con glutatión, que compite con la glutatión-sefarosa y libera la proteína. Para ello se incubó el precipitado obtenido en el apartado anterior 5 min con 100 ml de tampón de elución suplementado con glutatión 10 mM. Tras la centrifugación se recuperó el sobrenadante y se repitió el proceso dos veces más. Como en el caso anterior, la fracción de proteína purificada se conservó a 4°C.

10.1.4. Fraccionamiento de proteínas en geles desnaturalizantes (SDS-PAGE)

Las proteínas se fraccionaron en electroforesis en gel de poliacrilamida y SDS (SDS-PAGE; Laemmli, 1970). El gel se compuso de una zona de apilamiento de 2 cm de longitud seguida de una zona de fraccionamiento de 5 cm de longitud. Las electroforesis se realizaron en una cubeta Mini-Protean 3 Cell (Bio-Rad, Munich, Alemania) a la que se aplicó un campo eléctrico de 200 voltios durante 45 min. Como marcador de tamaño se utilizó una mezcla comercial de proteínas (Wide Molecular Weight Range, Sigma Chemical).

El gel de apilamiento al 4% se preparó con Tris-HCl 1,25 mM pH 6,8, 1 g/l de SDS y 40 g/l de acrilamida:N,N´metilenbisacrilamida 29:1 (p/p). La polimerización se generó por adición de 1 g/l de persulfato amónico y 1 ml/l de N,N,N´,N´-tetrametiletilenediamida (TEMED).

El gel de fraccionamiento al 12% se preparó con Tris-HCl 1,875 M pH 8,8, 1 g/l de SDS, 120 g/l de acrilamida:N,N´metilenbisacrilamida 29:1 (p/p), y se utilizó para polimerizar 1 g/l de persulfato amónico y 0,5 ml/l de TEMED.

Las muestras de proteínas se cargaron en el gel tras mezclarlas con tampón de carga 3x (65 mM TrisHCl pH 6.8, 20% (v/v) glicerina, 4% (p/v) SDS y 0,02% (p/v) azul de bromofenol y 10% (v/v) β-mercaptoetanol antes de cargar).

Una vez llevado a cabo el fraccionamiento, las proteínas se visualizaron sumergiendo el gel en solución de tinción (0,25 g/l de azul de Coomassie (Brilliant Blue R-250, Sigma Chemical), 100 ml/l de ácido acético y 100 ml/l de metanol) durante 30 min y en solución de destinción (100 ml/l de ácido acético y 100 ml/l de metanol) hasta que las bandas de proteínas fueron claramente visibles.

10.2. Ensayos *in vitro*

Los ensayos enzimáticos de proteína CarX o CarT se llevaron a cabo con suspensiones micelares del carotenoide en detergente. Estas se prepararon secando la cantidad deseada de carotenoide (50 μM de β-caroteno o toruleno) por evaporación rotatoria bajo vacío a 30°C. La muestra seca se resuspendió en 200 μl de benceno y se añadieron 150 μl de 0.7% (v/v) Triton X-100 y 1.6% (v/v) Triton X-405 disuelto en etanol 96%. La muestra se secó de nuevo por evaporación rotatoria en vacío hasta obtener un gel seco en el fondo del tubo. El gel se resuspendió cuidadosamente en 110 μl de tampón de incubación 2x (HEPES-NaOH 200 mM pH 8.0, TCEP (Tris(2-carboxi-etil)fosfina HCl) 2 mM, FeSO₄ 0.4 mM y 2 g/l de catalasa). La muestra se centrifugó en una microcentrífuga a 10.000 rpm durante 5 min para eliminar los restos de carotenoide no disuelto. La incubación se llevó a cabo añadiendo 50 ml de proteína purificada a 50 ml de la muestra de carotenoide. A otros 50 μl de la muestra de carotenoide se le añadieron 50 ml de proteína control.

Los carotenoides sintéticos empleados, β -apo-8'-carotenal, β -apo-10'-carotenal y β -apo-8'-licopenal, se procesaron de igual forma que el β -caroteno y el toruleno, pero se disolvieron en una solución de detergente distinta, consistente en una solución etanólica de 4% (v/v) octil β -D-glucopiranosido. El resto del tratamiento fue el descrito arriba.

Las incubaciones se llevaron a cabo durante 2 horas a 27°C, y se detuvieron añadiendo un volumen de acetona.

11. Análisis de carotenoides

11.1. Análisis de carotenoides de *F. fujikuroi*

11.1.1. Extracción y análisis del espectro crudo de las muestras

Se pesaron muestras de unos 0.1 g de micelio liofilizado y se trituraron con arena de mar en un mortero enfriado en hielo. Los carotenoides se extrajeron con acetona, se centrifugaron para eliminar los restos de micelio y arena y se secaron en un evaporador rotatorio conectado a una bomba de vacío (Büchi RE 111, Suiza) a una temperatura inferior a 50°C. Los extractos se disolvieron en n-hexano y se determinaron sus espectros de absorción de 350 nm a 650 nm utilizando un espectrofotómetro Beckman, DU 640 (Beckman Coulter, Foulerton, California, EE.UU.).

11.1.2. Separación de carotenoides neutros y polares

Cada muestra de carotenoides se resuspendió en un volumen pequeño de éter de petróleo y se separó en óxido de aluminio (Al_2O_3 , grado II-III) desactivado con 0,05 ml de agua/g. El óxido de aluminio se secó previamente en un horno, se pesó, se cubrió con éter de petróleo, se le añadió el volumen adecuado de agua y se homogeneizó con una varilla de vidrio. Como soportes de la columna se usaron puntas azules de 1 ml taponadas en su extremo con papel de celulosa y cargadas con óxido de aluminio desactivado con agua hasta alcanzar 2 cm de altura. Cada muestra se cargó en una columna, se eluyeron los carotenos neutros con 1 ml de éter etílico, quedando retenidos en la columna los carotenoides polares. Las fracciones eluidas de la columna se secaron por evaporación rotatoria y se disolvieron en n-hexano para la determinación de su espectro de 350 nm a 650 nm en el espectrofotómetro.

El espectro de carotenoides polares se determinó mediante la diferencia entre el espectro de absorción de la muestra total y la muestra eluida de la columna corregidos a las mismas diluciones.

Para los cálculos de las concentraciones de carotenoides se utilizó un coeficiente de extinción de 171,5 (1 mg/l, 1 cm) para la neurosporaxantina. La concentración de la mezcla de carotenos neutros se estimó empleando un coeficiente de extinción medio de 250 (1 mg/l, 1 cm).

11.1.3. Cromatografía en capa fina (TLC)

Las cromatografías en capa fina se llevaron a cabo sobre hojas de TLC de plástico cubiertas por Silicagel 60 (Merck). La fase móvil utilizada en cada caso se especifica en el texto.

11.1.4. Cromatografía líquida de alta presión (HPLC)

Las muestras crudas de carotenoides se disolvieron en 500 μ l de n-hexano y se inyectaron en un cromatografo líquido de alta presión (HPLC) Hewlett Packard Series 1100 (Agilent Technologies, Palo Alto, California, EE.UU.) equipado con un degasificador G1322A, una bomba cuaternaria G1311 y un detector de diodos en línea G1315A. Las muestras inyectadas (25 μ l) se separaron en una columna de fase reversa de 4.6 x 100 mm Hypersil ODS (octadecylsilyl) 5 m (Waters Corporation, Milford, EE.UU.) utilizando una mezcla de metanol, acetonitrilo y cloroformo en una relación constante 47:47:6.

Los análisis llevados a cabo en la Universidad de Friburgo (Alemania) se realizaron con un equipo HPLC Waters system (Eschborn, Alemania) equipado con un detector de diodos en línea modelo 996. Las muestras se separaron en una columna C30 de fase reversa (YMC Europe, Schermbeck, Alemania) siguiendo protocolos descritos por Scherzinger et al. (2006). El toruleno se purificó a partir de una muestra de carotenoides del mutante SG68 usando el sistema de solventes A: metanol/tert-butil metil éter (1:1, v/v) B: metanol/tert-butil metil éter/agua (30:1:10, v/v/v). La separación se llevó a cabo con una tasa de flujo de 1 ml/min con un gradiente lineal a partir de un 100% hasta un 43% de B durante los primeros 43 min. En el minuto siguiente B pasó al 0%, y se mantuvo esta proporción durante 26 min a una tasa de flujo de 2 ml/min.

11.2. Análisis de carotenoides de *E. coli*

11.2.1. Protocolo básico de extracción

Se centrifugó el cultivo de *E. coli*, se eliminó el sobrenadante y se añadieron al precipitado 10 ml de acetona:metanol (7:3). Se agitó vigorosamente en Vortex y se sonicó durante 1 minuto en un sonicador digital Branson SLPe (Dietzenbach, Alemania) bajo los parámetros 15% *duty cycle* y 2,5 *output control*. A continuación se centrifugó a 14.000 rpm durante 5 min, se pasó el sobrenadante a un tubo nuevo y se añadieron 10 ml de éter de petróleo:diel eter (1:4). Tras agitación en Vortex, se añadieron 5 ml de H₂O, se centrifugó durante 1 min a 14.000 rpm para separar las dos fases, se recogió la fase superior y se secó en un rotoevaporador bajo vacío a temperatura ambiente. Finalmente, la muestra seca de carotenoides se resuspendió en un volumen apropiado (normalmente 100 μ l) para su análisis en HPLC.

11.2.2. Extracciones modificadas de carotenoides

En los casos de solapamiento de picos de retinoides en los cromatogramas de HPLC, se llevaron a cabo modificaciones químicas selectivas.

11.2.2.1. Acetilación de retinol

El precipitado seco de retinol (o la correspondiente fracción de HPLC) se disolvió en una mezcla de 100 μ l de ácido acético y 200 μ l de piridina y se incubó durante una hora en oscuridad. La reacción se detuvo añadiendo 300 ml de etanol. Después de la incubación en oscuridad, los compuestos lipofílicos (en este caso retinil ester) se extrajeron por partición con éter de petróleo y se

secaron mediante rotoevaporación en vacío.

11.2.2.2. Extracción con formaldehído

El precipitado de *E. coli* de un cultivo de 50 ml se resuspendió en 150 µl de agua destilada y 50 µl de formaldehído (37%). La resuspensión se pasó a otro tubo eppendorf. Se añadió un volumen de metanol y se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente (ó 30°C) en oscuridad. La reacción se paró añadiendo 600 µl de acetona. Los retinoides y carotenoides se extrajeron añadiendo 500 µl de eter de petroleo. La extracción con eter de petróleo se repitió dos veces y la muestra completa se secó por rotoevaporación de vacío.

11.2.2.3. Extracción con hidroxilamina

El precipitado del cultivo de *E. coli* (apartado 11.2.1) se resuspendió en 200 µl de hidroxilamina 2M pH 6.8 y se pasó a un tubo Eppendorf. Se añadió un volumen de metanol y se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. La reacción se detuvo añadiendo 600 µl de acetona. Los carotenoides y/o retinoides se extrajeron por adición de 500 µl de éter de petróleo. La extracción se repitió dos veces y la muestra completa se secó por rotoevaporación en vacío.

11.2.3. Análisis de Cromatografía de Gases-Espectrometría de Masas (CG-EM)

Se utilizó un espectrómetro de masas Finnigan Trace DSQ acoplado a un cromatógrafo de gases Trace GC. Las separaciones se llevaron a cabo con una columna Zebtron ZB5 (5% fenil - 95% dimetilpolisilano, 0.25 mm I.D. y 0.25 µm de grosor; Phenomenex, Aschaffenburg, Alemania). Para la cuantificación de retinal, se utilizó un programa con una temperatura inicial de 100°C durante 5 min, seguido de un incremento de 25°C/min hasta alcanzar los 320°C, que fueron mantenidos durante otros 5 min. Se mantuvo un flujo constante de helio a 1 ml/min usando una división de flujo de 1:30. El tiempo sin división de flujo fue de 3 min, y la temperatura del inyector fue de 220°C. Se utilizó una potencia iónica de 70 eV a 200°C. El retinal se identificó por comparación con el comportamiento cromatográfico de referencia y por comparación del espectro de masas con el proporcionado por el programa NIST Mass Spectral Search Program Version 2.0 (National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, Maryland y Boulder, Colorado, EE.UU.).

12. Informática

12.1. Escritura, cálculo y dibujo

Para el tratamiento de los datos se usaron el procesador de textos Word y la hoja de cálculo y representación de datos Excel X de Microsoft (Microsoft Corp., Redmond, Washington, EE.UU.). Las imágenes digitalizadas se manejaron con el programa Photoshop 7.0 (Adobe Systems Inc., Mountain View, California, EE.UU.). En algunos casos se mejoró la calidad de las imágenes modificando parámetros que no alteran su información, como la latitud, o el brillo y contraste. Las gráficas, dibujos e imágenes se realizaron con el programa Canvas (Deneba Software, Miami, Florida, EE.UU.). Los espectros de carotenos se manejaron con la hoja de cálculo Excel X a partir de archivos

proporcionados por el espectrofotómetro.

12.2. Análisis de secuencias de ADN

Los mapas de restricción, las fases abiertas de lectura y las secuencias complementarias de las secuencias de ADN se manejaron con el programa Strider 1.1 (Institut de Recherche Fondamentale, CEA, Francia).

12.3. Similitud con secuencias publicadas en las bases de datos.

Las secuencias de ADN y las informaciones sobre el genoma de *F. graminearum* se obtuvieron por medio del servidor www.fgsc.net (McCluskey, 2003).

Las comparaciones de secuencias se llevaron a cabo por *Blast* mediante el servidor NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/). Los análisis *BlastP* se realizaron frente a la base de datos Swissprot no redundante. Las comparaciones de secuencias se llevaron a cabo con el programa ClustalX 1.83 (Jeanmougin et al., 1998).

12.4. Predicción de estructura secundaria

Las predicciones de estructura secundaria se realizaron con el programa 3D-PSSM (Kelley et al., 2000).

Bibliografía

- Aasen, A. J. y Jensen, S. L. (1965). Fungal carotenoids II. The structure of the carotenoid acid Neurosporaxanthin. *Acta Chem Scand* 19, 1843-1853.
- Adams, G., Johnson, N., Leslie, J. F. y Hart, L. P. (1987). Heterokaryons of *Gibberella zeae* formed following hyphal anastomosis or protoplast fusion. *Exp Mycol* 11, 339-353.
- Al-Babili, S., von Lintig, J., Haubruck, H. y Beyer, P. (1996). A novel, soluble form of phytoene desaturase from *Narcissus pseudonarcissus* chromoplasts is Hsp70-complexed and competent for flavinylation, membrane association and enzymatic activation. *Plant J* 9, 601-612.
- Al-Babili, S., Hoa, T. T. y Schaub, P. (2006). Exploring the potential of the bacterial carotene desaturase CrtI to increase the beta-carotene content in Golden Rice. *J Exp Bot* 57, 1007-1014.
- Albrecht, M., Ruther, A. y Sandmann, G. (1997). Purification and biochemical characterization of a hydroxyneurosporene desaturase involved in the biosynthetic pathway of the carotenoid spheroidene in *Rhodobacter sphaeroides*. *J Bacteriol* 179, 7462-7467.
- Almeida, E. R. A. (2006). Expresión de los genes de la carotenogénesis en hongos mucorales. Tesis Doctoral. Universidad de Sevilla.
- Amoah, B. K., Rezanoor, H. N., Nicholson, P. y MacDonald, M. V. (1995). Variation in the *Fusarium* section *Liseola* - pathogenicity and genetic-studies of isolates of *Fusarium moniliforme* sheldon from different hosts in Ghana. *Plant Pathology* 44, 563-572.
- An, G. H. y Johnson, E. A. (1990). Influence of light on growth and pigmentation of the yeast *Phaffia rhodozyma*. *Antonie van Leeuwenhoek* 57, 191-203.
- An, G. H., Cho, M. H. y Johnson, E. A. (1999). Monocyclic carotenoid biosynthetic pathway in the yeast *Phaffia rhodozyma* (*Xanthophyllomyces dendrorhous*). *J Biosci Bioeng* 88, 189-193.
- Andersson, M. E. y Nordlund, P. (1999). A revised model of the active site of alternative oxidase. *FEBS Lett* 449, 17-22.
- Aragón, C. M., Murillo, F. J., de la Guardia, M. D. y Cerdá-Olmedo, E. (1976). An enzyme complex for the dehydrogenation of phytoene in *Phycomyces*. *Eur J Biochem* 63, 71-75.
- Armstrong, G. A., Alberti, M., Leach, F. y Hearst, J. E. (1989). Nucleotide sequence, organization, and nature of the protein products of the carotenoid biosynthesis gene cluster of *Rhodobacter capsulatus*. *Mol Gen Genet* 216, 254-268.
- Armstrong, G. A., Alberti, M. y Hearst, J. E. (1990). Conserved enzymes mediate the early reactions of carotenoid biosynthesis in nonphotosynthetic and photosynthetic prokaryotes. *Proc Natl Acad Sci USA* 87, 9975-9979.
- Armstrong, G. A. y Hearst, J. E. (1996). Carotenoids 2: Genetics and molecular biology of carotenoid pigment biosynthesis. *Faseb J* 10, 228-237.
- Armstrong, G. A. (1997). Genetics of eubacterial carotenoid biosynthesis: a colorful tale. *Annu Rev Microbiol* 51, 629-659.
- Arndt, K. y Fink, G. R. (1986). GCN4 protein, a positive transcription factor in yeast, binds general control promoters at all 5' TGACTC 3' sequences. *Proc Natl Acad Sci USA* 83, 8516-8520.
- Arnould, S. y Camadro, J. M. (1998). The domain structure of protoporphyrinogen oxidase, the molecular target of diphenyl ether-type herbicides. *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 10553-10558.

- Arrach, N., Fernandez-Martin, R., Cerdá-Olmedo, E. y Avalos, J. (2001). A single gene for lycopene cyclase, phytoene synthase, and regulation of carotene biosynthesis in *Phycomyces*. *Proc Natl Acad Sci USA* 98, 1687-1692.
- Arrach, N., Schmidhauser, T. J. y Avalos, J. (2002). Mutants of the carotene cyclase domain of *al-2* from *Neurospora crassa*. *Mol Genet Genomics* 266, 914-921.
- Auldridge, M. E., McCarty, D. R. y Klee, H. J. (2006). Plant carotenoid cleavage oxygenases and their apocarotenoid products. *Curr Opin Plant Biol* 9, 315-321.
- Austin, D. J., Bu'Lock, J. D. y Drake, D. (1970). The biosynthesis of trisporic acids from beta-carotene via retinal and trisporol. *Experientia* 26, 348-349.
- Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A. y Struhl, K. (1995). *Current protocols in molecular biology*, John Wiley y Sons, Inc.
- Avalos, J., Casadesus, J. y Cerda-Olmedo, E. (1985). *Gibberella fujikuroi* mutants obtained with UV radiation and N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine. *Appl Environ Microbiol* 49, 187-191.
- Avalos, J. y Cerdá-Olmedo, E. (1986). Chemical modification of carotenogenesis in *Gibberella fujikuroi*. *Phytochemistry* 25, 1837-1841.
- Avalos, J. y Cerdá-Olmedo, E. (1987). Carotenoid mutants of *Gibberella fujikuroi*. *Curr genet* 11, 505-511.
- Avalos, J., Mackenzie, A., Nelki, D. S. y Bramley, P. M. (1988). Terpenoid biosynthesis in cell-extracts of wild type and mutant strains of *Gibberella fujikuroi*. *Biochim Biophys Acta* 966, 257-265.
- Avalos, J. y Schrott, E. L. (1990). Photoinduction of carotenoid biosynthesis in *Gibberella fujikuroi*. *FEMS Microbiol lett* 66, 295-298.
- Avalos, J., Bejarano, E. R. y Cerdá-Olmedo, E. (1993). Photoinduction of carotenoid biosynthesis. *Methods Enzymol* 214, 283-294.
- Avalos, J., Fernández-Martin, R., Prado, M. M. y Cerdá-Olmedo, E. (1999). Gibberellin biosynthesis in *Gibberella*. *J Bot Gall* 146, 55-65.
- Avalos, J. y Cerdá-Olmedo, E. (2004). Fungal carotenoid production. In *Handbook of Fungal Biotechnology* 2ª edición. (Arora, D. K., ed.), pp. 367-378. Marcel Dekker, Inc., New York.
- Bacon, C. W., Porter, J. K., Norred, W. P. y Leslie, J. F. (1996). Production of fusaric acid by *Fusarium* species. *Appl Environ Microbiol* 62, 4039-4043.
- Baima, S., Carattoli, A., Macino, G. y Morelli, G. (1992). Photoinduction of *albino-3* gene expression in *Neurospora crassa* conidia. *J Photochem Photobiol B* 15, 233-238.
- Barrero, A. F., Sánchez, J. F., Oltra, J. E., Tamayo, N., Cerdá-Olmedo, E., Candau, R. y Avalos, J. (1991). Fusarin-C and 8Z-Fusarin-C from *Gibberella fujikuroi*. *Phytochemistry* 30, 2259-2263.
- Bartley, G. E., Schmidhauser, T. J., Yanofsky, C. y Scolnik, P. A. (1990). Carotenoid desaturases from *Rhodobacter capsulatus* and *Neurospora crassa* are structurally and functionally conserved and contain domains homologous to flavoprotein disulfide oxidoreductases. *J Biol Chem* 265, 16020-16024.
- Barua, A. B. y Olson, J. A. (2000). Beta-carotene is converted primarily to retinoids in rats in vivo. *J Nutr* 130, 1996-2001.
- Beja, O., Spudich, E. N., Spudich, J. L., Leclerc, M. y DeLong, E. F. (2001). Proteorhodopsin

- phototrophy in the ocean. *Nature* 411, 786-789.
- Bejarano, E. R., Avalos, J., Lipson, E. D. y Cerdá-Olmedo, E. (1991). Photoinduced accumulation of carotene in *Phycomyces*. *Planta* 183, 1-9.
- Bejarano, E. R., Govind, N.S., Cerdá-Olmedo, E. (1987). zeta-carotene and other carotenes in a *Phycomyces* mutant. *Phytochemistry* 26, 2251-2254.
- Bennoun, P. (2001). Chlororespiration and the process of carotenoid biosynthesis. *Biochim Biophys Acta* 1506, 133-142.
- Bergo, V., Spudich, E. N., Spudich, J. L. y Rothschild, K. J. (2002). A Fourier transform infrared study of *Neurospora* rhodopsin: similarities with archaeal rhodopsins. *Photochem Photobiol* 76, 341-349.
- Bibikov, S. I., Grishanin, R. N., Kaulen, A. D., Marwan, W., Oesterhelt, D. y Skulachev, V. P. (1993). Bacteriorhodopsin is involved in halobacterial photoreception. *Proc Natl Acad Sci USA* 90, 9446-9450.
- Bieszke, J. A., Spudich, E. N., Scott, K. L., Borkovich, K. A. y Spudich, J. L. (1999a). A eukaryotic protein, Nop-1, binds retinal to form an archaeal rhodopsin-like photochemically reactive pigment. *Biochemistry* 38, 14138-14145.
- Bieszke, J. A., Braun, E. L., Bean, L. E., Kang, S., Natvig, D. O. y Borkovich, K. A. (1999b). The *nop-1* gene of *Neurospora crassa* encodes a seven transmembrane helix retinal-binding protein homologous to archaeal rhodopsins. *Proc Natl Acad Sci USA* 96, 8034-8039.
- Blount, J. D., Metcalfe, N. B., Birkhead, T. R. y Surai, P. F. (2003). Carotenoid modulation of immune function and sexual attractiveness in zebra finches. *Science* 300, 125-127.
- Bok, J. W., Noordermeer, D., Kale, S. P. y Keller, N. P. (2006). Secondary metabolic gene cluster silencing in *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol* 61, 1636-1645.
- Booker, J., Auldridge, M., Wills, S., MccarTy, D., Klee, H. y Leyser, O. (2004). MAX3/CCD7 is a carotenoid cleavage dioxygenase required for the synthesis of a novel plant signaling molecule. *Curr Biol* 14, 1232-1238.
- Booth, C. (1971). *The genus Fusarium*. Commonwealth Mycological Institute, Kew.
- Borrow, A., Brown, S., Jefferys, E., Kessell, R., Lloyd, E., Lloyd, P., Rothwell, A., Rothwell, B. y Swait, J. C. (1964). The kinetics of metabolism of *Gibberella fujikuroi* in stirred cultured. *Can J Microbiol* 10, 407-444.
- Bouvier, F., Dogbo, O. y Camara, B. (2003). Biosynthesis of the food and cosmetic plant pigment bixin (annatto). *Science* 300, 2089-2091.
- Bouvier, F., Suire, C., Mutterer, J. y Camara, B. (2003). Oxidative remodeling of chromoplast carotenoids: identification of the carotenoid dioxygenase CsCCD and CsZCD genes involved in *Crocus* secondary metabolite biogenesis. *Plant Cell* 15, 47-62.
- Bouvier, F., Isner, J. C., Dogbo, O. y Camara, B. (2005). Oxidative tailoring of carotenoids: a prospect towards novel functions in plants. *Trends Plant Sci* 10, 187-194.
- Bramley, P. M. (1994). Carotenoid biosynthesis: a target site for bleaching herbicides. *Biochem Soc Trans* 22, 625-629.
- Breitenbach, J., Vioque, A. y Sandmann, G. (2001). Gene sll0033 from *Synechocystis* 6803 encodes a carotene isomerase involved in the biosynthesis of all-E lycopene. *Z Naturforsch [C]* 56, 915-

- Britton, G., Liaaen-Jensen, S. y Pfander, H. (1998). *Carotenoids*, Vols 1, 2 y 3, Birkhäuser Verlag, Basel.
- Britton, G., Liaaen-Jensen, S. y Pfander, H. (2004). *Carotenoids handbook*. Birkhäuser Verlag, Basel.
- Britz, H., Coutinho, T. A., Wingfield, M. J., Marasas, W. F., Gordon, T. R. y Leslie, J. F. (1999). *Fusarium subglutinans* f. sp. *Pini* represents a distinct mating population in the *Gibberella fujikuroi* species complex. *Appl Environ Microbiol* 65, 1198-1201.
- Brown, L. S. (2004). Fungal rhodopsins and opsin-related proteins: eukaryotic homologues of bacteriorhodopsin with unknown functions. *Photochem Photobiol Sci* 3, 555-565.
- Brown, D. W., Dyer, R. B., McCormick, S. P., Kendra, D. F. y Plattner, R. D. (2004). Functional demarcation of the *Fusarium* core trichothecene gene cluster. *Fungal Genet Biol* 41, 454-462.
- Bu'Lock, J., Detroy, R., Hostálek, Z. y Munim-Al-Shakarchi, A. (1974). Regulation of secondary biosynthesis in *Gibberella fujikuroi*. *Trans Br Mycol Soc* 62, 377-389.
- Caddick, M. X., Peters, D. y Platt, A. (1994). Nitrogen regulation in fungi. *Antonie Van Leeuwenhoek* 65, 169-177.
- Candau, R., Avalos, J. y Cerdá-Olmedo, E. (1991). Gibberellins and carotenoids in the wild type and mutants of *Gibberella fujikuroi*. *Appl Environ Microbiol* 57, 3378-3382.
- Candau, R., Avalos, J. y Cerdá-Olmedo, E. (1992). Regulation of gibberellin biosynthesis in *Gibberella fujikuroi*. *Plant Physiol* 100, 1184-1188.
- Carol, P., Stevenson, D., Bisanz, C., Breitenbach, J., Sandmann, G., Mache, R., Coupland, G. y Kuntz, M. (1999). Mutations in the *Arabidopsis* gene IMMUTANS cause a variegated phenotype by inactivating a chloroplast terminal oxidase associated with phytoene desaturation. *Plant Cell* 11, 57-68.
- Cartharius, K., Frech, K., Grote, K., Klocke, B., Haltmeier, M., Klingenhoff, A., Frisch, M., Bayerlein, M. y Werner, T. (2005). MatInspector and beyond: promoter analysis based on transcription factor binding sites. *Bioinformatics* 21, 2933-2942.
- Cerdá-Olmedo, E. y Hüttermann, A. (1986). Förderung und Hemmung der Carotinsynthese bei *Phycomyces* durch Aromaten. *Angewandte Botanik* 60, 59-70.
- Cerdá-Olmedo, E. (1987). Carotene. In *Phycomyces* (Cerdá-Olmedo E, Lipson E., ed.), pp. 199-222. Cold Spring Harbor, New York.
- Chambon, P. (1996). A decade of molecular biology of retinoic acid receptors. *FASEB J* 10, 940-954.
- Chamovitz, D., Sandmann, G. y Hirschberg, J. (1993). Molecular and biochemical characterization of herbicide-resistant mutants of cyanobacteria reveals that phytoene desaturation is a rate-limiting step in carotenoid biosynthesis. *J Biol Chem* 268, 17348-17353.
- Chan, T., Lee, M. y Sakmar, T. P. (1992). Introduction of hydroxyl-bearing amino acids causes bathochromic spectral shifts in rhodopsin. Amino acid substitutions responsible for red-green color pigment spectral tuning. *J Biol Chem* 267, 9478-9480.
- Chapman, D. y Ragan, M. (1980). Evolution of biochemical pathways: evidence from comparative biochemistry. *Annu Rev Plant Physiol* 31, 639-678.
- Chattopadhyay, S., Muzaffar, N. E., Sherman, F. y Pearce, D. A. (2000). The yeast model for batten

- disease: mutations in *BTN1*, *BTN2*, and *HSP30* alter pH homeostasis. *J Bacteriol* 182, 6418-6423.
- Conn, P. F., Schalch, W. y Truscott, T. G. (1991). The singlet oxygen and carotenoid interaction. *J Photochem Photobiol B* 11, 41-47.
- Correll, J. D., Klittich, C. J. R. y Leslie, J. F. (1987). Nitrate nonutilizing mutants of *Fusarium oxysporum* and their use in vegetative compatibility tests. *Phytopatology* 77, 1640-1646.
- Corrochano, L. M. y Cerda-Olmedo, E. (1992). Sex, light and carotenes: the development of *Phycomyces*. *Trends Genet* 8, 268-274.
- Crauwels, M., Winderickx, J., de Winde, J. H. y Thevelein, J. M. (1997). Identification of genes with nutrient-controlled expression by PCR-mapping in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 13, 973-984.
- Dailey, T. A. y Dailey, H. A. (1998). Identification of an FAD superfamily containing protoporphyrinogen oxidases, monoamine oxidases, and phytoene desaturase - Expression and characterization of phytoene desaturase of *Myxococcus xanthus*. *J Biol Chem* 273, 13658-13662.
- Davis, R. (2000). *Neurospora. Contributions of a model organism*, Oxford University Press, New York.
- Di Pietro, A. y Roncero, M. I. (1998). Cloning, expression, and role in pathogenicity of *pg1* encoding the major extracellular endopolygalacturonase of the vascular wilt pathogen *Fusarium oxysporum*. *Mol Plant Microbe Interact* 11, 91-98.
- Domenech, C. E., Giordano, W., Avalos, J. y Cerdá-Olmedo, E. (1996). Separate compartments for the production of sterols, carotenoids and gibberellins in *Gibberella fujikuroi*. *Eur J Biochem* 239, 720-725.
- Edge, R., McGarvey, D. J. y Truscott, T. G. (1997). The carotenoids as antioxidants-a review. *J Photochem Photobiol B* 41, 189-200.
- Eggink, G., Engel, H., Vriend, G., Terpstra, P. y Witholt, B. (1990). Rubredoxin reductase of *Pseudomonas oleovorans*. Structural relationship to other flavoprotein oxidoreductases based on one NAD and two FAD fingerprints. *J Mol Biol* 212, 135-142.
- Ehrenshaft, M. y Daub, M. E. (1994). Isolation, sequence, and characterization of the *Cercospora nicotianae* phytoene dehydrogenase gene. *Appl Environ Microbiol* 60, 2766-2771.
- Eisenreich, W., Menhard, B., Hylands, P. J., Zenk, M. H. y Bacher, A. (1996). Studies on the biosynthesis of taxol: the taxane carbon skeleton is not of mevalonoid origin. *Proc Natl Acad Sci, USA* 6431-6436.
- El-Jack, M., Mackenzie, A. y Bramley, P. (1988). The photoregulation of carotenoid biosynthesis in *Aspergillus giganteus* mut. alba. *Planta* 174, 59-66.
- Eslava, A. P., Alvarez, M. I. y Cerdá-Olmedo, E. (1974). Regulation of carotene biosynthesis in *Phycomyces* by vitamin A and beta-ionone. *Eur J Biochem* 48, 617-623.
- Eyring, G. y Mathies, R. (1979). Resonance Raman studies of bathorhodopsin: evidence for a protonated Schiff base linkage. *Proc Natl Acad Sci USA* 76, 33-37.
- Faivre, B., Gregoire, A., Preault, M., Cezilly, F. y Sorci, G. (2003). Immune activation rapidly mirrored in a secondary sexual trait. *Science* 300, 103.
- Fernández-Martín, R., Cerdá-Olmedo, E. y Avalos, J. (2000). Homologous recombination and allele replacement in transformants of *Fusarium fujikuroi*. *Mol Gen Genet* 263, 838-845.

- Fernández-Martín, R., Reyes, F., Domenech, C. E., Cabrera, E., Bramley, P. M., Barrero, A. F., Avalos, J. y Cerda-Olmedo, E. (1995). Gibberellin biosynthesis in *gib* mutants of *Gibberella fujikuroi*. *J Biol Chem* 270, 14970-14974.
- Filipek, S., Stenkamp, R. E., Teller, D. C. y Palczewski, K. (2003). G protein-coupled receptor rhodopsin: a prospectus. *Annu Rev Physiol* 65, 851-879.
- Foster, K. W., Saranak, J., Patel, N., Zarilli, G., Okabe, M., Kline, T. y Nakanishi, K. (1984). A rhodopsin is the functional photoreceptor for phototaxis in the unicellular eukaryote *Chlamydomonas*. *Nature* 311, 756-759.
- Fraser, P. D., Misawa, N., Linden, H., Yamano, S., Kobayashi, K. y Sandmann, G. (1992). Expression, purification and reactivation of the recombinant *Erwinia uredovora* phytoene desaturase. *J Biol Chem* 267, 19891-19895
- Fraser, P. D., Ruiz-Hidalgo, M. J., López-Matas, M. A., Alvarez, M. I., Eslava, A. P. y Bramley, P. M. (1996). Carotenoid biosynthesis in wild type and mutant strains of *Mucor circinelloides*. *Biochim Biophys Acta* 1289, 203-208.
- Frigaard, N. U., Li, H., Martinsson, P., Das, S. K., Frank, H. A., Aartsma, T. J. y Bryant, D. A. (2005). Isolation and characterization of carotenosomes from a bacteriochlorophyll c-less mutant of *Chlorobium tepidum*. *Photosynth Res* 86, 101-111.
- Froehlich, A. C., Liu, Y., Loros, J. J. y Dunlap, J. C. (2002). White Collar-1, a circadian blue light photoreceptor, binding to the frequency promoter. *Science* 297, 815-819.
- Galm, U., Schimana, J., Fiedler, H. P., Schmidt, J., Li, S. M. y Heide, L. (2002). Cloning and analysis of the simocyclinone biosynthetic gene cluster of *Streptomyces antibioticus* Tu 6040. *Arch Microbiol* 178, 102-114.
- Gärtner, V. y Towner, P. (1995). Invertebrate visual pigments. *Photochem Photobiol* 62, 1-16.
- Gelderblom, W. C., Jaskiewicz, K., Marasas, W. F., Thiel, P. G., Horak, R. M., Vlegaar, R. y Kriek, N. P. (1988). Fumonisin-novel mycotoxins with cancer-promoting activity produced by *Fusarium moniliforme*. *Appl Environ Microbiol* 54, 1806-1811.
- Gessler, N. N., Sokolov, A. V., Bykhovskii, V. y Belozerskaia, T. A. (2002). Superoxide dismutase and catalase activities in carotenoid-synthesizing fungi *Blakeslea trispora* and *Neurospora crassa* under the oxidative stress. *Appl Biochem Microbiol* 38, 205-209.
- Giordano, W., Avalos, J., Cerda-Olmedo, E. y Domenech, C. E. (1999). Nitrogen availability and production of bikaverin and gibberellins in *Gibberella moniliformis*. *FEMS Microbiol lett* 173, 389-393.
- Giovannucci, E., Ascherio, A., Rimm, E. B., Stampfer, M. J., Colditz, G. A. y Willett, W. C. (1995). Intake of carotenoids and retinol in relation to risk of prostate cancer. *J Natl Cancer Inst* 87, 1767-1776.
- Giuliano, G., Giliberto, L. y Rosati, C. (2002). Carotenoid isomerase: a tale of light and isomers. *Trends Plant Sci* 7, 427-429.
- Giuliano, G., Al-Babili, S. y von Lintig, J. (2003). Carotenoid oxygenases: cleave it or leave it. *Trends Plant Sci* 8, 145-149.
- Goodwin, T. W. y Lijinski, W. (1952). Studies in carotenogenesis: 3. Identification of the minor polyene components of the fungus *Phycomyces Blakesleeanus* and a study of their synthesis under various cultural conditions. *Biochem J* 50: 550.

- Govind, N. y Cerdá-Olmedo, E. (1986). Sexual activation of carotenogenesis in *Phycomyces blakesleeanus*. *J Gen Microbiol* 132, 2775-2780.
- Goodwin, T. W. y Lijinsky, W. (1951). Studies in carotenogenesis. II. Carotene production by *Phycomyces blakesleeanus*; the effect of different amino-acids when used in media containing low concentrations of glucose. *Biochem J* 50, 268-273.
- Graul, R. C. y Sadee, W. (1997). Evolutionary relationships among proteins probed by an iterative neighborhood cluster analysis (INCA). Alignment of bacteriorhodopsins with the yeast sequence YRO2. *Pharm Res* 14, 1533-1541.
- Grigorieff, N., Ceska, T. A., Downing, K. H., Baldwin, J. M. y Henderson, R. (1996). Electron-crystallographic Refinement of the Structure of Bacteriorhodopsin. *J Mol Biol* 259, 393-421.
- Gunner, H. B. y Alexander, M. (1964). Anaerobic Growth Of *Fusarium oxysporum*. *J Bacteriol* 87, 1309-1316.
- Hagemann, P. (1997). Vision in microalgae. *Planta* 203, 265-274.
- Hao, W. y Fong, H. K. (1999). The endogenous chromophore of retinal G protein-coupled receptor opsin from the pigment epithelium. *J Biol Chem* 274, 6085-6090.
- Harding, R. y Turner, R. (1981). Photoregulation of the carotenoid biosynthetic pathway in albino and white collar mutants of *Neurospora crassa*. *Plant Physiol* 68, 745-749.
- Hausmann, A. y Sandmann, G. (2000). A single five-step desaturase is involved in the carotenoid biosynthesis pathway to beta-carotene and torulene in *Neurospora crassa*. *Fungal Genet Biol* 30, 147-153.
- He, Q., Cheng, P., Yang, Y., Wang, L., Gardner, K. H. y Liu, Y. (2002). White collar-1, a DNA binding transcription factor and a light sensor. *Science* 297, 840-843.
- Hedden, P., Holdsworth, M. J., Simpson, G. G., Edwards, K. J. y Lenton, J. R. (2002). New frontiers in plant development: from genes to phenotype. *Trends Plant Sci* 7, 381-383.
- Helmreich, E. J. y Hofmann, K. P. (1996). Structure and function of proteins in G-protein-coupled signal transfer. *Biochim Biophys Acta* 1286, 285-322.
- Hill, D. E., Hope, I. A., Macke, J. P. y Struhl, K. (1986). Saturation mutagenesis of the yeast *his3* regulatory site: requirements for transcriptional induction and for binding by GCN4 activator protein. *Science* 234, 451-457.
- Homann, V., Mende, K., Arntz, C., Ilardi, V., Macino, G., Morelli, G., Bose, G. y Tudzynski, B. (1996). The isoprenoid pathway: cloning and characterization of fungal FPPS genes. *Curr Genet* 30, 232-239.
- Horbach, S., Sahn, H. y Welle, R. (1993). Isoprenoid biosynthesis in bacteria: two different pathways? *FEMS Microbiol Lett* 111, 135-140.
- Hugueney, P., Romer, S., Kuntz, M. y Camara, B. (1992). Characterization and molecular cloning of a flavoprotein catalyzing the synthesis of phytofluene and zeta-carotene in *Capsicum* chromoplasts. *Eur J Biochem* 209, 399-407.
- Idnurm, A. y Howlett, B. J. (2001). Characterization of an opsin gene from the ascomycete *Leptosphaeria maculans*. *Genome* 44, 167-171.
- Idnurm, A., Rodríguez-Romero, J., Corrochano, L. M., Sanz, C., Iturriaga, E. A., Eslava, A. P. y

- Heitman, J. (2006). The *Phycomyces madA* gene encodes a blue-light photoreceptor for phototropism and other light responses. *Proc Natl Acad Sci USA* 103, 4546-4551.
- Iimura, Y. y Tatsumi, K. (2002). Structure of genes for Hsp30 from the white-rot fungus *Coriolus versicolor* and the increase of their expression by heat shock and exposure to a hazardous chemical. *Biosci Biotechnol Biochem* 66, 1567-1570.
- Inonue, H., Nojima, H. y Okama, H. (1990). High efficiency transformation of with plasmids. *Gene* 96, 23-28.
- Isaacson, T., Ronen, G., Zamir, D. y Hirschberg, J. (2002). Cloning of tangerine from tomato reveals a carotenoid isomerase essential for the production of beta-carotene and xanthophylls in plants. *Plant Cell* 14, 333-342.
- Iuchi, S., Kobayashi, M., Taji, T., Naramoto, M., Seki, M., Kato, T., Tabata, S., Kakubari, Y., Yamaguchi-Shinozaki, K. y Shinozaki, K. (2001). Regulation of drought tolerance by gene manipulation of 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase, a key enzyme in abscisic acid biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant J* 27, 325-333.
- Janzen, R. A., Rood, S. B., Dormaar, J. F. y McGill, W. B. (1992). *Azospirillum brasilense* produces gibberellin in pure culture on chemically-defined medium and in co-culture on straw. *Oil Biol Biochem* 24, 1061-1064.
- Jarayam, M., Presti, D. y Delbrück, M. (1979). Light induced carotene synthesis in *Phycomyces*. *Exp Mycol* 3, 42-52.
- Jeanmougin, F., Thompson, J. D., Gouy, M., Higgins, D. G. y Gibson, T. J. (1998). Multiple sequence alignment with Clustal X. *Trends Biochem Sci* 23, 403-405.
- Johnson, E. A. y Lewis, M. J. (1979). Astaxanthin formation by the yeast *Phaffia rhodozyma*. *J Gen Microbiol* 115, 173-183.
- Jorns, M. S., Baldwin, E. T., Sancar, G. B. y Sancar, A. (1987). Action mechanism of DNA photolyase. II. Role of the chromophores in catalysis. *J Biol Chem* 262, 486-491.
- Josse, E. M., Simkin, A. J., Gaffe, J., Laboure, A. M., Kuntz, M. y Carol, P. (2000). A plastid terminal oxidase associated with carotenoid desaturation during chromoplast differentiation. *Plant Physiol* 123, 1427-1436.
- Jyonouchi, H., Hill, R. J., Tomita, Y. y Good, R. A. (1991). Studies of immunomodulating actions of carotenoids. I. Effects of beta-carotene and astaxanthin on murine lymphocyte functions and cell surface marker expression in *in vitro* culture system. *Nutr Cancer* 16, 93-105.
- Kamoda, S. y Saburi, Y. (1993). Cloning, expression, and sequence analysis of a lignostilbene-alpha,beta-dioxygenase gene from *Pseudomonas paucimobilis* TMY1009. *Biosci Biotechnol Biochem* 57, 926-930.
- Kelley, L. A., MacCallum, R. M. y Sternberg, M. J. (2000). Enhanced genome annotation using structural profiles in the program 3D-PSSM. *J Mol Biol* 299, 499-520.
- Kiefer, C., Hessel, S., Lampert, J. M., Vogt, K., Lederer, M. O., Breithaupt, D. E. y von Lintig, J. (2001). Identification and characterization of a mammalian enzyme catalyzing the asymmetric oxidative cleavage of provitamin A. *J Biol Chem* 276, 14110-14116.
- Kim, Y. T., Lee, Y. R., Jin, J., Han, K. H., Kim, H., Kim, J. C., Lee, T., Yun, S. H. y Lee, Y. W. (2005). Two different polyketide synthase genes are required for synthesis of zearalenone in *Gibberella zeae*. *Mol Microbiol* 58, 1102-1113.

- Klaasen, J. A. y Nelson, P. E. (1996). Identification of a mating population, *Gibberella Nygamai* sp. Nov., within the *Fusarium nygamai* anamorph. *Mycologia* 88, 965-969.
- Klittich, C. J. R. y Leslie, J. (1987). Chlorate-resistant, nitrate-utilizing (crn) mutants in *Fusarium moniliforme* (*Gibberella fujikuroi*). *Phytopathology* 77, 1772-1772.
- Klittich, C. J. R. y Leslie, J. F. (1988). Nitrate reduction mutants of *Fusarium moniliforme* (*Gibberella fujikuroi*). *Genetics* 118, 417-423.
- Klittich, C. J. R., Leslie, J. F., Nelson, P. E. y Marasas, W. F. O. (1997). *Fusarium thapsicum* (*Gibberella thapsina*): a new species in section *Liseola* from sorghum. *Mycologia* 89, 643-652.
- Kloer, D. P., Ruch, S., Al-Babili, S., Beyer, P. y Schulz, G. E. (2005). The structure of a retinal-forming carotenoid oxygenase. *Science* 308, 267-269.
- Koelblin, R. I., Brückner, B., Blechschmidt, D. y Fischer, W. (1990). Activity of mutagens in the fungus *Gibberella fujikuroi*. *J Basic Microbiol* 675-677.
- Kohler, B. E. (1995). *Carotenoids. Volume 1 B: Spectroscopy*, Birkhäuser Verlag, Basel.
- Krubasic, P. y Sandmann, G. (2000). Molecular evolution of lycopene cyclases involved in the formation of carotenoids with ionone end groups. *Biochem Soc Transact* 28, 806-810.
- Kuhlman, E. G. (1983). Varieties of *Gibberella fujikuroi* with anamorphs in *Fusarium* section *Liseola*. *Mycologia* 74, 759-768.
- Landers, G. M. y Olson, J. A. (1988). Rapid, simultaneous determination of isomers of retinal, retinal oxime and retinol by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr* 438, 383-392.
- Landrum, J. T. y Bone, R. A. (2001). Lutein, zeaxanthin, and the macular pigment. *Arch Biochem Biophys* 385, 28-40.
- Lang-Feulner, J. y Rau, W. (1975). Redox dyes as artificial photoreceptors in light-dependent carotenoid synthesis. *Photochem Photobiol* 21, 179-183.
- Leslie, J. F., Summerell, B. A., Bullock, S. y Doe, F. J. (2005). Description of *Gibberella sacchari* and neotypification of its anamorph *Fusarium sacchari*. *Mycologia* 97, 718-724.
- Leuenberger, M. G., Engeloch-Jarret, C. y Woggon, W. D. (2001). The reaction mechanism of the enzyme-catalyzed central cleavage of beta-carotene to retinal. *Angew Chem Int Ed Engl* 40, 2613-2617.
- Leung, J. y Giraudat, J. (1998). Abscisic acid signal transduction. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 49, 199-222.
- Li, C. y Schmidhauser, T. J. (1995). Developmental and photoregulation of *al-1* and *al-2*, structural genes for two enzymes essential for carotenoid biosynthesis in *Neurospora*. *Dev Biol* 169, 90-95.
- Li, C., Sachs, M. S. y Schmidhauser, T. J. (1997). Developmental and photoregulation of three *Neurospora crassa* carotenogenic genes during conidiation induced by desiccation. *Fungal Genet Biol* 21, 101-108.
- Lichtenthaler, H. K., Schwender, J., Disch, A. y Rhomer, M. (1997). Biosynthesis of isoprenoids in higher plant chloroplasts proceeds via a mevalonate-independent pathway. *FEBS Lett* 400, 271-274.
- Linden, H., Misawa, N., Saito, T. y Sandmann, G. (1994). A novel carotenoid biosynthesis gene coding for zeta-carotene desaturase: functional expression, sequence and phylogenetic origin. *Plant*

Mol Biol 24, 369-379.

- Lindqvist, A. y Andersson, S. (2002). Biochemical properties of purified recombinant human beta-carotene 15,15'-monooxygenase. *J Biol Chem* 277, 23942-23948.
- Linnemannstons, P., Prado, M. M., Fernandez-Martin, R., Tudzynski, B. y Avalos, J. (2002). A carotenoid biosynthesis gene cluster in *Fusarium fujikuroi*: the genes *carB* and *carRA*. *Mol Genet Genomics* 267, 593-602.
- Logan, B. A., Monson, R. K. y Potosnak, M. J. (2000). Biochemistry and physiology of foliar isoprene production. *Trends Plant Sci* 5, 477-481.
- Lorca-Pascual, J. M., Murcia-Flores, L., Garre, V., Torres-Martinez, S. & Ruiz-Vazquez, R. M. (2004). The RING-finger domain of the fungal repressor *crgA* is essential for accurate light regulation of carotenogenesis. *Mol Microbiol* 52, 1463-1474.
- Luecke, H., Richter, H. T. y Lanyi, J. K. (1998). Proton transfer pathways in bacteriorhodopsin at 2.3 angstrom resolution. *Science* 280, 1934-1937.
- Macmillan, J. (2002). Occurrence of gibberellins in vascular plants, fungi and bacteria. *J Plant Growth Regul* 20, 387-442.
- Malonek, S., Bomke, C., Bornberg-Bauer, E., Rojas, M. C., Hedden, P., Hopkins, P. y Tudzynski, B. (2005). Distribution of gibberellin biosynthetic genes and gibberellin production in the *Gibberella fujikuroi* species complex. *Phytochem* 66, 1296-1311.
- Malz, S., Grell, M. N., Thrane, C., Maier, F. J., Rosager, P., Felk, A., Albertsen, K. S., Salomon, S., Bohn, L., Schafer, W. y Giese, H. (2005). Identification of a gene cluster responsible for the biosynthesis of aurofusarin in the *Fusarium Cercospora* species complex. *Fungal Genet Biol* 42, 420-433.
- Mander, L. (1992). The chemistry of gibberellins: an overview. *Chem Rev* 92, 573-612.
- Marasas, W. F. O., Thiel, P. G., Rabie, C. J., Nelson, P. E. y Toussoun, T. A. (1986). Moniliformin production in *Fusarium* section *Liseola*. *Mycologia* 78, 242-247.
- Marasas, W. F., Jaskiewicz, K., Venter, F. S. y Van Schalkwyk, D. J. (1988). *Fusarium moniliforme* contamination of maize in oesophageal cancer areas in Transkei. *S Afr Med J* 74, 110-114.
- Marasas, W. F., Thiel, P. G., Sydenham, E. W., Rabie, C. J., Lubben, A. y Nelson, P. E. (1991). Toxicity and moniliformin production by four recently described species of *Fusarium* and two uncertain taxa. *Mycopathologia* 113, 191-197.
- Marletaz, F., Holland, L. Z., Laudet, V. y Schubert, M. (2006). Retinoic acid signaling and the evolution of chordates. *Int J Biol Sci* 2, 38-47.
- Masamoto, K., Wada, H., Kaneko, T. y Takaichi, S. (2001). Identification of a gene required for cis-to-trans carotene isomerization in carotenogenesis of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Plant Cell Physiol* 42, 1398-1402.
- Mata, N. L., Moghrabi, W. N., Lee, J. S., Bui, T. V., Radu, R. A., Horwitz, J. y Travis, G. H. (2004). Rpe65 is a retinyl ester binding protein that presents insoluble substrate to the isomerase in retinal pigment epithelial cells. *J Biol Chem* 279, 635-643.
- Mays, L. L. (1969). Isolation, characterization, and genetic analysis of osmotic mutants of *Neurospora crassa*. *Genetics* 63, 781-794.

- McCluskey, K. (2003). The Fungal Genetics Stock Center: from molds to molecules. *Adv Appl Microbiol* 52, 245-262.
- McNabb, D. S. y Pinto, I. (2005). Assembly of the Hap2p/Hap3p/Hap4p/Hap5p-DNA complex in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot Cell* 4, 1829-1839.
- Mehta, B. y Cerdá-Olmedo, E. (1995). Mutants of carotene production in *Blakeslea trispora*. *Appl Microbiol Biotechnol* 42, 836-838.
- Mehta, B. J., Salgado, L. M., Bejarano, E. R. y Cerdá-Olmedo, E. (1997). New mutants of *Phycomyces blakesleeanus* for beta-carotene Production. *Appl Environ Microbiol* 63, 3657-3661.
- Mehta, B. J., Obraztsova, I. N. y Cerdá-Olmedo, E. (2003). Mutants and intersexual heterokaryons of *Blakeslea trispora* for production of beta-carotene and lycopene. *Appl Environ Microbiol* 69, 4043-4048.
- Mende, K., Homann, V. y Tudzynski, B. (1997). The geranylgeranyl diphosphate synthase gene of *Gibberella fujikuroi*: isolation and expression. *Mol Gen Genet* 255, 96-105.
- Michan, S., Lledias, F. y Hansberg, W. (2003). Asexual development is increased in *Neurospora crassa* *cat-3* null mutant strains. *Eukaryot Cell* 2, 798-808.
- Mihlan, M., Homann, V., Liu, T. W. y Tudzynski, B. (2003). AREA directly mediates nitrogen regulation of gibberellin biosynthesis in *Gibberella fujikuroi*, but its activity is not affected by NMR. *Mol Microbiol* 47, 975-991.
- Ming, Y. N., Lin, P. C. y Yu, T. F. (1966). Heterokaryosis in *Fusarium fujikuroi* (Saw.). *Wr Scientia Sinica* 15, 371-378.
- Mitchell, J., Skaggs, D. y Anderson, W. (1951). Plant growth-stimulating hormones in immature bean seeds. *Science* 114, 159-161.
- Moeller, S. M., Jacques, P. F. y Blumberg, J. B. (2000). The potential role of dietary xanthophylls in cataract and age-related macular degeneration. *J Am Coll Nutr* 19, 522S-527S.
- Mohsenzadeh, S., Saupe-Thies, W., Steier, G., Schroeder, T., Fracella, F., Ruoff, P. y Rensing, L. (1998). Temperature adaptation of house keeping and heat shock gene expression in *Neurospora crassa*. *Fungal Genet Biol* 25, 31-43.
- Moise, A. R., Kuksa, V., Imanishi, Y. y Palczewski, K. (2004). Identification of all-trans-retinol:all-trans-13,14-dihydroretinol saturase. *J Biol Chem* 279, 50230-50242.
- Moise, A. R., von Lintig, J. y Palczewski, K. (2005). Related enzymes solve evolutionarily recurrent problems in the metabolism of carotenoids. *Trends Plant Sci* 10, 178-186.
- Moretti, A., Logrieco, A., Bottalico, A., Ritieni, A., Fogliano, V. y Randazzo, G. (1996). Diversity in beauvericin and fusaproliferin production by different populations of *Gibberella fujikuroi* (*Fusarium* section *Liseola*). *Sydowia* 48, 44-56.
- Morriss-Kay, G. M. y Ward, S. J. (1999). Retinoids and mammalian development. *Int Rev Cytol* 188, 73-131.
- Morton, R. y Goodwin, T. (1944). The preparation of retinene in vitro. *Nature* 153, 405-406.
- Murillo, F. J. y Cerdá-Olmedo, E. (1976). Regulation of carotene synthesis in *Phycomyces*. *Mol Gen Genet* 148, 19-24.

- Murillo, F. J., Calderón, I. L., López-Díaz, I. y Cerda-Olmedo, E. (1978). Carotene-superproducing strains of *Phycomyces*. *Appl Environ Microbiol* 36, 639-642.
- Naested, H., Holm, A., Jenkins, T., Nielsen, H. B., Harris, C. A., Beale, M. H., Andersen, M., Mant, A., Scheller, H., Camara, B., Mattsson, O. y Mundy, J. (2004). *Arabidopsis* VARIEGATED 3 encodes a chloroplast-targeted, zinc-finger protein required for chloroplast and palisade cell development. *J Cell Sci* 117, 4807-4818.
- Navarro, E., Ruiz-Pérez, V. L. y Torres-Martínez, S. (2000). Overexpression of the *crgA* gene abolishes light requirement for carotenoid biosynthesis in *Mucor circinelloides*. *Eur J Biochem* 267, 800-807.
- Navarro, E., Lorca-Pascual, J. M., Quiles-Rosillo, M. D., Nicolas, F. E., Garre, V., Torres-Martínez, S. y Ruiz-Vázquez, R. M. (2001). A negative regulator of light-inducible carotenogenesis in *Mucor circinelloides*. *Mol Genet Genomics* 266, 463-470.
- Nelson, P. E., Toussoun, T. A. y Marasas, W. F. O. (1983). *Fusarium species. An illustrated manual for identification*, Pennsylvania State University Press.
- Nemcovic, M. y Borkovich, K. (2003). Orp-1, an Opsin Related Protein of *Neurospora crassa*. *Fungal Genet. Newsl.* 50, (s) abstract 99.
- Nievelstein, V., Vandekerchove, J., Tadros, M. H., Lintig, J. V., Nitschke, W. y Beyer, P. (1995). Carotene desaturation is linked to a respiratory redox pathway in *Narcissus pseudonarcissus* chromoplast membranes. Involvement of a 23-kDa oxygen-evolving-complex-like protein. *Eur J Biochem* 233, 864-872.
- Nirenberg, H. I. (1976). Untersuchungen über die Morphologische und Biologische Differenzierung in der *Fusarium*-Sektion *Liseola*. *Mitteilungen aus der Biologischen Bundesanstalt für Land-Forstwirtschaft Berlin-Dahlem* 169, 1-117.
- Norman, S. (1991). Beta-carotene from the abscisic acid producing strain of *Cercospora rosicola*. *Plant Growth Reg* 10, 103-108.
- Norris, S. R., Barrette, T. R. y DellaPenna, D. (1995). Genetic dissection of carotenoid synthesis in *Arabidopsis* defines plastoquinone as an essential component of phytoene desaturation. *Plant Cell* 7, 2139-2149.
- O'Donnell, K., Cigelnik, E. y Nirenberg, H. I. (1998). Molecular systematics and phylogeography of the *Gibberella fujikuroi* species complex. *Mycologia* 90, 465-493.
- Oesterhelt, D. (1998). The structure and mechanism of the family of retinal proteins from halophilic archaea. *Curr Opin Struct Biol* 8, 489-500.
- Ogawa, H., Yamada, I., Arai, K., Hirase, K., Moriyasu, K., Schneider, C., Sandmann, G., Boger, P. y Wakabayashi, K. (2001). Mode of bleaching phytotoxicity of herbicidal diphenylpyrrolidinones. *Pest Manag Sci* 57, 33-40.
- Ojima, K., Breitenbach, J., Visser, H., Setoguchi, Y., Tabata, K., Hoshino, T., van den Berg, J. y Sandmann, G. (2006). Cloning of the astaxanthin synthase gene from *Xanthophyllomyces dendrorhous* (*Phaffia rhodozyma*) and its assignment as a beta-carotene 3-hydroxylase/4-ketolase. *Mol Genet Genomics* 275, 148-158.
- Okano, T. y Fukada, Y. (1997). Phototransduction cascade and circadian oscillator in chicken pineal gland. *J Pineal Res* 22, 145-151.
- Oller-López, J., Avalos, J., Barrero, A. y Oltra, E. (2003). Improved GA1 production by *Fusarium fujikuroi*. *Appl Microbiol Biotechnol* 63, 282-285.

- Paluh, J. L., Plamann, M., Kruger, D., Barthelmess, I. B., Yanofsky, C. y Perkins, D. D. (1990). Determination of the inactivating alterations in two mutant alleles of the *Neurospora crassa* cross-pathway control gene *cpc-1*. *Genetics* 124, 599-606.
- Park, H., Kreunen, S. S., Cuttriss, A. J., DellaPenna, D. y Pogson, B. J. (2002). Identification of the carotenoid isomerase provides insight into carotenoid biosynthesis, prolamellar body formation, and photomorphogenesis. *Plant Cell* 14, 321-332.
- Pebay-Peyroula, E., Rummel, G., Rosenbusch, J. P. y Landau, E. M. (1997). X-ray structure of bacteriorhodopsin at 2.5 angstroms from microcrystals grown in lipidic cubic phases. *Science* 277, 1676-1681.
- Peck, R. F., Echavarri-Erasun, C., Johnson, E. A., Ng, W. V., Kennedy, S. P., Hood, L., DasSarma, S. y Krebs, M. P. (2001). *brp* and *blh* are required for synthesis of the retinal cofactor of bacteriorhodopsin in *Halobacterium salinarum*. *J Biol Chem* 276, 5739-5744.
- Peck, R. F., Johnson, E. A. y Krebs, M. P. (2002). Identification of a lycopene beta-cyclase required for bacteriorhodopsin biogenesis in the archaeon *Halobacterium salinarum*. *J Bacteriol* 184, 2889-2897.
- Pecker, I., Chamovitz, D., Linden, H., Sandmann, G. y Hirschberg, J. (1992). A single polypeptide catalyzing the conversion of phytoene to zeta-carotene is transcriptionally regulated during tomato fruit ripening. *Proc Natl Acad Sci USA* 89, 4962-4966.
- Pepe, I. M. y Cugnoli, C. (1992). Retinal photoisomerase: role in invertebrate visual cells. *J Photochem Photobiol B* 13, 5-17.
- Picot, D. y Garavito, R. M. (1994). Prostaglandin H synthase: implications for membrane structure. *FEBS Lett* 346, 21-25.
- Piper, P. W. (1995). The heat shock and ethanol stress responses of yeast exhibit extensive similarity and functional overlap. *FEMS Microbiol Lett* 134, 121-127.
- Piper, P. W., Ortiz-Calderon, C., Holyoak, C., Coote, P. y Cole, M. (1997). Hsp30, the integral plasma membrane heat shock protein of *Saccharomyces cerevisiae*, is a stress-inducible regulator of plasma membrane H(+)-ATPase. *Cell Stress Chaperones* 2, 12-24.
- Poliakov, E., Gentleman, S., Cunningham, F. X., Jr., Miller-Ihli, N. J. y Redmond, T. M. (2005). Key role of conserved histidines in recombinant mouse beta-carotene 15,15'-monooxygenase-1 activity. *J Biol Chem* 280, 29217-29223.
- Porter, J. W. y Lincoln, R. E. (1950). *Lycopersicon* selections containing a high content of carotenes and colorless polyenes; the mechanism of carotene biosynthesis. *Arch Biochem* 27, 390-403.
- Poulson, R. y Polglase, W. J. (1975). The enzymic conversion of protoporphyrinogen IX to protoporphyrin IX. Protoporphyrinogen oxidase activity in mitochondrial extracts of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 250, 1269-1274.
- Prado, M. M., Prado-Cabrero, A., Fernández-Martín, R. y Avalos, J. (2004). A gene of the opsin family in the carotenoid gene cluster of *Fusarium fujikuroi*. *Curr Genet* 46, 47-58.
- Prado-Cabrero, A. y Avalos, J. (2003). Empleo de una mutacion en el gen de la deshidrogenasa de fitoeno de *Fusarium fujikuroi* para producción de gamma-caroteno y beta-caroteno. Solicitud de patente nº 200302521.
- Puhalla, J. E. y Spieth, P. T. (1983). Heterokaryosis in *Fusarium moniliforme*. *Exp Mycol* 7, 328-335.

- Puhalla, J. E. y Spieth, P. T. (1985). A comparison of heterokaryosis and vegetative incompatibility among varieties of *Gibberella fujikuroi* (*Fusarium moniliforme*). *Exp Mycol* 9, 39-47.
- Punt, P. J., Oliver, R. P., Dingemanse, M. A., Pouwels, P. H. y van den Hondel, C. A. (1987). Transformation of *Aspergillus* based on the hygromycin B resistance marker from *Escherichia coli*. *Gene* 56, 117-124.
- Quiles-Rosillo, M. D., Ruiz-Vázquez, R. M., Torres-Martínez, S. y Garre, V. (2005). Light induction of the carotenoid biosynthesis pathway in *Blakeslea trispora*. *Fungal Genet Biol* 42, 141-153.
- Radley, M. (1956). Occurrence of substances similar to gibberellic acid in higher plants. *Nature* 178, 1070-1071.
- Raisig, A., Bartley, G., Scolnik, P. y Sandmann, G. (1996). Purification in an active state and properties of the 3-step phytoene desaturase from *Rhodobacter capsulatus* overexpressed in *Escherichia coli*. *J Biochem (Tokyo)* 119, 559-564.
- Raisig, A. y Sandmann, G. (2001). Functional properties of diapophytoene and related desaturases of C(30) and C(40) carotenoid biosynthetic pathways. *Biochim Biophys Acta* 1533, 164-170.
- Rao, V. R. y Oprian, D. D. (1996). Activating mutations of rhodopsin and other G protein-coupled receptors. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 25, 287-314.
- Rao, G. N., Ney, E. y Herbert, R. A. (1999). Changes associated with delay of mammary cancer by retinoid analogues in transgenic mice bearing *c-neu* oncogene. *Breast Cancer Res Treat* 58, 241-254.
- Rau, W., Feuser, B. y Rau-Hund, A. (1967). Substitution of p-chloro- or p-hydroxymercuribenzoate for light in carotenoid synthesis by *Fusarium aquaeductuum*. *Biochim Biophys Acta* 136, 589-590.
- Rau, W. y Rau-Hund, A. (1977). Light-dependent carotenoid synthesis X. Lag-phase after a second illumination period in *Fusarium aquaeductuum* and *Neurospora crassa*. *Planta* 136, 49-52.
- Ravagnani, A., Gorfinkiel, L., Langdon, T., Diallinas, G., Adjadj, E., Demais, S., Gorton, D., Arst, H. N., Jr. y Scazzocchio, C. (1997). Subtle hydrophobic interactions between the seventh residue of the zinc finger loop and the first base of an HGATAR sequence determine promoter-specific recognition by the *Aspergillus nidulans* GATA factor AreA. *Embo J* 16, 3974-3986.
- Redmond, T. M., Gentleman, S., Duncan, T., Yu, S., Wiggert, B., Gantt, E. y Cunningham, F. X., Jr. (2001). Identification, expression, and substrate specificity of a mammalian beta-carotene 15,15'-dioxygenase. *J Biol Chem* 276, 6560-6565.
- Regnacq, M. y Boucherie, H. (1993). Isolation and sequence of HSP30, a yeast heat-shock gene coding for a hydrophobic membrane protein. *Curr Genet* 23, 435-442.
- Ridge, K. D. (2002). Algal rhodopsins: phototaxis receptors found at last. *Curr Biol* 12, R588-590.
- Ritieni, A., Fogliano, V., Randazzo, G., Scarallo, A., Logrieco, A., Moretti, A., Mannina, L. y Bottalico, A. (1995). Isolation and characterization of fusaproliferin, a new toxic metabolite from *Fusarium proliferatum*. *Nat Toxins* 3, 17-20.
- Rodríguez-Saiz, M., Paz, B., De la Fuente, J. L., López-Nieto, M. J., Cabri, W. y Barredo, J. L. (2004). *Blakeslea trispora* genes for carotene biosynthesis. *Appl Environ Microbiol* 70, 5589-5594.
- Rohmer, M., Knani, M., Simonin, P., Sutter, B. y Sahn, H. (1993). Isoprenoid biosynthesis in bacteria: a novel pathway for the early steps leading to isopentenyl diphosphate. *Biochem J* 295, 517-524.

- Rojas, M. C., Urrutia, O., Cruz, C., Gaskin, P., Tudzynski, B. y Hedden, P. (2004). Kaurenolides and fujenoic acids are side products of the gibberellin P450-1 monooxygenase in *Gibberella fujikuroi*. *Phytochemistry* 65, 821-830.
- Rossmann, M. G., Moras, D. y Olsen, K. W. (1974). Chemical and biological evolution of nucleotide-binding protein. *Nature* 250, 194-199.
- Ruch, S., Beyer, P., Ernst, H. y Al-Babili, S. (2005). Retinal biosynthesis in Eubacteria: in vitro characterization of a novel carotenoid oxygenase from *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Mol Microbiol* 55, 1015-1024.
- Ruiz-González, M. X. y Marín, I. (2004). New insights into the evolutionary history of type 1 rhodopsins. *J Mol Evol* 58, 348-358.
- Ruiz-Hidalgo, M. J., Benito, E. P., Sandmann, G. y Eslava, A. P. (1997). The phytoene dehydrogenase gene of *Phycomyces*: regulation of its expression by blue light and vitamin A. *Mol Gen Genet* 253, 734-744.
- Sabehi, G., Loy, A., Jung, K. H., Partha, R., Spudich, J. L., Isaacson, T., Hirschberg, J., Wagner, M. y Beja, O. (2005). New insights into metabolic properties of marine bacteria encoding proteorhodopsins. *PLoS Biol* 3, e273.
- Sakaki, H., Kaneno, H., Sumiya, Y., Tsushima, M., Miki, W., Kishimoto, N., Fujita, T., Matsumoto, S., Komemushi, S. y Sawabe, A. (2002). A new carotenoid glycosyl ester isolated from a marine microorganism, *Fusarium* strain T-1. *J Nat Prod* 65, 1683-1684.
- Sakmar, T. P. (1998). Rhodopsin: a prototypical G protein-coupled receptor. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 59, 1-34.
- Salgado, L., Bejarano, E. y Cerdá-Olmedo, E. (1989). Carotene-superproducing mutants of *Phycomyces blakesleeanus*. *Exp Mycol* 13, 332-336.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. y Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed.*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor.
- Sancar, G. B., Jorns, M. S., Payne, G., Fluke, D. J., Rupert, C. S. y Sancar, A. (1987). Action mechanism of DNA photolyase. III. Photolysis of the enzyme-substrate complex and the absolute action spectrum. *J Biol Chem* 262, 492-498.
- Sancar, G. B., Smith, F. W., Reid, R., Payne, G., Levy, M. y Sancar, A. (1987). Action mechanism of DNA photolyase. I. Formation of the enzyme-substrate complex. *J Biol Chem* 262, 478-485.
- Sandmann, G. (1994). Carotenoid biosynthesis in microorganisms and plants. *Eur J Biochem* 223, 7-24.
- Sandmann, G. (1997). High level expression of carotenogenic genes for enzyme purification and biochemical characterization. *Pure and Applied Chemistry* 69.
- Sandmann, G. (2001). Genetic manipulation of carotenoid biosynthesis: strategies, problems and achievements. *Trends Plant Sci* 6, 14-17.
- Sandmann, G. y Misawa, N. (2002). Fungal carotenoids. In *The Mycota X. Industrial applications* (Osiewacz, H. D., ed.), pp. 247-262. Springer Verlag, Berlin Heidelberg.
- Sandmann, G., Misawa, N., Wiedemann, M., Vittorioso, P., Carattoli, A., Morelli, G. y Macino, G. (1993). Functional identification of *al-3* from *Neurospora crassa* as the gene for geranylgeranyl pyrophosphate synthase by complementation with *crt* genes, in vitro characterization of the gene product and mutant analysis. *J Photochem Photobiol B* 18, 245-251.

- Sanner, M. F., Olson, A. J. y Spehner, J. C. (1996). Reduced surface: an efficient way to compute molecular surfaces. *Biopolymers* 38, 305-320.
- Sanz, C., Alvarez, M. I., Orejas, M., Velayos, A., Eslava, A. P. y Benito, E. P. (2002). Interallelic complementation provides genetic evidence for the multimeric organization of the *Phycomyces blakesleeanus* phytoene dehydrogenase. *Eur J Biochem* 269, 902-908.
- Saranak, J. y Foster, K. W. (1997). Rhodopsin guides fungal phototaxis. *Nature* 387, 465-466.
- Scherzinger, D., Ruch, S., Kloer, D. P., Wilde, A. y Al-Babili, S. (2006). Retinal is formed from apo-carotenoids in *Nostoc* sp. PCC7120: In vitro characterization of an apo-carotenoid oxygenase. *Biochem J* 398, 361-369
- Schjerling, P. y Holmberg, S. (1996). Comparative amino acid sequence analysis of the C6 zinc cluster family of transcriptional regulators. *Nucleic Acids Res* 24, 4599-4607.
- Schmidhauser, T. J., Lauter, F. R., Russo, V. E. y Yanofsky, C. (1990). Cloning, sequence, and photoregulation of *al-1*, a carotenoid biosynthetic gene of *Neurospora crassa*. *Mol Cell Biol* 10, 5064-5070.
- Schmidhauser, T. J., Lauter, F. R., Schumacher, M., Zhou, W., Russo, V. E. y Yanofsky, C. (1994). Characterization of *al-2*, the phytoene synthase gene of *Neurospora crassa*. Cloning, sequence analysis, and photoregulation. *J Biol Chem* 269, 12060-12066.
- Schmidt, A. y Sandmann, G. (1990). In vitro characterization of two different *Phycomyces blakesleeanus* mutants with impaired phytoene desaturation. *J Bacteriol* 172, 4103-4105.
- Schmidt-Dannert, C., Umeno, D. y Arnold, F. H. (2000). Molecular breeding of carotenoid biosynthetic pathways. *Nat Biotechnol* 18, 750-753.
- Schneider, C., Boger, P. y Sandmann, G. (1997). Phytoene desaturase: heterologous expression in an active state, purification, and biochemical properties. *Protein Expr Purif* 10, 175-179.
- Schroeder, W. A. y Johnson, E. A. (1995). Singlet oxygen and peroxy radicals regulate carotenoid biosynthesis in *Phaffia rhodozyma*. *J Biol Chem* 270, 18374-18379.
- Schumann, G., Nurnberger, H., Sandmann, G. y Krugel, H. (1996). Activation and analysis of cryptic crt genes for carotenoid biosynthesis from *Streptomyces griseus*. *Mol Gen Genet* 252, 658-666.
- Schwartz, S. H., Tan, B. C., Gage, D. A., Zeevaart, J. A. y McCarty, D. R. (1997). Specific oxidative cleavage of carotenoids by VP14 of maize. *Science* 276, 1872-1874.
- Schwartz, S. H., Qin, X. y Zeevaart, J. A. (2001). Characterization of a novel carotenoid cleavage dioxygenase from plants. *J Biol Chem* 276, 25208-25211.
- Schwartz, S. H., Qin, X. y Loewen, M. C. (2004). The biochemical characterization of two carotenoid cleavage enzymes from *Arabidopsis* indicates that a carotenoid-derived compound inhibits lateral branching. *J Biol Chem* 279, 46940-46945.
- Schwender, J., Seemann, M., Lichtenthaler, H. K. y Rohmer, M. (1996). Biosynthesis of isoprenoids (carotenoids, sterols, prenyl side-chains of chlorophylls and plastoquinone) via a novel pyruvate/glyceraldehyde 3-phosphate non-mevalonate pathway in the green alga *Scenedesmus obliquus*. *Biochem J* 316, 73-80.
- Seo, J. A., Proctor, R. H. y Plattner, R. D. (2001). Characterization of four clustered and coregulated genes associated with fumonisin biosynthesis in *Fusarium verticillioides*. *Fungal Genet Biol* 34, 155-165.

- Seoighe, C. y Wolfe, K. H. (1999). Updated map of duplicated regions in the yeast genome. *Gene* 238, 253-261.
- Sidhu, G. S. (1983a). Genetics of *Gibberella fujikuroi*. II. Natural occurrence and significance of heterokaryosis in sorghum isolates. *Can J Bot* 61, 3314-3319.
- Sidhu, G. S. (1983b). Genetics of *Gibberella fujikuroi*. III. Significance of heterokaryosis in natural occurring corn isolates. *Can J Bot* 61, 3320-3325.
- Sidhu, G. S. (1983). Genetics of *Gibberella fujikuroi*. I. Inheritance of certain cultural traits. *J Gen Cytol* 25, 93-96.
- Sieiro, C., Poza, M., de Miguel, T. y Villa, T. G. (2003). Genetic basis of microbial carotenogenesis. *Int Microbiol* 6, 11-16.
- Sies, H. y Stahl, W. (1995). Vitamins E and C, beta-carotene, and other carotenoids as antioxidants. *Am J Clin Nutr* 62, 1315S-1321S.
- Simkin, A. J., Schwartz, S. H., Auldridge, M., Taylor, M. G. y Klee, H. J. (2004). The tomato carotenoid cleavage dioxygenase 1 genes contribute to the formation of the flavor volatiles beta-ionone, pseudoionone, and geranylacetone. *Plant J* 40, 882-892.
- Simkin, A. J., Underwood, B. A., Auldridge, M., Loucas, H. M., Shibuya, K., Schmelz, E., Clark, D. G. y Klee, H. J. (2004). Circadian regulation of the PhCCD1 carotenoid cleavage dioxygenase controls emission of beta-ionone, a fragrance volatile of petunia flowers. *Plant Physiol* 136, 3504-3514.
- Sineshchekov, O. A., Jung, K. H. y Spudich, J. L. (2002). Two rhodopsins mediate phototaxis to low- and high-intensity light in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc Natl Acad Sci USA* 99, 8689-8694.
- Snodderly, D. M. (1995). Evidence for protection against age-related macular degeneration by carotenoids and antioxidant vitamins. *Am J Clin Nutr* 62, 1448S-1461S.
- Snowden, K. C., Simkin, A. J., Janssen, B. J., Templeton, K. R., Loucas, H. M., Simons, J. L., Karunairetnam, S., Gleave, A. P., Clark, D. G. y Klee, H. J. (2005). The Decreased apical dominance1/Petunia hybrida CAROTENOID CLEAVAGE DIOXYGENASE 8 gene affects branch production and plays a role in leaf senescence, root growth, and flower development. *Plant Cell* 17, 746-759.
- Spudich, J. L. (1998). Variations on a molecular switch: transport and sensory signalling by archaeal rhodopsins. *Mol Microbiol* 28, 1051-1058.
- Spudich, J. L., Yang, C. S., Jung, K. H. y Spudich, E. N. (2000). Retinylidene proteins: structures and functions from archaea to humans. *Annu Rev Cell Dev Biol* 16, 365-392.
- Spudich, J. L. (2006). The multitasking microbial sensory rhodopsins. *Trends Microbiol* 14, 480-487.
- Stahl, W. y Sies, H. (2002). Carotenoids and protection against solar UV radiation. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol* 15, 291-296.
- Steenkamp, E. T., Wingfield, B. D., Coutinho, T. A., Zeller, K. A., Wingfield, M. J., Marasas, W. F. y Leslie, J. F. (2000). PCR-based identification of MAT-1 and MAT-2 in the *Gibberella fujikuroi* species complex. *Appl Environ Microbiol* 66, 4378-4382.
- Stephen, D., Jones, C. y Schofield, J. P. (1990). A rapid method for isolation high quality plasmid DNA suitable for DNA sequencing. *Nucleic Acids Res* 18, 7463-7464.

- Sutter, R. (1970). Effect of light on beta-carotene accumulation in *Blakeslea trispora*. *J Gen Microbiol* 64, 215-221.
- Sutter, R. P. (1975). Mutations affecting sexual development in *Phycomyces Blakesleeanus*. *Proc Natl Acad Sci USA* 72, 127-130.
- Talora, C., Franchi, L., Linden, H., Ballario, P. y Macino, G. (1999). Role of a white collar-1-white collar-2 complex in blue-light signal transduction. *Embo J* 18, 4961-4968.
- Tan, B. C., Cline, K. y MccarTy, D. R. (2001). Localization and targeting of the VP14 epoxy-carotenoid dioxygenase to chloroplast membranes. *Plant J* 27, 373-382.
- Tan, B. C., Joseph, L. M., Deng, W. T., Liu, L., Li, Q. B., Cline, K. y MccarTy, D. R. (2003). Molecular characterization of the *Arabidopsis* 9-cis epoxy-carotenoid dioxygenase gene family. *Plant J* 35, 44-56.
- Taylor, I. B., Burbidge, A. y Thompson, A. J. (2000). Control of abscisic acid synthesis. *J Exp Bot* 51, 1563-1574.

148

- Telfer, A. (2005). Too much light? How beta-carotene protects the photosystem II reaction centre. *Photochem Photobiol Sci* 4, 950-956.
- Terakita, A. (2005). The opsins. *Genome Biol* 6, 213.
- Tokunaga, F., Hisatomi, O., Satoh, T., Taniguchi, Y., Matsuda, S., Imanishi, Y., Honkawa, H., Takahashi, Y., Kobayashi, Y., Yoshida, M. y Tsukahara, Y. (1999). Evolution of visual pigments and related molecules. *Novartis Found Symp* 224, 44-52; discussion 52-43.
- Tudzynski, B. (1999). Biosynthesis of gibberellins in *Gibberella fujikuroi*: biomolecular aspects. *Appl Microbiol Biotechnol* 52, 298-310.
- Tudzynski, B. (2005). Gibberellin biosynthesis in fungi: genes, enzymes, evolution, and impact on biotechnology. *Appl Microbiol Biotechnol* 66, 597-611.
- Tudzynski, B. y Holter, K. (1998). Gibberellin biosynthetic pathway in *Gibberella fujikuroi*: evidence for a gene cluster. *Fungal Genet Biol* 25, 157-170.
- Uhlinger, C. (1997). Leukoencephalomalacia. *Vet Clin North Am Equine Pract* 13, 13-20.
- Umeno, D. y Arnold, F. H. (2003). A C35 carotenoid biosynthetic pathway. *Appl Environ Microbiol* 69, 3573-3579.
- Umeno, D., Tobias, A. V. y Arnold, F. H. (2005). Diversifying carotenoid biosynthetic pathways by directed evolution. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 69, 51-78.
- Valadon, L. R. & Mummery, R. S. (1976). Effect of certain nitrogenous heterocyclic compounds on carotenogenesis in *Verticillium agaricinum*. *Microbios* 15, 203-208.
- Vallon, O. (2000). New sequence motifs in flavoproteins: evidence for common ancestry and tools to predict structure. *Proteins* 38, 95-114.
- Velayos, A., Blasco, J. L., Alvarez, M. I., Iturriaga, E. A. y Eslava, A. P. (2000a). Blue-light regulation of phytoene dehydrogenase (*carB*) gene expression in *Mucor circinelloides*. *Planta* 210, 938-946.

- Velayos, A., Eslava, A. P. y Iturriaga, E. A. (2000b). A bifunctional enzyme with lycopene cyclase and phytoene synthase activities is encoded by the *carRP* gene of *Mucor circinelloides*. *Eur J Biochem* 267, 5509-5519.
- Velayos, A., Papp, T., Aguilar-Elena, R., Fuentes-Vicente, M., Eslava, A. P., Iturriaga, E. A. y Alvarez, M. I. (2003). Expression of the *carG* gene, encoding geranylgeranyl pyrophosphate synthase, is up-regulated by blue light in *Mucor circinelloides*. *Curr Genet* 43, 112-120.
- Verdoes, J. C., Krubasik, K. P., Sandmann, G. y van Ooyen, A. J. (1999a). Isolation and functional characterisation of a novel type of carotenoid biosynthetic gene from *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Mol Gen Genet* 262, 453-461.
- Verdoes, J. C., Misawa, N. y van Ooyen, A. J. (1999b). Cloning and characterization of the astaxanthin biosynthetic gene encoding phytoene desaturase of *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Biotechnol Bioeng* 63, 750-755.
- Visser, H., van Ooyen, A. J. y Verdoes, J. C. (2003). Metabolic engineering of the astaxanthin-biosynthetic pathway of *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *FEMS Yeast Res* 4, 221-231.
- Vogele, K., Schleier, S. y Brückner, B. (1995). Genetic variability in *Gibberella fujikuroi* and some related species of the genus *Fusarium* based on random amplification of polymorphic DNA (RAPD). *Current Genetics* 27, 528-535.
- von Lintig, J. y Wyss, A. (2001). Molecular analysis of vitamin A formation: cloning and characterization of beta-carotene 15,15'-dioxygenases. *Arch Biochem Biophys* 385, 47-52.
- von Lintig, J. y Vogt, K. (2000). Filling the gap in vitamin A research. Molecular identification of an enzyme cleaving beta-carotene to retinal. *J Biol Chem* 275, 11915-11920.
- von Lintig, J. y Vogt, K. (2004). Vitamin A formation in animals: molecular identification and functional characterization of carotene cleaving enzymes. *J Nutr* 134, 251S-256S.
- von Lintig, J., Hessel, S., Isken, A., Kiefer, C., Lampert, J. M., Voolstra, O. y Vogt, K. (2005). Towards a better understanding of carotenoid metabolism in animals. *Biochim Biophys Acta* 1740, 122-131.
- Wald, G. (1968). Molecular basis of visual excitation. *Science* 162, 230-239.
- Wald, G. (1933). Vitamin A in the retina. *Nature* 132, 316.
- Wang, C. W. y Liao, J. C. (2001). Alteration of product specificity of *Rhodobacter sphaeroides* phytoene desaturase by directed evolution. *J Biol Chem* 276, 41161-41164.
- Ward, S. P. y Leyser, O. (2004). Shoot branching. *Curr Opin Plant Biol* 7, 73-78.
- Waschuk, S. A., Bezerra, A. G., Jr., Shi, L. y Brown, L. S. (2005). *Leptosphaeria* rhodopsin: bacteriorhodopsin-like proton pump from a eukaryote. *Proc Natl Acad Sci USA* 102, 6879-6883.
- Weete, J. D. y Ghandi, S. R. (1996). *Biochemistry and molecular biology of fungal sterols*. The Mycota. Vol. 3. Biochemistry and Molecular Biology (Brambi, R. y Marzluf, G. A., Eds.), Springer-Verlag.
- Wendt, K. U., Lenhart, A. y Schulz, G. E. (1999). The structure of the membrane protein squalene-hopene cyclase at 2.0 Å resolution. *J Mol Biol* 286, 175-187.
- Wiebe, M. G. (2002). Myco-protein from *Fusarium venenatum*: a well-established product for human consumption. *Appl Microbiol Biotechnol* 58, 421-427.

- Wieland, B., Feil, C., Gloria-Maercker, E., Thumm, G., Lechner, M., Bravo, J. M., Poralla, K. y Gotz, F. (1994). Genetic and biochemical analyses of the biosynthesis of the yellow carotenoid 4,4'-diaponeurosporene of *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 176, 7719-7726.
- Wineland, G. O. (1924). An ascigerous stage and synonymy for *Fusarium moniliforme*. *J Agric Res* 28, 909-922. 901, 902.
- Wu, D., Wright, D. A., Wetzel, C., Voytas, D. F. y Rodermel, S. (1999). The IMMUTANS variegation locus of *Arabidopsis* defines a mitochondrial alternative oxidase homolog that functions during early chloroplast biogenesis. *Plant Cell* 11, 43-55.
- Wyss, A., Wirtz, G., Woggon, W., Brugger, R., Wyss, M., Friedlein, A., Bachmann, H. y Hunziker, W. (2000). Cloning and expression of beta,beta-carotene 15,15'-dioxygenase. *Biochem Biophys Res Commun* 271, 334-336.
- Wyss, A. (2004). Carotene oxygenases: a new family of double bond cleavage enzymes. *J Nutr* 134, 246S-250S.
- Xue, L., Gollapalli, D. R., Maiti, P., Jahng, W. J. y Rando, R. R. (2004). A palmitoylation switch mechanism in the regulation of the visual cycle. *Cell* 117, 761-771.
- Yan, W., Jang, G. F., Haeseleer, F., Esumi, N., Chang, J., Kerrigan, M., Campochiaro, M., Campochiaro, P., Palczewski, K. y Zack, D. J. (2001). Cloning and characterization of a human beta,beta-carotene-15,15'-dioxygenase that is highly expressed in the retinal pigment epithelium. *Genomics* 72, 193-202.
- Yoshida, Y. y Hasunuma, K. (2004). Reactive oxygen species affect photomorphogenesis in *Neurospora crassa*. *J Biol Chem* 279, 6986-6993.
- Zeller, K. A., Summerell, B. A., Bullock, S. y Leslie, J. F. (2003). *Gibberella konza* *Gibberella konza* (*Fusarium konzum* *Fusarium konzum*) sp. nov., a new species within the *Gibberella fujikuroi* *Gibberella fujikuroi* species complex from native prairie grasses. *Mycologia*, 943-954.
- Zhai, Y., Heijne, W. H., Smith, D. W. y Saier, M. H., Jr. (2001). Homologues of archaeal rhodopsins in plants, animals and fungi: structural and functional predications for a putative fungal chaperone protein. *Biochim Biophys Acta* 1511, 206-223.