

**Departamento de Microbiología y Genética**



**VNiVERSiDAD  
D SALAMANCA**

TESIS DOCTORAL

**Estudio de la regulación por la luz azul en**  
*Phycomyces blakesleeanus*

Memoria presentada por D. Mahdi Shahriari para  
Optar al Grado de Doctor

DIRECTORES

Dra. Dña. Catalina S. Sanz Lozano

Dr. D. Fernando Sánchez Juanes

**2016**

**Departamento de Microbiología y Genética**



**VNiVERSiDAD  
D SALAMANCA**

TESIS DOCTORAL

**Estudio de la regulación por la luz azul en  
*Phycomyces blakesleeanus***

Memoria presentada por D. Mahdi Shahriari para  
Optar al Grado de Doctor

Fdo. Mahdi Shahriari

**2016**

La Prof<sup>a</sup>. Dra. Dña. Catalina S. Sanz Lozano, Profesora Ayudante Doctor del Departamento de Microbiología y Genética y el Prof. Dr. D. Fernando Sánchez Juanes, del Instituto de Investigación Biomédica de Salamanca (IBSAL).

**CERTIFICAN:**

Que el trabajo titulado “Estudio de la regulación por la luz azul en *Phycomyces blakesleeanus*”, que presenta el licenciado en Biología D. Mahdi Shahriari y ha sido realizado bajo nuestra dirección en el Departamento de Microbiología y Genética de la Universidad de Salamanca, reúne a nuestro juicio, la originalidad y contenidos suficientes para que sea presentado ante el Tribunal correspondiente y optar al grado de Doctor por la Universidad de Salamanca.

Y para que así conste y a los efectos oportunos, expedimos el presente certificado en Salamanca a 9 de Diciembre de 2015.

---

Fdo: Prof<sup>a</sup>. Dra. Dña. Catalina S. Sanz Lozano

---

Fdo: Dr. D. Fernando Sánchez Juanes

*A Atefeh*

*a mis padres y mis hermanos*



# AGRADECIMIENTOS

Quisiera expresar mi agradecimiento a todas aquellas personas que de una u otra forma han hecho posible la realización de esta Tesis Doctoral.

En primer lugar quiero expresar mi agradecimiento a la Dra. Catalina S. Sanz Lozano, directora de esta Tesis, por haberme dado la oportunidad de realizar este trabajo por la confianza y apoyo depositado en mí desde principio. Al Dr. Fernando Sánchez Juanes, co-director de esta tesis por tantos momentos agradables, por compartir conmigo sus conocimientos y experiencias sobre la proteómica. Gracias a ambos por la dirección, revisión y corrección de esta memoria de Tesis Doctoral.

Asimismo quiero expresar mi reconocimiento a Prof. Dr. Arturo Pérez Eslava por su apoyo, seguimiento y dedicación. Gracias por las sugerencias.

A la Prof<sup>a</sup>. Dra. María Isabel Alvarez Gallego por mostrarme su apoyo durante todos estos años y sobre todo por su amabilidad y buena disposición. Gracias por tratarme siempre con mucho cariño.

Al D. Fernando Díez Martín y Dña. Silvia Rodríguez-Prieto por tener todo el material listo para trabajar, por preocuparse por todos y por su ayuda.

A mis amigos y conocidos, por estar siempre pendientes, por su paciencia y por el interés mostrado por este trabajo.

# INDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
1.1. SUJETO DE ESTUDIO: <i>Phycomyces blakesleeanus</i> .....	1
1.1.1. Ciclo de vida .....	1
1.1.1.1. Ciclo asexual .....	2
1.1.1.2. Ciclo sexual.....	4
1.1.2. <i>Phycomyces</i> como sistema modelo.....	5
1.1.2.1. Las respuestas de <i>Phycomyces</i> a estímulos ambientales.....	6
1.1.2.2. Aproximación genética al estudio de las respuestas sensoriales de <i>Phycomyces</i> .....	8
1.1.3. Genética sexual.....	11
1.1.4. El genoma de <i>Phycomyces</i> .....	13
1.1.5. Fotorrespuestas en hongos .....	14
1.1.5.1. La luz como señal reguladora en los procesos biológicos.....	14
1.1.5.2. Genes regulados por la luz en hongos.....	16
1.1.5.3. Los receptores de la luz .....	16
1.1.5.4. Otros fotorreceptores de hongos.....	21
1.1.5.4.1. Rodopsinas.....	21
1.1.5.4.2. Criptocromos y fotoliasas.....	21
1.1.5.4.3. Fiticromos.....	23
1.1.5.4.3. Fiticromos.....	23
1.1.5.4.3. Fiticromos.....	23
1.1.5.5. Otros posibles fotorreceptores.....	24
1.1.5.6. Fotorrecepción en <i>Neurospora</i> .....	25
1.1.5.7. Fotorreceptores en <i>Phycomyces</i> .....	26
1.2. Proteoma.....	31
1.2.1. Tecnologías de la proteómica .....	33
1.2.2. Electroforesis bidimensional .....	34
1.2.3. Espectrometría de masas (EM).....	35
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>41</b>

<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>42</b>
3.1. ORGANISMOS UTILIZADOS.....	43
3.2. MEDIOS Y CONDICIONES DE CULTIVO.....	44
3.3. CONDICIONES DE ILUMINACIÓN.....	45
3.4. OBTENCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS.....	46
3.4.1. Extracción de ADN Genómico de <i>P. blakesleeanus</i> .....	46
3.5. MANIPULACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS.....	47
3.5.1. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	47
3.5.1.1. Diseño de oligonucleótidos .....	47
3.5.1.2. Condiciones de PCR .....	49
3.5.2. ELECTROFORESIS EN GELES DE AGAROSA .....	50
3.5.2.1. Electroforesis de ADN en geles de agarosa.....	50
3.5.3. Purificación de los fragmentos de PCR.....	51
3.5.4. Secuenciación.....	52
3.5.5. Análisis de datos .....	52
3.6. EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES.....	53
3.6.1. Extractos totales de proteínas de <i>P. blakesleeanus</i> .....	53
3.7. MANIPULACIÓN DE EXTRACTOS PROTEICOS.....	54
3.7.1. Cuantificación de los extractos proteicos.....	54
3.7.2. Preparación de la muestra.....	54
3.7.3. Electroforesis bidimensional.....	55
3.7.3.1. Primera dimensión o isoelectroenfoque.....	56
3.7.3.2. Segunda dimensión o SDS-PAGE.....	57
3.7.3.3. Tinción de las proteínas en el gel de electroforesis.....	57
3.7.4. Análisis de las imágenes de los geles 2D .....	58
3.8. IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS POR ESPECTROMETRÍA	
DE MASAS.....	60
3.8.1. Digestión en gel.....	60
3.8.2. Obtención de PMF y fragmentación MS/MS mediante	
MALDI TOF-TOF.....	61

3.8.3. Análisis de datos MS e identificación de proteínas mediante	
Búsqueda en base de datos:.....	62
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>64</b>
4.1. Estudio Genético.....	65
4.2. Estudio del Proteoma de <i>Phycomyces blakesleeanus</i> .....	70
4.3. Estudio de las diferencias en el perfil proteico entre distintas condiciones	
experimentales.....	78
4.3.1. Comparación micelio tipo silvestre crecido en medio líquido en	
Condiciones de iluminación vs condiciones de oscuridad.....	79
4.3.2. Comparación entre micelios de la estirpe <i>madA</i> crecidos en medio líquido	
En condiciones de iluminación vs condiciones de oscuridad.....	83
4.3.3. Comparación entre micelios de la estirpe tipo silvestre crecidos en	
Medio líquido en condiciones de iluminación vs micelios de la	
Estirpe <i>madA</i> crecidos en condiciones de iluminación.....	88
4.3.4. Comparación entre micelios de la estirpe tipo silvestre crecidos en	
Medio líquido en condiciones de oscuridad vs micelios de la	
Estirpe <i>madA</i> crecidos en condiciones de oscuridad.....	91
4.3.5. Comparación entre micelios de la estirpe <i>madB</i> crecidos en medio	
Líquido en condiciones de iluminación vs condiciones de oscuridad.....	95
4.3.6. Comparación entre micelios de la estirpe tipo silvestre crecidos en	
Medio líquido en condiciones de iluminación vs micelios de	
La estirpe <i>madB</i> crecidos en condiciones de iluminación.....	101
4.3.7. Comparación entre micelios de la estirpe tipo silvestre crecidos en	
Medio líquido en condiciones de oscuridad vs micelios de	
La estirpe <i>madB</i> crecidos en condiciones de oscuridad.....	104
4.3.8. Comparación entre micelios de la estirpe <i>madC</i> crecidos en medio	
Líquido en condiciones de iluminación vs condiciones	
De oscuridad.....	108
4.3.9. Comparación entre micelios de la estirpe tipo silvestre crecidos en	
Medio líquido en condiciones de iluminación vs micelios de	
La estirpe <i>madC</i> crecidos en condiciones de iluminación.....	113
4.3.10. Comparación entre micelios de la estirpe tipo silvestre crecidos	
En medio líquido en condiciones de oscuridad vs micelios de	

La estirpe <i>madC</i> crecidos en condiciones de oscuridad.....	117
4.3.11. Comparación llevada a cabo en la estirpe tipo silvestre entre el Micelio crecido en medio solido bajo iluminación vs el micelio Crecido en medio solido bajo oscuridad.....	122
4.3.12. Comparación llevada a cabo en la estirpe tipo silvestre entre Esporangióforos crecidos en medio solido bajo iluminación Vs esporangióforos crecidos en medio solido bajo oscuridad.....	126
4.3.13. Comparación llevada a cabo en la estirpe silvestre entre micelios Crecidos en medio solido bajo iluminación vs esporangióforos en Idénticas condiciones de crecimiento.....	129
4.3.14. Comparación llevada a cabo en la estirpe silvestre entre micelios Crecidos en medio solido bajo oscuridad vs esporangióforos En idénticas condiciones de crecimiento.....	134
<b>5. CONCLUSIONES.....</b>	<b>146</b>
<b>6. ANEXO I.....</b>	<b>149</b>
<b>7. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>160</b>



# **1. INTRODUCCIÓN**

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 Sujeto de estudio: *Phycomyces blakesleeanus*.

*Phycomyces blakesleeanus* es un hongo filamentoso que presenta una amplia distribución en la naturaleza, encontrándose en el suelo, en ambientes húmedos y sobre otros sustratos orgánicos en descomposición. *Phycomyces blakesleeanus* se encuentra clasificado en el subfilo Mucoromycotina, en el orden Mucorales familia Mucoraceae y en el género *Phycomyces* (Cantos, 2015).

*Phycomyces* fue descrito por primera vez en Suecia en 1817 por C. A. Agardh, que lo confundió con un alga verde (Agardh, 1817). Esta confusión inspiró el nombre actual de *Phycomyces*: “hongo-alga”.

Fue Kunze (Kunze, 1823) quien estableció el género *Phycomyces* al que encontró creciendo en los alrededores de un molino de aceite en Sajonia, Alemania. La especie original, *Phycomyces nitens*, fue dividida en dos por Burgeff (Burgeff, 1925), que encontró diferencias morfológicas y presumibles barreras de esterilidad entre variedades de *Phycomyces nitens*.

La forma con las esporas más pequeñas y esporangióforos más grandes fue descrita por Burgeff como la especie *Phycomyces blakesleeanus*. La forma con las esporas más grandes la denominó *Phycomyces nitens*. La primera es la especie usada en la inmensa mayoría de las investigaciones con este hongo.

### 1.1.1. Ciclo de vida.

*Phycomyces* es haploide. En la Figura 1 se representa los principales estadios de su ciclo de vida. Las fases más importantes de los ciclos de vida asexual y sexual así como:



### **1.1.1.1 Ciclo asexual.**

#### **Germinación de las esporas**

Las esporas vegetativas de *Phycomyces* son elipsoidales, no móviles y contienen en su interior varios núcleos, siendo su tamaño en *P.blakesleeanus* de 8 a 13 por 5 a 7,5  $\mu\text{m}$ . La distribución de núcleos por espora depende de la estirpe y de las condiciones de cultivo. En el tipo silvestre habitual, NRRL1555, solamente el 0,3% de las esporas son uninucleadas, siendo de 3-4 la media de núcleos por espora (Cerdá-Olmedo y Lipson, 1987).

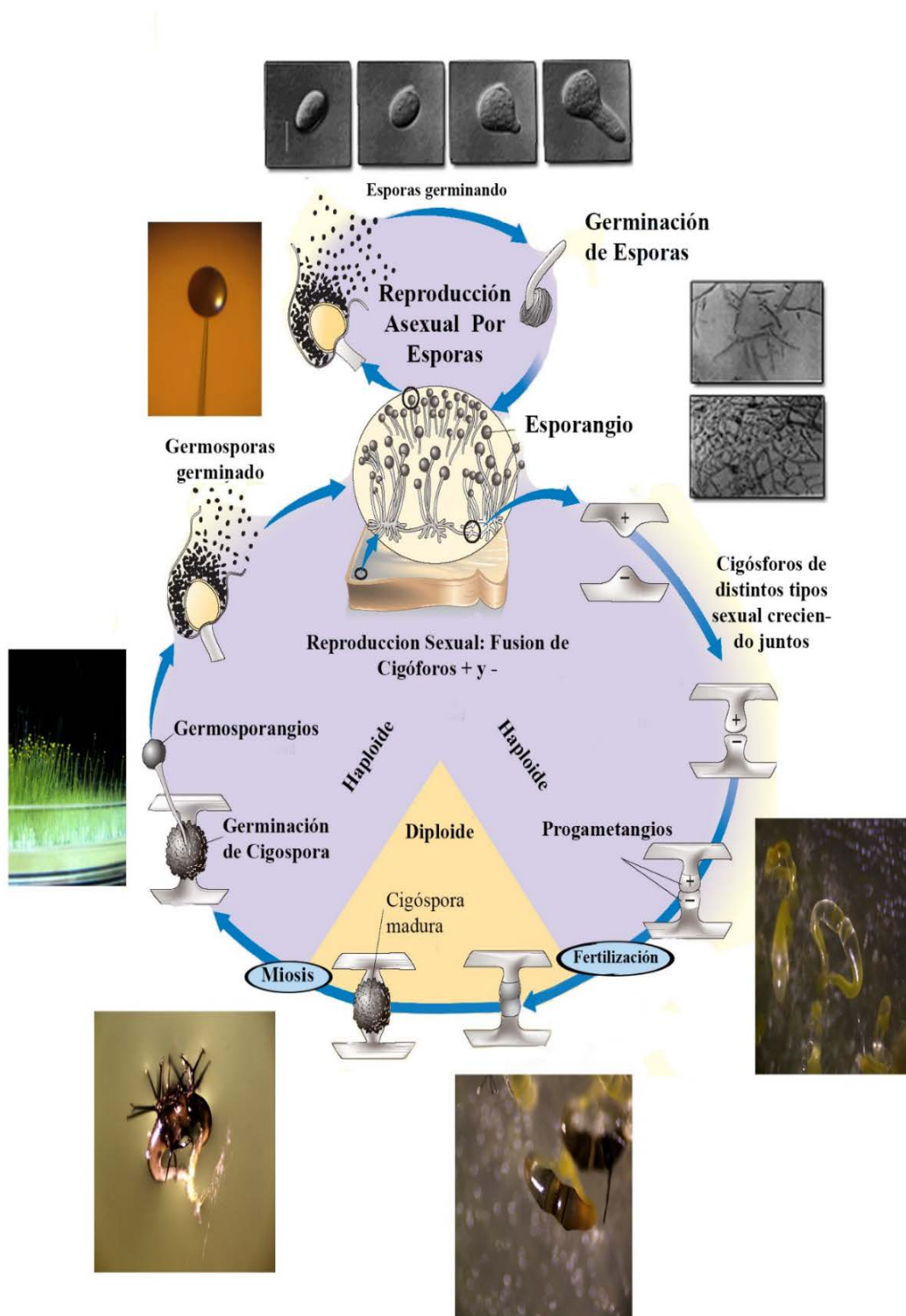
#### **Crecimiento del micelio**

El micelio de *Phycomyces* se puede cultivar en medio líquido con aireación o en medio sólido, que suele ser el más habitual. Después de la germinación las hifas crecen y se ramifican rápidamente, ocurriendo el crecimiento en los extremos y extendiéndose el micelio radial y simétricamente a partir del punto en donde cayó la espora. En el micelio no existe ningún tabique de separación y las hifas nunca se anastomosan (Galle, 1965).

#### **Esporangióforos**

En condiciones adecuadas, fundamentalmente en medio sólido, el micelio al cabo de dos o tres días produce los cuerpos fructíferos denominados esporangióforos, que son hifas aéreas las cuales forman un esporangio en el extremo. En condiciones normales de temperatura, 22-23°C el ciclo de espora a espora dura unos cuatro días. Existen dos tipos de cuerpos fructíferos en *Phycomyces*, denominados macróforos y micróforos, que difieren en tamaño, nivel de desarrollo y comportamiento. Las señales ambientales como la luz, composición del medio, disponibilidad de oxígeno y la densidad del cultivo determinan la formación de un tipo u otro (Cerdá-Olmedo, 2001; Cerdá-Olmedo y Lipson, 1987; Corrochano y Cerdá-Olmedo, 1992). Los macróforos pueden llegar a tener varios cms de largo, en su madurez (4-5 cms) crecen a una velocidad de 3 mm/h., sus esporangios tienen un diámetro de unos 5 mm y contienen unas  $1 \times 10^5$  esporas. Los micróforos tienen entre 1-3 mm. De longitud, los esporangios tienen un diámetro de unos 0.1 mm. Y contienen unas  $1 \times 10^3$  esporas. *Phycomyces* es cenocítico, es decir, tanto el micelio como los macróforos y micróforos al no estar interrumpido por septos o paredes celulares pueden ser

considerados como una sola célula con muchos núcleos atravesada por rápidas corrientes citoplasmáticas.



**FIGURA 1.** Ciclos de vida de *Phycomyces blakesleeanus*. (Esquema modificado de Solomon: Biology, 5/e)

### 1.1.1.2Ciclo sexual.

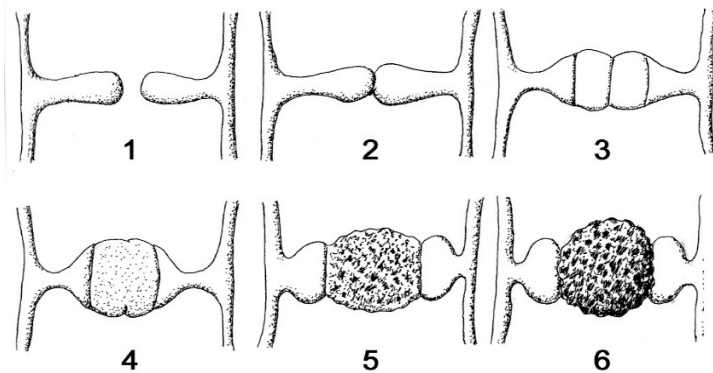
*Phycomyces* es heterotálico. Las estirpes de este hongo se clasifican en grupos (+) o (-) por la definición de que dos estirpes tienen diferente signo si pueden interactuar para formar unas estructuras especiales denominadas cigosporas. Estos grupos corresponden a los sexos y las cigosporas son productos de la fusión sexual como demostró Blakeslee (Blakeslee, 1904; Blakeslee, 1906). Los genes responsables del sexo se denominan *sexM* (-) y *sexP* (+) (Idnurm et al., 2008). Cada gen está situado en el locus sexual, una región de 5.8 Kb en el sexo (+) y de 3.4 Kb en el sexo (-), que contienen ADN repetitivo. Los genes *sexM* y *sexP* codifican para una proteína con un dominio HMG (High Mobility Group). Este dominio está asociado al locus del sexo de otros hongos y levaduras. Los genes *sexM* y *sexP* tienen tamaños diferentes, 636 pares de base en *sexM* y 723 pares de base en *sexP*, y distinta orientación (Idnurm et al., 2008).

La forma en la que estas proteínas intervienen en la interacción sexual se desconoce. Si se colocan micelios de diferente sexo en un medio adecuado, creciendo uno ceca del otro, se producen un número de cambios tanto químicos como morfológicos. Los extremos de las hifas se engruesan e incrementan su consumo de oxígeno y su producción de carotenos. Las hifas modificadas de cada sexo, denominadas cigóforos, crecen hacia las del sexo opuesto y entran en contacto (Burgeff, 1924; Burnett, 1953; Plempel y Braunitzer, 1958). Estos procesos ocurren aunque los dos sexos se encuentren separados por una membrana de celulosa (Burgeff, 1924; van den Ende, 1968). Se postuló que una o más sustancias difusibles producidas por cada uno de los sexos y detectadas por el otro deben dirigir a los cigóforos para entrar en contacto.

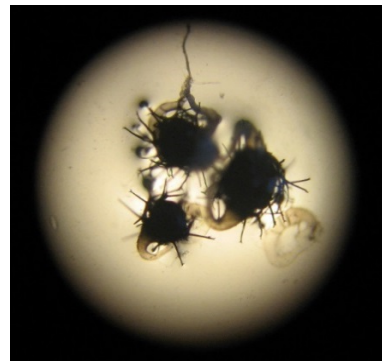
Pemple postuló la existencia de varios pares de hormonas cada uno de los cuales produce ciertos cambios bioquímicos y morfológicos en el sexo opuesto y estimula la producción del siguiente par de hormonas (Sutter, 1987). Los cigóforos de sexo contrario, después de establecer contacto, crecen juntos en el aire, engrosando considerablemente y formando finalmente un círculo en el que cada mitad está compuesta por la región distal de un cigóforo, el progametangio figura 2. Una pared transversal dentro de cada progametangio separa una célula, el gametangio, del resto del micelio; la pared entre los

dos gametangios desaparece y se forma una sola célula, el cigoto, cuyo citoplasma y miles de núcleos derivan de los dos micelios.

Los cigotos maduros o cigosporas son grandes esferas de casi 1 mm de diámetro de color negro. Las porciones adyacentes de los cigóforos a ambos lados de la cigospora se llaman suspensores y de ellas salen unas espinas de color negro dispuestas alrededor de la cigospora figura 3. Las cigosporas permanecen en latencia durante meses (de dos a más de doce) antes de germinar, dependiendo de las estirpes y las condiciones de cultivo, produciendo un germosporangióforo, con su germosporangio y sus germosporas, idénticas a los macroesporangióforos del ciclo asexual. Las germosporas, al germinar, dan lugar a micelios vegetativos (Cerdá-Olmedo, 2001; Cerdá-Olmedo y Lipson, 1987) .



**FIGURA 2.** 1. Formación de cigóforos, 2. Septo de fusión, 3. Progametangio y septo gametangial, 4. Disolución del septo de fusión, 5. Cariogamia y prozigosporanigo, 6. Zoosporangio con 1 cigosporas.



**FIGURA 3.** Cigosporas y espinas

### 1.1.2 *Phycomyces* como sistema modelo.

La razón principal de la presencia de *Phycomyces* en los laboratorios es su sensibilidad a la luz, descubierta hace cerca de 150 años (Carnoy, 1870; Massart, 1888). Desde entonces se han desarrollado técnicas que permiten su manipulación genética y bioquímica. *Phycomyces* fue el primer organismo en el que se investigaron mutantes espontáneos (Burgeff, 1912, 1914, 1929) y el segundo, después de *Drosophila*, en el que se indujeron mutaciones artificialmente (Dickson, 1932) . En *Phycomyces* no se conocen diploides estables y la presencia de dos genomas en una misma célula se consigue mediante heterocariosis. El término heterocarionte (células con núcleos genéticamente diferentes) fue acumulado por Burgeff en 1914 (Burgeff, 1914), aunque fue descrito por primera vez por

*Blakeslee* en 1906 (Blakeslee, 1906), iniciadores éstos del desarrollo de la genética de *Phycomyces*. Mediante el uso de heterocariontes es posible realizar las pruebas de complementación y también la llamada complementación cuantitativa, técnica en la que cada micelio heterocariótico es analizado fenotípicamente y genéticamente para relacionar la proporción nuclear de ambos núcleos en el heterocarionte y una determinada función.

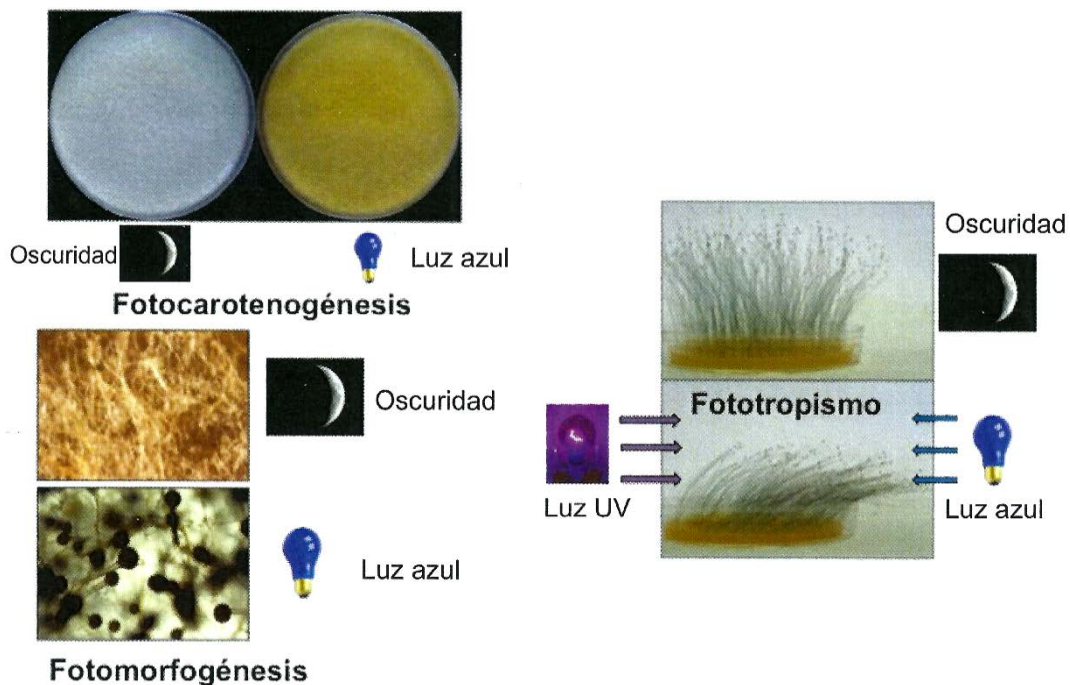
Con este método se ha profundizado mucho en el estudio de la biosíntesis de carotenoides y su regulación (Cerdá-Olmedo y Lipson, 1987), así como en el estudio de algunas propiedades del fototropismo (Medina y Cerdá-Olmedo, 1977). El contraste entre la relativa simplicidad del hongo *Phycomyces*, cuyo esporangióforo presenta unas pautas de crecimiento muy bien definidas, y la relativa complejidad de sus reacciones a gran variedad de estímulos ambientales, atrajo la atención de varios grupos de investigación en el siglo XIX. Posteriormente, el gran impulsor de las investigaciones en *Phycomyces* para tratar de entender los mecanismos de sensibilidad y comportamiento celulares fue Max Delbrück, que abandonó sus estudios con los fagos, por los cuales obtuvo junto con Luria y Hershey el Premio Nobel en 1969, y se dedicó al estudio de *Phycomyces* como sistema modelo para tratar de ver las bases moleculares de la captación de la información externa (información ambiental), su procesamiento y elaboración de mecanismos de respuesta.

Dicho de otro modo, trataba de ver las bases moleculares del comportamiento usando un enfoque reduccionista (organismo sencillo, fácil de cultivar, una sola célula, que responde a varios estímulos, fácil de medir sus respuestas, etc.) de la misma manera que usó ese mismo enfoque en sus trabajos con los fagos.

### **1.1.2.1 Las respuestas de *Phycomyces* a estímulos ambientales.**

El esporangióforo de *Phycomyces* responde a una gran variedad de estímulos ambientales tales como la luz, gravedad, evitación de objetos cercanos, etc. Prácticamente todo estímulo imaginable sea físico o químico, excepto los acústicos, es capaz de provocar respuestas (Cerdá-Olmedo y Lipson, 1987). Cuando el estímulo está simétricamente distribuido alrededor del esporangióforo, las respuestas son mecánicas (cambios en la velocidad de crecimiento), cuando los estímulos están asimétricamente distribuidos, dan

lugar a los tropismos (cambios en la dirección del crecimiento). La zona sensible del esporangióforo coincide aproximadamente con la zona de crecimiento, situada en la parte superior del esporangióforo, justo por debajo del esporangio, ocupando una zona de unos 3 mm. Unos de los estímulos ambientales que más ha sido estudiado en *Phycomyces* es el efecto de la luz. La luz azul provoca un fototropismo positivo (se dirige hacia la fuente de la luz) del esporangióforo cuando se le irradia unilateralmente. La luz ultravioleta provoca un fototropismo negativo (se aleja de la fuente de luz) (Curry y Gruen, 1957). También el micelio de *Phycomyces* responde a los estímulos luminosos figura 4. La luz induce la formación de macróforos e inhibe la formación de micróforos (Corrochano y Cerdá-Olmedo, 1992) y también afecta a la síntesis de carotenoides (Cerdá-Olmedo y Lipson, 1987).



**FIGURA 4.** Ejemplos de fotorrespuestas de *Phycomyces*.

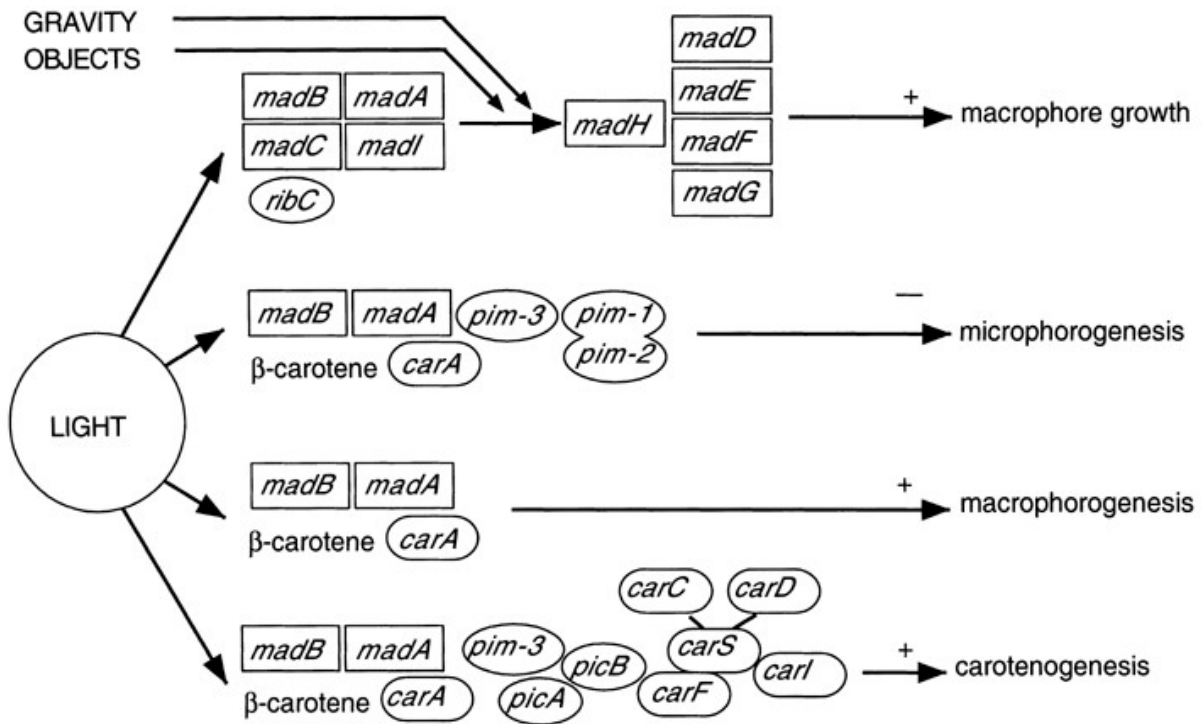
El esporangióforo responde también a estímulos gravitacionales, como la fuerza de la gravedad o la fuerza centrífuga, creciendo en contra del estímulo por lo que se dice que presenta gravitropismo negativo (Bergman et al., 1969). Una de las respuestas más curiosas del esporangióforo es la evitación de obstáculos. Cuando se coloca un objeto próximo a su zona de crecimiento, el esporangióforo crece apartándose del objeto (Elfving, 1881; R. J. Cohen, 1975; Shropshire, 1962). Otros estímulos reseñables son el viento, la presión mecánica, el etileno, etc., (Shropshire 1987).

Estudios pioneros sobre las respuestas a la luz de *Phycomyces* fueron realizados durante la primera mitad del siglo XX por Blaauw en Holanda, Buder en Alemania y Castle en los Estados Unidos (Eslava y Alvarez, 1987). Estos grupos describieron el patrón de crecimiento a la luz y el fototropismo. Posteriormente Delbrück y su escuela se concentraron en el estudio y descripción cuantitativa de las diversas respuestas de *Phycomyces* “motivados por un interés común en el estudio de la transducción de señales exhibidas por los órganos sensoriales de todos los organismos” (Bergman et al., 1969).

Varios modelos fueron propuestos para tratar de explicar algunas de estas respuestas. Los espectros clásicos de acción para el fototropismo y la respuesta de crecimiento a la luz sugirieron la presencia de flavina como cromóforo en el fotorreceptor. Toda una gama de experimentos basados fundamentalmente en la espectrofotometría y la fisiología fueron realizadas hasta los años 1970 sin que se llegara a conocer la naturaleza molecular del pigmento o pigmentos receptores de la luz. (Bergman et al., 1969; Cerdá-Olmedo y Lipson, 1987).

### **1.1.2.2 Aproximación genética al estudio de las respuestas sensoriales de *Phycomyces*.**

La obtención de mutantes alterados en el comportamiento fototrópico (genotipo *mad*) fue iniciada en el laboratorio de Delbrück a finales de los años 1960. A principios de los 70, en una aproximación liderada por Cerdá-Olmedo, se obtuvieron más mutantes ciegos y se estudiaron y clasificaron fenotípicamente. Los mutantes aislados por su fototropismo anormal están alterados en algún componente/s del canal/es de información que va desde la recepción de la luz a la ejecución de la respuesta. Para separar estos componentes y determinar sus funciones se estudiaron en estos mutantes ciegos las demás respuestas sensoriales (fotocarotenogénesis, fotomorfogénesis, gravitropismo y evitación de objetos). El procedimiento usado fue el mismo que se usa por ejemplo para averiguar las conexiones de una red telefónica, se corta al azar uno de sus elementos y se averigua qué comunicaciones han resultado afectadas. Con estos resultados se elaboró un esquema de árbol de integración sensorial en *Phycomyces* que fue el primero descrito en organismos eucarióticos (Bergman et al., 1973) figura 5.

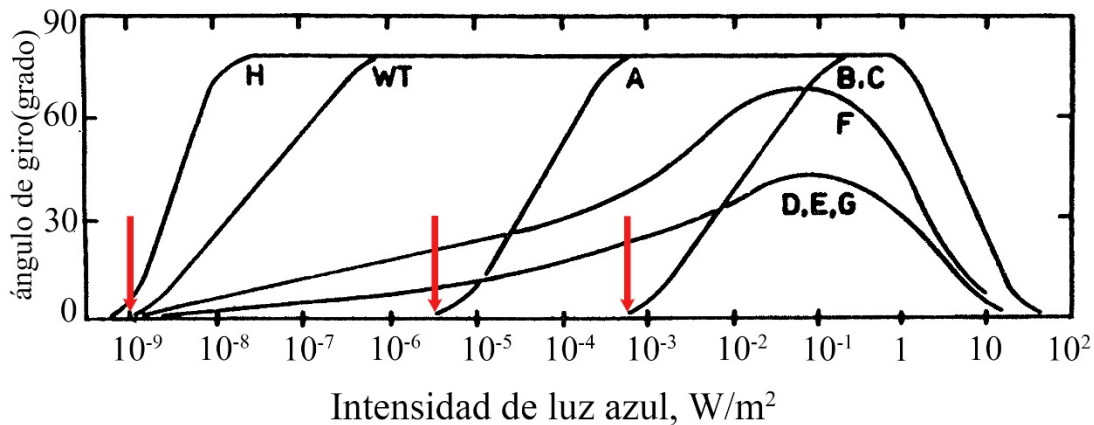


**FIGURA 5.** Ruta sensorial de *Phycomyces* conectando al estímulo (Izda.) y las respuestas (Dcha.) El flujo de información se obstaculiza por los genes mutados indicados en cursiva o por la ausencia de  $\beta$ -caroteno.(Cerdá-Olmedo, 2001) .

Los mutantes ciegos fueron clasificados fenotípicamente en dos tipos, los del tipo 1 están alterados al principio de la ruta, los del tipo 2 están alterados en el fototropismo y en las otras respuestas del esporangióforo tales como la evitación y el gravitropismo; la fotocarotenogénesis y la fotomorfogénesis las tienen normales por lo que presumiblemente los mutantes tipo 2 están afectados en los mecanismos de respuesta. Análisis de complementación han identificado, hasta el momento, 10 genes *mad* (*madA-madJ*) (Campuzano et al., 1995; Eslava et al., 1976; Ootaki et al., 1974; Ootaki et al., 1977; Orejas et al., 1987). Los mutantes *madA*, *madB*, *madC* y *madI* pertenecen al tipo 1 y el resto pertenecen al tipo 2. El mutante *madH* es el único mutante encontrado por ahora con fototropismo alterado que es hipertrópico (López-Díaz y Lipson, 1983). Ninguno de los mutantes *mad* aislados hasta ahora es completamente ciego ya que a altas intensidades de luz presentan cierto grado de fototropismo. Los dobles mutantes *madA madB* y *madB madC*, así como el triple mutante *madA madB madC* son mucho menos sensibles a la luz que los mutantes simples, sin embargo a la más alta intensidad comprobada (1,6 W/m cuadrado) no parecen ser completamente ciegos. La figura 6 representa la respuesta fototrópica a la luz azul de la estirpe silvestre y los mutantes ciegos.



## Fototropismo de la estirpe silvestre y mutantes *mad*

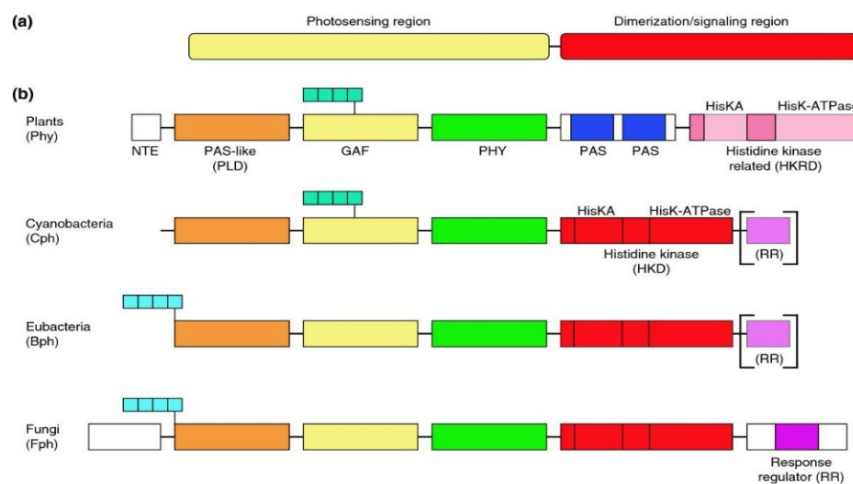


**FIGURA 6.** Respuesta fototrópica de la estirpe silvestre y los mutantes *mad* (Lipson, 1991).

El sistema de un único fotorreceptor y el camino de transducción sensorial postulado originalmente por Bergman et. Al. En 1973 está basado en la clasificación fenotípica de los mutantes ciegos y asume un solo pigmento visual y un camino de transducción sensorial lineal con diferentes productos génicos operando secuencialmente. Estudios de respuestas de crecimiento a la luz de simples y dobles mutantes ciegos estudiados en comparación con el tipo silvestre y empleando diversos métodos (Palit et al., 1986; Poe et al., 1986a, b), análisis del espectro de acción de mutantes ciegos simples y dobles (Cerdá-Olmedo y Lipson, 1987; Galland, 1983; Galland y Lipson, 1985), así como estudios genéticos (Alvarez y Eslava, 1983) indican que los productos de los genes *mad* no operan secuencialmente sino con ciertos grados de interacción y también que es probable la existencia de más de un fotorreceptor. En particular estos resultados sugieren la existencia de un complejo multimolecular de transducción sensorial. Una versión actualizada de la/s ruta/s de transducción sensorial de *Phycomyces* basada en los fenotipos de los mutantes se muestra en la figura 7. En ella se muestra que algunos productos génicos se usan en muchas rutas sensoriales diferentes. Por ejemplo *madA* y *madB* La complejidad tiene hasta cierto punto una base combinatoria. Los bloques indican los productos de los genes cuyas mutaciones interrumpen la transferencia de información desde los receptores a las respuestas.

Existe también una respuesta de *Phycomyces* a la luz ultravioleta (UV). Como ya se ha indicado, *Phycomyces* presenta fototropismo negativo cuando se exponen los esporangióforos a la acción de luz UV cercana por debajo de 310 nm (Curry y Gruen, 1957). Se han aislado mutantes *uvi* alterados en el fototropismo a la luz UV cercana y que no están alterados en la percepción de la luz azul; al mismo tiempo se ha visto que mutantes alterados en el fototropismo a la luz azul se comportan como el tipo silvestre para el fototropismo a la luz UV.

Todo ello indica la existencia de al menos dos mecanismos para el fototropismo, uno para la radiación UV y otro para la luz azul (Ballario et al., 1996; Campuzano et al., 1994; Martin-Rojas et al., 1995).



**FIGURA 7.** Dominios estructurales de los fitocromos. **a.** Naturaleza modular de los fitocromos **b.** Dominios conservados en los distintos grupos (Sharrock, 2008).

### 1.1.3 Genética sexual.

La genética sexual de *Phycomyces* inició a principios del siglo pasado (Blakeslee, 1904; Blakeslee, 1906; Burgeff, 1915) pero las condiciones generales para la germinación de las cigosporas fueron establecidas en el último tercio del siglo XX (Eslava y Alvarez, 1987). Cuando los micelios de sexo opuesto se encuentran, los extremos de las hifas sufren unas tabicaciones que producen lo que puede ser equivalente a los gametos Figura 1. Las dos células se fusionan para formar las cigosporas inmaduras. Estas cigosporas incorporan miles de núcleos de cada sexo y, aunque los mecanismos no se conocen en detalle, se postula que de los miles de núcleos haploides de los dos sexos que entran en la zigospora la mayoría degeneran, bien después de la fusión entre ellos para formar diploides o bien en su

estado haploide inicial. En general, solamente un núcleo diploide sufre meiosis y los cuatro productos meióticos posteriormente sufren una serie de divisiones mitóticas. El germosporangio se divide en diversas masas celulares conteniendo un solo núcleo que puede sufrir otras divisiones mitóticas que producen los dos, tres o cuatro núcleos encontrados con frecuencia en las germosporas maduras.

Estas germosporas suelen ser homocariotas. En algunos casos se da una pequeña proporción de germosporas que son heterocariotas. En estos casos se asume que los primordios de estas germosporas contienen más de un núcleo distinto. Experimentos analizando tétradas por un lado (Eslava et al., 1975a; Eslava et al., 1975b) y por otro el estudio del locus del sexo y la presencia en el genoma de genes que tienen un papel importante en meiosis (Chaudhary et al., 2013; Idnurm et al., 2008), sugieren que las germosporas de un germosporangio son productos de una sola meiosis en la mayoría de los casos y que pueden presentarse en algunos casos germosporas en un germosporangio que son el producto de dos o más meiosis y también se da la existencia de meiosis que no son regulares con casos de inviabilidad de uno o más de los productos meióticos.

La existencia de meiosis en *Phycomyces* como mecanismo que da lugar a la obtención de recombinantes ha sido cuestionada (Mehta y Cerdá-Olmedo, 2001), sobre la base de que en sus experimentos los marcadores genéticos en la descendencia de cigosporas individuales no están en las proporciones mendelianas. Mediante el análisis de cruces entre estirpes de *Phycomyces* usando un total de 29 marcadores, (Eslava AP, 1996; Orejas et al., 1987), se estableció un mapa genético en el que existen al menos 11 grupos de ligamiento. Este mapa se ha obtenido por los métodos de la genética clásica de análisis en masa de las germosporas, análisis de tétradas (en este caso tétradas desordenadas y amplificadas) y distancia de los marcadores a sus respectivos centrómeros. Recientemente se ha construido un nuevo mapa genético de *Phycomyces* usando marcadores moleculares (PCR-RFLPs) y el genoma secuenciado de este hongo. Esto ha permitido la realización de un mapa físico del genoma de *Phycomyces* y la clonación por posición que ha permitido la identificación de algunos genes (Chaudhary et al., 2013). Los resultados del mapa obtenido por este procedimiento y los obtenidos con el mapa clásico, incluido el número de grupos de ligamiento, son parecidos salvo algunas excepciones.

### 1.1.4 El genoma de *Phycomyces*.

El genoma de *Phycomyces blakesleeanus* ha sido secuenciado por el Joint Genome Institute (Departamento de Energía, USA). La secuencia del genoma, con los resultados de la anotación automática está disponible en internet (<http://genome.jgi-psf.org/Phybl2/Phybl2.home.html>) así como su respectivo ADN mitocondrial. El genoma de *P. blakesleeanus* contiene 55,9 Mb de una secuencia total estimada de 62 a 67 Mb. La diferencia se atribuye a secuencias muy repetidas, difíciles de secuenciar y ensamblar. El tamaño del genoma de *Phycomyces* es mucho mayor que el tamaño del genoma de las especies del subfilo Mucoromycotina, *Mucor circinelloides* (36,5 Mb), *Rhizopus delemar* (45,3 MB) y *Lichtheimia corymbifera* (33,6 Mb) (Ma et al., 2009; Schwartze et al., 2014). El mayor tamaño del genoma de *Phycomyces* se debe en parte a la presencia de ADN repetitivo.

Actualmente el número de genes que codifican proteínas en el genoma de *Phycomyces blakesleeanus* que han sido anotados son 16.528 y en *Mucor circinelloides* 11.719. La comparación de los genomas de *P. blakesleeanus*, *M. circinelloides*, *R. delemar* y otros hongos sugiere que un gran evento de duplicación (WGD) ocurrió muy pronto en el subfilo de las Mucoromycotina (Corrochano et al., En preparación).

El aspecto menos positivo en las investigaciones con *Phycomyces* es que no se ha podido transformar establemente con ADN exógeno a pesar de los muchos y variados intentos realizados por varios laboratorios en todo el mundo. Parece ser que la introducción de ADN exógeno da lugar a una reacción defensiva que destroza no sólo el ADN entrante sino también al propio ADN del organismo, con pérdida de viabilidad e inducción de mutaciones entre los supervivientes (Obraztsova et al., 2004). La ausencia de estirpes transformadas de manera estable impide el uso de numerosas técnicas modernas de biología molecular que ya se aplican con éxito en otros hongos filamentosos incluida la especie aún *Mucor circinelloides* (van Heeswijk y Roncero, 1984).

## **1.1.5 Fotorrespuestas en hongos.**

### **1.1.5.1 La luz como señal reguladora en los procesos biológicos.**

La luz es una fuente de energía importante, aunque no imprescindible, para la vida en la tierra. Aporta energía para la fotosíntesis, calor y permite la visión en microorganismos, plantas y animales (Gehring, 2014), además de jugar un papel fundamental como señal ambiental, regulando el desarrollo y la fisiología de los organismos.

La reacción de *Phycomyces* a la luz fue descrita por primera vez por Hoffmeister en 1867(Hoffmeister, 1867) y el estudio cuantitativo del fototropismo empezó hacia 1888 cuando el belga Jean Massart demostró que la reacción a la luz de *Phycomyces* obedece a la ley de Weber(Cerdá-Olmedo y Lipson, 1987).

Aunque *Phycomyces* fue probablemente el primer hongo en el cual el efecto de la luz ha sido analizado, el estudio del uso de la luz por las plantas data de mucho antes, incluso anterior a los estudios de los Darwin en 1881, los cuales realizaron experimentos pioneros de transducción de señales en el fototropismo. Ellos separaron el sitio fotorreceptor de la región que responde con el crecimiento en semillas germinadas de monocotiledóneas.

Actualmente ya han sido identificadas respuestas a la luz en todos los grupos de seres vivos. La luz es necesaria para la obtención de energía en todos los organismos fotosintéticos, y por ello han desarrollado una compleja maquinaria de percepción y transducción de la señal lumínica mediante proteínas fotorreceptoras que les permite ajustarse a las condiciones ambientales y evitar los efectos nocivos del exceso de luz solar (Eberhard et al., 2008). Estos organismos son capaces de percibir la calidad, la intensidad y la dirección de la luz. Las bacterias detectan y responden a la luz mediante el empleo de moléculas y mecanismos altamente evolucionados.

Existen sistemas moleculares para aprovechar la energía útil de la luz en las bacterias fototrópicas, para combatir los daños foto-oxidativos derivados de las especies altamente reactivas que se generan en la absorción de la energía de la luz, para utilizar el estímulo

luminoso para reparar el ADN, para las taxis, el desarrollo y la virulencia, la inducción de la síntesis de carotenoides y la sincronización circadiana (Rockwell et al., 2006).

Las plantas utilizan la luz para regular procesos como la germinación, la de-etiolación, el fototropismo, el movimiento de los cloroplastos, apertura de estomas, la floración y el ajuste del ritmo circadiano (Kami et al., 2010). En los animales la luz se utiliza para controlar el ritmo circadiano (Huang et al., 2011) y sobre todo para la visión, ya que les permite detectar, discriminar y reconocer objetos como fuentes de alimentos, pareja o marcas en su territorio (Gehring, 2014; Kelber y Lind, 2010).

La luz regula también el desarrollo y comportamiento de los hongos. El desarrollo de un hongo ocurre en varias etapas: germinación de las esporas, crecimiento y ramificación de las hifas y formación de las estructuras reproductoras para el desarrollo y dispersión de las esporas. Estos procesos están regulados por muchos factores ambientales, incluyendo la presencia o ausencia de luz (Idnurm y Heitman, 2010).

La mayoría de respuestas a la luz en hongos se deben a la luz azul, aunque también se conocen respuestas a otras longitudes de onda como la conidiación de *Aspergillus nidulans* regulada por la luz roja (Mooney y Yager, 1990), o la conidiación en *Alternari atomato*, regulada por la luz ultravioleta cercana (Kumagai, 1989).

Se ha prestado menos atención a la luz verde, aunque se ha observado que ésta afecta a la producción de esporas en los patógenos de plantas *Trichonympharia turcica* y *Alternaria solani* ya sea por sí sola o en interacción con la luz azul (Klein, 1992).

Además de intervenir en el desarrollo de los hongos, la luz azul actúa como señal ambiental activando rutas metabólicas como la síntesis de carotenos o dirigiendo el crecimiento de estructuras reproductivas.

La activación por la luz de la síntesis de carotenos en *Phycomyces blakesleeanus* y *Neurospora crassa* y el fototropismo en *Phycomyces* han servido como modelos de respuestas a la luz azul en otros hongos (Cerdá-Olmedo, 2001; Corrochano y Garre, 2010; Chen et al., 2010a; Linden et al., 1997).

### **1.1.5.2 Genes regulados por la luz en hongos.**

La luz regula la transcripción en muchos hongos (Tisch y Schmoll, 2010). Los avances en las técnicas genómicas están ayudando a la identificación y caracterización de los genes y proteínas regulados por la luz.

Se han realizado experimentos de hibridación de microrrays en *Neurospora crassa*, *Cryptococcus neoformans*, *Trichoderma atroviride*, y *Aspergillus nidulans* para detectar diferencias transcripcionales debidas a la luz.

El número de genes regulados por la luz varía entre el 0,25% de *C. neoformans* (Idnurm y Heitman, 2010), el 2,5% en *A. nidulans* (Rodriguez-Romero et al., 2010; Ruger-Herreros et al., 2011), el 2,8% en *T. atroviridae* (Rosales-Saavedra et al., 2006), y el 3-7% de *N. crassa* (Chen et al., 2009; Dong et al., 2008; Lewis et al., 2002; Smith et al., 2010).

Los resultados no son comparables al estar hechos en distintas condiciones, con distintos medios, condiciones de iluminación, etc., pero muestran una apreciable activación del transcriptoma de los hongos investigados.

### **1.1.5.3 Los receptores de la luz.**

Los fotorreceptores son cromoproteínas, proteínas unidas a compuestos de bajo peso molecular que absorben la luz como flavinas, tetrapirroles o retinal y que se denominan cromóforos. La luz recibida por el cromóforo da lugar generalmente a cambios conformacionales del fotorreceptor que inicia la transducción de la señal generando una respuesta en el organismo.

Existen distintos tipos de fotorreceptores que se unen a diferentes cromóforos. Los fotorreceptores son elementos claves en las rutas de transducción sensorial puesto que las propiedades básicas de una fotorrespuesta, como el color de la luz (energía) que puede percibirse, o la sensibilidad (umbral) de la fotorrespuesta depende del fotorreceptor que está involucrado en una fotorrespuesta particular. Se han descrito fotorreceptores en todo

los tipos de organismos (Briggs y Spudich, 2005), incluyendo los hongos (Idnurm y Heitman, 2010), Figura 8.

	White collar 1	White collar 2	Vivid	Cryptochrome	Opsin	Opsin-related protein	Phytochrome	
<i>Neurospora crassa</i>	1	1	1	1	1	1	2	ASCOMYCETES
<i>Fusarium oxysporum</i>	1	1	1	2	3	2	1	
<i>Aspergillus nidulans</i>	1	1				1	1	
<i>Magnaporthe oryzae</i>	1	1	1	2		1	1	
<i>Coccidioides immitis</i>						1		
<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	1	1				1		
<i>Histoplasma capsulatum</i>	1	1				1		
<i>Blastomyces dermatitidis</i>						1		
<i>Trichophyton rubrum</i>						2		
<i>Microsporium gypseum</i>						2		
<i>Trichoderma reesei</i>	1	1	1	1			1	
<i>Trichoderma atroviride</i>	1	1	1	1		1	1	
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	1	1	1	1	2		3	
<i>Stagonospora nodorum</i>	1	1		2	2		2	
<i>Botrytis cinerea</i>	1	1	1	1	2		2	
<i>Candida albicans</i>						2		
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>						3		
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>						1		
<i>Cryptococcus neoformans</i>	1	1			1		1	BASIDIOMYCETES
<i>Coprinopsis cinerea</i>	1	1					1	
<i>Ustilago maydis</i>	1	1		2	2	1	1	
<i>Puccinia graminis</i>	1	1		1		1	1	
<i>Sporobolomyces roseus</i>	2	2		1	2		1	
<i>Malassezia globosa</i>								
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	1	1				5	1	
<i>Phycomyces blakesleeanus</i>	3	4		1				ZYGOMYCETES
<i>Rhizopus oryzae</i>	3	5		1				
<i>Mucor circinelloides</i>	3	4		1				
<i>Encephalitozoon cuniculi</i>								
<i>Batrachochytrium dendrobatidis</i>								CHYTRIDS
<i>Spizelomyces punctatus</i>	2	2					1	

**Figura 8.** La distribución de las proteínas fotosensoriales y sus Números de copias en todo el reino de fungí Información Obtenida a base de la secuencia completa del genoma (Idnurm et al., 2010)



El primer gen de un fotorreceptor identificado en hongos fue *wc-1* en *Neurospora crassa*. Su descubrimiento tuvo su origen en el estudio de mutantes afectados en la fotoinducción de la carotenogénesis (Degli-Innocenti y Russo, 1984) fácilmente distinguible en los cultivos de este hongo en tubos de agar inclinado. Su nombre, White Collar (WC), se debe al peculiar fenotipo del mutante resultante de la diferente regulación de la carotenogénesis en el micelio y en las esporas.

Mientras que en el micelio la síntesis de carotenos es estrictamente dependiente de la luz, en los conidios se acumulan carotenos tanto en la luz como en la oscuridad. En los tubos de agar inclinado se forma una capa de micelio en la base que desarrolla una masa de hifas aéreas dedicadas en su gran mayoría a la formación de conidios. El mutante *wc* presenta la masa aérea pigmentada, mientras que en la base se aprecia un anillo o collar albino que le da el nombre al mutante.

Estos mutantes reguladores son fácilmente distinguibles de los mutantes blancos alterados en los genes estructurales de la ruta de los carotenoides (*al-1*, *al-2* y *al-3*), ya que los conidios de estos mutantes son blancos y por tanto toda la biomasa es albina.

Los mutantes *wc* no sólo están alterados en la fotocarotenogénesis sino que además pierden el resto de las fotorrespuestas conocidas de este hongo como son la regulación por la luz de la conidiación, el ritmo circadiano y la formación y comportamiento de los protoperitecios.

A pesar de ser mutantes ciegos, no presentan ninguna alteración en el crecimiento, morfología o en genes no regulados por la luz (Degli-Innocenti y Russo, 1984).

Las proteínas fotorreceptoras de hongos del tipo WC están relacionadas con las fototropinas de plantas. Las fototropinas son receptores de luz azul en plantas que son necesarios para regular el movimiento hacia la luz (fototropismo) de la planta, el movimiento de los cloroplastos y la apertura de los estomas (Jarillo et al., 2001; Kagawa et al., 2001; Kinoshita et al., 2001).

El dominio LOV se identificó primeramente en las fototropinas, las cuales tienen dos dominios LOV que se han identificado en proteínas reguladas por la Luz, el Oxígeno y el Voltaje y que actúan como dominios fotosensibles. Los dominios LOV forman parte de un

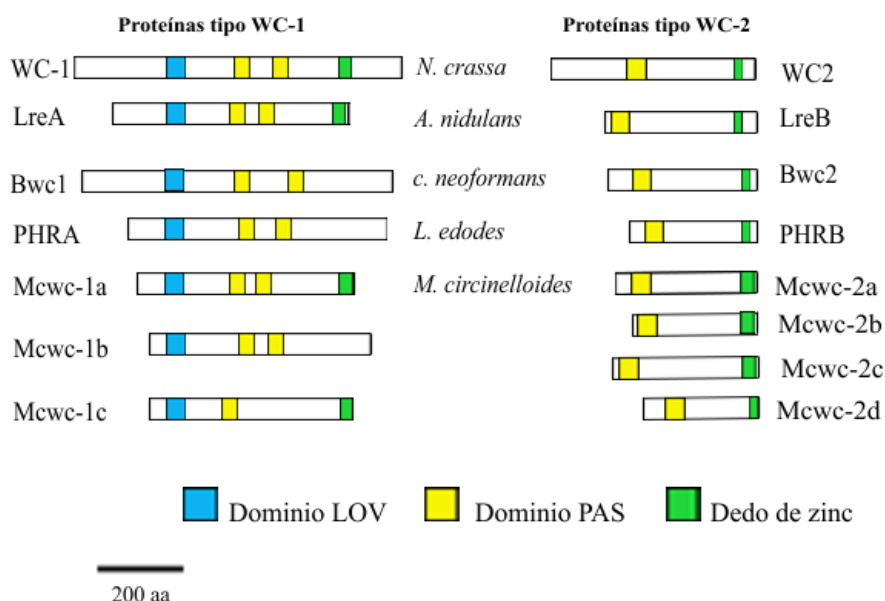
subconjunto de los dominios de unión entre proteínas llamados PAS (Per-Arnt-Sim) (Taylor y Zhulin, 1999).

También tienen las fototropinas un dominio tipo quinasa necesario para la actividad efectora de los fotorreceptores (Briggs, 2007; Briggs y Christie, 2002; Cashmore, 2003).

El aislamiento y caracterización de fotorreceptores en hongos se inició con la caracterización de los genes *wc-1* y *wc-2*, requeridos para todas las fotorrespuestas del hongo *Neurospora crassa* (Linden et al., 1997; Liu et al., 2003). La proteína WC-1 contiene un dedo de zinc, un dominio de unión al cromóforo (LOV) y un dominio PAS para las interacciones proteína-proteína (Ballario et al., 1996).

Al dominio LOV se une la flavina FAD posibilitando que WC-1 actúe como un fotorreceptor (Froehlich et al., 2002; He et al., 2002). La proteína WC-2 contiene un dedo de zinc y un dominio PAS (Linden y Macino, 1997), e interacciona con VC-1 formando un complejo. Después de la exposición a la luz, este complejo se une transitoriamente a los promotores de los genes inducibles por luz activando su transcripción (Belden et al., 2007; Froehlich et al., 2002; He y Liu, 2005).

Las proteínas WC se necesitan para las respuestas a la luz azul en los hongos basidiomicetos *Cryptococcus neoformans* (Idnurm y Heitman, 2005a; Lin y Todo, 2005) y *Coprinus cinereus* (Terashima et al., 2005). Tres genes *wc-1* se han descrito en los hongos cigomicetos *Rhizopus oryzae* y *Mucor circinelloides* (Idnurm et al., 2006; Silva et al., 2008; Silva et al., 2006), figura 9.



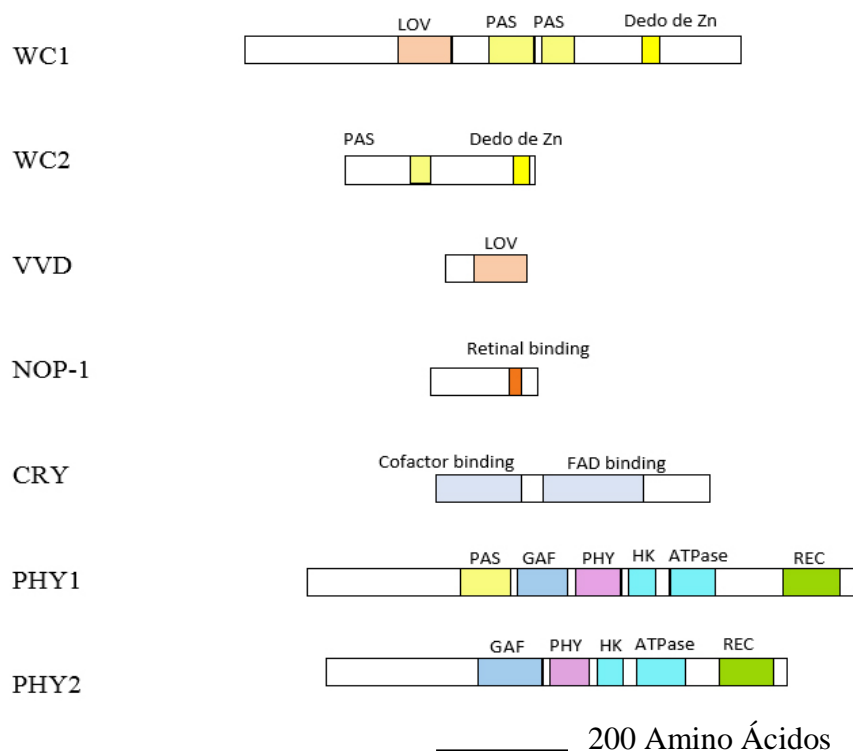
**FIGURA 9.** Proteínas White Collar de varios grupos de hongos.

La existencia de proteínas similares a WC-1 y WC-2 en hongos ascomicetos, basidiomicetos y cigomicetos hace pensar que el complejo WC surgió pronto en la evolución de los hongos como un factor de transcripción fotorreceptivo (Bahn et al., 2007; Corrochano, 2007; Herrera-Estrella y Horwitz, 2007; Idnurm y Heitman, 2010).

También algunas especies de ascomicetos contienen en su genoma un gen que codifica para una proteína con un dominio LOV relativamente pequeño. Este gen fue identificado por primera vez en *Neurospora* y de le denominó VIVID a la proteína que codifica (186 aminoácidos). Esta proteína se une físicamente con la flavina y actúa como una segunda proteína fotosensorial (Schwerdtfeger y Linden, 2003).

ENVOY es otra proteína pequeña (207 aminoácidos) con un dominio LOV y que fue identificada por primera vez en *Trichoderma reesei* (Schmoll et al., 2005). El funcionamiento de ENVOY en fotobiología no está muy bien aclarado.

VIVID interacciona físicamente en el núcleo con el complejo WC y regula la fotoadaptación en *Neurospora* (Chen et al., 2010b; Chen et al., 2010a; Hunt et al., 2010). En la figura 10 se representa un esquema simplificado de la regulación por la luz en *Neurospora*.



**FIGURA 10.** Resumen de las proteínas fotorreceptoras en *N. Crassa*. (Corrochano, 2007).

#### **1.1.5.4 Otros fotorreceptores de hongos.**

Existen otros tipos de fotorreceptores en hongos diferentes a los WC tales como las opsinas, fitocromos y criptocromos-fotoliasas. Mientras algunas especies de hongos poseen genes de todos los tipos de fotorreceptores en su genoma, otros fotorreceptores aparecen esporádicamente entre los hongos.

El acceso a los genomas secuenciados de varios hongos y la comparación de secuencias entre los genomas permiten conocer la distribución de las proteínas fotorreceptoras y su número de copias en muchas especies del reino de los hongos como aparece en la figura 7.

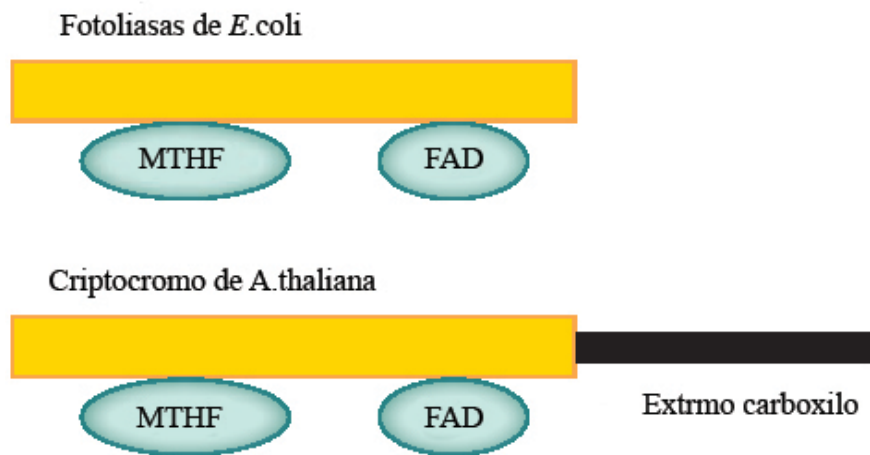
##### **1.1.5.4.1 Rodopsinas.**

Son proteínas integrales de membrana con siete hélices transmembranales compuestas de un cromóforo, el retinal, unido a una apoproteína denominada opsina. Las opsinas actúan como sensores de luz o como transportadores de iones H<sup>+</sup> o Cl<sup>-</sup> a través de la membrana activada por la luz (Spudich et al., 2000). Existen dos tipos de rodopsinas, probablemente con un origen evolutivo distinto: las del tipo I utilizan como cromóforo el retinal todo trans y las del tipo II, el retinal 11-cis (Terakita, 2005).

La aparición de genes para las opsinas en los genomas de hongos es esporádica y si nos basamos en estudios filogenéticos, tendrían su origen en eventos de transferencia horizontal (Sharma et al., 2006), como la adquisición de una opsina de haloarqueas por un ancestro de ascomicetos y basidiomicetos (Ruiz-Gonzalez y Marín, 2004).

##### **1.1.5.4.2 Criptocromos y fotoliasas.**

Los criptocromos y las fotoliasas forman una familia de fotorreceptores de luz azul y UV-A y se diferencian principalmente en que las fotoliasas tienen actividad reparadora de daños en el ADN (Sancar et al., 2004), y los criptocromos no, pero éstos tienen un papel en la recepción de la luz (Chaves et al., 2011) figura 10.



**FIGURA 11.** Dominios estructurales de fotoliasa y criptocromos (Chaves et al., 2011) se muestra La comparación de los dominios estructurales de la fotoliasa de *E.coli* y Cry1 de *Arabidopsis*.

La familia criptocromo-fotoliasa se divide en 6 subfamilias : fotoliasas de CPD (cyclo-butane pyrimidine dimer) de clase I, de CPD de clase II, criptocromo de plantas, criptocromo de animales, 6-4 CPD fotoliasas y proteínas CRY-DASH (por *Drosophila*, *Arabidopsis*, *Synechocystis*) (Bayram et al., 2008a), Recientemente se ha identificado otra subfamilia, fotoliasas de CPD de clase III, a partir de la cual evolucionaron los criptocromos de plantas (Müller y Carell, 2009).

Así como las fotoliasas reparan las lesiones producidas tanto en el ADN de 1c como en el de 2c y no son fotorreceptores, CRY-DASH, que está presente en bacterias, plantas, animales y hongos, es un fotorreceptor con una actividad reparadora de daños en el ADN de 1c residual.

El genoma de *Phycomyces* contiene un gen *cryA* que codifica para CRY-DASH y, a diferencia con los ascomicetos y basidiomicetos, no contiene ningún gen que codifique para otros criptocromos o fotoliasas a pesar de que en *Phycomyces* se da fotorreactivación (Galland, 1996) sugiriendo que en *Phycomyces*, *cryA* puede representar un estadio antiguo en la evolución de CRY-DASH. El papel de los criptocromos DASH de hongos en la percepción sensorial de la luz no está muy bien dilucidado. Los criptocromos del tipo CRY-DASH actúan como represores de la transcripción (Brudler et al., 2003) y se ha propuesto que CRY de *Neurospora* funciona como modulador de la actividad

transcripcional del complejo WC en algunos genes como *con-10*, *al-1* o *vvd* (Olmedo et al., 2010a; Olmedo et al., 2010b).

#### **1.1.5.4.3 Fitocromos.**

Los fitocromos son fotorreceptores que perciben la luz roja y la luz roja lejana. A estas proteínas se les une un cromóforo tetrapirrólico lineal (Rockwell et al., 2006). Los fitocromos se descubrieron por primera vez en plantas (Borthwick et al., 1952), y se encuentran presentes en plantas, hongos y bacterias (Karniol et al., 2005).

El genoma de *Neurospora crassa*, contiene dos genes para el fitocromo (Froehlich et al., 2005), aunque parece ser que su papel en la fotobiología de *Neurospora* es escaso. Sin embargo en el ascomiceto *Aspergillus nidulans* un fitocromo y las proteínas WC sirven como fotorreceptores para la regulación por luz azul y luz roja del desarrollo de este hongo (Blumenstein et al., 2005; Purschwitz et al., 2008).

Se han descrito genes para fitocromos en hongos ascomicetos y basidiomicetos (Idnurm y Heitman, 2010), pero no se han encontrado estos genes en los hongos cigomicetos. En *A. nidulans* el fitocromo posee una función sensorial. La proteína FphA regula la transición del ciclo asexual a sexual y la biosíntesis de metabolitos secundarios en respuesta a la luz. También posee una función represora en la formación de las cleistotecas (Rodríguez-Romero et al., 2010), y está implicada en la activación por la luz del gen *brlA* (Ruger-Herreros et al., 2011).

En *Aspergillus* tenemos por tanto un fitocromo y las proteínas WC que sirven de fotorreceptores para la regulación del desarrollo por luz azul y luz roja (Blumenstein et al., 2005; Purschwitz et al., 2008). Además, la regulación del desarrollo por la luz en *Aspergillus* requiere el gen *veA* que codifica un regulador negativo de la conidiación inducida por la luz (Calvo, 2008). El fitocromo, las proteínas WC y VeA se puede poner VEA) interaccionan en el núcleo, sugiriendo la formación de un complejo de fotorrecepción que regula la transcripción de los genes después de recibir la luz (Purschwitz et al., 2009; Purschwitz et al., 2008).

### 1.1.5.5 Otros posibles fotorreceptores.

Últimamente se han descubierto una serie de genes que codifican para proteínas que podrían actuar como fotorreceptores. Una adenilato ciclasa sensible a la luz azul se ha identificado en *Euglena gracilis* (Iseki et al., 2002). Tiene un dominio de unión a flavina AppA/BLUF (Blue Light Sensing Using Flavin) que se conocía ya en bacterias fotosintéticas anoxigénicas, donde las proteínas homólogas a AppA modulan la expresión de los genes de la fotosíntesis según las condiciones de luz (Han et al., 2004). Se ha descrito una proteína similar a AppA en *Ustilago maydis*, pero no en otros hongos, aunque su función es desconocida (Herrera-Estrella y Horwitz, 2007).

El mutante en el gen *dst2* de *Coprinus cinerea* está alterado en la producción asexual de esporas y en la regulación por la luz azul de la morfogénesis del cuerpo fructífero. (Kuratani et al., 2010). El gen *dst1* es un homólogo de *wc-1* (Terashima et al., 2005), pero *dst2* codifica para una proteína con dos trozos de un dominio de unión a flavina que son distintos de los dominios LOV o BLUF.

La presencia de este dominio de unión a flavina sugiere que podría ser el primero de un nuevo tipo de fotorreceptores. La secuenciación del genoma de numerosos hongos ha revelado un gran número de genes que podrían codificar para nuevos fotorreceptores.

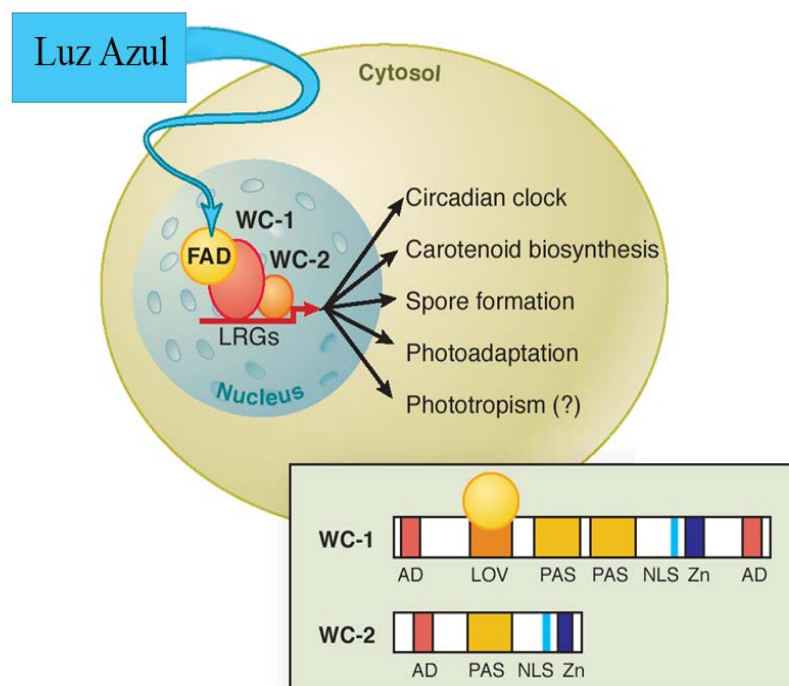
Algunos ascomicetos presentan proteínas con un dominio LOV y un dominio regulador de proteínas G señalizadoras que podrían estar implicadas en los efectos residuales que se ven en los mutantes *wc-1* al exponerlos a luz azul o en las rutas de señalización por luz y de proteínas G y AMPc. También se han encontrado respuestas a la luz en especies cuyos fotorreceptores han sido alterados por mutación, por lo que deben de existir fotorreceptores adicionales.

En *Trichoderma atroviridae*, mutaciones en *blr-1* o *blr-2* (homólogos de *wc-1* y *wc-2*) producen una reducción en el crecimiento radial pero solo bajo luz roja o azul, pero no blanca, sugiriendo la presencia de otros fotorreceptores (Casas-Flores et al., 2004). En *Fusarium fujikuroi*, la carotenogénesis permanece inducida por la luz en el mutante del gen *wcoA*, el homólogo de *wc-1* de *Neurospora* (Estrada y Avalos, 2008).

### 1.1.5.6 Fotorrecepción en *Neurospora*.

Es en el ascomiceto *Neurospora crassa* en donde se identificó por primera vez las proteínas fotorreceptoras WC-1 y WC-2 y es en este organismo en donde los mecanismos moleculares de la fotorrecepción en hongos se han investigado con más detalle. Existen otros hongos en los cuales los mecanismos de fotorrecepción se están investigando, especialmente *Aspergillus nidulans*, (Bayram et al., 2010; Rodríguez-Romero et al., 2010), aquí solo vamos a dar un resumen simplificado de la fotoactivación de la expresión de los genes en *Neurospora* y posteriormente pasaremos a considerar el caso de *Phycomyces blakesleeanus*, que es el organismo de estudio en esta tesis.

En *Neurospora* los productos regulados por la luz intervienen en varias respuestas fisiológicas como la biosíntesis de carotenoides, ritmo circadiano, formación de esporas, adaptación a la luz y fototropismo, figura 12.



**FIGURA 12** (Linden, 2002). Fotorrecepción en *Neurospora*.

Las proteínas fotorreceptoras WC-1 y WC-2 forman un complejo heterodimérico que se localiza en el núcleo de *Neurospora*. La luz azul es captada por un cromóforo tipo flavina (FAD) que está unido al dominio LOV de la proteína WC-1. Como hemos señalado



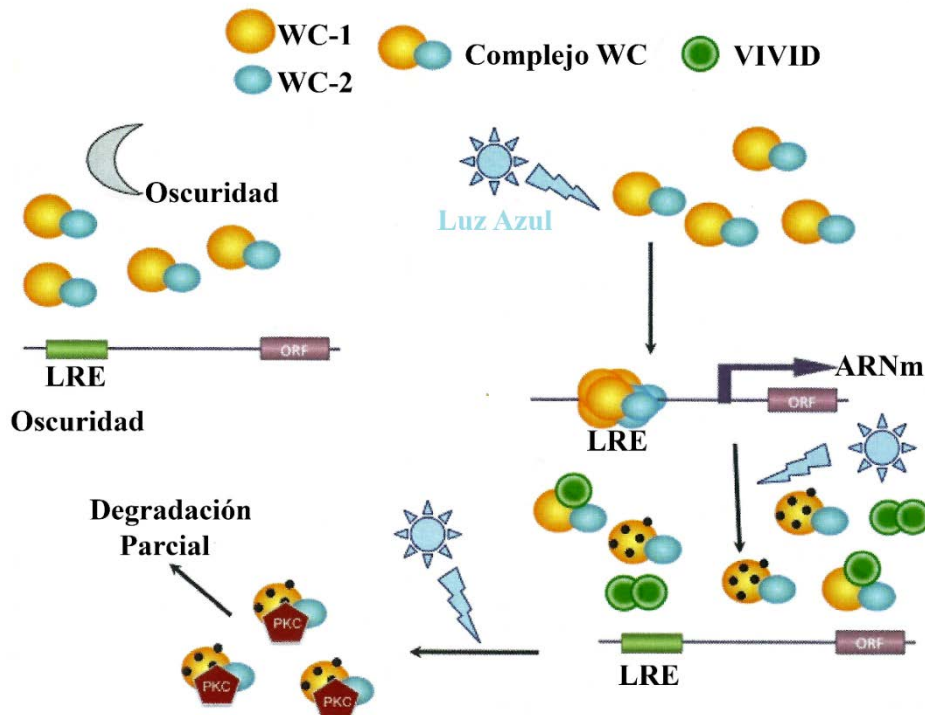
anteriormente el dominio LOV se identificó por primera vez en plantas y contiene una cisteína que se une a la flavina después de la fotorrecepción. La percepción de la luz conduce a un cambio conformacional que produce la agregación del complejo WC y la unión al promotor, remodelación de la cromatina y activación de la transcripción de los genes regulados por la luz (LRGs), incluido el gen *vvd*. La fotoactivación de los genes es transiente. Después de una exposición luminosa prolongada, WC-1 se fosforila y se desconecta el complejo WC del promotor con lo que termina la transcripción del gen. La proteína VVD se acumula en el núcleo e interacciona físicamente con el WCC (*White Collar Complex*) regulando la fotoadaptación al reprimir la actividad del WCC en luz constante. La cinética de la fotoadaptación está regulada fundamentalmente por la cantidad de proteína VVD en el sistema.

Varios genes diferentes del *vvd* parece ser que están implicados también en la regulación de la fotoadaptación en *Neurospora*, pero no se sabe su mecanismo de actuación (Chen et al., 2010a). El complejo WC que se ha quedado libre del promotor se defosforila y se degrada parcialmente debido probablemente a su interacción con una proteína quinasa (PKC). Después de un cierto tiempo en la oscuridad el complejo WC, probablemente debido a la aparición de nuevo de WC-1 y WC-2 está listo para volver a realizar la fotoactivación de los genes. Los procesos que conducen a la fotoactivación de los genes en *Neurospora* están resumidos en la siguiente figura 13.

### **1.1.5.7 Fotorreceptores en *Phycomyces*.**

Como hemos indicado en el apartado aproximación genética al estudio de las respuestas sensoriales con el aislamiento y estudio de los mutantes ciegos de *Phycomyces* (mutantes *mad*) se descubrieron 10 genes (*madA-madJ*) que afectan a los procesos de recepción de la luz y transmisión y elaboración de respuestas al estímulo luminoso.

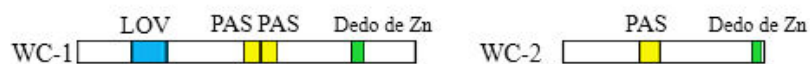
Basados en la observación de que homólogos de los genes *wc-1* y *wc-2* de *Neurospora* se requieren para la transducción de señales por la luz en otros hongos, incluidos ascomicetos y basidiomicetos, se exploraron la secuencia de genes homólogos a *wc-1* y *wc-2* en los diferentes mutantes *mad*.



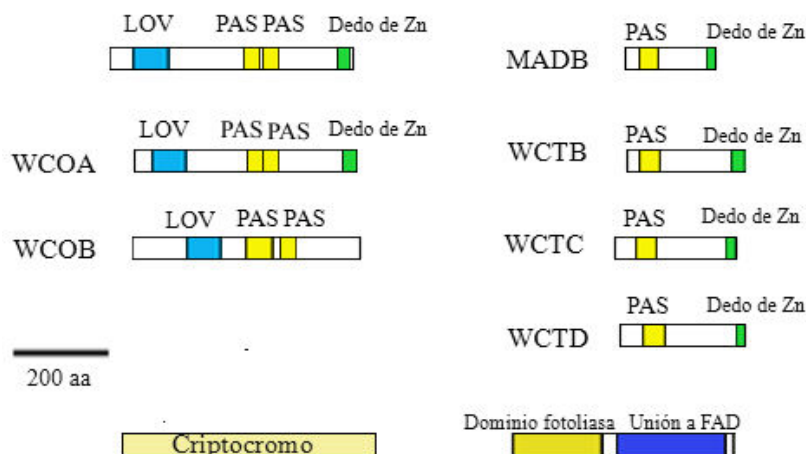
**FIGURA 13.** Esquema de la regulación por luz en *Neurospora crasa* modificado de (Corrochano, 2007; Malzahn et al., 2010; Schafmeier y Diernfellner, 2011). El complejo WC está formado por las proteínas WC-1 y WC-2 y aparece y formado en oscuridad. Al ocurrir la iluminación, el cromóforo de WC-1 se une covalentemente al dominio LOV, lo que provoca un cambio conformacional que lleva a la generación de la cromatina y la transcripción de dichos genes, la fotoactivación génica es transitoria y tras la iluminación, WC-1 es fosforilado lo que provoca que el complejo WC se separe del promotor y finalice la transcripción. La proteína VIVID es necesaria para la fotoactivación transitoria de los genes ya que se une a los complejos WC formando heterodímeros WCC-VVD. El complejo WC es defosforilado y parcialmente degradado a través de la interacción con la proteína *Quinasa C* (PKC). Después de un tiempo en oscuridad, el complejo WC está listo para un nuevo ciclo de fotoactivación gracias a la adición de proteína WC-1 y WC-2 sintetizada *de novo*.

Haciendo uso de las homologías entre los genomas de diversos hongos, de sus mapas genéticos, tanto clásicos como de mapas físicos de restricción, contigs y STS (*sequence-tagged-site*) se han identificado algunos de los genes *mad* de *Phycomyces*. Hay que tener en cuenta que *Phycomyces blakesleeanus* no se transforma establemente y por tanto no se puede utilizar por el momento esta técnica para poder aislar genes por complementación. Usando oligonucleótidos degenerados basados en secuencia conservada de los genes *wc-1* y *wc-2* de *Neurospora* se han identificado en el genoma de *Phycomyces* tres genes similares al *wc-1* y cuatro genes similares al *wc-2* que han sido caracterizados en detalle (Idnurm et al., 2006; Sanz et al., 2009), y que se representan en la figura 14.

## *Neurospora*



## *Phycomyces*



**FIGURA 14.** Fotoreceptores de *Phycomyces blakesleeanus*.

Las proteínas WC-1 de *Phycomyces* tienen dos dominios PAS, un dominio LOV y un dedo de zinc localizado en el extremo carboxilo de la proteína excepto en WCOB que parece tener un dedo de zinc funcional no canónico. Las proteínas con parecido a WC-2 contienen un dominio PAS y un dedo de zinc en su extremo carboxilo.

De todos los genes *mad* conocidos hasta el momento solo los mutantes *madA* y *madB* están alterados en todas las respuestas a la luz (Bergman et al., 1973; Cerdá-Olmedo, 2001), como se aprecia en la figura 4. Se pensó por tanto que podrían estar alterados en la fotorrecepción.

La secuenciación de los diferentes homólogos de *wc-1* y *wc-2* en los mutantes ciegos (*madA-madJ*) condujo a descubrir que los mutantes *madA* están alterados en uno de los genes tipo *wc-1* de *Phycomyces* y los mutantes *madB* están alterados en uno de los genes tipo *wc-2* de *Phycomyces*. Curiosamente ninguno de los otros genes *wc* tenían mutaciones en el resto de los mutantes *mad* (Idnurm et al., 2006; Sanz et al., 2009), con lo que el papel de las restantes proteínas WC en la fotobiología de *Phycomyces* es desconocido. Las proteínas *madA* y *madB* interaccionan físicamente formando un

complejo (el complejo MAD) tanto en los ensayos de doble híbrido en levaduras como cuando se expresan los dos genes en *E. coli*.

Ninguna otra proteína del tipo WC de *Phycomyces* interacción ni con *madA* ni con *madB* ni entre ellas, en las condiciones estudiadas, lo que sugiere que el complejo MAD es el principal complejo fotorreceptor de *Phycomyces* (Sanz et al., 2009). Es posible que las otras proteínas del tipo WC-1 (WCOA y WCOB), se utilicen como fotorreceptores secundarios optimizados para distintas intensidades de luz y/o para distintos estadios del desarrollo ya que en *Phycomyces* se han descrito dos fotosistemas optimizados para la recepción de la luz de baja y alta intensidad (Bejarano et al., 1991; Corrochano y Cerdá-Olmedo, 1988; Galland y Lipson, 1987). Análogamente el fenómeno de la fotoadaptación parece ser diferente en *Neurospora* y en *Phycomyces*.

Es importante resaltar que el papel de *madA* y *madB* como fotorreceptores y factores de transcripción está basado en similitudes con las secuencias de los homólogos *wc-1* y *wc-2* de *Neurospora*. Así, mientras que *madA* y *madB* pueden considerarse putativos fotorreceptores y factores de transcripción que regulan las fotorrespuestas de larga duración, el papel que desempeñan en las fotorrespuestas cortas, como el fototropismo, está todavía sin resolver.

En resumen puede concluirse que el sistema de fotorrecepción de *Phycomyces* es más complejo que el descrito en *Neurospora* y probablemente sea de los más complejos que existen en hongos.

La comparación de las funciones de *madA* y *madB* con la situación en *Mucor circinelloides* (hongo cercano en la escala evolutiva) nos da un ejemplo de duplicación de genes y posterior divergencia. *M. circinelloides* también tiene tres genes homólogos del *wc-1* (Silva et al., 2006), y cuatro genes homólogos de *wc-2* (figura 14).

En *Phycomyces*, *madA* controla tanto el fototropismo como la síntesis de carotenoides, sin embargo cuando se mutan cada uno de los homólogos *wc-1* de *Mucor* y se analizan sus fenotipos se observa que el gen *mcwc-1a* se requiere para el fototropismo, el *mcwc-1c* se requiere para la fotocarotenogénesis y el *mcwc-1b* actúa como un activador de la carotenogénesis sugiriendo todo ello que en *Mucor* se da una especialización en la unión a los promotores después de la duplicación génica (Corrochano y Garre, 2010). El genoma

de otros cigomicetos como *Rhizopus oryzae* o *Pilobolus crystallinus* (Kubo, 2009) también contienen tres genes del tipo *wc-1* y 4-5 genes del tipo *wc-2*.

Se puede especular que puesto que WC-1 y WC-2 forman un complejo en *Neurospora*, se espera que la multiplicidad de *wc-1* y *wc-2* en hongos cigomicetos pueda conducir a diferentes combinaciones de proteínas de manera que los complejos WC resultantes puedan especializarse (como en el caso de *Mucor*) para servir como fotorreceptores primarios o secundarios para las diferentes fotorrespuestas o para operar a diferentes rangos de intensidades luminosas (Corrochano, 2007).

El genoma de *Phycomyces* contiene un gen del criptocromo, *cryA*, que es un fotorreceptor de luz azul detectado por primera vez en plantas (Lin y Todo, 2005; Müller y Carell, 2009). Los criptocromos son muy parecidos a las fotoliasas, que son enzimas que se requieren para la reparación de los daños del ADN producidos por luz UV.

Sin embargo los criptocromos no tienen actividad fotoliasa y se unen covalentemente con el cromóforo FAD y otros cromóforos secundarios (pterinas o deazaflavinas).

Además los criptocromos tienen un extremo carboxilo de longitud variable que no lo tienen las fotoliasas (figura 11). En *Phycomyces* el criptocromo es una proteína de 587 aminoácidos que es muy parecida a la subfamilia de criptocromos-fotoliasas del tipo *CRY-DASH* (1.1.5.4.2). No se ha identificado ningún gen de fotoliasa en *Phycomyces* por lo que es posible que sea este criptocromo quien tenga también actividad fotoliasa puesto que *Phycomyces* es fotoactivable (Galland, 1996). A pesar de existir en muchos genomas de hongos genes para los fotorreceptores del tipo de opsina y fitocromo, en el genoma de *Phycomyces* no se han encontrado estos genes. Parece ser que la compleja fotobiología de *Phycomyces* reside fundamentalmente en unas cuantas proteínas del tipo WC con una posible colaboración del criptocromo.

## 1.2. Proteoma.

Las proteínas son moléculas orgánicas compuestas por aminoácidos unidos entre sí mediante enlaces peptídicos que adquieren una estructura tridimensional secundaria, terciaria y/o cuaternaria característica. Las proteínas fueron descritas por primera vez en el siglo XIX por Jöns Jakob Berzelius quien las denominó πρωτειοξ, que en griego significa “somos número uno” o πρωτειον que quiere decir “preeminente” o “primer premio”, deriva de la palabra griega πρώτα que significa “lo primero”, aunque también puede haberse las bautizado en honor al dios de la mitología griega Proteo por la cantidad de formas que éste y éstas pueden adquirir. Estas moléculas tienen un papel crucial en todos los organismos vivos, pudiendo actuar como enzimas catalizadoras de muchas reacciones químicas esenciales del metabolismo celular, o constituyendo el esqueleto o sistema de sostén de la célula, así como de diferentes estructuras subcelulares.

También hay que resaltar el papel que juegan en el mantenimiento de la estructura del ADN (Ácido y durante la transcripción y replicación del mismo. Además, las proteínas participan en la motilidad celular, en la señalización celular, actúan como fotorreceptores en el fototropismo, en la mitosis, meiosis, etcétera. La importancia de las proteínas se ve resaltada por su participación en la mayoría de procesos y funciones celulares. El término proteoma, entendido como el conjunto de todas las proteínas expresadas por un genoma dado, no fue acuñado hasta finales de 1994 (Anderson y Anderson, 1998). El proteoma a diferencia del genoma, no es una característica fija ya que se modifica en función del desarrollo, el tipo de tejido, las condiciones ambientales a las que está sometiendo el organismo, etc.

Aunque las proteínas han sido estudiadas desde su descubrimiento, su análisis se vuelve particularmente intenso al serles reconocido su importante papel en todos los organismos vivos. El término “*proteome*”, que surge de la abreviación de la expresión inglesa “*PROTEin complement of the genOME*”, sólo hace referencia al conjunto de proteínas expresadas por la célula (Dhingra et al., 2005), pero, según una concepción más precisa en la que se enfatiza su naturaleza dinámica, el proteoma debe entenderse como el conjunto de proteínas expresadas en un tiempo y espacio dado, debido a que la composición del mismo varía de tejido a tejido e incluso de célula a célula. Así, la composición de un proteoma es dependiente de una gran variedad de factores internos y

externos tales como el medio ambiente, edad, sexo, enfermedad, etcétera. La proteómica podría describirse como el análisis de proteínas a gran escala (Boersema et al., 2015) o, de una manera más exhaustiva, la proteómica no sólo incluye la identificación y cuantificación de proteínas, sino también la determinación de sus localizaciones, modificaciones, interacciones, actividades y funciones (Jensen, 2006; Nørregaard Jensen, 2004).

El rápido desarrollo de la proteómica se ha hecho posible gracias al progreso en la instrumentación analítica, especialmente en espectrometría de masas (EM), con la introducción de cada vez más potentes espectrómetros de masas unidos a las mejoras en las técnicas de ionización suave. No menos importantes son los avances tecnológicos y metodológicos en la separación de proteínas y péptidos así como en la reducción de la complejidad de las muestras, mayoritariamente por técnicas de cromatografía líquida y electroforesis.

La bioinformática es la otra gran herramienta responsable del avance de la proteómica, gracias a su cada vez mayor capacidad para coleccionar, almacenar, procesar y visualizar la gran cantidad de datos que se generan en los estudios proteómicos. Aunque la genómica ha estado dominando el área de la investigación biomédica durante las décadas pasadas, la proteómica ha ido ganando terreno en este ámbito.

La razón fundamental para ello es el hecho de que el patrón proteico de una muestra biológica es mucho más informativo sobre el estado fisiológico de un organismo que su genoma, lo que subraya el prometedor papel de la proteómica en el campo de la biomedicina del futuro. Se puede describir tres tipos de proteómica que tratan de caracterizar el proteoma estudiando distintos aspectos del mismo:

**La proteómica de expresión** es el estudio cuantitativo de la expresión de proteínas entre muestras que difieren en alguna variable. En esta estrategia se compara la expresión del proteoma total o de subproteomas entre diferentes muestras. La información obtenida puede permitir la identificación de nuevas proteínas implicadas en transducción de señales.

**La proteómica del mapa celular** o estructural es el estudio de la localización subcelular de las proteínas y de las interacciones proteína-proteína, mediante la purificación de orgánulos o complejos y la posterior identificación de sus componentes mediante espectrometría de masas.

Para caracterizar un proteoma de una célula o un organismo es importante tener en cuenta que el proteoma es dinámico y que es reflejo del medio ambiente en el que es estudiado. Como respuesta a estímulos externos e internos, las proteínas pueden ser modificadas post-traduccionalmente, translocadas, sintetizadas o degradadas.

**La proteómica funcional** estudia la función de las proteínas y las interacciones que se producen entre las proteínas y otras moléculas con el fin de determinar su función.

### **1.2.1. Tecnologías de la proteómica.**

Las metodologías de análisis de las proteínas despiertan gran interés tanto para la investigación básica como para la biomédica. Durante los últimos años, las tecnologías de la proteómica han dado lugar a grandes avances en la investigación básica y clínica. El impacto de estas tecnologías nos permite una comprensión más completa de los procesos celulares. Sin embargo, a pesar de los grandes avances tecnológicos, seguimos encontrando grandes problemas.

Por ejemplo, una mayor sensibilidad en la detección de proteínas a partir de mezclas complejas y de fácil acceso para ensayos rápidos y rentables, útiles para validar los marcadores prometedores. Las tecnologías que se aplican en la proteómica van encaminadas a separar, identificar y caracterizar un gran conjunto de proteínas con el objetivo de conocer la abundancia de las mismas, su localización, modificación e interacciones entre diferentes proteínas. A continuación describiremos más detalladamente los métodos utilizados para el fraccionamiento de proteínas.

Conocer la localización de las proteínas en la célula es un dato muy significativo que nos puede ayudar a explicar su funcionalidad. Por lo tanto, el análisis de las proteínas expresadas en los compartimentos subcelulares provee información referente a la funcionalidad de las proteínas, disminuyendo de esta manera la complejidad de la muestra.



Actualmente en la literatura encontramos numerosos métodos para el aislamiento y purificación de distintas estructuras subcelulares, donde podemos encontrar una amplia gama de métodos que incluyen desde la clásica centrifugación en gradiente de densidad hasta la purificación por afinidad mediante anticuerpos específicos (Andersen et al., 2003; Josic et al., 2008; Pasquali et al., 1999).

Para el fraccionamiento de proteínas transmembrana de diferentes orgánulos también se describen otros métodos comúnmente utilizados como las técnicas electroforéticas, entre ellas la electroforesis de flujo libre, la electroforesis en gradiente de densidad de alta resolución o la inmunoelectroforesis. Las identificaciones proteicas en estos estudios varían numéricamente desde diez hasta miles de proteínas identificadas, dependiendo del orgánulo u estructura subcelular de estudio y los métodos que se han utilizados para el análisis (Foster et al., 2006).

### **1.2.2. Electroforesis bidimensional.**

La electroforesis bidimensional (2-DE) es una técnica que fue desarrollada en los años 70 por Kenrick & Margolis y por O' Farrell. Esta técnica de gran poder de resolución se caracteriza por la separación de mezclas complejas de proteínas. En primer lugar se realiza un isoelectroenfoque (IEF) (Pier Giorgio Righetti, 1998) donde las proteínas se separan en un gradiente continuo de pH en función de su punto isoeléctrico (pI). A continuación se lleva a cabo una electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS (SDS-PAGE), donde las proteínas se separan en función de su masa molecular.

La dirección del movimiento de las proteínas en esta segunda etapa electroforética es perpendicular a la primera, de manera que se obtiene un mapa de “manchas proteicas” que se distribuye en dos dimensiones. Su uso se generalizó a partir de los años 80, tras la invención de un método para generar gradientes de pH inmovilizados (IPG) (Bjellqvist et al., 1982). Los IPG mejoraron la reproducibilidad entre geles y permitieron la creación de bases de datos de geles bidimensionales, disponibles hoy día en Internet (<http://world-2dpage.expasy.org/swiss-2dpage/>).

En los últimos tiempos, el desarrollo de la electroforesis bidimensional diferencial (2D-DIGE) (Marouga et al., 2005) ha mejorado mucho la capacidad de la 2-DE para realizar análisis comparativos. Se trata de una técnica basada en el marcaje fluorescente de las proteínas previo a su separación, lo que le otorga una gran precisión en la cuantificación, que además permite la separación de varias muestras proteicas en un mismo gel, incrementando la reproducibilidad y la fiabilidad del análisis de expresión diferencial entre muestras gracias al uso de un estándar interno en cada gel. La 2-DE presenta varias ventajas que explican su notoriedad en los estudios proteómicos. Además se destaca el hecho de que permite realizar una visualización directa de los mapas proteicos del proteoma estudiado. Permitiendo una fácil identificación de isoformas proteicas y sus modificaciones postraduccionales, así como la comparación con otros mapas proteicos existentes en las bases de datos.

Una vez que la segunda dimensión ha finalizado, las proteínas deben ser visualizadas, para ello existen varios métodos de tinción con diferentes características (sensibilidad, linealidad, homogeneidad y reproducibilidad). Entre los métodos de tinción visibles tenemos (tinción con nitrato de plata, “*colloidal blue*”, “*coomassie*”, tinción negativa con zinc-imidazol), el método más sensible es la tinción de plata, pero el rango lineal es más amplio en las técnicas fluorescentes, y entre estas últimas tenemos (Sypro Ruby) para proteínas totales, “*PQ-Diamond*” para las fosforiladas y “*Emerald*” para las glicosiladas.

La aplicación de estos métodos es posterior al desarrollo de la 2-DE. También podemos utilizar métodos de detección inmunoquímica, considerando que la separación proteica se lleva a cabo en un gel de electroforesis y luego sean estas transferidas a un soporte o membrana, para luego ser identificadas mediante técnicas de inmunodetección o “*blotting*”.

### **1.2.3 Espectrometría de masas (EM).**

La espectrometría de masas (EM) es una técnica que ioniza una muestra y mide la relación masa/carga de los iones resultantes. La versatilidad de esta función ha permitido que llegue a ser una herramienta vital en un amplio rango de disciplinas, incluida la

investigación biológica. El primer espectrómetro de masas se construyó por J.J Thompson en 1912 (Bergmüller et al., 2008).

En principio estos aparatos se utilizaban por los físicos para estudiar el peso atómico de los elementos y la abundancia relativa natural de los isotopos elementales y no eran capaces de analizar biomoléculas. El análisis de compuestos grandes (tales como péptidos y proteínas) ha sido posible mediante el desarrollo de bombardeo atómico rápido (FAB).

El análisis de masa por Tiempo de vuelo (TOF) fue desarrollado y comercializado en 1958, pero la resolución baja en determinar la masa fue un problema hasta que se realizaron mejoras a principio de los 70. El gran avance de la identificación y caracterización de péptidos y proteínas llegó cuando se introdujeron dos técnicas de ionización suave:

Desorción mediante laser asistida por matriz (MALDI) en 1988 por Karas y Hillenkamp (Hillenkamp y Karas, 1990; Karas y Hillenkamp, 1988); e ionización por *electrospray* (ESI) en 1989 por Fenn et al (Fenn et al., 1989).

El uso de la EM en biología empezó en 1940, cuando se aplicaron isótopos pesados estables para estudiar la producción de CO<sub>2</sub> en animales. Desde entonces, los avances en la tecnología han incrementado el rango de muestras que pueden ser ionizadas así como el rango de masas que pueden ser analizadas. Las aplicaciones biológicas de la EM son diversas, como la comparación de los niveles de expresión de una proteína entre células cultivadas en distintas condiciones, etc. Un ejemplo de la creciente importancia de la EM es el aumento de número de entradas en PubMed (un archivo de citas de revistas de las ciencias de la vida, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=mass+spectrometry>).

Una búsqueda reciente en el PubMed para la frase “*Mass spectrometry*” se encontró 253133 citas, mientras en el 2002 solo era de 6500 citas. La importancia de la EM se hizo evidente en el 2002 al conceder el premio Nobel en química a John Fenn y Koichi Tanaka “por su desarrollo de métodos suaves de ionización para el análisis de macromoléculas biológicas mediante EM. Los espectrómetros de masas se componen de tres elementos básicos que en función en un análisis por EM serían: la fuente de ionización,

el analizador de masas y el detector, el aparato debe de tener una bomba de vacío para controlar la presión dentro del espectrómetro de masas.

La identificación de proteínas como un marcador biológico durante el análisis de EM se basa en parte a la exactitud de las masas, la resolución y la velocidad del análisis utilizado en el experimento. El centro de un espectrómetro de masas es el analizador de masas. Estos logran la separación de iones aprovechando las diferencias de comportamiento entre los dos iones de diferentes masas de carga ( $m/z$ ) dentro de un campo eléctrico y/o magnético. Esto se puede lograr de diferentes maneras y las diferentes estrategias han sacado a la luz una variedad de espectrómetros de masas comerciales con diferentes modos de funcionamiento. Estos incluyen: el cuadrupolo, la trampa de iones (2D y 3D), el tiempo de vuelo (TOF), e instrumentos de alto rendimiento como el Orbitrap.

En el presente trabajo se utilizó un espectrómetro de masas MALDITOF-TOF. Para analizar una muestra o analito en el espectrómetro de masas MALDI TOF-TOF, la muestra se co-cristaliza con una matriz orgánica como el ácido sinapínico o el ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinámico. La co-cristalización se consigue mezclando la muestra con la matriz; depositando dicha mezcla en una placa de metal y dejándola secar.

Los cristales resultantes son irradiados con pulsos de rayos láser de una longitud de onda en la cual la matriz tiene máxima absorción. Este proceso produce la desorción de la mezcla y fotoactiva la matriz. La matriz excitada ioniza el analito vía transferencia de protón. El resultado de todo este proceso genera iones del analito en fase gaseosa, teniendo la mayoría de los iones una sola carga positiva.

El analizador de tiempo de vuelo (TOF) es uno de los analizadores más sencillos y más comunes en los laboratorios de proteómica. El principio de los espectrómetros de tiempo de vuelo se basa en la relación entre la masa y la velocidad de los iones.

Se mide el tiempo que requieren los iones acelerados para recorrer una distancia ( $L$ ), que depende de las características del instrumento, sin que se aplique ningún campo magnético. Se han incorporado algunos elementos en el instrumento como unos espejos electrostáticos denominados *reflectrones* para aumentar la resolución y mejorar la separación de los haces de iones.

Una vez la muestra ha sido ionizada, un haz de iones es enfocado y dirigido hacia el analizador de masa, que separa los iones por su relación  $m/z$ . las medidas de  $m/z$  en un analizador del tipo TOF se basan en la siguiente ecuación:

$$KE = 0.5mv^2$$

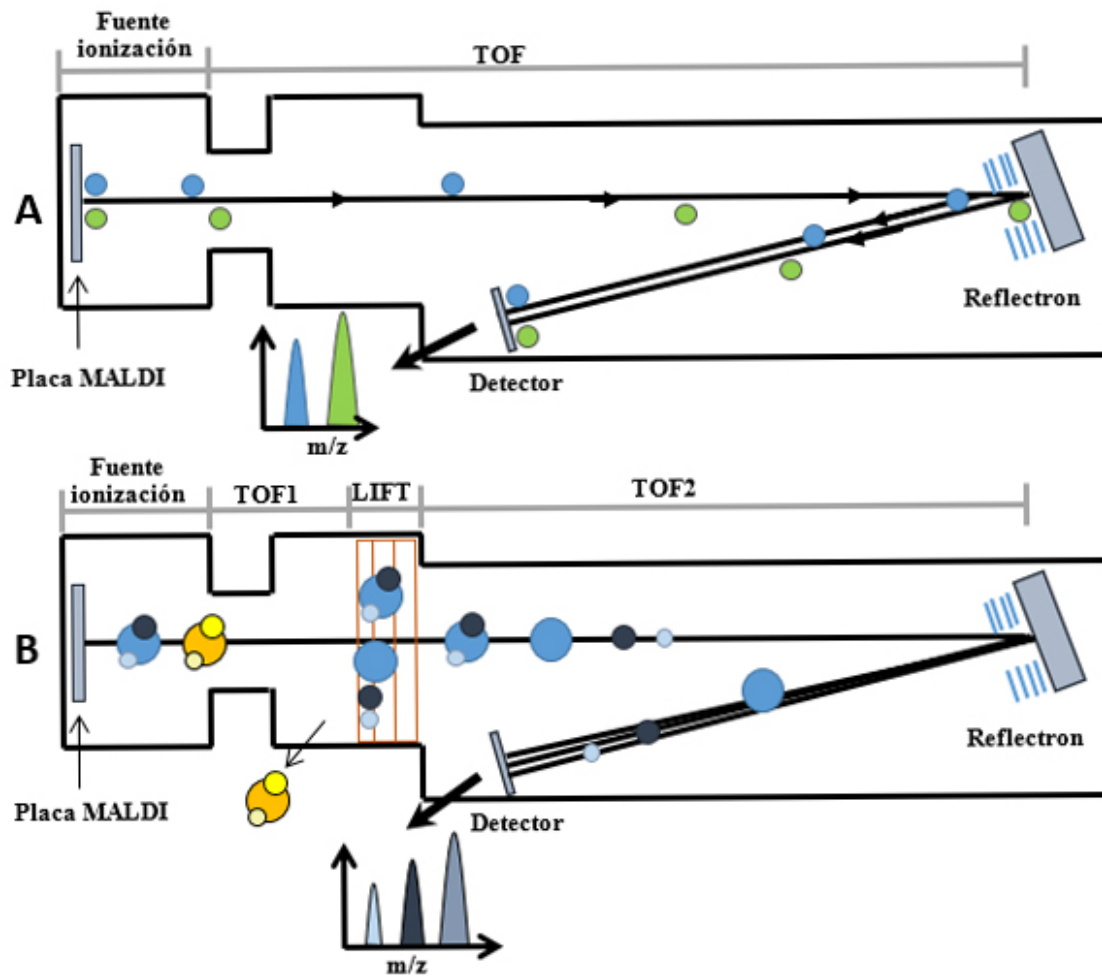
Donde  $KE$  es la energía cinética del ión,  $m$  es la masa del ión y  $v$  es la velocidad del ión. Los iones son inicialmente acelerados mediante un campo eléctrico con un potencial  $V$ , el cual resulta en una energía cinética final de  $zV$ , donde  $z$  es la carga del ión. Los iones entran en el tubo de vuelo de longitud  $L$ , en el final del cual hay un detector de iones.

Debido a que el tubo de vuelo carece de cualquier tipo de campo magnético o eléctrico, toda la energía cinética ( $KE$ ) de los iones es resultado de su aceleración inicial, así, a partir de la ecuación anterior se deriva que:

$$zV = 0.5mv^2 \quad m/z = (2Vt^2)/L^2$$

Donde  $t$  es el tiempo que tarda el ión en llegar al detector de iones. Ya que  $V$  y  $L$  son conocidos, la relación  $m/z$  de un ión puede ser determinada por la cantidad de tiempo que transcurre entre los pulsos de láser hasta que el ión llega al detector de iones. Por este motivo, las moléculas de mayor tamaño tienen un tiempo superior de llegada al detector en comparación con las de menor tamaño, figura 15 apartado A.

En nuestro caso, el espectrómetro de masas utilizado posee además un sistema de espectrometría de masas en tándem (MS/MS) llamado TOF/TOF y que se consigue combinando dos sistemas TOF. Este sistema se emplea mucho en los estudios proteómicos y nos va a permitir que determinados *iones precursores* seleccionados en el primer espectrómetro de masas (TOF1) se fragmenten en una serie de iones más pequeños denominados *iones producto* cuyo perfil se determina en el segundo espectrómetro de masas (TOF2) figura 14, apartado B.



**FIGURA 15.** Esquema representativo de un espectrómetro de masas MALDI TOF-TOF. En el apartado A se muestra el funcionamiento del espectrómetro en modo masas simple para la obtención de la huella peptídica de una proteína (en el espectro resultante cada pico representa un péptido diferente). En el apartado B se muestra el funcionamiento en modo tándem, con los iones precursores ionizados en el TOF1 y tras la fragmentación del seleccionado, el vuelo y detección de los iones producto en el TOF2 (en el espectro resultante el pico mayoritario corresponde al ion precursor mientras que el resto son de los iones producto de menor tamaño).

## **2.OBJETIVOS**

## 2. OBJETIVOS.

- Caracterización molecular del gen *cryA* en distintas estirpes tipo silvestre y mutantes *mad* de *Phycomyces blakesleeanus*.
- Análisis del Proteoma del tipo silvestre de *Phycomyces blakesleeanus*.
- Análisis de las diferencias en el perfil de expresión proteica entre las condiciones de luz y oscuridad del micelio del tipo silvestre de *Phycomyces*, tanto en medio líquido como en medio sólido.
- Análisis de las diferencias en el perfil de expresión proteica entre las condiciones de luz y oscuridad de los esporangióforos del tipo silvestre de *Phycomyces* crecidos en medio sólido.
- Análisis de las diferencias en el perfil de expresión proteica entre las condiciones de luz y oscuridad de los mutantes *madA*, *madB* y *madC* de *Phycomyces*. Comparación de estos resultados entre sí y con los obtenidos en el tipo silvestre.
- Análisis de las posibles diferencias en el perfil de expresión proteica entre las fases de crecimiento en micelio y en esporangióforo de la estirpe tipo silvestre crecida en medio sólido, tanto en la condición de iluminación como en la de oscuridad, comparación entre ambos resultados.



### **3. MATERIALES Y MÉTODOS.**

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS.

#### 3.1 Organismos utilizados.

En este trabajo ha sido utilizado el hongo *P.blakesleeanus*. Las estirpes utilizadas en este trabajo figuran en la tabla 1. Se ha utilizado la cepa silvestre NRRL1555 genotipo (-) del hongo *Phycomyces blakesleeanus*. Las cepas mutantes se han obtenido a partir del tipo silvestre tratado con los mutagenesis químicos como N-metil-N-nitro-N-nitrosoguanidina (NTG), Metanosulfonato de etilo (EMS) y ICR-170.

**Tabla1. Estirpes utilizadas en el presente trabajo.**

Estirpe	Genotipo	Origen/mutágeno	Fenotipo
NRRL1555	(-)	Tipo silvestre	Tipo silvestre
Rob	(+)		Tipo silvestre
UBC21	(+)		Tipo silvestre
UBC24	(-)		Tipo silvestre
A56	(+)		Tipo silvestre
C111	<i>madB103(-)</i>	NRRL1515(-),NG	Ciega
C21	<i>madA7(-)</i>	NRRL1515(-),NG	Ciega
A491	<i>madC(-)</i>	NRRL1515(-),EMS	Ciega
A201	<i>madC469 (+)</i>	A56 X B24	Ciega
A241	<i>madC467 (+)</i>	A56 X B22	Ciega
A238	<i>madC464 (+)</i>	A56 X B18	Ciega
A844	<i>madI712 (+)</i>	L149 x C264	Ciega
A845	<i>madI712 (+)</i>	L149 x C264	Ciega
A846	<i>madI712 (-)</i>	L149 x C264	Ciega
A847	<i>madI714 (+)</i>	L151 x C264	Ciega
A903	<i>nicB401, lysA401, madI712 (+)</i>	A637 x A845	Ciega, lys-, nic-
A905	<i>madC406 (-)</i>	Del, ICR	-
A906	<i>nicA101, madI712 (+)</i>	A845 x C270	-
A907	<i>nicA101, carA5, madI712 (-)</i>	A845 x C270	-
A914	<i>madI712, lysA401 (-)</i>	A637 x A845	-
A915	<i>madI712, lysA401 (-)</i>	A637 x A845	-
C39	<i>madC21 (+)</i>	NRRL1554,NG	Clase 1.2
C70	<i>madC61(+)</i>	NRRL1554,NG	Clase 1.2
C64	<i>madC55(+)</i>	NRRL1554,NG	Clase 1.2
C54	<i>madC42(+)</i>	NRRL1554,NG	Clase 1.2
C66	<i>madC57(+)</i>	NRRL1554,NG	Clase 1.2
C92	<i>madC83(+)</i>	NRRL1554,NG	Clase 1.2
C91	<i>madc83(+)</i>	NRRL1554,NG	Clase 1.2
C148	<i>madC119,carA5</i>	C2, NG	Albino, Clase 1.2
L149	<i>madI712 (-)</i>	Del, ICR	
L151	<i>madI714 (-)</i>	Del, NG	
L153	<i>madI716 (-)</i>	Del, NG	
L149	<i>madI712 (-)</i>	Del, ICR-170	
L151	<i>madI714 (-)</i>	Del, NG	

## 3.2 Medios y condiciones de cultivo.

Para el crecimiento de *P. blakesleeanus* se utilizaron los siguientes medios de cultivo (Sutter, 1975; Eslava et al., 1975b):

### **SIV** (medio mínimo):

D-glucosa 2%, asparagina 0.2% y 2% de una solución concentrada (X50) de sales minerales que contiene  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  25%,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.25%,  $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  2.5.  $10^{-5}\%$ , 10 ml de una solución de  $\text{CaCl}_2$  al 14%, vitamina B<sub>1</sub> 0.1 g/l y ácido cítrico -  $1\text{H}_2\text{O}$  1.  $10^{-3}\%$ . El pH de este medio es aproximadamente 4.2.

### **SIVYC (medio rico):**

D-glucosa 2%, L-asparagina 0.2%, extracto de levaduras 0.1%, *bactocasitone* aminoácidos 0.1% y solución de sales concentrada (X50) 2%.

Los inóculos de las distintas estirpes de *Phycomyces* en placas Petri se realizaron, bien a partir de una suspensión de esporas previamente activadas por calentamiento durante 15 min a 48°C (Rudolf, 1960), o bien a partir de pequeñas porciones de micelio colocadas sobre la superficie del medio con pinzas estériles. Al cabo de 5 - 6 días de incubación a 22°C, el hongo ha completado su ciclo vegetativo y pueden recolectarse esporas maduras.

Para ello, la placa de Petri se invierte y se añaden sobre la tapa 5ml de agua destilada estéril. El giro vigoroso de la base sobre la tapa de placa de Petri favorece la ruptura de los esporangios y la liberación de las esporas, las cuales son recogidas con una pipeta estéril, lavadas varias veces con agua destilada estéril y almacenadas a 4°C. De esta manera pueden mantenerse durante unos 6 meses. Los inóculos en medio líquido se realizaron añadiendo suspensiones de esporas previamente activadas (calentando 15 min a 48°C) al medio de cultivo, en concentraciones de  $2 \times 10^5$  esporas por 1 ml de medio.

Las incubaciones se llevaron a cabo 3 días a 22°C y 200 revoluciones por minuto. La conservación de las estirpes de *Phycomyces* se llevó a cabo sembrando pequeñas porciones de micelio en tubos de agar inclinado con medio extra-rico. Una vez completado el ciclo vegetativo del hongo, los tubos se congelan y se mantienen a -20°C.

### 3.3 Condiciones de iluminación.

Se utilizaron tres fluorescentes estándar F 20W/54, emisores de luz blanca, como fuente de luz constante ( $0.4 \text{ W/m}^2$  de luz azul).

La intensidad luminosa se midió con un fotodiodo (modelo 71920, Oriel Corporation) en combinación con un sistema de detección (modelo 7072, Oriel Corporation). El fotodiodo había sido calibrado en función de la longitud de onda con una termopila (Kipp y Zonen CA1-712995) conectada a un microvoltímetro (modelo 155, Kithley Instruments).

En los estudios de fotoinducción se utilizó un proyector de diapositivas “Slide 250W” (Prado Universal 31047, Ernst Leitz GmbH) como fuente de luz. La luz infrarroja de la lámpara se eliminó colocando dos filtros de absorción de calor (KG1, 5 mm, Schott Glaswerke). Se obtuvo luz azul o roja ( $0.1$  o  $4 \text{ W/m}^2$ ) colocando delante de la lámpara un filtro de cristal azul de banda amplia (BG12, 3 mm, máximo de transmisión cerca de 450 nm, Schott) o dos filtros de plástico rojo (lucita, 3 mm, tipo 502, Rhöm GmbH) [el plástico rojo transmite luz por encima de 600 nm (90% de transmisión a 710 nm, 0% de transmisión a 590 nm)].

Cuando fue necesario, el flujo se controló con filtros neutros de densidad (tipo NG, Schott) y con un resistor acoplado a la lámpara. En estos casos las distintas intensidades luminosas se determinaron con un fotodiodo intensificado para UV (Meßkopf BN-9102-4, Gigahertz-Optik GmbH) y un sistema de lectura calibrado (Optometer P-9201, Gigahertz-Optik).

La manipulación de los micelios que habían sido cultivados en oscuridad o en distintas condiciones de iluminación se realizó bajo luz roja de baja intensidad suministrada por un fluorescente rojo (120 cm; TL 40 W/15, Philips) cubierto con un filtro de plástico rojo (lucita, Rhöm GmbH).

## 3.4. Obtención de ácidos nucleicos

### 3.4.1. Extracción de ADN Genómico

#### 3.4.1.1. Extracción de ADN Genómico de *P. blakesleeanus*

Se siguió el procedimiento descrito por (Möller et al., 1992) con algunas modificaciones. Se partió de micelios obtenidos de medio sólido, congelados a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Los micelios recogidos fueron triturados en un mortero con adición frecuente de nitrógeno líquido hasta ser reducido a un polvo fino. 150 mg de dicho polvo fueron resuspendidos en un tubo *ependorf* con 500  $\mu\text{l}$  de tampón de TES (Tris-HCl 100 mM pH 8, EDTA 10 mM, SDS 2%) con agitación en “vortex”. Entre 50 y 100  $\mu\text{g}$  de proteínas K fueron añadidos a la solución.

Tras 30 - 60 min a  $55 - 60^{\circ}\text{C}$  la solución se ajustó a 1.4 M NaCl, se añadieron 0.1 volúmenes de una solución al 10% de CTAB (bromuro de hexadeciltrimetilamonio) y se incubó a  $65^{\circ}\text{C}$  durante 10 min.

Seguidamente se añadieron un volumen 700  $\mu\text{l}$  de cloroformo/ alcohol isoamílico (24:1), se mezcló suavemente, se incubó en hielo durante 30 min y se centrifugó a velocidad máxima durante 10 min a  $4^{\circ}\text{C}$ . El sobrenadante fue mezclado con 225  $\mu\text{l}$  de acetato amónico 5 M e incubado en hielo durante al menos 30 min. Se añadió a la mezcla 10  $\mu\text{l}$  de ARNasa y se incubó a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 30 min.

Posteriormente se añadieron 0.5 volúmenes de fenol más 0.5 volúmenes de cloroformo/alcohol isoamílico (24:1), se agitó en vórtex, se centrifugó 15 min a velocidad máxima y se recogió la fase acuosa. A esta fase se le añadió 1 volumen de cloroformo/alcohol isoamílico (24:1), se agitó en vórtex, se volvió a centrifugar 15 min a velocidad máxima y se recogió la fase acuosa.

El ADN presente en esta fase fue precipitado con 0.55 volúmenes (unos 510 µl) de isopropanol y centrifugación a velocidad máxima durante 5 min a temperatura ambiente. El precipitado fue lavado con etanol al 70% frío, secado al vacío y resuspendido en 100 µl de agua destilada estéril.

## **3.5. Manipulación de ácidos nucleicos.**

### **3.5.1 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).**

En los experimentos en los que se hizo uso de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Saiki *et al.* 1989) se utilizaron como cebadores de oligonucleótidos (ver tabla 2) correspondientes a los extremos 5' de las dos cadenas del fragmento de ADN que se desea amplificar.

Las muestras de ADN utilizadas como molde junto con los cebadores correspondientes se sometieron a una serie de ciclos de desnaturalización, anillamiento y extensión del cebador por acción de una ADN polimerasa termoestable, resultando en la amplificación del fragmento de ADN de interés, cuyos extremos quedan definidos por la secuencia de los dos cebadores utilizados.

Las amplificaciones se realizaron en un volumen de 20 µl siguiendo las indicaciones de utilización del kit *PCR Extender System-5 PRIME* (5 PRIME). Las reacciones fueron llevadas a cabo en un termociclador “*Biometra TPROFESSIONAL BASIC*” (Biometra GmbH), y los productos obtenidos fueron analizados por electroforesis en geles de agarosa.

#### **3.5.1.1 Diseño de oligonucleótidos.**

Para el diseño de oligonucleótidos (iniciadores, cebadores, primers u oligos) se utiliza el programa NetPrimer (<http://www.premierbiosoft.com/netprimer/>), en el cual se

introdujeron las secuencias de los genes analizados (*CryA* y *Ras-GAP*) que está disponibles en la base de datos del genoma de *Phycomyces* (<http://genome.jgi-psf.org/Phybl2/phybl2.home.html>) que pudieran poseer las características necesarias para actuar como oligonucleótidos.

Se diseñarán los oligonucleótidos necesarios para llevar a la amplificación en la PCR y la secuenciación. Las características que deben cumplir los oligonucleótidos para el correcto funcionamiento de las técnicas llevadas a cabo en este trabajo son las siguientes:

1. Tamaño de 18-22 pares de bases.
2. Contenido en G-C del 50% aproximadamente.
3. Temperatura de fusión ( $T_m$ ) adecuada dependiendo de la longitud del oligonucleótido. En este caso se procurará que sea cercana a 60°C en todos los oligonucleótidos del gen (en la tabla de correspondencias esta temperatura se relaciona con 20 pares de bases).
4. Que no formen horquillas, dímeros, híbridos, repeticiones u otras estructuras secundarias que podrían interferir en la PCR.

Los oligos Forward y Reverse se diseñaron aproximadamente 200 pares de bases antes y después del comienzo y final del gen, respectivamente.

La distancia entre el resto de oligonucleótidos tiene un máximo de 500 pares de bases para evitar que queden regiones del gen sin secuenciar.

Los oligonucleótidos utilizados en este trabajo para la PCR fueron el Forward y el Reverse, y para la secuenciación fueron, además de los anteriores, 5 oligonucleótidos más (o 6, dependiendo de los resultados de la primera secuenciación). Los oligonucleótidos fueron fabricados por la empresa IDT® (Integrated DNA Technologies).

Las muestras se entregaron liofilizadas y se resuspendieron en las cantidades de agua adecuadas para obtener tres stock de concentraciones 100  $\mu$ M, 20  $\mu$ M y 1  $\mu$ M. Los oligos utilizados en este trabajo aparecen reflejados en la tabla 2.

**TABLA 2.** Oligonucleótidos utilizados.

Nombre <sup>a</sup>	Secuencia <sup>b</sup>	T <sub>m</sub> <sup>c</sup>	Posición <sup>d</sup>
<b>CryA</b>			
Cry9	GTGTGTGTATGTATAAGCAGAG	61.0	-2577 a -2555
Cry10	CAATCAAACGACTAAAGAAGAAG	57.0	-2227 a -2204
Cry11	GCTCCAAGAAACCAAGGATATGA	63.0	-1684 a -1661
Cry12	GAAGGCAAACCTGAGGCACATTG	62.0	-1156 a -1134
Cry13	GACACATCTTGTGGTTTACTTAC	59.0	-659 a -636
Cry2	GACAACAAGGACAGCAACAACAAC	61.6	-47 a -24
Cry1	CGATCGATACCGTAGTGCCATG	62.1	+203 a +182
Cry3	CACTTGGCCATATTCACACGCAC	62.4	+356 a +378
Cry4	CACCATCTACATTGACATCAAGGTC	61.3	+840 a + 864
Cry5	GATTACTGGAGGTACTIONTGTGTCAGCC	62.7	+1268 a +1280
Cry6	GAATCTTATCTCACAGATCATGATGTC	60.4	+1660 a +1686
Cry7	CTAGAGCCACCATCTTCTTGTCTCG	64.8	+2274 a +2299

<sup>a</sup> El encabezamiento corresponde al gen de *P. blakesleeanus*.

<sup>b</sup> Secuencia en dirección 5'-3'.

<sup>c</sup> T<sub>m</sub>, temperatura media de anillamiento, en °C.

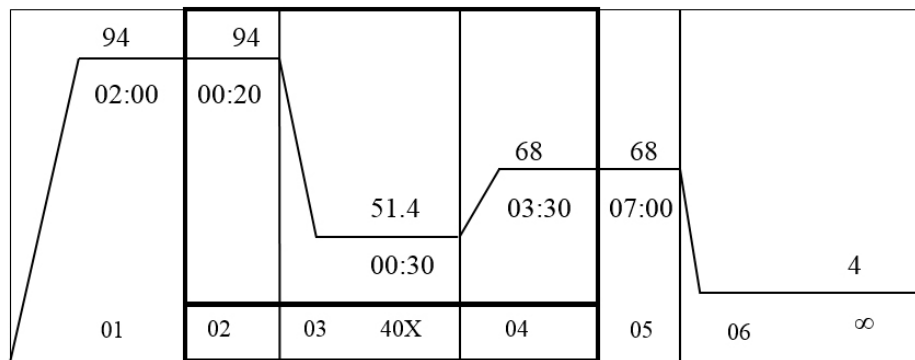
<sup>d</sup> Posición de cada oligonucleótido tomando como referencia el inicio del gen.

### 3.5.1.2 Condiciones de PCR.

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se llevó a cabo siguiendo los siguientes pasos: Desnaturalización inicial a 94 °C durante 3 min, a continuación 40 ciclos que constaron de desnaturalización a 94 °C durante 30 s, el anillamiento de los cebadores se produjo en una temperatura de 51.4 °C durante 30 s, una vez anillado los cebadores, fueron extendidos a 68 °C entre 2 min hasta 3:30 (1 kb/min) y la extensión final se hizo en una única etapa asegurándose que cualquier ADN de cadena simple restante sea totalmente ampliado a 68 °C durante 7 min y a final las muestras se conservan a 4 °C hasta su recogida. La mezcla de la reacción con un volumen final de 20 µl contiene 2 µl del tampón de PCR 10X, 1 µl de 2.5 mM de la mezcla de dNTP, 1 µl de cada uno de los cebadores (20 µM), 0.3 µl de Taq ADN polimerasa (PCR Extender System - 5 PRIME), x µl ADN genómico



(0.1-2 µg) y añadiendo hasta 20 µl agua libre de nucleasa. Las condiciones de PCR se reflejan en la figura 16.



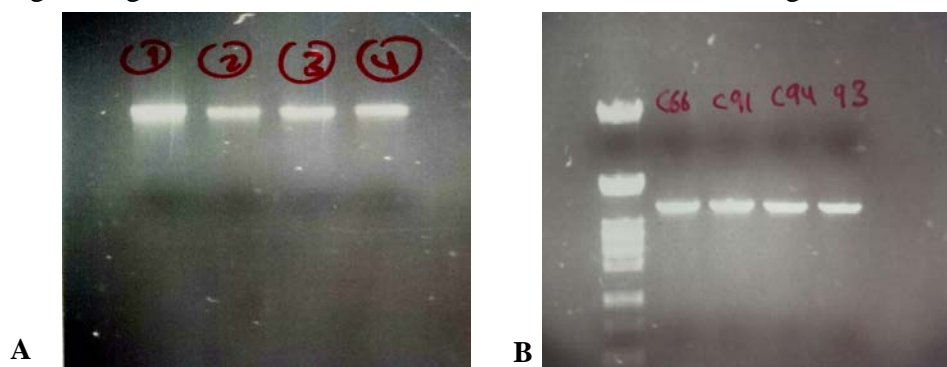
**FIGURA 16.** Condiciones de Reacción en cadena de la polimerasa

### 3.5.2. Electroforesis en geles de agarosa.

#### 3.5.2.1 Electroforesis de ADN en geles de agarosa.

La electroforesis en geles de agarosa se realizó en cubetas horizontales en las que los geles, de tamaño variable, fueron sumergidos en el tampón de electroforesis. La concentración de agarosa en los geles varió entre 0.6% y 2% (p/v) en función del tamaño de los fragmentos de ADN que se querían analizar.

Tanto la preparación de los geles como el desarrollo de las electroforesis se llevaron a cabo en tampón TAE 1X (Tris-acetato 40 mM, EDTA 1 mM) con RedSafe™ Nucleic Acid “Staining Solution” (20,000x) en una concentración final de 0.5X. Este compuesto se intercala entre el ADN y permite su visualización cuando se ilumina el gel con luz UV (260 o 360 nm). Se utilizó como marcador el ADN del bacteriófago λ digerido con las endonucleasa de restricción *Pst*I figura 17.



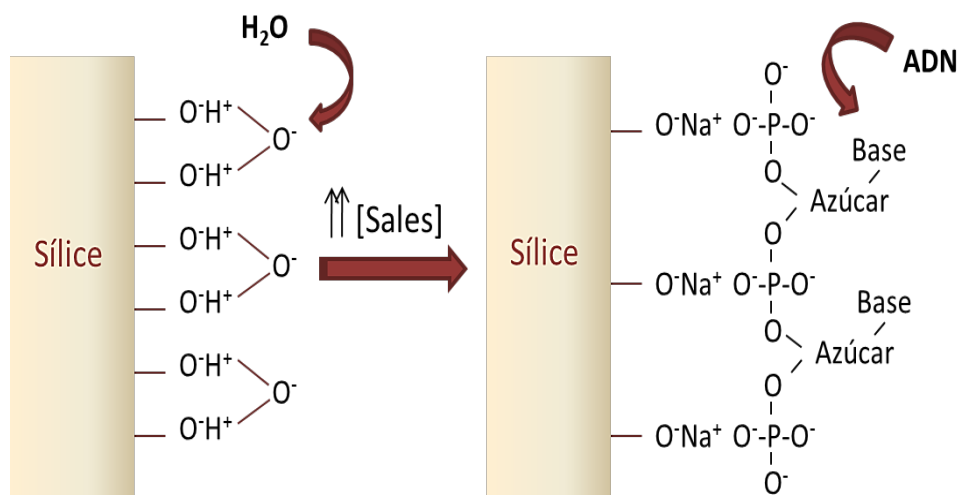
**FIGURA 17.** A y B representan respectivamente la electroforesis de AND genómico y resultados del PCR, se utilizó el marcador λ/*Pst*I.

### 3.5.3 Purificación de los fragmentos de PCR.

La purificación de los amplicones se llevó a cabo inicialmente mediante el kit comercial *NucleoSpin ExtractII* (MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG), que permite eliminar fragmentos de ADN de un tamaño 164bp.

Con este métodos se separaron los fragmentos de ADN de interés del exceso de oligonucleótidos procedente de la reacción de PCR.

El procedimiento se basa en una extracción en fase sólida, basado en la propiedad del ADN de unirse a una matriz de sílice cuando se encuentra en un medio con una elevada concentración de sales, y por el contrario, de liberarse de dicha unión a bajas concentraciones salinas figura 17. El protocolo que se siguió fue el indicado por el fabricante a partir de los 20  $\mu$ L producto de la reacción de PCR, tras retirar el volumen empleado en la electroforesis. Los reactivos aportados por el kit son las soluciones de preparación de la muestra (Buffer NT), elución (*NE Elution Solution*) y lavado (NT3); la solución fue reconstituida con la cantidad de etanol puro indicada por el fabricante.



**FIGURA 18.** Principio de purificación de NucleoSpin ExtractII kit.

Los materiales proporcionados son la matriz de sílice (*NucleoSpin® Extract II Column*) y los tubos de recolección, tanto de desechos como de muestra purificada (*NucleoSpin® Extract II collection Tube*).

El primer paso consistió en añadir 2 volúmenes de la solución NT al volumen de PCR (se ajusta el volumen de la muestra hasta 100µl para los volúmenes menos de 100µl) para conseguir las condiciones en las que el ADN quedara retenido en la matriz del *NucleoSpin® Extract II column* colocado en un *NucleoSpin® Extract II collection Tube*. Tras una breve centrifugación, se descartó el sobrenadante y se llevó a cabo un paso de lavado del ADN con 700 µl del buffer NT3.

El sobrenadante se descartó en dos pasos consecutivos de centrifugación con el fin de asegurar que la matriz quedara libre de esta solución de lavado. En el último paso se añadieron sobre el *NucleoSpin® Extract II column* colocado a su vez sobre un nuevo *eppendorf*, 15-50µl de *NE Elution Solution* para romper las interacciones del ADN con la matriz de sílice y recoger el ADN purificado en esta disolución.

Este paso de purificación se comprobó mediante electroforesis en geles horizontales de agarosa de alta resolución al 1% y tampón TAE al 0,5X figura 16.

### **3.5.4 Secuenciación.**

La determinación de las secuencias se realizó en un secuenciador automático ABI PRISM 377 (*PE Applied biosystems*).

En cada reacción de secuenciación se utilizarán 40 - 100 ng del producto de PCR purificado por las columnas comerciales "*NucleoSpin Extract II*" (Roche) y 0.37µM de oligonucleótido.

### **3.5.5 Análisis de Datos.**

La edición, manipulación y análisis de secuencias de ADN se realizó empleando el programa Vector NTI Suite (versión 11.0) (InforMax, Inc. 1995). Los análisis de secuencias aminoacídicas se llevaron a cabo usando distintos programas disponibles en las

páginas WWW EBI (<http://www.ebi.ac.uk/>) y ExPASy (<http://www.expasy.ch>) y WWW NCBI (Protein blast). Para el diseño de oligonucleótidos se utilizó el programa Geneious (versión 4.8) y para el análisis de los cromatogramas de las secuencias de ADN se empleó el programa Chromas Pro (versión 1.45) disponible en la página [www.techne.lysium.com.au/chromas.html](http://www.techne.lysium.com.au/chromas.html).

## **3.6. Extracción de proteínas totales.**

### **3.6.1. Extractos totales de proteínas de *P. blakesleeanus*.**

Se utilizaron micelios crecidos durante 3 días en medio líquido mínimo o 4 días en medio sólido mínimo y cultivados en distintas condiciones de oscuridad o iluminación según se ha descrito en el apartado 3.3. Se trabajó siempre entre 0 y 4°C. Se separó el micelio del medio, el esporangióforo y micelio de los cultivos sólidos y se utilizaron 2.5 g para la extracción de las proteínas. Las muestras de micelio o de esporangióforos obtenidas anteriormente, fueron triturados en un mortero con adición frecuente de nitrógeno líquido durante ~ 30 min hasta que fue obtenido un polvo fino y fue conservado a -80 ° C. La extracción se realizó añadiendo 35 ml de buffer de extracción A50 frío (25 mM Hepes pH 7.5, 50 mM KCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10% glicerol (v/v), 0.1 mM EDTA, 0.5 mM DTT, 1 mM PMSF, 1 μM pepstatina, 0.6 μM leupeptina).

Se facilitó la liberación de proteínas nucleares llevando la mezcla a 0.4 M de sulfato amónico (goteando lentamente a partir de un stock 3.8 M pH 7.5, cf 10% saturación) y se dejó agitando con un agitador magnético durante 2 horas a 4°C. El material insoluble se precipitó centrifugando a 100000 X g en una ultracentrífuga Beckman L13-70M (rotor SW 40 Ti) durante 2 h a 2°C.

Las proteínas del sobrenadante se precipitaron añadiendo lentamente 0.405 g/ml de sulfato amónico sólido (cf 70% saturación) con agitación mediante agitador magnético durante una noche. Las proteínas precipitadas se recogieron por centrifugación a 12000 X g durante 20 min en una centrifuga Beckman Avanti J-25I (rotor JA-25.50) a 0°C.

En este punto los precipitados se pueden congelar a  $-80^{\circ}\text{C}$  (las proteínas así precipitadas son muy estables).

Cada precipitado se resuspendió en 5 ml de buffer A100 frío (25 mM Hepes pH 7.9, 100 mM KCl, 5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 20% glicerol (v/v), 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT, 1 mM PMSF, 1  $\mu\text{M}$  pepstatina, 0.6  $\mu\text{M}$  leupeptina) y se desaló en columnas PD10 (Amersham Pharmacia Biotech) previamente equilibradas con tampón A100.

## **3.7. Manipulación de extractos proteicos.**

### **3.7.1 Cuantificación de los extractos proteicos.**

La cuantificación del extracto proteico se realizó utilizando el método de Bradford (1976) a partir de una recta patrón de BSA (1-10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). Las alícuotas se conservaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización.

### **3.7.2 Preparación de la muestra.**

La muestra de proteínas se preparó para el isoelectroenfoque con el kit *2D Clean-up* (GE, Healthcare) siguiendo las especificaciones del fabricante. Este procedimiento tiene como objeto eliminar los lípidos, carbohidratos, ácidos nucleicos y detergentes que pudieran estar en solución y que son incompatibles con la primera dimensión de la electroforesis bidimensional (2-DE), isoelectroenfoque (IEF). La recuperación proteica tras el proceso de limpieza es del 90% y no resulta en ningún tipo de pérdida de *spots* así como cambio alguno de posición de los mismos respecto a las muestras no tratadas.

La separación de proteínas que obtenemos al utilizar el *2-D Clean-Up Kit* es sustancialmente mejor respecto a otros métodos de preparación. Con este kit se reduce el “*streaking*” horizontal (artefacto que consiste en que los *spots* aparecen difuminados en bandas horizontales), se aumenta la resolución de los *spots* y se mejora el nivel de detección respecto a las muestras no tratadas.

Para los geles comparativos la muestra se preparó de siguiente modo, se transfirieron 1-100µl de la muestra (100µg de proteína) a un tubo *ependorf*, se añadieron 300 µl de “*precipitante*” y se mezcló bien con *vortex*. La muestra se incubó durante 15 min a 4°C y posteriormente se añadieron 300 µl de “co-precipitante” y se mezcló con *vortex*, la muestra se centrifugó durante 5 min a 12000 X g a 4° C, se retiró el sobrenadante rápidamente, en este paso se ve un sedimento pequeño, para retirar todo el líquido posible se centrifugó brevemente y después se añadieron 40 µl de la solución “co-precipitante” encima del sedimento.

Tras ello, la muestra se incubó a 4 °C durante 5 min y se centrifugó en las condiciones anteriormente descritas para después retirar de nuevo el sobrenadante. Se depositaron 25µl de agua encima del sedimento, para dispersar el mismo se agitó el tubo *ependorf* en un agitador durante 5-10 s después se añadió 1 ml del tampón lavado (enfriado previamente a -20°C durante 1h) y 5 µl del aditivo del tampón, se agitaron las muestras en un agitador hasta que se dispersó el sedimento, a partir de ese momento los tubos se incubaron a -20° C al menos durante 30 min y se agitaban con *vortex* durante 20-30 s cada 10 min.

En estas condiciones las muestras pueden mantenerse hasta una semana. En el caso de proceder directamente al IEF las muestras se centrifugaron durante 5 min a 4°C a 12000 X g, se retiró el sobrenadante y se dejaron abiertos los tubos para facilitar la evaporación durante 5 min, después se resuspendió el sedimento en 340µl de tampón de rehidratación [7 M urea, 2 M thiourea, 4% CHAPS, 0.5% anfolitos de pH 3–11 (tampón de IPG, GE Healthcare) 50 mM DTT, 0.002% azul de bromofenol] y se dejaron agitando durante 30 min a temperatura ambiente para que las muestras se resuspendiesen totalmente, posteriormente se centrifugaron durante 5 min a 4 °C 12000 X g para eliminar cualquier material insoluble.

### **3.7.3. Electroforesis bidimensional.**

La electroforesis bidimensional (2-DE) es aquella que se realiza en dos dimensiones. Normalmente, se utiliza el enfoque isoeléctrico (IEF) en la primera dimensión y la

electroforesis en gel de acrilamida con dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE) en la segunda dimensión.

Por medio del IEF las proteínas se separan en función de su punto isoeléctrico y con la SDS-PAGE se separan de acuerdo con su masa molecular. De este forma, tras la 2-DE tenemos un mapa proteico en el que las coordenadas de cada proteína corresponden a su punto isoeléctrico y su masa molecular.

Dependiendo del tamaño del gel y del gradiente de pH utilizado, la 2-DE puede resolver más de 5000 proteínas simultáneamente (2000 proteínas rutinariamente) y puede detectar < 1 ng de proteína por mancha. Otra de las grandes ventajas de la 2-DE es que muestra las proteínas intactas, de forma que pueden detectarse las modificaciones posteriores a la traducción, que se suelen manifestar como líneas seriadas de manchas diferenciadas en el eje horizontal y/o vertical en el gel 2-DE.

Además, esta técnica nos permite aislar las proteínas en cantidades de miligramos para poder realizar estudios a continuación. Görg y colaboradores describieron la técnica bidimensional utilizada en la actualidad (Görg et al., 2000; Görg et al., 1988; Görg et al., 2004).

### **3.7.3.1 Primera dimensión o isoelectroenfoque.**

Para enfocar las muestras en las tiras IPG™ DryStrips (pH 3–11 NL, 18 cm, GE Healthcare) en lo que denominados la primera dimensión del proceso de electroforesis bidimensional (2-DE) se siguieron los siguientes pasos:

Después de que las proteínas se solubilizaran en el último paso de la preparación de la muestra, se cargó la solución proteica en un sarcófago (recipiente cerámico en el que se va a desarrollar el IEF), se colocaron las tiras del rango de pH 3-11 boca abajo y se cubrieron las tiras con aceite mineral (PlusOne™ Dry Stripcover Fluid, GE Healthcare) para evitar la evaporación de la solución de la muestra o la cristalización de la urea.

Finalmente los sarcófagos se colocaron en la unidad de IEF IPGphor (GE Healthcare) y se aplicó la siguiente programación gradual de distintos voltajes para realizar el IEF:

Las tiras se rehidrataron en un proceso de rehidratación activa a un voltaje entre 30-60 V durante 12 horas. Después se aplicó un voltaje de 500V y 1000V durante 1h cada paso y se aumentó el voltaje gradualmente hasta 8000 V (30 min), para dejarlo constante durante otras 6 horas.

Inmediatamente después del IEF y antes de la segunda dimensión, las tiras de IPG se equilibraron pues es esencial para que las proteínas separadas interactúen con el SDS. Se incubaron durante 15 min en (Görg et al., 1988) DTT 1% (P/V) en el amortiguador descrito por Görg: Urea 6 M; glicerol 30% (V/V); Tris-HCL 1,5 M PH 8,8; SDS 2% (P/V) y azul de bromofenol 0,025 (V/V); siguiendo otros 15 min en 2,5% de iodoacetamida (P/V) en el mismo amortiguador.

### **3.7.3.2 Segunda dimensión o SDS-PAGE.**

Los geles se elaboraron el día anterior de su uso dejándolos polimerizar durante toda la noche a 4°C. La separación de segunda dimensión se realizó según el método de (Laemmli, 1970) en geles SDS-PAGE al 12% (H<sub>2</sub>O, 30% Acrilamida 30%, la solución de acrilamida y diacrilamida 37.5:1 Bio-Rad, 1.5 M Tris pH 8.8, 10% SDS, 10% APS, TEMED) de poliacrilamida (160 x 180 x 1 mm) en el sistema para geles Hoefer SE 600 Ruby (Amersham Biosciences). Las tiras se pusieron en contacto directo con SDS-PAGE y se selló con agarosa 0.5%. Se aplicó un amperaje de 15 mA hasta comprobar la entrada de las proteínas en el mismo y posteriormente se aumentó el amperaje hasta 40mA para cada gel. La electroforesis se detuvo cuando el frente del colorante salió por la parte inferior del gel. Los geles se corrieron a una temperatura inferior a 25 °C para evitar los problemas que originaría el calentamiento.

### **3.7.3.3 Tinción de las proteínas en el gel de electroforesis.**

Tras la electroforesis bidimensional, las proteínas separadas deben visualizarse, ya sea con métodos de tinción universales o específicos (Patton, 2002). Las proteínas



fueron fijadas utilizando el tampón de fijación (metanol 50% y 7% del ácido acético) durante 30 min.

Tras pasar este tiempo los geles fueron teñidos poniendo una noche en SYPRO-Ruby (Molecular Probes) siguiendo las instrucciones de fabricante. La tinción con SYPRO-Ruby fue nuestra elección como método de tinción, dado que ofrece un amplio intervalo dinámico, detecta cantidades pequeñas de proteína y confiere a los experimentos una gran reproducibilidad.

### 3.7.4 Análisis de las imágenes de los geles 2D.

Para garantizar la fiabilidad de los resultados de cada estirpe y cada condición de iluminación se realizaron como mínimo 3 extracciones proteicas y tres geles bidimensionales distintos que fueron procesados de forma independiente.

Los geles fueron digitalizados en un escáner fluorescente *Ettan DIGE Imager* (GE Healthcare) a una resolución de 100 dpi (píxeles por pulgada) utilizando el programa informático *Ettan DIGE Imager* (GE Healthcare) guardado en archivos de imagen informáticos (formato gel) para poder ser analizados. El análisis de las imágenes obtenidas por el escáner fue realizado con el programa informático *Image Master Platinum versión 7* (GE Healthcare) y se desarrolló en 4 pasos:

1. En una primera fase hay un procesamiento previo de las imágenes captadas del gel. Se realizaron una serie de correcciones de la falta de homogeneidad producida por el proceso de electroforesis, principalmente se realizaron correcciones espaciales y de la intensidad.
2. Después de la detección automática de las manchas proteicas, se eliminaron los artefactos como señales de fondo. Para ello se utilizaron estos 3 parámetros:
  - A. **Smooth:** Procesamiento de imagen mediante diferentes algoritmos. Se pretende discernir entre *spot*, favoreciendo la separación y diferenciación de los mismos.

Se mantiene en un valor de 2 normalmente y se sube excepcionalmente a 3 si observamos dificultad en la detección, al subirlo se penaliza la delimitación de los *spots* y aparecen en ocasiones bordes irregulares que se pueden corregir.

B. **Área mínima:** Se eliminan los *spots* que tienen un área menor que el límite especificado para evitar incluir como *spots* partículas de superficie. Este límite osciló entre 2 y 10 en función del ruido de fondo en el escaneado.

C. **Prominencia:** Se indica hasta qué punto una mancha sobresale con respecto a su alrededor. *Spots* reales generalmente tienen altos valores de prominencia mientras que los artefactos y ruido de fondo tienen valores pequeños. El valor se fija a la baja observando los parámetros de los *spots* más tenues y comprobando que no queden fuera del análisis.

3. Emparejamiento entre los tres geles de cada estirpe y condición, para ello se eligieron unos puntos de control o “*landmarks*” comunes en todos los geles y una vez hecho esto se deja que el programa haga el emparejamiento automático del resto de manchas.
4. Finalmente se procedió a la búsqueda de proteínas con expresión diferencial entre las siguientes condiciones, tabla 3:

**TABLA 3.** Las condiciones y estirpes utilizadas para la búsqueda de expresión diferencial

---

1	- <sup>a</sup> Micelio tipo silvestre luz VS <sup>a</sup> Micelio tipo silvestre oscuridad.
2	- <sup>a</sup> Micelio <i>madA</i> VS <sup>a</sup> Micelio <i>madA</i> oscuridad.
3	- <sup>a</sup> Micelio tipo silvestre luz VS <sup>a</sup> Micelio <i>madA</i> luz.
4	- <sup>a</sup> Micelio tipo silvestre oscuridad VS <sup>a</sup> Micelio <i>madA</i> oscuridad.
5	- <sup>a</sup> Micelio <i>madB</i> luz VS <sup>a</sup> Micelio <i>madB</i> oscuridad.
6	- <sup>a</sup> Micelio tipo silvestre luz VS <sup>a</sup> Micelio <i>madB</i> luz.
7	- <sup>a</sup> Micelio tipo silvestre luz VS <sup>a</sup> Micelio <i>madB</i> oscuridad.
8	- <sup>a</sup> Micelio <i>madC</i> luz VS <sup>a</sup> Micelio <i>madC</i> oscuridad.
9	- <sup>a</sup> Micelio tipo silvestre luz VS <sup>a</sup> Micelio <i>madC</i> luz.
10	- <sup>a</sup> Micelio tipo silvestre oscuridad VS <sup>a</sup> Micelio <i>madC</i> oscuridad.
11	- <sup>b</sup> Micelio tipo silvestre luz VS <sup>b</sup> Micelio tipo silvestre oscuridad.
12	- <sup>b</sup> Esporangióforo tipo silvestre luz VS <sup>b</sup> Esporangióforo tipo silvestre oscuridad
13	- <sup>b</sup> Micelio tipo silvestre luz VS <sup>b</sup> Esporangióforo tipo silvestre luz.
14	- <sup>b</sup> Micelio tipo silvestre oscuridad VS <sup>b</sup> Esporangióforo tipo silvestre oscuridad

---

Tipo silvestre utilizado \_ NRRL1555.

<sup>a</sup> Muestras crecidas en medio mínimo líquido.

<sup>b</sup> Muestras crecidas en medio mínimo líquido.

La cuantificación de un *spot* se expresa en porcentaje del volumen (vol. %), el volumen de cada *spot* normalizado con respecto del volumen total de los *spots* en el gel bidimensional.

Los volúmenes relativos (vol. %) corresponden al volumen de cada mancha dividiendo por el volumen total de todas las proteínas existentes en el gel. La diferencia en % de volumen de los *spots* se utilizó como medida para medir el nivel de la expresión de las proteínas.

Se considera que las proteínas se expresaron de forma diferencial cuando la relación de la media del porcentaje del volumen entre condiciones diferentes fue  $> 1.5$  y el valor del análisis estadística del test de la varianza (ANOVA) era inferior a 0.05.

## **3.8. Identificación de proteínas por espectrometría de masas.**

### **3.8.1. Digestión en gel.**

La identificación de proteínas mediante huella peptídica utilizando EM MALDI TOF-TOF se realizó previa digestión enzimática con tripsina de las manchas proteicas aisladas a partir de geles de 2-DE preparativos.

Una vez realizada la determinación de las diferencias entre estirpes y condiciones diferentes, a partir de un gel de 1mg de proteína se aislaron las manchas y se transfirieron a tubos *ependorf* de 1.5ml, se añadieron 50 $\mu$ l de H<sub>2</sub>O HPLC Grade (Sigma) a cada tubo *ependorf* de modo que el *spot* quedase completamente sumergido en agua y se conservaron a -20°C hasta su digestión.

Para hacer la digestión posteriormente se quitaron los 50 $\mu$ l H<sub>2</sub>O de los tubos *ependorf* y se añadieron 70 $\mu$ l de bicarbonato amónico (BA) 25mM e incubaron en termobloque a temperatura 25°C durante 20 minutos a 950 rpm. Se retiró el BA 25mM y se

añadió 70µl de BA 25mM/50%acetonitrilo (ACN) (Lab-SCAN), se incubó 20 min 25° C agitando en termobloque, se repitió este paso 2 veces.

Se retiró el sobrenadante y añadieron 70µl de ACN100%, se incubó 10 min a temperatura ambiente agitando en termobloque, se retiró el ACN y se dejaron los tubos 10 min dentro de la campana para que se evaporase el resto de ACN. Se añadieron 15µl de solución de tripsina(0.2µg/µl)/BA 25mM y se incubó toda la noche a 37°C agitando en termobloque a 950-1000rpm.

Posteriormente se añadieron 8µl de ACN y se incubó 15 min a 37°C, a continuación se añadieron 50µl a cada muestra de solución de extracción (0.2% de ácido trifluoroacético) e incubó 30 min a temperatura ambiente en termobloque a 650rpm. Se traspasó la solución de los péptidos a los tubos de 0.5ml y se centrifugaron en *speed vac* a 40°C durante 2 horas hasta que se evapore el sobrenadante. Transcurrido el tiempo se añadió 8 de TFA (ácido trifluoroacético) 0.1%/50%ACN, agitaron con *vortex* y sonicaron 5 min, centrifugaron y se depositaron 1.4 µl de muestra en la placa de MALDI, esperamos 4 minutos y después lavamos con 10 µl de fosfato amónico monosódico y retiramos todo el volumen restante que quede sobre la matriz.

Las placas utilizadas son placas PAC (*PrespottedAnchorChip96*, Bruker Daltonics-*Eppendorf*) que traen incorporados 24 puntos de calibración y directamente aplicada la matriz, el ácido α- ciano- 4- hidroxicinámico (HCCA).

### **3.8.2. Obtención de PMF y fragmentación MS/MS mediante MALDI TOF-TOF.**

El análisis de los fragmentos de péptidos se llevó a cabo en un equipo MALDI TOF-TOF AutoFlex (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) que funciona en modo reflector con un voltaje de aceleración de 21000 V. El equipo se calibró externamente mediante los patrones predepositados en la placa PAC y las muestras se analizaron en un intervalo de valores *m/z* entre los 1000 y los 4000.

Los espectros fueron adquiridos en el programa Flex Control 3.0 software (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) y posteriormente los picos se procesaron en el programa FlexAnalysis 3.0 (Bruker Daltonics, Bremen, Germany).

La lista de los picos se generó a partir de los señales en un intervalo de  $m/z$  800-4000 con un umbral  $> 4$ . El algoritmo incluido en el programa se utilizó para seleccionar los picos mosoisótopos de las distribuciones isotópicas observadas. Además, los picos correspondientes a ionización de la matriz, queratinas y autólisis de la tripsina se eliminaron del espectro y se aplicó una calibración interna estadística cuando fue necesario.

La lista de picos final se utilizó para la identificación de la proteínas mediante huella peptídica (PMF). En los casos en los que fue posible, se realizaron análisis mediante espectrometría de masas en tándem (MS/MS) con el sistema TOF-TOF del MALDI (LIFT). Estos análisis MS/MS se realizaron seleccionando picos candidatos precursores o parentales, y fragmentándolos a posteriori.

### **3.8.3. Análisis de datos MS e identificación de proteínas mediante búsqueda en base de datos.**

La identificación de las proteínas se llevó a cabo utilizando el motor de búsqueda Mascot a través del programa *BioTools* (Bruker Daltonics, Bremen, Alemania).

Las búsquedas por PMF se realizaron a partir de los péptidos analizados por MALDI TOF MS y fragmentación MS/MS, se empleó la base de datos *Phycomyces blakesleeanus* NRRL1555 v2.0 *filtered proteins* (<http://genome.jgi-psf.org>) instalada en un servidor propio gracias a la posesión de una licencia Mascot v.2.2.04 ([www.matrixscience.com](http://www.matrixscience.com); Matrix Science, London, UK).

En el proceso de búsqueda se establecieron como parámetros hasta un posible error en la posición de corte realizada por la tripsina, la carbamido metilación de cisteína como modificación fija y como posibles modificaciones variables la oxidación de la metionina.

La tolerancia de masas se estableció en 50 ppm para las búsquedas derivadas del análisis de MALDI TOF MS y de 0.5 Da para los MS/MS. Los parámetros de las

búsquedas combinadas (PMF y fragmentaciones MS/MS) fueron los mismos descritos para las búsquedas individuales.

El motor de búsqueda estableció un valor estadístico de probabilidad o *score* significativo (a una  $p > 0,05$ ) como condición para una identificación positiva. En el caso de las búsquedas PMF ese valor mínimo de *score* fue 55 y en el de las MS/MS fue de 24.

## **4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 Caracterización molecular del gen *cryA*.

La definición aceptada de un criptocromo es una proteína con similitud a las fotoliasas que ha perdido o reducido su capacidad de reparación del ADN y ha ganado un nuevo papel en la señalización. Sin embargo, hay varios ejemplos de fotoliasas, incluyendo algunos de hongos, que tiene una doble función como enzima de reparación del ADN y como fotorreceptores (Bayram et al., 2008a; Berrocal-Tito et al., 2007).

El genoma del hongo *P. blakesleeanus* contiene un solo gen (*cryA*) para una proteína de la familia criptocromo/fotoliasa a diferencia de *Ascomycetes* y *Basidiomycetes*, el genoma de *Phycomyces* no contiene genes para la otros criptocromos o fotoliasas a pesar de la observación de fotorreactivación en este hongo. La proteína codificada por el gen *cryA* es una enzima de reparación del ADN cuya expresión durante el crecimiento vegetativo está regulada por la luz.

La secuencia nucleotídica completa del gen *cryA* de *P. blakesleeanus* y de sus regiones flanqueantes se obtuvo a partir de la base de datos del genoma de *Phycomyces* a partir de la secuencia identificada con el código ID85761. La secuencia nucleotídica correspondiente a este gen comprende 2442 nucleótidos con un total de 4 exones y 3 intrones. La secuenciación de la copia ADNc de esta ORF de 2038 pb permitió localizar la posición exacta de los tres intrones de 220, 68 y 62 pb respectivamente, tras cuyo procesamiento y posterior traducción del ARNm correspondiente se dedujo una proteína de 679 aminoácidos. Esta proteína mostró unas similitudes del 53% y del 51% con las proteínas homólogas deducidas de *Mucor circinelloides* y de *Rhizopus oryzae*. La secuencia nucleotídica completa de la región codificante del gen *cryA* de *P. blakesleeanus* se muestra en la figura 19. La secuencia completa de la región promotora del gen *cryA* se muestra en la figura 20.

Las zonas promotoras y codificante del gen *cryA* amplificaron mediante PCR y se analizaron mediante secuenciación automática según se describe en los correspondientes apartados de la sección de Material y métodos. Este análisis se llevó a cabo en un total de 57 estirpes entre las que se incluyeron 5 estirpes tipo silvestre y





GTAGCTCAAGTTGCCACAGTATTGCAAGCACGGCCACAAGTACAAAAGTCTCTTCGAAAAACAAGCATAAT  
ATGGAACAGATTAAAGAATCTTAATACAAACATTACATACCTACCAACTCTCTAAAAAAAAGAGAAGAA  
TAATAATAATATATTTTTGATTTATTTATTTAAATTAATTAATTTAGTTAATTGATAGATTTTCATTTCA  
TTTCATTTTCTTCATTTTCTTCATGTAAATTTATTTCCCTTGTTCATTTATACCGATGCAACAGCAGCAA  
CCCCTACAAGCAATACTCATATTCATACTCATTTCAAGCATATCTTTCTTTATCTTCACATACACCCGTGT  
CCCTGCAATACAACATTTTTAACTATTCCTAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATTATACAT  
GGCTTCCTTGTACAAATTTATTAACAAATGTATCTAAAGCCTATAGTTAATTGCTCACCTATTTCTTATG  
TCTGTCTGTAAACAGTATTTCATTTTATTAATCAAAACAGAAACTAATGCAATAAAGGTAATAATATGTACA  
TGTGTATGTGTGTATGTATAAGCAGACTTAAAGGCCAAAGACATGTAGACCTTTTATTTTTTATTTTTAT  
TTTTGTCTTGATCTTGTTTTGACCAATAAAAATTTGTGTCTGTCTATGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTAAATTT  
AGACATTTTTTTTTAAAAAATAAAAATAAATAAATAAATTCACCAATTACTGCCTGACTACTCATTTCAACT  
GAAATCTTGTGCATTGTCAAAACAAATAAGAAATGACAGACAACCAAGCATCATTACACTCCATGACGGA  
ACCACCATGCCAAAAGATTGGCTGTAAGAACCAAAAGAAAAATAAATTAACAACCAACAAAACCGACAAAAC  
AACAAACCAATCAAAACGACTAAAGAAGAAGACGCATAATAACAAAACAATATTTCTTATTTATTTGTTTTTT  
TTTTTAAAACTTGTTTACACACACACACACACACATATATATATATATATTTCTTCTTGATACTTGACAGTG  
GGTACCTACAGAATGAAGACCTTGGGGAACTCAGACCTGTAGTTAAGGAAGCTGTTTCGTAATGGATATA  
GACTTATTGGTAATATTGATATTGACATTGAATAAGAACAGTATTTTAATATCCTAGTGTTTTTCTATCA  
CTACTGTATTGTCGTTATGATTAATATCATTAGATTGGCTACTGTCTATAGAAACGAAGAAGCAATTGG  
TAAAATTATTAATGAAATAATCAATGACGAGACATTTGGCGTTGAGCGAAAAGACCTCTTTGTCCATCC  
AAGCTATGTAAGAATCACAAACAGGCAAACTCGACTTTTTCTATGCACACGCTATCTATATATCTATCTAT  
ATAATTTGTCTTGTTTGCACTTGATTAATTTCTAATGATTGTGAACCTCATGTTTAAATTAAGCTCCAAGAA  
ACCAAGGATATGAAGAATGCTACAAAAGGTATAAAAGAAAAGAACATCTAAATTTTTATCTTTATAAAAATGT  
AAAGGTGTAATAATGAATACTTGTTCGATATTTCTGCCAATTTTCAAATAATAATACGAGAATACAAAA  
TGCATTATTAGCTGTCCTTGCATCTCTCAAGAAACTCAAGCTGGACTATATTGATCTTTATTTGATTCAC  
TGGCCAGGGTAAAAACATTTATATATATATATATATGTATGATAGTACTTTAACAAATTCATCAAGACATC  
AATATATCTATAAATTTGAATATGATTTATCGAAGATTTTAAAGATTTTAAATTAATAACTTGGTCTGGC  
GGCTCTGTATCTTATCTTAAATAAATAAATTAATTAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATA  
ATAGGACATCGAAAACAAATTTGGATGATCCAAAAGAACAAAGGAGAACCGATCAGAGAGCTACAGAGCACT  
CGAACAGCTTTTTGAAAAGAAAGCAACTGAGGCACATTGGAGTATCCAACCTATACCGAAAAGCACCTTGAGG  
CACTTGATCGACACCTGCACCGTCTACCACATGTGCACCAATTCGAACCTCACCCGGCACCTTATCAAC  
CCGAGATCCTGTGATCTGTGAGAGAACCGAATCCAGATACAGGCCCTACTCGAGTCTCGGCGAAGGAAA  
GCTCTTGAAAGGCAAAATATGCCATCAAAGAACTCGATCCAATTTCCGAGCGGCTGCAGGTTTCTCCAGCC  
CAGGTCTTGTGCGCTGGGCTATTCAGCACGATTGGGCAGTCATACCAAAGTCTACAAAGCCAGATAGAG  
TAAAGACCAATGGAGATTTGTTTTCTTTGAACTGTGAGGACAAGTACGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGT  
GTTTTGGGAAGAAAATAGAAAAGGGGAGGGGAGGATAAAGTTTAAACTTCTTCTCACCTCTCCCCCTTTA  
TTTTGTTTTGCTTTTAATACTATACATGAATAAATGACACATCTTGTGGTTTACTTACTGTCTTTATACTG  
TACACTATTAGGATATGGCGTTTCTTGATGACTATCACAAGCAAGAAGCACACCCGAATGTGTTGGGACCC  
AACAGATATCTACTAATCTTTCTAAAATATCTTCATTGCTATGATACGTCTATATATATATATATATATTG  
TGAATACAATTTACATTATAGTGCTTTCCAAGTGCTATGCTGTTTTCTATTTTTAAAAACAAAAGAAGAG  
GAGGCAAAAAAGCAAAACAATTTCTCCCCCTAGTATCTTACTATAAATATTAATAAATAAATAAATAAAG  
ACGCCTAATTCATAAGCTACCTTCTTCTTCTTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGT  
CAAAGACGGTAAATCTATCATTCATTCATCGATGCTAAAACCGATCGATCCAATTCGCGATCCCAGC  
AGTCACATATATCTTTAACATAAAGCAAAAAAGAAAAAAGTCAAAGGTTCTCAGCAAAAAGTATT  
AATTTATTACTCTTTTTTAACTTATTCATTTATATATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATA  
TCAAGATTTACAACAAGGACAACAAGGACAGCAACAACAACAACAACAACAAGCGAAGAAGAAAATGAAG  
TCTGTCAATATCTGTTTCTTTAGAAATATATTCCTGTTCACGACAACATGTCGTTGTATCATGCAATCC  
AGTCCAAGCCAGACACCCCTATTGCCTTTGGTGTGCCCTGGATCCACGAATGATGGACCTTTCTGCGCTCAA  
CGGGCTACTCAAGACCGACTTTAAGCCCCCTACCAATGCGCACTACGGTATCGATCGATGTTTCGCGGTTT  
AGAACAAGGTTTATAATCGAAAAGTATCTTGGATCTCAAGAATAATTTGCTAAAAAGGAAAAGTGATTTAC  
TGGTACTTTATGGCGAGCCAGAGAACTTTTACCAGAGCTCAGAGACTTTTTTGGCCAAAAAAGGGCTCAC

**FIGURA 20.** Secuencia promotora del gen *cryA* de *Phycomyces blakesleeanus*. En azul se muestra la región promotora. En rojo se muestra un fragmento de la región codificante. Con color verde se indican los oligonucleótidos empleados en la amplificación mediante PCR del gen. Con color amarillo se indican los oligonucleótidos empleados en la secuenciación del gen.

**TABLA 4.** Resultados de la secuenciación del gen *cryA* en las estirpes tipo silvestre y mutantes *madA*, *madB*, *madD*, *madE*, *madF*, *madG* y *madH*.

<u>ESTIRPE</u>	<u>GENOTIPO</u>	<u>ORIGEN</u>	<u>MUTACIÓN</u>
*Del	(-)		sin mutaciones gen ni promotor
Rob	(+)		^ A -1278, C-937T, G-311C, Δ-34ACA, C+868G, ^C+1557, G+1833A
UBC24	(-)		sin mutaciones gen ni promotor
UBC21	(+)		^ A -1278, C-937T, G-311C, Δ-34ACA, C+868G, ^C+1557, G+1833A
A56	(+)	Del X A32	sin mutaciones gen ni promotor
C21	<i>madA7</i> (-)	Del, NG	sin mutaciones gen ni promotor
C47	<i>madA35</i> (-)	Del, NG	sin mutaciones gen
A896	<i>madA403</i> , <i>nicA101</i> (+)	A893 x C247	sin mutaciones gen
C111	<i>madB103</i> (-)	Del, NG	sin mutaciones gen
C114	<i>madB106</i> (-)	Del, NG	sin mutaciones gen
B16	<i>madD462</i> (-)	Del, ICR170	^ A -1278, C-937T, G-311C, Δ-34ACA, C+868G, ^C+1557, G+1833A
A279	<i>madD120</i> (-)	A56 x C149	sin mutaciones gen
B27	<i>madD471</i> (-)	Del, ICR 170	sin mutaciones gen
C68	<i>madD59</i> (-)	Del, NG	sin mutaciones gen
*A767	<i>madE102</i> , <i>nicB401</i> (-)	A532 x C110	sin mutaciones gen
C110	<i>madE102</i> (-)	Del, NG	sin mutaciones gen
L157	<i>madE720</i> (-)	Del, NG	sin mutaciones gen
L163	<i>madE726</i> (-)	Del, NG	sin mutaciones gen
A327	<i>madF48</i> , <i>nicA101</i> (+)	A56 x C316	sin mutaciones gen
L161	<i>madF724</i> (-)	Del, NG	sin mutaciones gen
A281	<i>madG131</i> (+)	A56 x C307	sin mutaciones gen
C288	<i>madG131</i> (+)	C107 x C264	sin mutaciones gen
L83	<i>madH703</i> (-)	Del, NG	sin mutaciones gen
L85	<i>madH705</i> (-)	Del, NG	sin mutaciones gen
L151	<i>madI714</i> (-)	Del, NG	sin mutaciones gen
A914	<i>madI712</i> , <i>lysA401</i> (-)	A637 x A845	sin mutaciones gen
A909	<i>madJ407</i> (-)	Del, NG	sin mutaciones gen

**TABLA 5.** Resultados de la secuenciación del gen *cryA* en las estirpes *madC*.

<u>ESTIRPE</u>	<u>GENO TIPO</u>	<u>ORIGEN</u>	<u>MUTACIÓN</u>
B24	<i>madC469</i> (-)	Del, ICR170	^ A -1278, C-937T, G-311C, Δ-34ACA, C+868G, ^C+1557, G+1833A
A201	<i>madC469</i> (+)	A56 X B24	^ A -1278, C-937T, G-311C, Δ-34ACA, C+868G, ^C+1557, G+1833A
A202	<i>madC469</i> (-)	A56 X B24	^ A -1278, C-937T, G-311C, Δ-34ACA, C+868G, ^C+1557, G+1833A
C148	<i>madC119, carA5</i> (-)	C2, NG	sin mutaciones promotor ni gen
L52	<i>madC119, madA7</i> (-)	L2 x C21	sin mutaciones promotor ni gen
B2	<i>madC452</i> (-)	Del ICR170	^ A -1278, C-937T, G-311C, Δ-34ACA, C+868G, ^C+1557, G+1833A
A146	<i>madC452</i> (+)	A56 X B2	sin mutaciones promotor ni gen
A429	<i>madC452, nicA101</i> (+)	A146 X S102	sin mutaciones promotor ni gen
A431	<i>madC452, nicA101</i> (-)	A146 X S102	sin mutaciones promotor ni gen
A434	<i>madC452, carA5</i> (+)	A146 X C2	sin mutaciones promotor ni gen
A435	<i>madC452, carA5</i> (-)	A146 X C2	sin mutaciones promotor ni gen
A905	<i>madC406</i> (-)	Del, ICR170	sin mutaciones promotor ni gen
S18	<i>madC209, carA57</i> (-)	UBC24, NG	^ A -1278, C-937T, G-311C, Δ-34ACA, C+868G, ^C+1557, G+1833A
C286	<i>madC209, carA57</i> (+)	S18 X C246	^ A -1278, C-937T, G-311C, Δ-34ACA, C+868G, ^C+1557, G+1833A
S14	<i>madC205, carA53</i> (-)	UBC24, NG	^ A -1278, C-937T, G-311C, Δ-34ACA, C+868G, ^C+1557, G+1833A
C287	<i>madC205</i> (+)	S14 X C246	sin mutaciones promotor ni gen
S5	<i>madC202, carA51</i> (-)	UBC24, NG	^ A -1278, C-937T, G-311C, Δ-34ACA, C+868G, ^C+1557, G+1833A
C141	<i>madC51, carA5</i> (-)	C59 X C2	^ A -1278, C-937T, G-311C, Δ-34ACA, C+868G, ^C+1557, G+1833A
B11	<i>madC457</i> (-)	Del, ICR 170	^ A -1278, C-937T, G-311C, Δ-34ACA, C+868G, ^C+1557, G+1833A
A233	<i>madC457</i> (+)	B11 X A56	sin mutaciones promotor ni gen
A234	<i>madC457</i> (+)	B11 X A56	sin mutaciones promotor ni gen
B13	<i>madC459</i> (-)	Del, ICR 170	^ A -1278, C-937T, G-311C, Δ-34ACA, C+868G, ^C+1557, G+1833A
A254	<i>madC459</i> (+)	B13 X A56	#^ A -1278, C-937T, G-311C, Δ-34ACA, C+868G, ^C+1557, G+1833A
A255	<i>madC459</i> (+)	B13 X A56	^ A -1278, C-937T, G-311C, Δ-34ACA, C+868G, ^C+1557, G+1833A
B18	<i>madC464</i> (-)	Del, ICR 170	^ A -1278, C-937T, G-311C, Δ-34ACA, C+868G, ^C+1557, G+1833A
A238	<i>madC464</i> (+)	B18 X A56	^ A -1278, C-937T, G-311C, Δ-34ACA, C+868G, ^C+1557, G+1833A
A239	<i>madC464</i> (+)	B18 X A56	sin mutaciones promotor ni gen
B22	<i>madC467</i> (-)	Del, ICR 170	^ A -1278, C-937T, G-311C, Δ-34ACA, C+868G, ^C+1557, G+1833A
A241	<i>madC467</i> (+)	B22 x A56	^ A -1278, C-937T, G-311C, Δ-34ACA, C+868G, ^C+1557, G+1833A
A242	<i>madC467</i> (+)	B22 x A56	sin mutaciones promotor ni gen

De los resultados de la secuenciación del gen *cryA* en las estirpes analizadas en el presente trabajo podemos concluir, en primer lugar, que ni el tipo silvestre ni ninguna de las estirpes *madA*, *madB*, *madD*, *madE*, *madF*, *madG*, *madH*, *madI*, *madJ* ni los mutantes múltiples *madA-madB-madC* (L72) ni *madA-madB* (L52) presentan mutaciones en el gen *cryA*. En segundo lugar hemos observado que dentro de los mutantes *madC* hay dos variantes, unos que presentan el gen *cryA* intacto y otros que presentan 7 mutaciones localizadas en la región que va de la posición -1500 del promotor al final de la región codificante del gen. Igualmente hemos observado que en todas las estirpes *madC* en las que el gen *cryA* está alterado se observan siempre las mismas 7 mutaciones mencionadas en el párrafo anterior y detalladas en la tabla 5, nunca aparecen dichos cambios de forma aislada.

La secuenciación de cada estirpe se repitió 2 o 3 veces obteniendo siempre el mismo resultado. Estas repeticiones se llevaron a cabo con el fin de confirmar los resultados obtenidos y descartar la posibilidad de que la detección de la copia intacta o alterada fuese un fenómeno debido a la existencia de dos copias del gen de las que se amplificase por PCR aleatoriamente una u otra copia. Descartamos esta opción porque los resultados para cada estirpe eran consistentes (siempre se obtenía el mismo resultado) y no se detectó mezcla de una copia intacta y otra alterada en las secuenciaciones, salvo una única excepción (estirpe A254) en la que se observa una mezcla de la copia alterada y la copia intacta del gen *cryA* por lo que probablemente se trate de un heterocarionte. De todos estos resultados podemos concluir que las mutaciones presentes en el gen *cryA* en las estirpes *madC* son responsable al menos en parte del fenotipo de ceguera atribuido a estos mutantes, que como se ha mencionado en la introducción pertenece al tipo I de mutantes ciegos que se caracterizan por tener alteradas todas las respuestas a la luz (fototropismo, gravitropismo, evitación, fotomorfogénesis y fotocarotenogénesis).

## **4.2. Estudio del Proteoma de *Phycomyces blakesleeanus***

Tal y como se explicó en los apartados 3.2 y 3.3 de Materiales y Métodos, para la descripción del proteoma total de *Phycomyces blakesleeanus* se utilizó el micelio del

tipo silvestre (NRRL1555) cultivado en medio SIV líquido en las condiciones de luz anteriormente descritas. Los micelios así cultivados se recogieron y conservaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta que se llevó a cabo la extracción de proteínas totales según se describe en el apartado 3.6. A partir de las muestras de proteínas totales se procedió a la realización de las electroforesis bidimensionales según se describe en el apartado 3.7 de Materiales y Métodos. El análisis se realizó a partir de tres geles preparativos de 1 mg de proteína, se analizaron un total 485 proteínas de las cuales se identificaron 252 mediante EM MALDI TOF-TOF. En la figura 21 (A, B, C, D, E) se muestra los geles analizados y las proteínas que se identificaron. Los resultados correspondientes a estas identificaciones como el nombre de la proteína, su peso molecular, así como, los datos concretos de la identificación mediante MALDI TOF-TOF (Número de péptidos, Score, etc.) se recogen en la tabla 6 que, por motivos de espacio y maquetación, dado el gran número de filas y columnas de la misma, aparecerá incluida en el Anexo I al final de esta memoria.

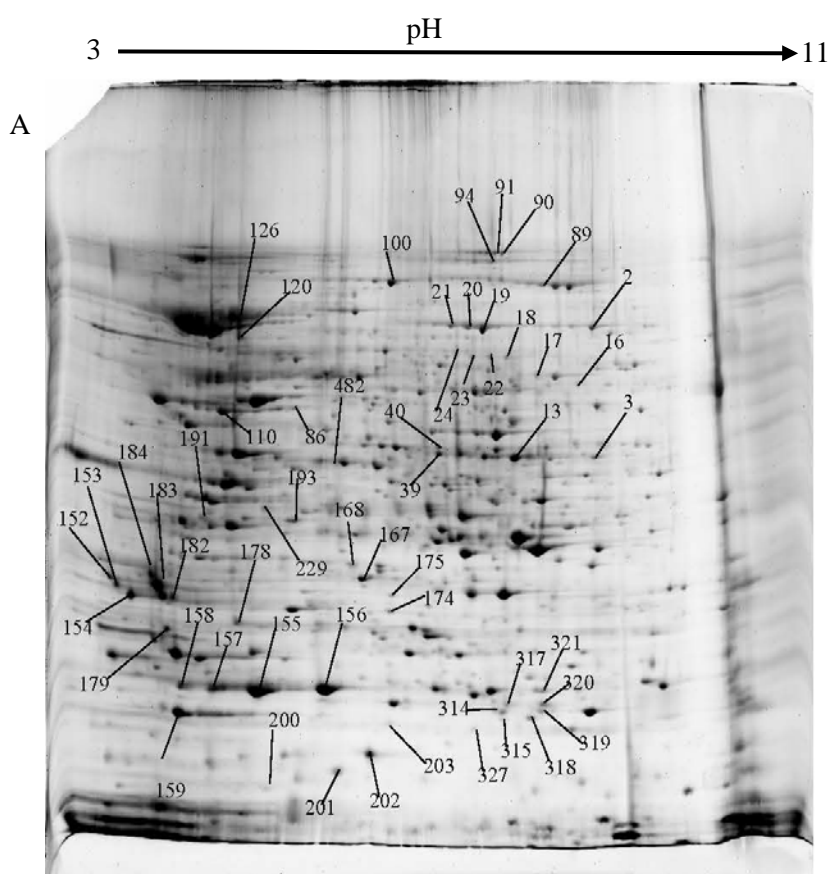
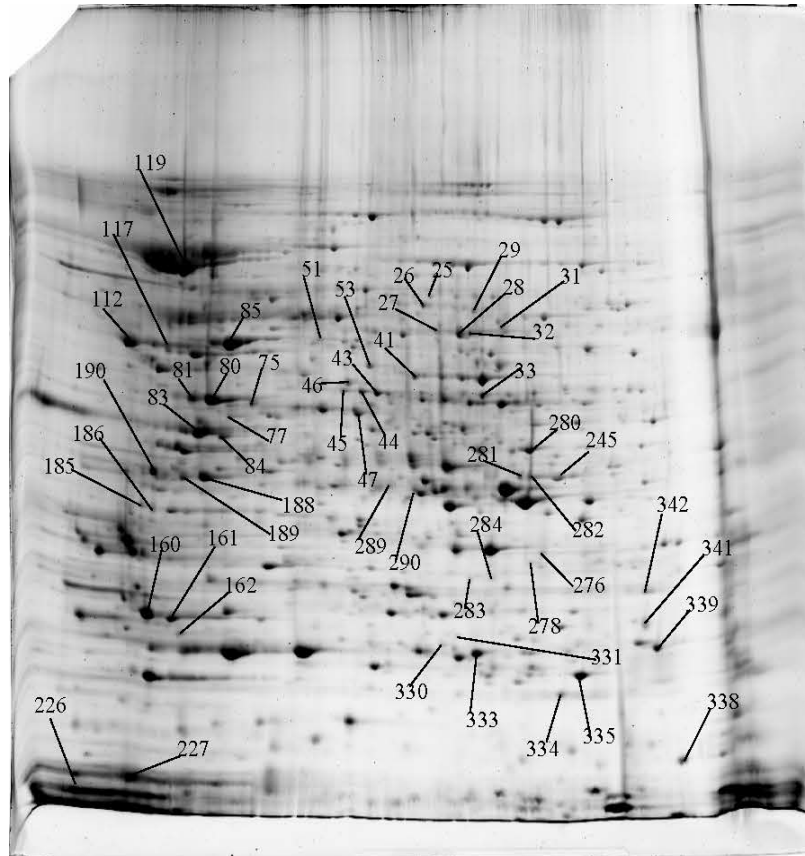


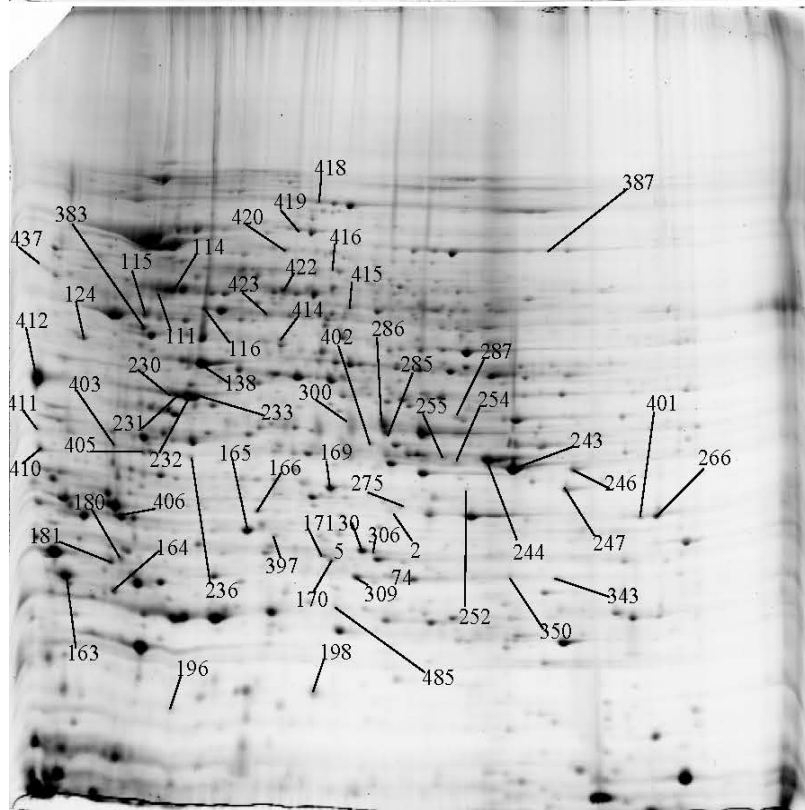
Figura 21. A Proteoma de *Phycomyces blakesleeanus*, los números señalan las proteínas identificadas mediante EM MALDI TOF-TOF.

3 → pH 11

B



C



**FIGURA 21 .B y C** Proteoma de *Phycomyces blakesleeanus*, los números señalan las proteínas identificadas mediante EM MALDI TOF-TOF.





Con el fin de realizar una descripción más profunda de las proteínas identificadas se realizó búsquedas individuales para las mismas en la base de datos del genoma de *Phycomyces* y se obtuvieron los datos correspondientes a las siguientes anotaciones ontológicas (función molecular, Grupos de proteínas ortólogos en eucariotas, categoría de proteínas ortólogos en eucariotas). En la figura 22 aparece un esquema de la distribución de las proteínas identificadas en función de función molecular. En la figura 23 se detalla la distribución de las proteínas en función grupos de proteínas ortólogos en eucariotas. Finalmente, en la figura 24 se detalla la distribución de las proteínas en función categoría de proteínas ortólogos en eucariotas.

Tal y como se refleja en la introducción de esta memoria, *Phycomyces blakesleeanus* ha sido una referencia en el estudio de las respuestas ambientales dada su sensibilidad a la luz y la facilidad de creación de mutantes debido a sus condiciones genéticas. Durante los últimos 8 años se ha estudiado su genoma de modo que en la actualidad existe una base de datos de dominio público (<http://genome.jgi.doe.gov/Phybl2/Phybl2.home.html>) y se han generado numerosas publicaciones en torno a la investigación de su material genético entre las cuales destaca el trabajo en el que se describe el genoma completo (Corrochano et al., En preparación) en el que ha construido de forma importante nuestro grupo de investigación.

Sin embargo, el proteoma de *Phycomyces blakesleeanus* no ha sido apenas abordado, ni tampoco el de algunos hongos de la misma familia cuyo genoma está descrito desde hace más tiempo. En el caso de *Mucor circinelloides* se han descrito algunas proteínas del secretoma (Wei et al., 2013). Por otra parte, en el caso de *Blakeslea trispora* se ha evaluado el efecto que el ácido trispórico puede tener en el proteoma del hongo (Sun et al., 2012). En ninguno de los dos casos se abordó el estudio del proteoma completo de los hongos a estudio.

De este modo consideramos de gran relevancia el afrontar el estudio del proteoma completo de *Phycomyces blakesleeanus* por ser el primero que se realiza en esta familia de hongos y coincidiendo en el tiempo con la publicación del genoma completo de *Phycomyces blakesleeanus*. Este trabajo facilitará estudios posteriores que puedan investigar cambios en el proteoma en distintas condiciones así como establecer una referencia para la comparación con otro tipo de hongos de similares características.

## FUNCIÓN MOLECULAR

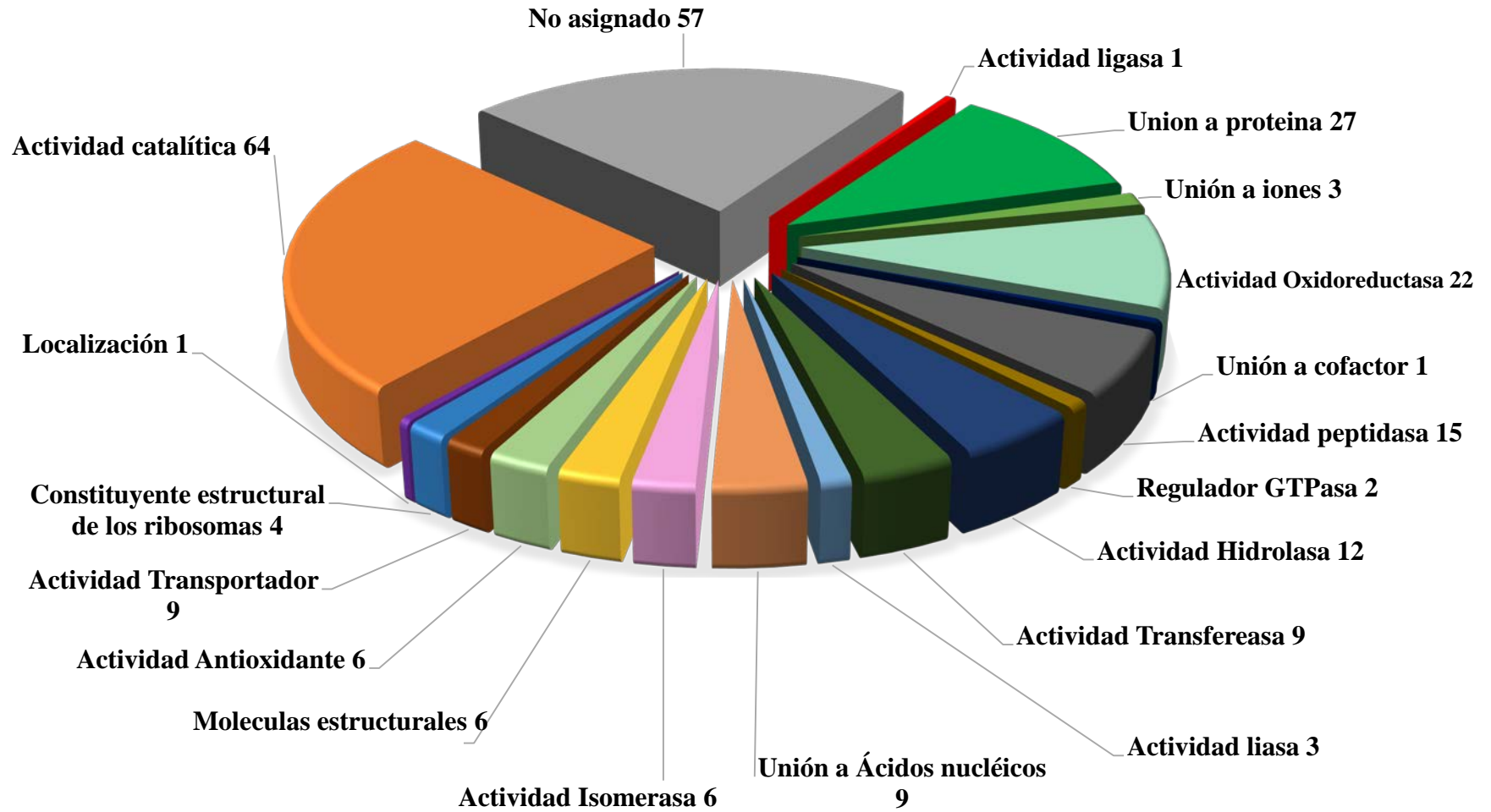
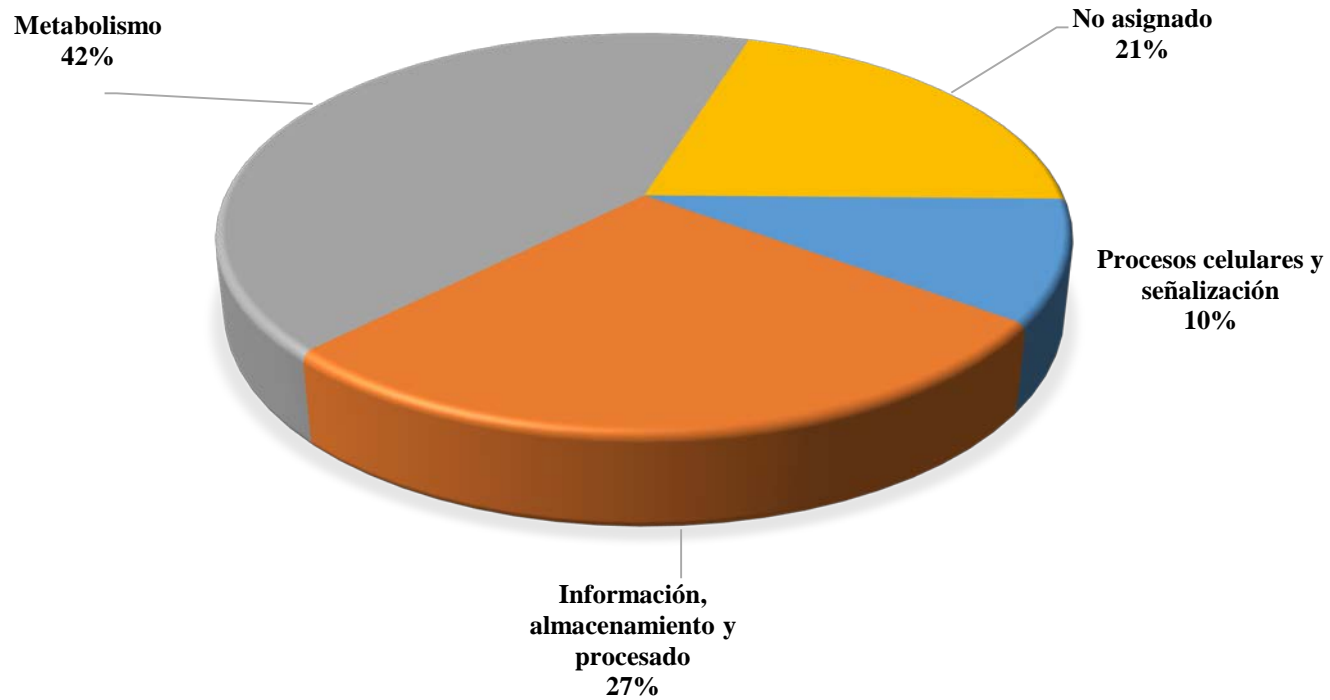


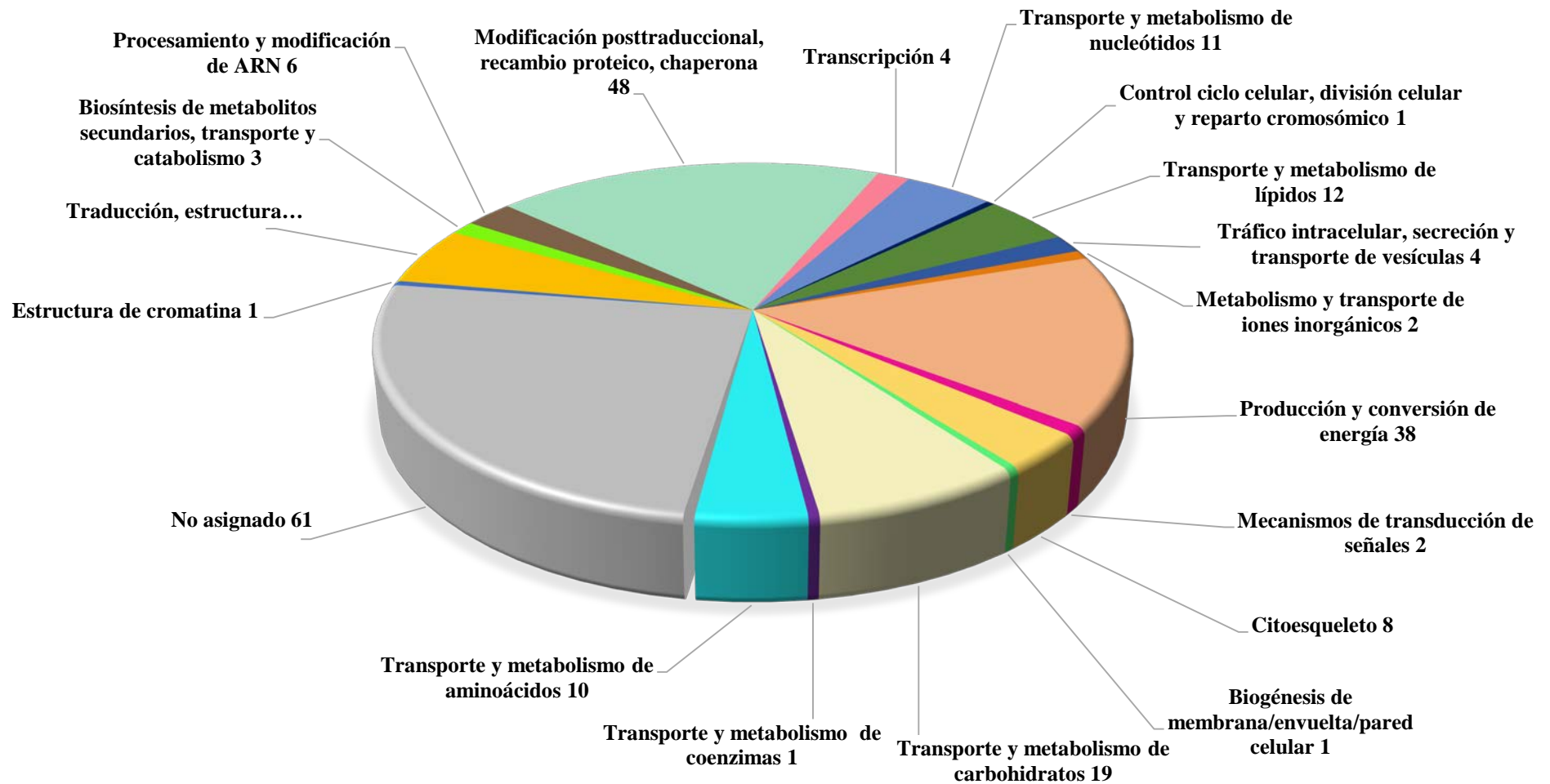
FIGURA 22. Distribución de las proteínas atendiendo a su función molecular.

## GRUPOS DE PROTEÍNAS ORTÓLOGOS EN EUCARIOTAS



**FIGURA 23.** Distribución de las proteínas en función de categoría de proteínas ortólogos en eucariotas.

## CATEGORÍA DE PROTEÍNAS ORTÓLOGOS EN EUCARIOTAS



**FIGURA 24.** Distribución de las proteínas en función de categoría de proteínas ortólogos en eucariotas.

### **4.3 Estudio de las diferencias en el perfil proteico entre distintas condiciones experimentales.**

*Phycomyces* es considerado como un organismo modelo para el estudio de las respuestas a la luz, por tal motivo, durante varias décadas se han aislado varios mutantes alterados en distintas fotorrespuestas. Recientemente, con la publicación del genoma de *Phycomyces* (Corrochano et al., en proceso de publicación) se han caracterizado los genes alterados en varios de estos mutantes ciegos. Este es el caso de los mutantes *madA*, *madB* y *madC*. Los mutantes *madA* y *madB* están alterados en genes homólogos a los genes *wc-1* y *wc-2*, respectivamente, de *Neurospora crassa* (genes fundamentales para todas las fotorrespuestas en este hongo). El mutante *madC* está alterado en el gen *Ras-GAP* que interviene en la señalización Ras de las respuestas de fototropismo y ritmo circadiano en hongos.

Se recogieron muestras de micelio de la estirpe silvestre NRRL1555y de los mutantes *madA*, *madB* y *madC* crecidos en medio SIV líquido en condiciones tanto de iluminación como de oscuridad continua según se ha descrito en el apartado 3.3. A partir de los micelios así obtenidos se llevaron a cabo extracciones de proteínas totales según se desarrolla en el apartado 3.6 de Materiales y Métodos. Para cada condición experimental se obtuvieron cuatro extractos proteicos distintos. Los extractos así obtenidos se cuantificaron utilizando el método Bradford y se procedió a la realización de las electroforesis 2D comparativas con 0.1 mg del extracto proteico correspondiente a cada muestra, en total se realizaron cuatro electroforesis por cada muestra y condición experimental. El valor de expresión relativo de cada proteína se obtuvo mediante el análisis de intensidad de cada spot con el programa ImageMaster 2D Platinum (versión 7) según se describe en el apartado 3.7.4 Con el fin de encontrar diferencias estadísticamente significativas entre las distintas condiciones de estudio, se llevó a cabo un análisis estadístico empleando el test de la ANOVA en el que se comparó para cada proteína de cada muestra y cada condición experimental los valores obtenidos en las cuatro electroforesis de la condición 1 con los valores obtenidos en las cuatro electroforesis de la condición 2. En primer lugar, se llevó a cabo una comparación entre las condiciones de luz y oscuridad tanto para el tipo silvestre (NRRL1555) como para los mutantes anteriormente descritos. Aquellas proteínas en las que se detectaron

diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) entre las dos condiciones de análisis se marcaron para su posterior aislamiento e identificación a partir de electroforesis preparativas con 1 mg de cada muestra y posterior análisis tras digestión trípica mediante EM MALDI TOF-TOF según se describe en el apartado 3.8. Para detectar posibles diferencias en los patrones de expresión proteica entre la estirpe tipo silvestre y cada mutante se llevaron a cabo comparaciones entre las electroforesis del tipo silvestre y de cada una de las estirpes mutantes. Estas comparaciones se realizaron por un lado en los micelios crecidos con iluminación continua y por otro lado en los micelios crecidos en oscuridad total. Las proteínas con expresión diferencial así detectadas fueron aisladas e identificadas como se describe en el apartado anterior. Finalmente, para detectar las posibles diferencias debidas a las condiciones de crecimiento, se realizaron cultivos del tipo silvestre (NRRL1555) en medio sólido separando la fracción de micelio y la de los esporangióforos. Con los extractos proteicos obtenidos a partir de estas muestras se llevaron a cabo electroforesis 2D y se procedió a la comparación entre las muestras de micelio crecidas en luz vs las muestras de micelio crecidas en oscuridad. Por otro lado se compararon las muestras de esporangióforos crecidas en luz vs las crecidas en oscuridad. Además, para detectar las diferencias entre el crecimiento en micelio y en esporangióforo se llevaron a cabo comparaciones entre ambas muestras obtenidas en condiciones de iluminación, así como comparaciones entre ambas muestras obtenidas en condiciones de oscuridad continua. Como en los casos anteriores las proteínas para las que se detectó una expresión diferencial en los geles comparativos fueron aisladas e identificadas como se describe en el apartado anterior.

#### **4.3.1 Comparación entre micelios de la estirpe silvestre (NRRL1555) crecidos en medio líquido en condiciones de iluminación vs condiciones de oscuridad.**

En esta comparación se utilizó el micelio de la estirpe silvestre (NRRL 1555) cultivado en el medio SIV líquido en 2 condiciones diferentes, luz y oscuridad. Se detectaron un total de 13 proteínas con expresión diferencial entre las dos condiciones analizadas, 7 de ellas se expresaron más en el cultivo de luz y el resto en el cultivo de

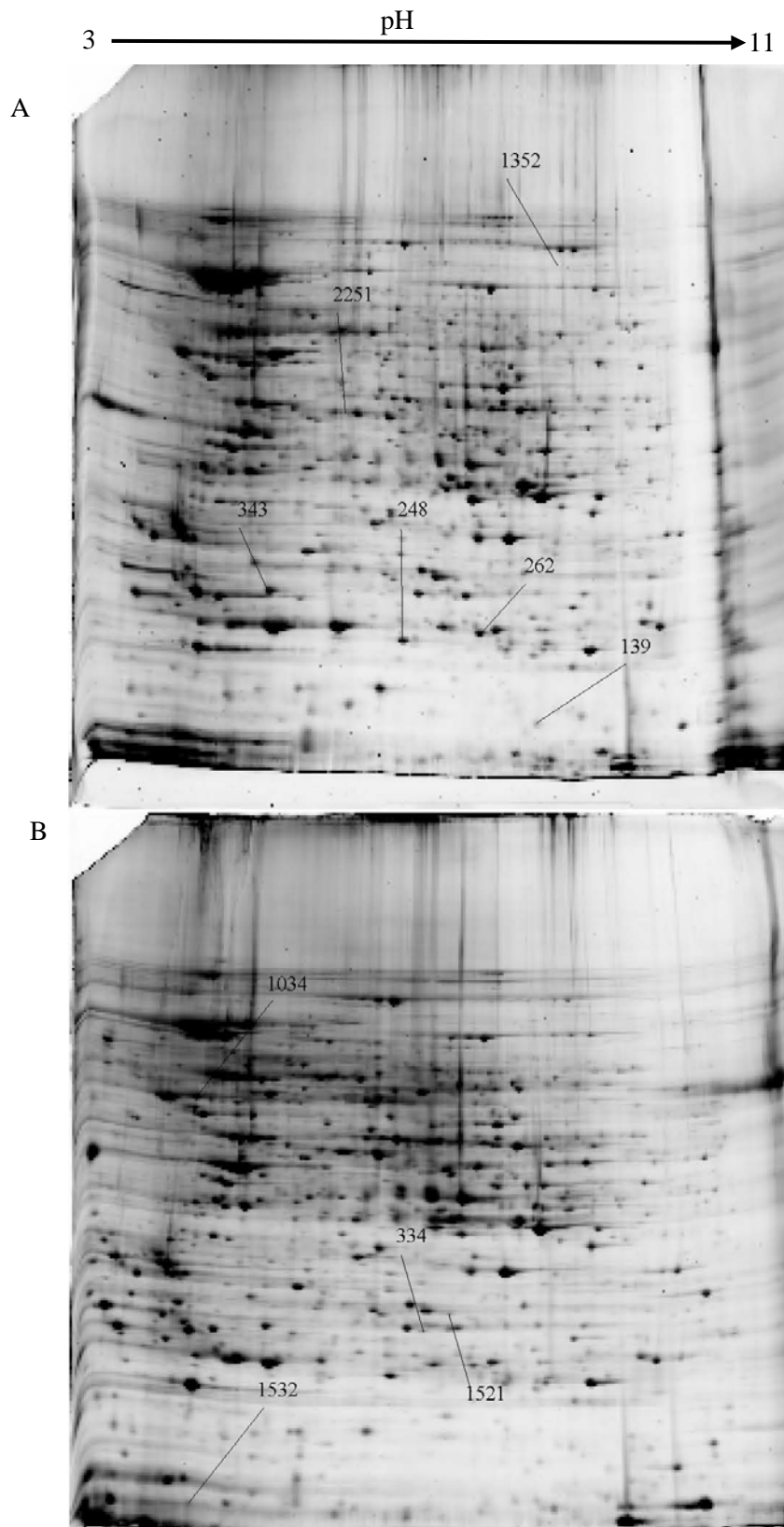
oscuridad. Se identificaron 10 proteínas diferenciales que aparecen representadas en la figura 25. Los datos correspondientes de la identificación aparecen en la tabla 7.

Entre las 10 proteínas identificadas con expresión diferencial entre las condiciones de luz y oscuridad en el tipo silvestre se encuentran 4 proteínas con una posible función reguladora ya que llevan a cabo modificaciones postraduccionales que podrían depender de la condición lumínica. Más concretamente estas proteínas son las descritas como “*Putative 26S protease regulatory subunit 6A*” (ID74407), “*peptidyl-prolyl cis-trans isomerase h*” (ID126634), “*uracil phosphoribosyl transferase*” (ID131254) y “*Proteasome subunit alpha type-2*” (ID176667).

La proteína 74407 tiene la actividad ATPasa y es la subunidad reguladora de la proteasa 26S, esta proteasa es la que regula la degradación de las proteínas intracelulares en eucariotas, tiene una estructura altamente conservada entre los eucariotas. La proteasa 26S está implicada en la degradación dependiente de ATP de las proteínas ubiquitinadas.

Además de las proteínas anteriormente descritas se ha identificado en este apartado la proteína 116781 que es una *citocromo C oxidasa* que se expresa significativamente más en oscuridad que en luz, esta proteína interviene en el transporte de electrones y en la producción de energía por lo que no es de extrañar que su expresión esté regulada por la luz. Esta enzima es un complejo enzimático oligomérico que a su vez es un componente del complejo de la cadena respiratoria que está implicado en la transferencia de los electrones del citocromo C a oxígeno. En eucariotas este complejo enzimático se localiza en la membrana mitocondrial interna.

También encontramos en este apartado a la proteína 108829 que es una *proteína de segregación nuclear Bfr1* que está implicada en la regulación de la división meiótica nuclear y varias proteínas implicadas en el metabolismo como son la 122026 (con actividad catalítica en la biosíntesis de manosa) que es la enzima *fosfomanomutasa* que está implicada en la síntesis de *GDP-manosa* y *dolicol-manosa-fosfato* que son cruciales para numerosas reacciones de la transferencia de manosa. Otras son la 157044 (implicada en el transporte de electrones), la 178542 (actividad citoplásmica en el procesado de purinas) y la 127075 (con actividad hidrolasa sobre enlaces carbono-nitrógeno).



**FIGURA 25.** A y B representan las proteínas analizadas de la comparación entre tipo silvestre cultivado en las condiciones de luz (A) frente a oscuridad (B). Los números marcan las proteínas identificadas que tienen expresión diferencial en esa condición.



**TABLA 7.** Proteínas con expresión diferencial identificadas en la comparación del tipo silvestre en condiciones de luz frente a oscuridad.

Nº de Proteína	ID	Nombre de Proteína	SilvLuz	SilvOsc	Anova	SCORE	Peptidos
1034	74407	26S protease regulatory subunit 6A [ <i>Mucor circinelloides</i> ]	0,045	0,118	0,017	67	6, 1
1352	108829	Nuclear segregation protein Bfr1 [ <i>Mucor ambiguus</i> ]	0,011	0,004	0,018	84	2, 1
1532	116781	Cytochrome c oxidase subunit 5b [ <i>Mucor circinelloides</i> ]	0,007	0,063	0,007	105	2, 1
1521	122026	Phosphomannomutase [ <i>Lichtheimia corymbifera</i> ]	0,009	0,067	0,015	69	3, 1
139	126634	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase h [ <i>Lichtheimia corymbifera</i> ]	0,041	0,027	0,012	67	1, 1
2251	127075	Composite domain of metallo-dependent hydrolase [ <i>Mucor ambiguus</i> ]	0,018		0,028	95	1, 1
262	131254	Uracil phosphoribosyltransferase [ <i>Lichtheimia corymbifera</i> ]	0,124	0,078	0,031	134	3, 1
866	157044	Saccharopine dehydrogenase [NAD(+), L-lysine-forming] [ <i>Mucor circinelloides</i> ]	0,009	0,022	0,044	62	5, 0
343	176667	Proteasome subunit alpha type-2 [ <i>Mucor circinelloides</i> ]	0,210	0,114	0,000	98	7, 1
334	178542	Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase [ <i>Lichtheimia corymbifera</i> ]	0,009	0,004	0,022	90	3, 1

### **4.3.2 Comparación entre micelios de la estirpe *madA* crecidos en medio líquido en condiciones de iluminación vs condiciones de oscuridad.**

El mutante *madA*, como se describió en la introducción, es un mutante que pertenece al tipo 1 de los mutantes ciegos en los que la alteración está al principio de la ruta sensorial. Los resultados obtenidos en la comparación de los niveles de expresión proteica entre el mutante *madA* en luz y en oscuridad mostraron un total de 34 proteínas con expresión diferencial de las cuales 20 han podido ser identificadas. De esa cantidad se observó que 18 proteínas se expresaron más en la luz mientras que el resto tienen una expresión mayor o solamente se han expresado en oscuridad. Tras la realización de geles preparativos, aislamiento y la posterior digestión y análisis mediante EM MALDI TOF-TOF del total de 34 proteínas expresión diferencial se lograron identificar 20 proteínas.

En la figura 26 se muestran los geles preparativos que se utilizaron tras el análisis de comparación y aparecen señaladas las 20 proteínas con expresión diferencial. Los datos relativos a la identificación se reflejan en la tabla 8. Los mutantes *madA* fueron aislados hace 50 años y se caracterizan por presentar una pérdida severa de la capacidad de respuesta a la luz que se refleja en una gran alteración de la mayor parte de las fotorrespuestas (Bergman et al., 1973).

Recientemente se ha caracterizado el gen alterado en esta estirpe (Idnurm et al., 2006) que se corresponde a un gen homólogo al gen *white collar 1 (wc1)* de *N. crassa* (homólogo que regula también gran parte de las respuestas a la luz en este hongo) y codifica una proteína con función de fotorreceptor y factor transcripcional. Por este motivo, no es de extrañar que la mutación *madA* que condiciona en gran medida las fotorrespuestas en *Phycomyces* dé lugar a una alteración de los patrones de expresión de varias proteínas.

Entre las proteínas que presentan expresión diferencial en el mutante *madA* cabe destacar por su posible relación con la regulación ejercida por la luz las proteínas con ID 29315 y 74362, ambas con una expresión significativamente superior en luz que en

oscuridad. Estas proteínas están implicadas en procesos de señalización celular a través de modificaciones postraduccionales, recambio de proteínas y actuación como Chaperonas. En el caso de la 29315 se trata proteína con actividad *glutación peroxidasa* que interviene en la respuesta al estrés oxidativo y cataliza la reacción de oxidación de glutación a glutación disulfuro utilizando el peróxido de hidrógeno la enzima *glutación peroxidasa* usa como cofactor el selenio. Por su parte la proteína 74362 tiene actividad *peptidil propil cis-trans isomerasa* y actuaría controlando el plegamiento, ensamblaje y transporte celular de otras proteínas. Es interesante señalar que una proteína (*peptidil propil cis-trans isomerasa*) con una función similar pero con distinto ID (126634) ha sido identificada como diferencialmente expresada entre luz y oscuridad en el tipo silvestre (ver sección 3.2.1), además en ambos casos (tanto en el tipo silvestre como en el mutante *madA*) estas proteínas análogas están significativamente más expresadas en luz que en oscuridad. Esta coincidencia observada en dos estirpes distintas y por lo tanto en dos fondos genéticos distintos parece confirmar un posible papel regulador de la luz sobre estas proteínas, que a su vez podrían actuar regulando la expresión de otras proteínas de la cadena de transmisión de señales.

Entre las proteínas con expresión diferencial en el mutante *madA* encontramos también varias proteínas implicadas en mecanismos de regulación a través del procesamiento y modificación de ácidos nucleicos que presentan una expresión significativamente mayor en la luz que en oscuridad. Este es el caso de la 132231 que codifica la *subunidad Rpb11 de la ARN polimerasa II dirigida por ADN*, la enzima ARN polimerasa II es un complejo multienzimático de 12 subunidades, que está implicado en el proceso de control de la transcripción. La subunidad *Rpb11* contiene el dominio *Rpb11* que se requiere para la dimerización y unión a la región homóloga en la subunidad *Rpb3*.

La proteína 148109 es un *factor de splicing alternativo SRp20* que participa también en mecanismos de procesamiento y modificación del RNA. La 69141 que es una *ribonucleasa t2*, que interviene igualmente en el procesamiento y modificación del RNA, probablemente está implicada en la degradación lisosomal de ARN ribosomal. La 166257 es una proteína que contiene un dominio de unión a RNA y se une a ARNs. Algunas de las proteínas de unión a ARN de una sola hebra pertenecen a la familia eucariótica “M” (RRM) que contienen la secuencia RNP-1 que es una secuencia de consenso de 8 aminoácidos. Las proteínas RRM tienen una variedad de preferencia y

funciones de unión a ARN, están implicadas en la regulación de *splicing* alternativo, son componentes proteicos de las ribonucleoproteínas nucleares y las proteínas que regulan la estabilidad y traducción de ARN.

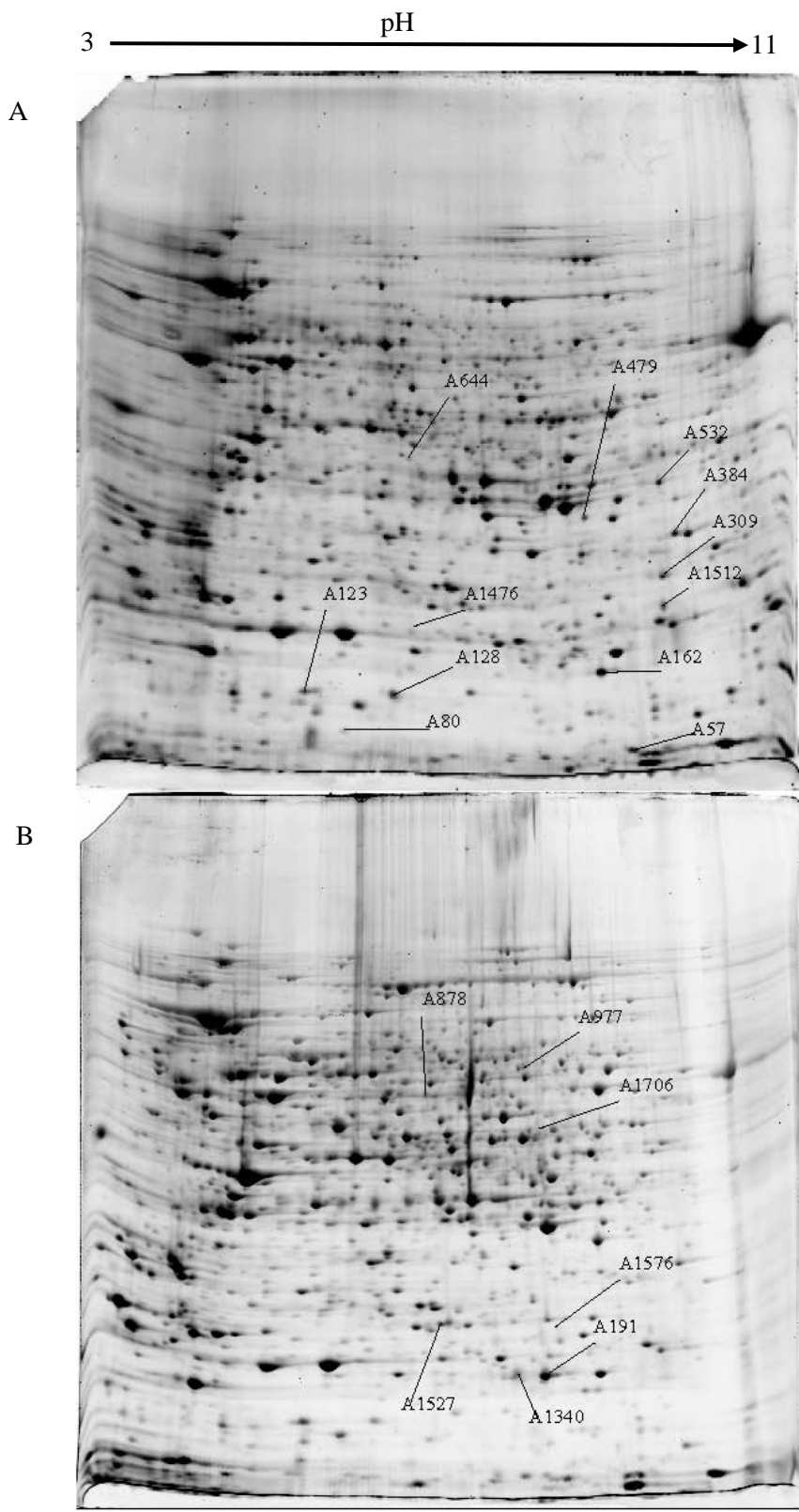
En este grupo de proteínas con expresión diferencial en el mutante *madA* se encuentran también las proteínas *117188* y *181278* que codifican una *N-acetiltransferasa* y una *metiltransferasa* respectivamente por lo que podrían influir en el control epigenético de la expresión génica en este mutante atendiendo a la condición lumínica. Estas dos proteínas presentan una expresión significativamente mayor en la luz que en la oscuridad.

Las proteínas restantes identificadas por su expresión diferencial en esta comparación están implicadas en su mayor parte en distintos procesos del metabolismo como en el transporte y metabolización de lípidos (*127551*, *77971*), carbohidratos (*127864*, *76956*) o aminoácidos (*123781*, *13050*).

La proteína *94086* es la *universal stress protein A-like* que presenta el dominio que se encuentra en la proteína “*Universal stress protein UspA*”, la expresión de esta proteína se aumenta cuando en organismo está expuesto a agentes de estrés. Dicha proteína aumenta la supervivencia del organismo o la célula durante la exposición prolongada a agentes de estrés. La proteína *98645* es una *serina proteasa autofágica alp2*, que es una endopeptidasa que está implicada en modificaciones postraduccionales

Al comparar las proteínas con expresión diferencial entre la luz y la oscuridad identificadas en el tipo silvestre con las identificadas en esta misma comparación en el mutante *madA* cabe destacar, en primer lugar, que las 10 proteínas con expresión diferencial encontradas en el tipo silvestre (ver sección 4.3.1) no han sido detectadas como diferencias en el mutante *madA*. Este resultado indica que esta regulación ejercida por la condición lumínica en condiciones normales (en el tipo silvestre) parece haberse perdido completamente en el mutante *madA*.

Además observamos que en el mutante *madA* aparecen 20 proteínas con expresión diferencial que no aparecían en el tipo silvestre con expresión diferencial, lo que parece confirmar el hecho de que en la mutación en este gen tiene un efecto fundamental en la regulación de la expresión génica por la luz en este hongo, provocando cambios en distintas vías de señalización celular.



**FIGURA 26.** A y B muestran las proteínas diferenciales identificadas entre mutante *madA* cultivado en luz (A) versus la misma estirpe cultivado en oscuridad (B). Los números marcan las proteínas identificadas que tienen expresión diferencial en esa condición.

**TABLA 8.** Análisis de las proteínas diferenciales de la comparación entre mutante *madA* cultivado en luz y oscuridad.

Nº De Proteína	ID	Nombre de Proteína	MutA Luz	MutA Osc	Anova	SCORE	Peptid
A128	29315	Glutathione peroxidase [ <i>Mucor circinelloides</i> ]	0,175	0,101	0,003	89	4, 1
A309	69141	Ribonucleace t2 [ <i>Lichtheimia corymbifera</i> y <i>Mucor</i> ]	0,104	0,028	0,001	136	3, 2
A1706	74362	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase [ <i>Lichtheimia corymbifera</i> ]		0,030	0,000	68	2, 1
A644	76956	Glyceraldehyde-3-phphate dehydrogenase 3 [ <i>Mucor circinelloides</i> ]	0,025	0,013	0,004	91	4, 1
A1512	77484	Hypothetical protein HMPREF1544_05024 [ <i>Mucor circinelloides</i> ]	0,101	0,049	0,002	120	4, 2
A532	77971	Peroxisomal multifunctional enzyme [ <i>Mucor ambiguus</i> ]	0,082	0,047	0,001	324	9, 3
A1340	94086	Universal stress protein A-like protein-like [ <i>Mucor ambiguus</i> ]	0,070	0,136	0,002	58	5, 0
A191	94086	Universal stress protein A-like protein-like [ <i>Mucor ambiguus</i> ]	0,046	0,185	0,003	196	5, 2
A479	98645	Autophagic serine protease alp2 [ <i>Lichtheimia corymbifera</i> ]	0,058	0,031	0,003	113	1, 1
A57	102610	Secreted protein [ <i>Mucor ambiguus</i> ]	0,128	0,030	0,007	119	2, 1
A162	117188	Glucamine 6-phphate [ <i>Lichtheimia corymbifera</i> ]	0,182	0,098	0,008	116	4, 1
A878	123781	Aspartyl aminopeptidase [ <i>Mucor ambiguus</i> ]	0,021	0,035	0,004	205	4, 3
A384	127551	3-oxoacyl-[acyl-carrier protein] reductase [ <i>Mucor circinelloides</i> ]	0,111	0,045	0,002	118	4, 2
A1527	127864	6-phphogluconolactonase [ <i>Rhizopus delemar</i> ]	0,017	0,043	0,000	88	3, 1
A433	130500	Spermidine synthase [ <i>Mucor circinelloides</i> ]	0,041	0,074	0,008	155	6, 2
A80	132231	DNA-directed RNA polymerase II subunit RPB11 [ <i>Mucor circinelloides</i> ]	0,034	0,019	0,002	68	2, 1
A1576	148109	Alternative splicing factor SRp20/9G8 [ <i>Mucor ambiguus</i> ]		0,019	0,000	57	2, 1
A123	166257	RNA-binding domain-containing protein [ <i>Mucor ambiguus</i> ]	0,091	0,040	0,003	121	8, 1
A1476	181278	Methyltransferase [ <i>Mucor ambiguus</i> ]	0,020	0,005	0,002	82	3, 1
A977	181427	UTP-glucose-1-phphate uridylyltransferase [ <i>Mucor ambiguus</i> ]	0,033	0,059	0,005	195	12, 2

### **4.3.3 Comparación entre micelios de la estirpe tipo silvestre crecidos en medio líquido en condiciones de iluminación vs micelios de la estirpe *madA* crecidos en condiciones de iluminación.**

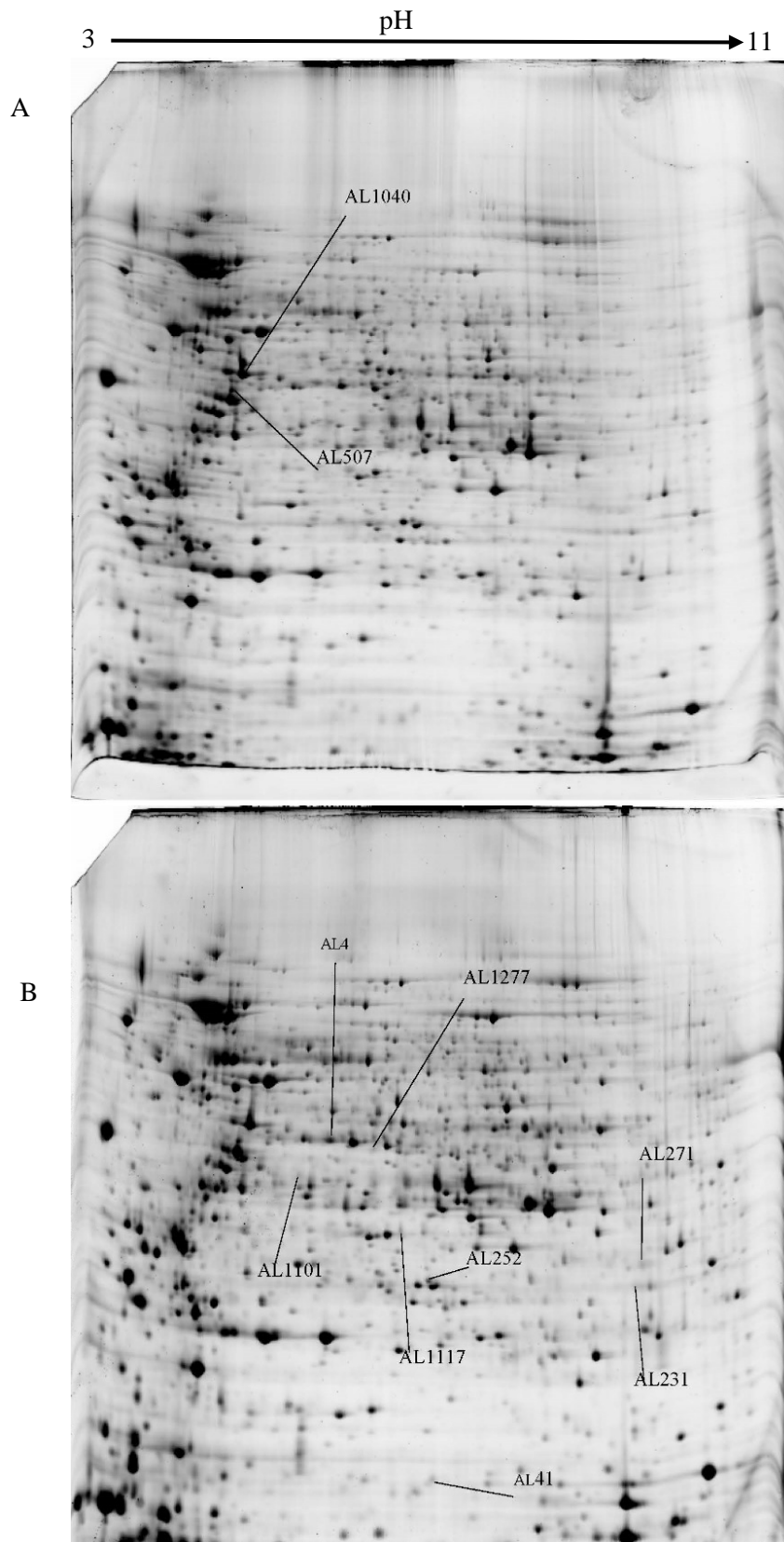
Esta comparación se realizó entre la estirpe *madA* cultivada en el medio SIV líquido condiciones de luz y el tipo silvestre (NRRL1555) cultivado en el medio SIV líquido en condiciones de luz, por lo que nos permite identificar las posibles diferencias de expresión debidas a la mutación *madA* en la condición de crecimiento en iluminación.

Se detectaron un total de 57 proteínas con diferencias estadísticamente significativas en los valores de expresión entre ambas condiciones. Entre ellas 2 proteínas solamente se expresaron en el mutante *madA* y no en el tipo silvestre, 43 proteínas estuvieron más expresadas en el mutante *madA* que en el tipo silvestre, 3 proteínas sólo se han expresado en el tipo silvestre, y 9 proteínas mostraron mayor expresión en el tipo silvestre que en el mutante *madA*.

Se identificaron 8 proteínas mediante el análisis EM MALDI TOF-TOF. Las proteínas diferenciales aparecen representadas en la figura 27. Los datos correspondientes de la identificación EM MALDI TOF-TOF aparecen reflejados en la tabla 9.

Entre las proteínas con expresión diferencial en iluminación entre el tipo silvestre y el mutante *madA* cabe destacar las proteínas con ID *177616* y *135540* ya que ambas intervienen en procesos de señalización celular.

En el caso de la proteína *177616*, que apareció con una expresión significativamente mayor en el mutante *madA* que en el tipo silvestre, la función atribuida es una *uracilo forforibosil transferasa 1* involucrada en mecanismos de transducción de señales, esta proteína cataliza la conversión de la uracilo y 5-fosfo- $\alpha$ -D-ribosa 1-difosfato (PRPP) a uridina mono fosfato (UMP) y difostato y está implicada en el paso 1 de sub-ruta de la síntesis de UMP a partir de uracilo. Dicha proteína tiene importancia en la vía de salvamento de pirimidina (Li et al., 2007).



**FIGURA 27** .A y B muestran las proteínas diferenciales identificadas entre el tipo silvestre cultivado en iluminación (A) versus el mutante *madA* cultivado en iluminación (B). Los números marcan las proteínas identificadas que tienen expresión diferencial en esa condición.



**TABLA 9.** Proteínas diferenciales entre tipo silvestre cultivado en iluminación versus el mutante *madA* cultivado en

<b>Nº De Proteína</b>	<b>ID</b>	<b>Nombre De Proteína</b>	<b>MutA Luz</b>	<b>Del Luz</b>	<b>Anova</b>	<b>SCORE</b>	<b>Peptidos</b>
AL41	79926	U2 small nuclear ribonucleoprotein B'' [ <i>Mucor circinelloides</i> ]	0,089	0,023	0,010	162	3, 1
AL252	107085	Enoyl-CoA hydratase [ <i>Mucor circinelloides</i> ]	0,085	0,047	0,008	179	6, 2
AL1101	112334	Cyclase protein [ <i>Lichtheimia corymbifera</i> ]	0,026	0,015	0,004	123	5, 2
AL1277	131941	Ornithine carbamoyltransferase [ <i>Mucor ambiguus</i> ]	0,028	0,014	0,017	71	0, 1
AL4	134993	Glutamine synthetase [ <i>Lichtheimia corymbifera</i> ]	0,166	0,109	0,024	67	2, 1
AL1040	135540	Gamma-actin [ <i>Blakeslea trispora</i> ]	0,396	0,688	0,006	173	6, 2
AL271/231	177616	Uracil phosphoribosyltransferase 1 [ <i>Mucor circinelloides</i> ]	0,052	0,022	0,026	37	0, 1
AL507	186453	Keto-acid reductoisomerase, mitochondrial [ <i>Mucor circinelloides</i> ]	0,078	0,133	0,024	171	6, 3

En el caso de la *135540*, se trata de una proteína del citoesqueleto, la *Gamma actina*, que aparece significativamente más expresada en el tipo silvestre. Está implicada en la formación de los filamentos de actina, esenciales para citoesqueleto, la movilidad celular y citocinesis. Se ha mostrado que el dominio de ATPasa de actina tiene semejanza con el dominio ATPasa de las proteínas hexokinasa y hsp70 (Flaherty et al., 1991).

Además, hemos identificado con expresión diferencial la proteína *79926* que es una ribonucleoproteína que interviene en el procesamiento y modificación de RNA específicamente en *splicing* del precursor de ARNm (pre-mRNA) por lo que podría tener un posible papel regulador en la oscuridad que estaría alterado en el mutante *madA*. Al presentar esta proteína niveles de expresión significativamente mayores en este mutante que en el tipo silvestre. Esta proteína comparte el dominio de reconocimiento de ARN con la proteína *166257* de la comparación anterior (Bandziulis et al., 1989) (Sección 4.2.2).

El resto de proteínas con expresión diferencial identificadas en esta comparación intervienen en distintos procesos metabólicos como el transporte y metabolismo de lípidos (*107085*) o de aminoácidos (*131941*, *134993* y *186453*).

#### **4.3.4 Comparación entre micelios de la estirpe tipo silvestre crecidos en medio líquido en condiciones de oscuridad vs micelios de la estirpe *madA* crecidos en condiciones de oscuridad.**

Esta comparación se realizó entre estirpe *madA* cultivada en el medio SIV líquido en la condición de oscuridad y la estirpe NRRL1555 (tipo silvestre) cultivado en el medio SIV en la condición de oscuridad, por lo que nos permite identificar las posibles diferencias de expresión debidas a la mutación *madA* en la condición de crecimiento en oscuridad continua.

Se detectaron un total de 52 proteínas con expresión diferencial entre estas dos condiciones. Entre ellas 13 proteínas solamente se expresaron en el mutante *madA* y no en el tipo silvestre, 25 proteínas estuvieron más expresadas en el mutante *madA* que en el tipo silvestre, 8 proteínas sólo se han expresado en el tipo silvestre, y 6 proteínas mostraron mayor expresión en el tipo silvestre que en el mutante *madA*.

Mediante el análisis de EM MALDI TOF-TOF se identificaron 9 de estas proteínas, las cuales aparecen marcadas en la figura 28 y los resultados correspondientes de este análisis aparecen reflejados en la tabla 10.

Entre las proteínas con expresión diferencial en iluminación entre el tipo silvestre y el mutante *madA* cabe destacar por su posible relación con la regulación ejercida por la condición lumínica las proteínas con ID *16437*, *136854*, *181959* y *135540* ya que todas ellas intervienen en procesos de señalización celular.

En el caso de la proteína *16437*, que apareció con una expresión significativamente mayor en el mutante *madA* que en el tipo silvestre, la función atribuida es regular la respuesta sensorial a través del sistema de dos componentes de transmisión de señales.

La proteína *136854* es una *proteína nuclear de unión a GTP* que participa en los mecanismos de transducción de señales mediados por GTPasa, esta proteína también presentó una expresión significativamente mayor en el mutante *madA*.

La proteína *181959* contiene un dominio regulador del proteasoma *pi31* que parece estar implicado en la transmisión de señales mediante modificaciones postraduccionales, recambio de proteínas y actuación como chaperonas; esta proteína también presentó una expresión significativamente mayor en el mutante *madA*.

Finalmente la proteína *135540* codifica una *gamma actina* que participa en la señalización celular mediante la unión a otras proteínas, esta proteína al contrario que las anteriores, se encontró más expresada en el tipo silvestre que en el mutante *madA*.

Además, hemos identificado con expresión diferencial las proteínas con ID *30142* y *121375* que intervienen en el procesamiento y modificación de ácidos

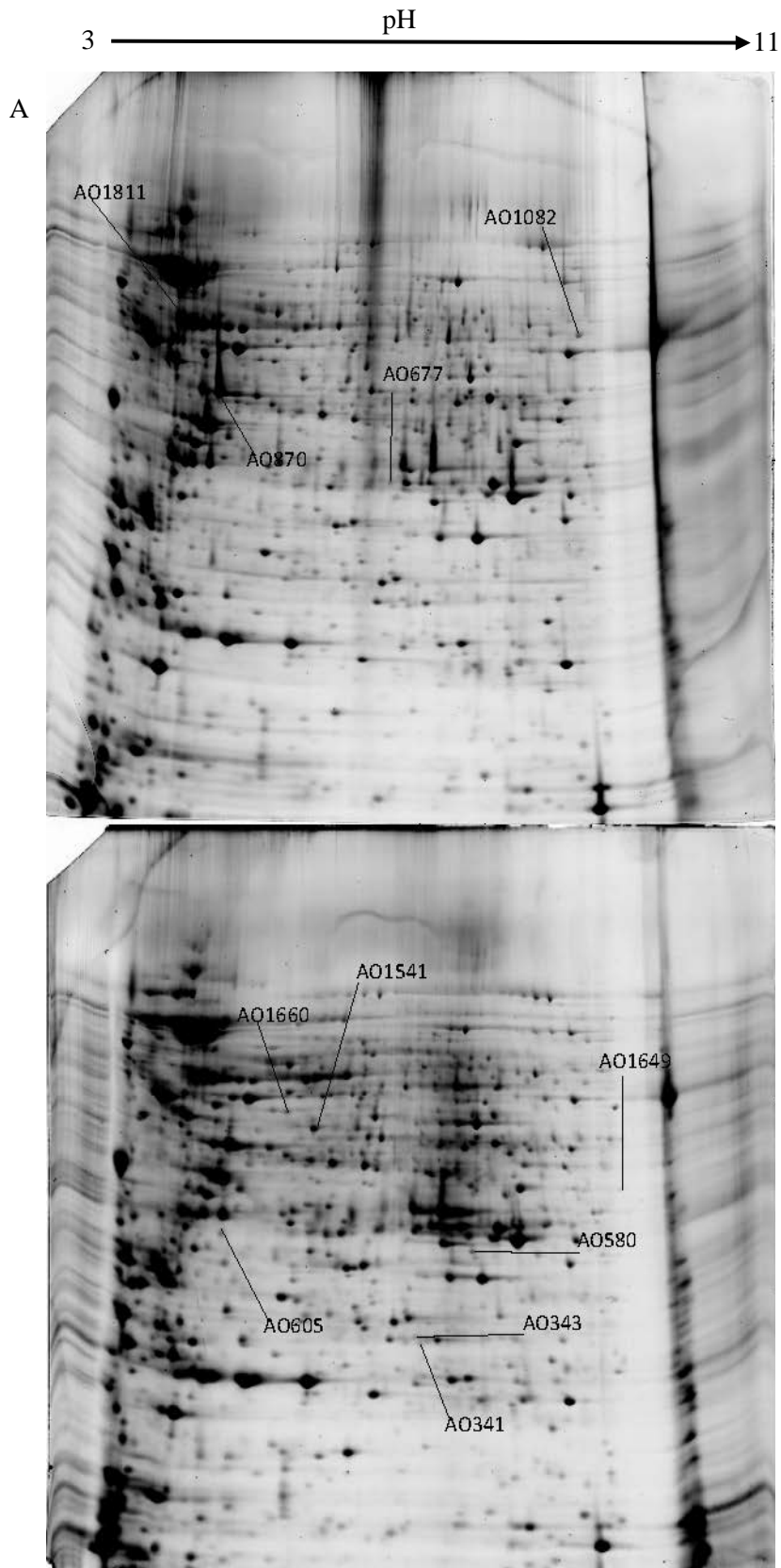
nucleicos y por lo tanto podrían tener un posible papel regulador en esta condición de crecimiento en oscuridad continua. La proteína 30142 es una *proteína MutT de reparación de errores en el ADN* cuya expresión es significativamente inferior en el mutante *madA*. En los organismos los niveles espontáneos de las mutaciones se controlan por varios mecanismos de reducciones de error, *MutT* es un componente importante para evitar las replicaciones erróneas, se ha mostrado que el alelo inactivo de *MutT* es un mutágeno fuerte con una especificidad mutacional estricta pues solamente aumenta la mutación transversión A.T→G.C (Fowler y Schaaper, 1997).

La proteína 121375 es un *factor de elongación Tu* que interviene en la traducción, la estructura ribosómica y la biogénesis. Esta proteína también presenta una menor expresión en el mutante *madA*. Es responsable de la selección del complejo *aminoacil ARNt* a posición A de la ribosoma.

El resto de proteínas con expresión diferencial identificadas en esta comparación intervienen en distintos procesos metabólicos como el transporte y metabolismo de nucleótidos (75347) o el de carbohidratos (188388).

Al comparar las proteínas con expresión diferencial entre el tipo silvestre y el mutante *madA* detectadas en la condición de crecimiento en iluminación con las proteínas con expresión diferencial entre el tipo silvestre y el mutante *madA* detectadas en la condición de crecimiento en oscuridad, cabe destacar, en primer lugar, que las 8 proteínas con expresión diferencial encontradas en condiciones de iluminación (ver sección 4.3.3) no han sido detectadas en oscuridad y viceversa, a excepción de la proteína 135540 que aparece en ambas comparaciones más expresada en el tipo silvestre que en el mutante *madA*.

De estos resultados concluimos que las diferencias de expresión observadas en la proteína 135540 se deben al efecto de la mutación *madA* independientemente de la condición lumínica, mientras que el resto de diferencias parecen ser exclusivas de cada condición lumínica (luz u oscuridad).



**FIGURA 28** .A y B muestran las proteínas diferenciales identificadas entre el tipo silvestre (A) versus el mutante *madA* (B) ambos crecidos en condiciones de oscuridad. Los números marcan las proteínas identificadas que tienen expresión diferencial en esa condición.

**Tabla 10.** Proteínas diferenciales de la comparación entre la estirpe NRRL 1555 cultivado en condiciones de oscuridad versus el mutante *madA* cultivado en las mismas condiciones.

N° De Proteína	ID	Nombre De Proteína	Del Osc	MutA Osc	Anova	SCORE	Peptidos
AO343	16437	Sensor histidine kinase response regulator [ <i>Lichtheimia corymbifera</i> ]	0,026	0,043	0,003	58	8, 0
AO1811	30142	DNA mismatch repair protein MutT [ <i>Mucor ambiguus</i> ]	0,053	0,026	0,018	134	5, 2
AO1082	75347	Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase [ <i>Rhizopus delemar</i> ]	0,065	0,168	0,033	136	5, 2
AO1660	121375	Elongation factor Tu [ <i>Mucor circinelloides</i> ]	0,060	0,095	0,019	59	5, 0
AO870	135540	Gamma-actin [ <i>Blakeslea trispora</i> ]	0,809	0,464	0,008	197	9, 1
AO341	136854	GTP-binding nuclear protein GSP1/Ran [ <i>Mucor circinelloides</i> ]	0,102	0,195	0,004	82	7, 0
AO605	181959	Pi31 proteasome regulator domain-containingprotein [ <i>Lichtheimia corymbifera</i> ]	0,043	0,068	0,014	238	3, 2
AO1541	188388	Phosphoglycerate kinase 2 [ <i>Mucor circinelloides</i> ]	0,076	0,190	0,004	164	8, 1

### **4.3.5 Comparación entre micelios de la estirpe *madB* crecidos en medio líquido en condiciones de iluminación vs condiciones de oscuridad.**

Esta comparación se realizó entre las proteínas expresadas para el mutante *madB* en 2 condiciones diferentes (luz y oscuridad) con el fin de encontrar diferencias estadísticamente significativas entre ambas situaciones. Se detectaron un total de 19 proteínas, 7 de ellas han mostrado un aumento de expresión en la muestra cultivada en la luz mientras que 10 tuvieron un aumento de la expresión en la muestra cultivada en la oscuridad, 2 proteínas solo se expresaron en la condición de luz. Tras analizar por EM MALDI TOF-TOF se pudieron identificar 10 proteínas que se presentan en la figura 29 y los datos de este análisis aparecen reflejados en la tabla 11.

El mutante *madB* al igual que el mutante *madA* descrito previamente, pertenece al tipo 1 de los mutantes ciegos que se caracterizan por presentar una alteración severa de todas las respuestas a la luz. Tanto es así que todas las respuestas a la luz en *Phycomyces* requieren de los productos de los genes *madA* y *madB*. En ese organismo se ha demostrado que el gen *madA* codifica una proteína similar a la WC-1 de *Neurospora* (fotorreceptor de luz azul y factor transcripcional tipo dedo de Zinc) (Idnurm et al., 2006).

Se ha comprobado también que el gen *madB* codifica una proteína similar a la proteína WC-2 *Neurospora*, y que ambas proteínas MADA y MADB interaccionan para formar un complejo fotorreceptor que actúa como factor transcripcional y regula todas las respuestas a la luz en ese hongo (Sanz et al., 2009). No obstante, en el genoma de *Phycomyces* se han identificado además de *madA* otros dos genes similares al *wc-1*, y además de *madB* otros 3 genes similares al *wc-2*, muchos de los cuales son regulados por la luz de una forma dependiente de *madA* y *madB*. Esta presencia de múltiples genes *wc* en *Phycomyces* podría permitir la percepción a través de una amplia gama de intensidades de luz, y proporcionar fotorreceptores especializados para las distintas fotorrespuestas (Sanz et al., 2009).

En nuestro estudio y en concreto en la presente comparación esperamos observar un gran número de diferencias en los patrones de expresión proteica entre el

tipo silvestre y el mutante *madB* debido a la alteración severa de las fotorrespuestas que presenta este mutante y que ya hemos comentado.

Para estudiar esta posible desregulación analizamos en primer lugar las diferencias en la expresión proteica entre la luz y la oscuridad en este mutante y posteriormente compararemos este patrón con el observado en la estirpe tipo silvestre tanto para la condición de oscuridad como para la condición de iluminación.

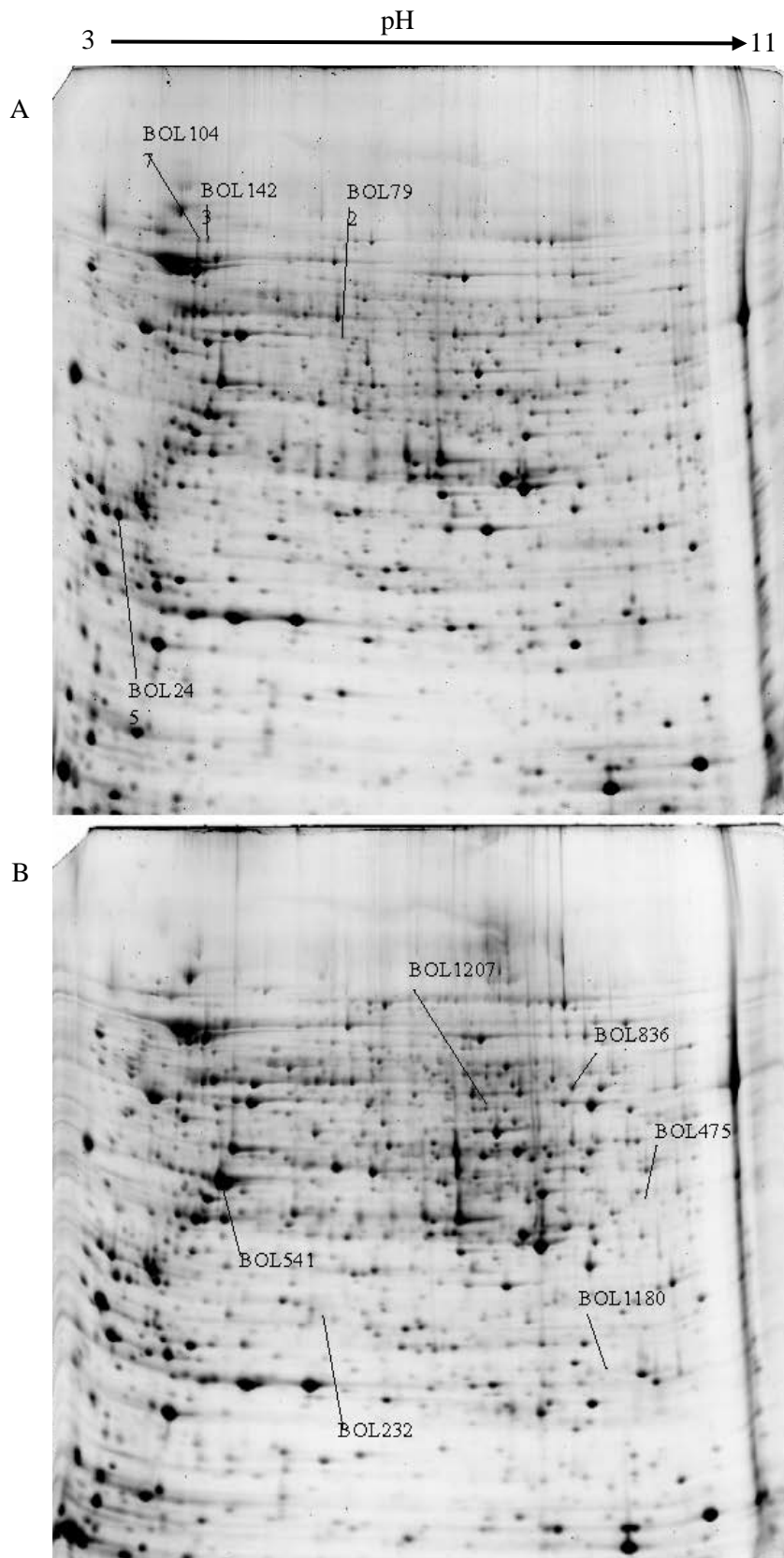
En el mutante *madB*, al analizar las proteínas con expresión diferencial entre luz y oscuridad encontramos varias proteínas implicadas en procesos de señalización celular que podrían tener que ver con la cadena de transmisión de señales en función de las condiciones de iluminación, estas proteínas son las ID177616, ID127826 e ID187821.

La proteína 177616 que se expresa significativamente más en oscuridad es una *uracil forforibosil transferasa 1* involucrada en mecanismos de transducción de señales, y también tiene una expresión diferencial en la comparación de *madA* en condiciones de luz versus el tipo silvestre en las mismas condiciones.

La proteína 127826 que se expresa más en luz, es la proteína de choque térmico de 70 kDa (*peptidasa de la familia s9c*) que actúa mediante la unión a ATP y está implicada en modificaciones postraduccionales, recambio proteico y actuación como chaperona. Finalmente la proteína 187821 con una expresión significativamente superior en luz, es una *peptidasa de la familia s9c* que también está implicada en llevar a cabo modificaciones postraduccionales, recambio proteico y actuación como chaperona, en este caso mediante actividad peptidasa de tipo serina.

Además en este mutante encontramos diferencialmente expresada a la proteína 109058 que es *Aldehído Deshidrogenasa* (NAD<sup>+</sup>) que interviene en la producción de energía y tiene actividad oxidoreductasa. Esta proteína que se expresa significativamente más en la luz que en la oscuridad por lo que podría estar implicada en fomentar la producción de energía en condiciones de luz.





**FIGURA 29.A y B** muestran las proteínas diferenciales identificadas entre mutante *madB* en condiciones de luz (A) versus oscuridad (B) Los números marcan las proteínas identificadas que tienen expresión diferencial en esa condición.

**Tabla 11.** Proteínas diferenciales identificadas de la comparación entre condiciones de luz versus oscuridad del mutante *madB*.

Nº De Proteína	ID	Nombre De Proteína	MutB Luz	MutB Osc	Anova	SCORE	Peptidos
BOL475	4549	D-aspartate oxidase [ <i>Mucor ambiguus</i> ]	0,013	0,060	0,019	102	3 , 1
BOL836	75347	Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase [ <i>Rhizopus delemar</i> ]	0,058	0,107	0,020	354	6 , 3
BOL229	79326	Mannose-1-phosphate guanyltransferase beta-like [ <i>Lichtheimia corymbifera</i> ]	0,004	0,024	0,028	212	7 , 2
BOL792	109058	Aldehyde dehydrogenase (NAD+) [ <i>Mucor circinelloides</i> ]	0,042	0,020	0,010	155	4 , 2
BOL1207	116342	Metallo-beta-lactamase family protein [ <i>Lichtheimia corymbifera</i> ]	0,011	0,030	0,010	91	4 , 1
BOL1047	127826	Heat shock 70 kDa protein 2 [ <i>Rhizopus delemar</i> ]	0,034	0,006	0,001	94	5 , 1
BOL245	158069	Carboxypeptidase Y precursor [ <i>Mucor ambiguus</i> ]	0,455	0,229	0,005	115	4 , 1
BOL1180	177616	Uracil phosphoribosyltransferase 1 [ <i>Mucor circinelloides</i> ]	0,009	0,033	0,007	111	3 , 2
BOL541	186453	Ketol-acid reductoisomerase, mitochondrial [ <i>Mucor circinelloides</i> ]	0,423	0,750	0,006	185	9 , 2
BOL1423	187821	s9c family peptidase [ <i>Lichtheimia corymbifera</i> ]	0,047	0,016	0,010	202	7 , 2

La proteína 75347, que es una *inosina-5'-monofosfato deshidrogenasa* que interviene en el metabolismo y transporte de nucleótidos. Tiene actividad oxidoreductasa que cataliza el primer paso cometido y limitante de la velocidad en la síntesis *de novo* de los nucleótidos de guanina y tiene un papel importante en la regulación del crecimiento celular. Esta proteína se expresa diferencialmente en la oscuridad.

El resto de proteínas identificadas en esta comparación intervienen de alguna u otra manera distintos procesos metabólicos. Este es el caso de las proteínas con IDs 4595, que es una *D aspartato oxidasa* (que tiene actividad quinasa, interviene en el transporte de electrones y fosforilación de los aminoácidos), 79326 “Manosa-1-P guanidiltransferasa  $\beta$ ” (que tiene actividad *Nucleotidil transferasa*) la 116342 pertenece a la familia *metalo-beta-lactamasa*, la 186453 que es una *ceto-ácido reductoisomerasa* (que cataliza 2 pasos en la biosíntesis de la cadena lateral de los aminoácidos) y finalmente la 158069 (que es un *precursor de la carboxipeptidasa Y*) que tiene actividad nucleotidil transferasa. A excepción de esta última todas estas proteínas se expresaron más en la oscuridad que en condiciones de iluminación continua.

Al comparar las proteínas con expresión diferencial entre la luz y la oscuridad identificadas en el tipo silvestre con las identificadas en esta misma comparación en el mutante *madB* cabe destacar, en primer lugar, que las 10 proteínas con expresión diferencial encontradas en el tipo silvestre (ver sección 4.3.1) no han sido detectadas en el mutante *madB*. Este resultado indica que esta regulación ejercida por la condición lumínica en condiciones normales (en el tipo silvestre) parece haberse perdido completamente en el mutante *madB*, al igual que ocurría en el mutante *madA* (ver sección 4.3.2).

Además observamos que en el mutante *madB* aparecen 10 proteínas con expresión diferencial que no aparecían en el tipo silvestre ni en el mutante *madA* (ver secciones 4.3.1 y 4.3.2). Estas dos observaciones parecen confirmar el hecho de que en la mutación en este gen tiene un efecto fundamental en la regulación de la expresión génica por la luz en este hongo, provocando cambios en distintas vías de señalización celular.

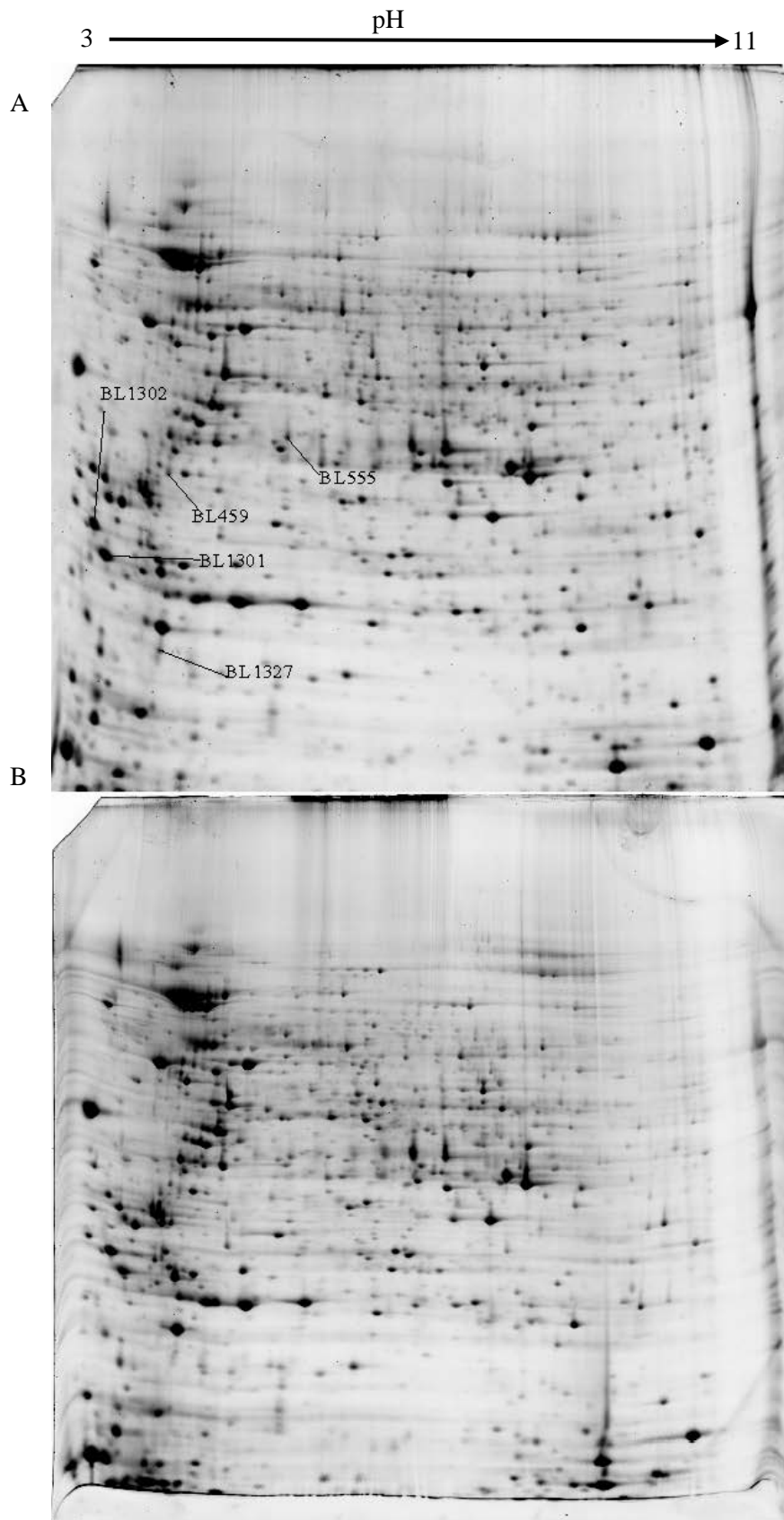
### **4.3.6 Comparación entre micelios de la estirpe tipo silvestre crecidos en medio líquido en condiciones de iluminación vs micelios de la estirpe *madB* crecidos en condiciones de iluminación.**

Esta comparación se realizó entre micelio del tipo silvestre cultivado en medio SIV líquido e iluminación continua y el mutante *madB* cultivado en medio SIV líquido e iluminación continua. En esta comparación se detectaron un total de 15 proteínas con expresión diferencial, 14 de ellas se expresaron más en el mutante *madB* y solamente 1 proteína se expresó más en el tipo silvestre cultivado en la luz. Se identificaron 5 de estas proteínas, en la figura 30 aparecen señaladas las proteínas con expresión diferencial identificadas en esta comparación. Los datos relativos a la identificación aparecen reflejados en la tabla 12.

Entre las proteínas identificadas en este apartado cabe destacar la proteína con ID154878 que es una *peptidasa de la familia m28* que es una *metaloproteasa*. Su expresión en condiciones de iluminación es significativamente mayor en el mutante *madB* que en el tipo silvestre. Esta proteína interviene en mecanismos de señalización celular mediante procesos de modificación postraduccionales, recambio proteico y actuación como chaperona que podrían estar relacionados con la regulación de la expresión génica dependiente de las condiciones de iluminación.

Otra de las proteínas identificadas con expresión diferencial en esta comparación fue la proteína con ID 123571 que es un *posible factor de elongación 1-beta*. Este factor con expresión significativamente superior en el mutante *madB* interviene en la elongación de la transcripción, por lo que podría tener un papel importante en la regulación ejercida en este mutante en condiciones de crecimiento en luz.

El resto de proteínas con expresión diferencial identificadas en este apartado interviene en procesos metabólicos como la 125044 (*ferritina de cadena pesada* que participa en el transporte y metabolismo de iones), 131929 (*gliceraldehido 3 fosfato deshidrogenasa 3* que interviene en el transporte y metabolismo de carbohidratos) y 158069 (*precursor de la carboxipeptidasa Y* que interviene en el transporte y metabolismo de aminoácidos, ésta se ha descrito más adelante en la sección 4.3.5).



**FIGURA 30.A y B** muestran las proteínas diferenciales identificadas entre el tipo silvestre (A) y mutante *madB* (B), ambos en condiciones de luz. Los números marcan las proteínas identificadas que tienen expresión diferencial en esa condición.

**TABLA 12.** Proteínas diferenciales identificadas en la comparación del tipo silvestre versus el mutante *madB* ambos en condiciones de luz.

<b>N° De Proteína</b>	<b>ID</b>	<b>Nombre De Proteína</b>	<b>Del Luz</b>	<b>Mut BLuz</b>	<b>Anova</b>	<b>SCORE</b>	<b>Peptidos</b>
BL1302	123571	Putative Elongation factor 1-beta [ <i>Rhizopus microsporus</i> ]	0,083	0,205	0,027	197	5 , 2
BL1327	125044	Ferritin heavy chain [ <i>Mucor circinelloides</i> ]	0,061	0,099	0,003	103	4 , 1
BL555	131929	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 3 [ <i>Rhizopus delemar</i> ]	0,087	0,150	0,012	211	5 , 2
BL459	154878	Peptidase family m28 [ <i>Lichtheimia corymbifera</i> ]	0,032	0,097	0,001	161	5 , 1
BL1301	158069	Carboxypeptidase Y precursor [ <i>Mucor ambiguus</i> ]	0,252	0,405	0,006	97	1 , 1

### **4.3.7 Comparación entre micelios de la estirpe tipo silvestre crecidos en medio líquido en condiciones de oscuridad vs micelios de la estirpe *madB* crecidos en condiciones de oscuridad.**

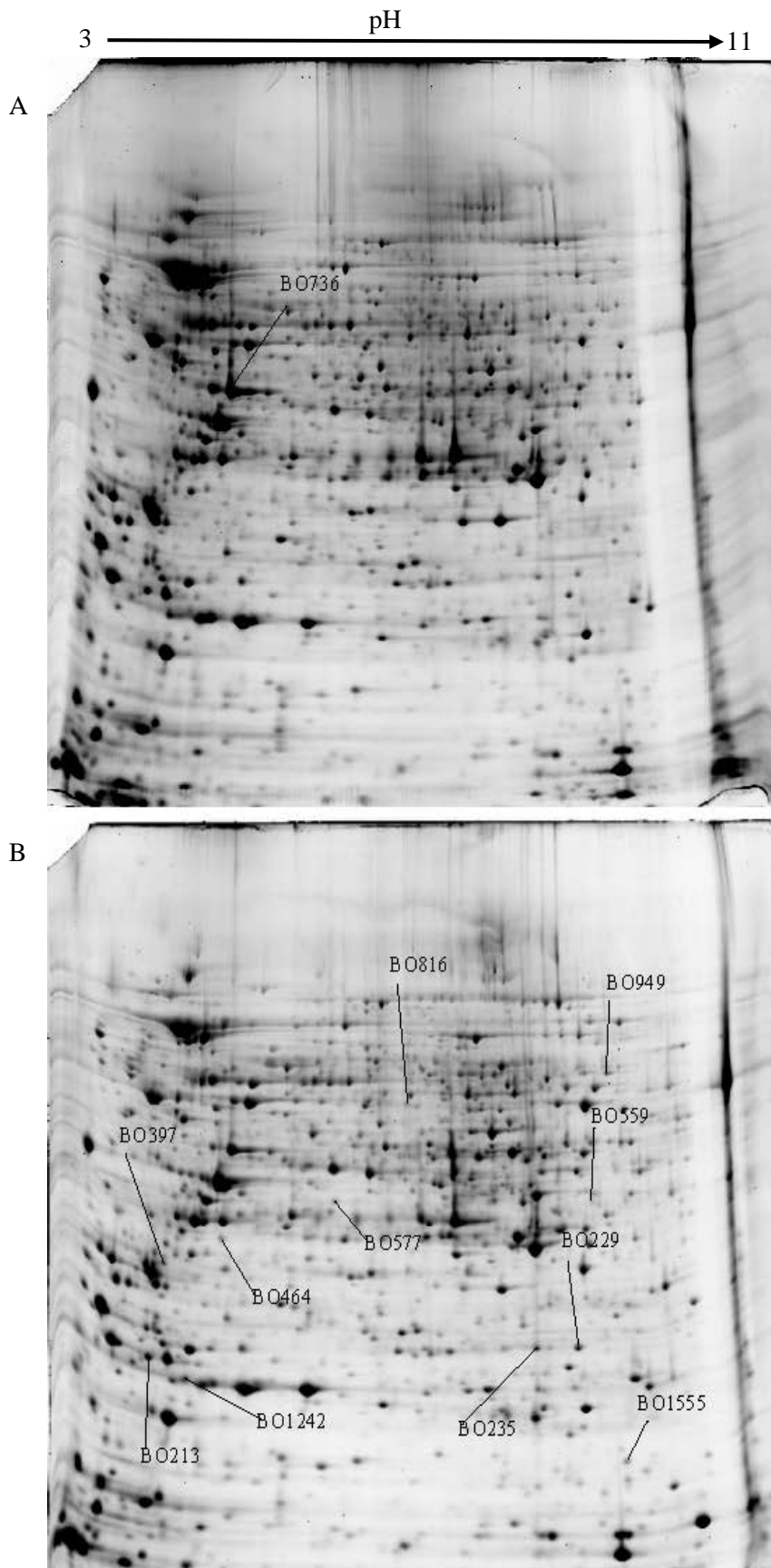
La comparación se realizó entre el micelio tipo silvestre recogido del medio SIV líquido en condición de oscuridad y el micelio de la estirpe *madB* recogido del medio SIV líquido también en oscuridad.

En esta comparación se detectaron 38 proteínas con expresión diferencial entre ambas condiciones, de las cuales 31 se expresaron significativamente más en el mutante *madB* cultivado en la oscuridad, sólo 2 se expresaron más en el tipo silvestre cultivado en la oscuridad y 1 proteína sólo se expresó en el mutante *madB*.

Posteriormente se identificaron 13 de estas proteínas por EM MALDI TOF-TOF, las proteínas identificadas se presentan en la figura 31 y los resultados del análisis se describen en la tabla 13.

Entre las diferencias identificadas en este apartado cabe destacar las proteínas con IDs *107242*, *118257*, *154725*, *181959* e *135540* por estar implicadas en mecanismos de señalización celular que podrían estar relacionados con la regulación de la expresión génica dependiente de las condiciones de iluminación, ya que todas ellas presentan una expresión significativamente mayor en el mutante *madB* que en el tipo silvestre en condiciones de crecimiento en oscuridad.

La proteína *107242* (*Meyer, 2004*) es un activador de chaperonas *Aha*, con la actividad co-chaperona que se une a Hsp90 y estimula su actividad ATPasa, el análisis bioquímico muestra que esta actividad depende del extremo N del dominio *Aha1* que interactúa con el segmento central de la proteína de choque térmico 90kDa (Hsp90).



**FIGURA 31** .A y B Proteínas diferenciales identificadas de la comparación tipo silvestre cultivado en oscuridad versus el mutante *madB* cultivados en condiciones de oscuridad. Los números marcan las proteínas identificadas que tienen expresión diferencial en esa condición.



**TABLA 13.** Proteínas diferenciales entre tipo silvestre y el mutante *madB* en condiciones de oscuridad.

N° De Proteína	ID	Nombre De Proteína	Del Osc	MadB Osc	Anova	SCORE	Peptidos
BO1519	36918	Charged multivesicular body protein 5 [Mucor ambiguus]	0,018	0,043	0,005	112	5, 2
BO577	107242	Chaperone activator aha1 [Lichtheimia corymbifera]	0,025	0,054	0,022	214	7, 2
BO1555	118257	Sorting nexin [Lichtheimia corymbifera]	0,024	0,045	0,011	183	7, 2
BO949	122316	Delta-1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase [Mucor circinelloides]	0,024	0,059	0,033	144	11, 1
BO816	123781	Aspartyl aminopeptidase [Mucor ambiguus]	0,021	0,035	0,010	164	8, 1
BO213	124245	Had-variant 3 family protein [Lichtheimia corymbifera]	0,066	0,105	0,008	124	8, 1
BO229	126915	Oxidoreductase [Mucor circinelloides f. circinelloides]	0,053	0,082	0,005	185	7, 2
BO1242	129275	Eukaryotic translation initiation factor 5A [Mucor circinelloides]	0,125	0,191	0,038	128	2, 1
BO736	135540	Gamma-actin [Blakeslea trispora]	0,809	0,529	0,029	210	7, 2
BO397	154725	14-3-3 family protein 7 [Mucor circinelloides]	0,025	0,039	0,010	212	5, 2
BO235	160672	Bis(5-nucleosyl)-symmetrical [Lichtheimia corymbifera]	0,050	0,073	0,014	85	5, 1
BO559	181365	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase [Mucor ambiguus]	0,011	0,023	0,034	102	8, 1
BO464	181959	Pi31 proteasome regulator domain-containingprotein [Lichtheimia corymbifera]	0,043	0,079	0,002	172	4, 2

La proteína 118257 es una *nexina* que mediante la unión a otras proteínas participa en mecanismos de comunicación celular, las proteínas **SNX** son una gran familia de proteínas que se definen por la presencia de un dominio de homología “*SNX phox*”. Los *SNX* que se han analizado han mostrado que el dominio *SNX-PX* actúa como el motivo “*unión a fosfoinosítidos*” que ayuda en la orientación de la proteína *SNX* a las membranas enriquecidas en *fosfoinosítidos* (Worby y Dixon, 2002). La proteína 154725 es una *proteína 7 de la familia 14-3-3*, una familia de moléculas reguladoras conservadas en todas las células eucariotas, una de las características llamativas de estas proteínas es su capacidad de unirse a una multitud de proteínas de señalización, incluyendo quinasas, fosfatasas y receptores transmembranas. La importancia de esta familia se destaca en un amplio rango de procesos reguladores tales como la transducción de la señal mitogénica, la muerte celular programada y el control del ciclo celular. Mediante la unión a dominios específicos lleva a cabo procesos de modificación postraduccional, recambio proteico y actuación como chaperona (Fu et al., 2000).

Finalmente, la proteína 135540 es una *gamma actina* y su expresión es significativamente mayor en el tipo silvestre cultivado en la oscuridad que el mutante *madB*.

Además de estas proteínas hemos identificado con una expresión significativamente mayor en el mutante *madB* que en el tipo silvestre en condiciones de oscuridad la proteína con ID 181365 que es una *D-3-fosfoglicerato deshidrogenasa (PGDH)* que participa en la producción de energía por lo que esta proteína podría tener un papel importante en la regulación ejercida en condiciones de crecimiento en oscuridad en este mutante.

La proteína 181959 tiene un dominio regulador de proteasoma *pi31* y participa también en procesos de modificación postraduccional, recambio proteico y actuación como chaperona (Li et al., 2014). Esta proteína también se expresa diferencialmente mayor en el mutante *madB*.

El resto de proteínas con expresión diferencial identificadas en este apartado interviene principalmente en procesos metabólicos como es el caso de las proteínas 122316 (*carboxilato deshidrogenasa*) y 123781 (*aspartil aminopeptidasa*) que intervienen en el transporte y metabolismo de aminoácidos además de 126915

(*oxidoreductasa*) que interviene en el transporte y metabolismo de metabolitos secundarios.

Al comparar las proteínas con expresión diferencial entre el tipo silvestre y el mutante *madB* detectadas en la condición de crecimiento en oscuridad con las proteínas con expresión diferencial entre el tipo silvestre y el mutante *madB* detectadas en la condición de crecimiento en luz, cabe destacar, en primer lugar, que las proteínas con expresión diferencial encontradas en condiciones de iluminación (4.3.6) no han sido detectadas en condiciones de oscuridad y viceversa. De estos resultados podemos concluir que las diferencias de expresión observadas entre el mutante *madB* y el tipo silvestre parecen ser exclusivas de cada condición lumínica (luz u oscuridad). También es interesante señalar que una situación similar se observó al comparar la misma situación entre el mutante *madA* y el tipo silvestre (4.3.4).

#### **4.3.8 Comparación entre micelios de la estirpe *madC* crecidos en medio líquido en condiciones de iluminación vs condiciones de oscuridad.**

La comparación se realizó entre los micelios recogidos del medio SIV líquido crecidos en dos condiciones diferentes de la luz y oscuridad del mutante *madC*. Se detectaron un total de 33 proteínas con expresión diferencial, de las que 15 han tenido mayor expresión en los cultivos crecidos en la luz y 14 de ellas se han expresado más en los cultivos de la oscuridad. Mediante el análisis EM MALDI TOF-TOF se identificaron 9 proteínas. Las proteínas están marcadas en la figura 32 y los datos correspondientes de las proteínas se presentan en la tabla 14.

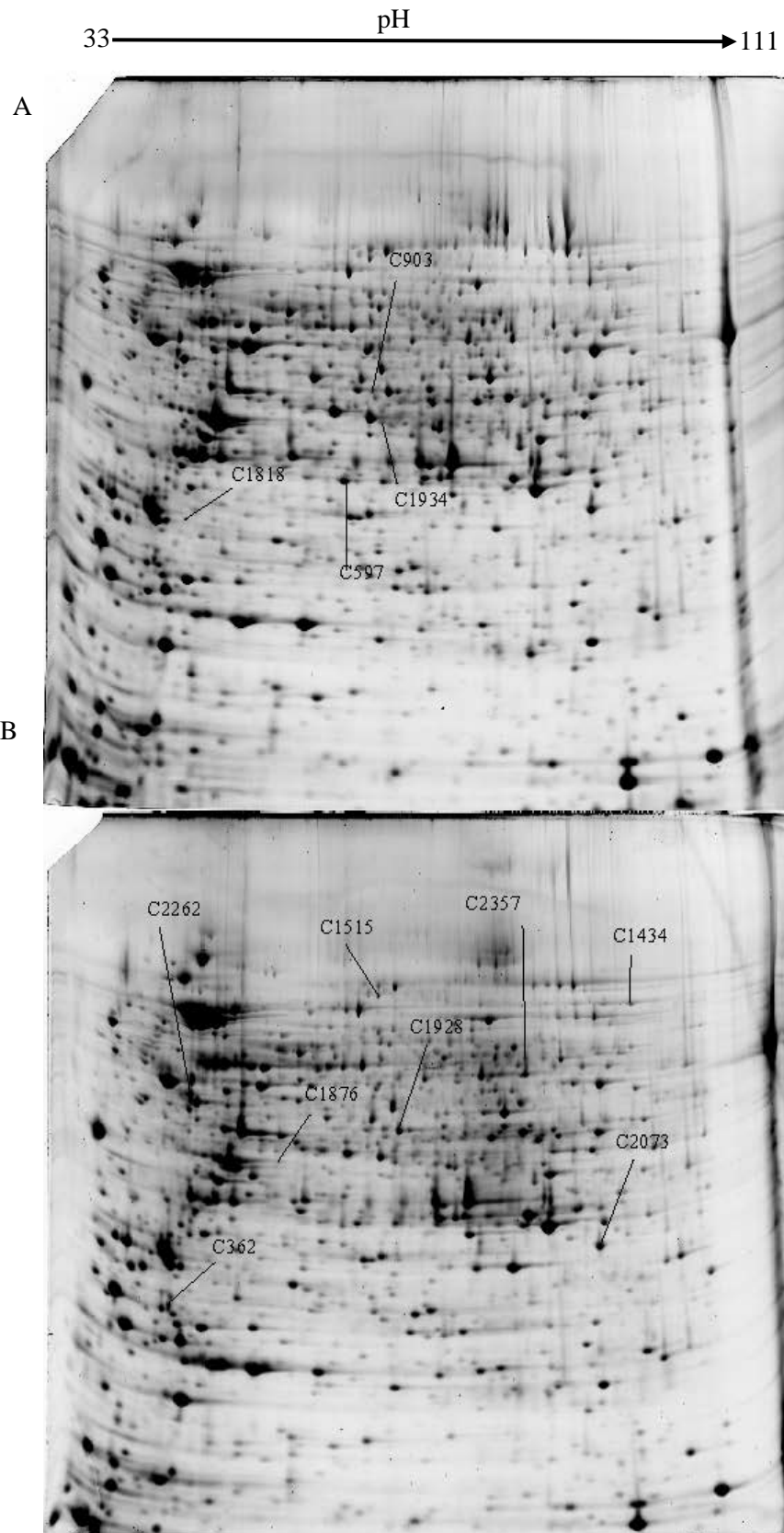
Como se ha indicado en la introducción, en *Phycomyces* los mutantes ciegos (*mad*) se clasificaron hace varias décadas en base a su fenotipo en dos tipos. Los del tipo 1, presentan una alteración en todas las respuestas a la luz, por este motivo se consideró que estos mutantes debían estar alterados al principio de la ruta sensorial o incluso en la percepción de la luz. Por el contrario los mutantes del tipo 2 están alterados en el fototropismo y en las otras respuestas del esporangióforo tales como la evitación y el gravitropismo pero no en la fotocarotenogénesis ni en la

fotomorfogénesis, por lo que se consideró que los mutantes tipo 2 están afectados en un punto posterior de la cadena de transmisión de la señal lumínica.

De los 10 tipos distintos de mutantes *mad* identificados por presentar alteraciones en 10 genes distintos (*madA-madJ*). En este trabajo se han estudiado los perfiles de expresión proteica en los mutantes *madA*, *madB* y *madC* por ser los que presentan alteraciones más severas en la percepción de la luz, perteneciendo estos tres mutantes al tipo 1 de mutantes *mad* descrito anteriormente.

En concreto los mutantes *madC* al contrario que los mutantes *madA* y *madB* no parecen estar alterados en la fotorrecepción sino que más bien parecen estar alterados en una *GTPasa de señalización Ras*. Esta proteína podría interactuar con el complejo *White Collar* formado por las proteínas MadA y MadB controlando así parte de las respuestas a la luz en *Phycomyces* como por ejemplo el fototropismo de los esporangióforos (Polaino S., et al – resultados en proceso de publicación).

Entre las proteínas identificadas en este apartado por su expresión diferencial entre las dos condiciones de estudio cabe destacar la proteína con ID 122178 cuya expresión en el mutante *madC* es significativamente mayor en condiciones de oscuridad. Esta proteína interviene en mecanismos de señalización celular mediante unión a actina en el citoesqueleto (Ohtsu et al., 1997; Sun et al., 1999), a través de estos procesos podría participar en la regulación de la expresión génica dependiente de las condiciones de iluminación en este mutante.



**FIGURA 32.** A y B representan las proteínas diferenciales identificadas de la comparación entre mutante *madC* cultivado en las condiciones de luz (A) frente a oscuridad (B). Los números marcan las proteínas identificadas que tienen expresión diferencial en esa condición.

**TABLA 14.** Se representan los resultados del análisis de EM MALDI TOF-TOF de la comparación entre el mutante *madC* cultivado en condición de luz y el mismo cultivado condiciones de oscuridad

Nº De Proteína	ID	Nombre De Proteína	Mut C Luz	Mut C Osc	Anova	SCORE	Peptidos
C362	38868	ATP synthase (E/31 kDa) subunit [ <i>Mucor circinelloides</i> ]	0,047	0,071	0,030	225	4, 2
C2357	178031	Glucose-6-phosphate dehydrogenase [ <i>Mucor circinelloides</i> ]	0,022	0,044	0,006	61	4, 1
C1434	181903	Polyadenylate binding protein [ <i>Mucor ambiguus</i> ]	0,041	0,106	0,003	65	8, 1
C1934	131941	Ornithine carbamoyltransferase [ <i>Mucor ambiguus</i> ]	0,099	0,038	0,014	114	1, 1
C1515	119761	Trehalose-phosphate synthase [ <i>Lichtheimia corymbifera</i> ]	0,025	0,045	0,013	66	3, 1
C597	177523	Oxidoreductase [ <i>Mucor circinelloides</i> ]	0,121	0,073	0,013	78	1, 1
C1928	182982	Argininosuccinate synthetase [ <i>Lichtheimia corymbifera</i> ]	0,325	0,174	0,006	249	12, 2
C2073	124225	6-phosphogluconate dehydrogenase [ <i>Mucor ambiguus</i> ]	0,092	0,145	0,001	102	5, 1
C2262	122178	Gelsolin-like protein 2-like isoform X3 [ <i>Mucor ambiguus</i> ]	0,092	0,145	0,001	256	5,2

Otra de las proteínas identificadas con expresión diferencial es esta comparación fue la proteína con ID 181903 que es una *proteína de unión a poliadenilato* (PABP). Esta proteína con expresión significativamente mayor en oscuridad que en iluminación en el mutante *madC* interviene en el procesamiento y modificación del ARNm, esta proteína reconoce la cola de poli A en el extremo 3' de ARNm y tiene un papel esencial en la iniciación de la traducción y la estabilidad y degradación de ARNm en las eucariotas, por lo que podría tener un papel importante en la regulación ejercida en este mutante en condiciones de crecimiento en oscuridad. La proteína con ID 38868 es una *subunidad de ATP sintasa (E/31KDa)* que hidroliza el ATP para transportar los protones a través de la. Esta proteína se expresa significativamente más en la luz que en la oscuridad, por lo que podría intervenir en el aporte de energía dependiente de la luz.

El resto de proteínas con expresión diferencial identificadas en este apartado interviene en procesos metabólicos como es el caso de las proteínas con IDs 119761 (*trehalosa-fosfato sintasa*), 124225 (*6-fosfogulconato deshidrogenasa*), 178031 (*glucosa-6-fosfato deshidrogenasa*) todas ellas implicadas en el transporte y metabolismo de carbohidratos, 131941 (*ornitina carbamiltransferasa*), 177523 (*oxido reductasa*) y 182982 (*argininosuccinato sintasa*) que intervienen en el transporte y metabolismo de aminoácidos.

Al comparar las proteínas con expresión diferencial entre la luz y la oscuridad identificadas en el tipo silvestre con las identificadas en esta misma comparación en el mutante *madC* cabe destacar, en primer lugar, que las 10 proteínas con expresión diferencial encontradas en el tipo silvestre (ver sección 4.31) no han sido detectadas en el mutante *madC* como proteínas diferenciales. Este resultado indica que esta regulación ejercida por la condición lumínica en condiciones normales (en el tipo silvestre) parece haberse perdido completamente en el mutante *madC*. Además observamos que en el mutante *madC* aparecen 9 proteínas con expresión diferencial que no aparecían en el tipo silvestre como diferenciales, lo que parece confirmar el hecho de que en la mutación en este gen afecta también a la regulación de la expresión génica por la luz en este hongo, provocando distintos cambios en las vías de señalización celular.

### **4.3.9 Comparación entre micelios de la estirpe tipo silvestre crecidos en medio líquido en condiciones de iluminación vs micelios de la estirpe *madC* crecidos en condiciones de iluminación.**

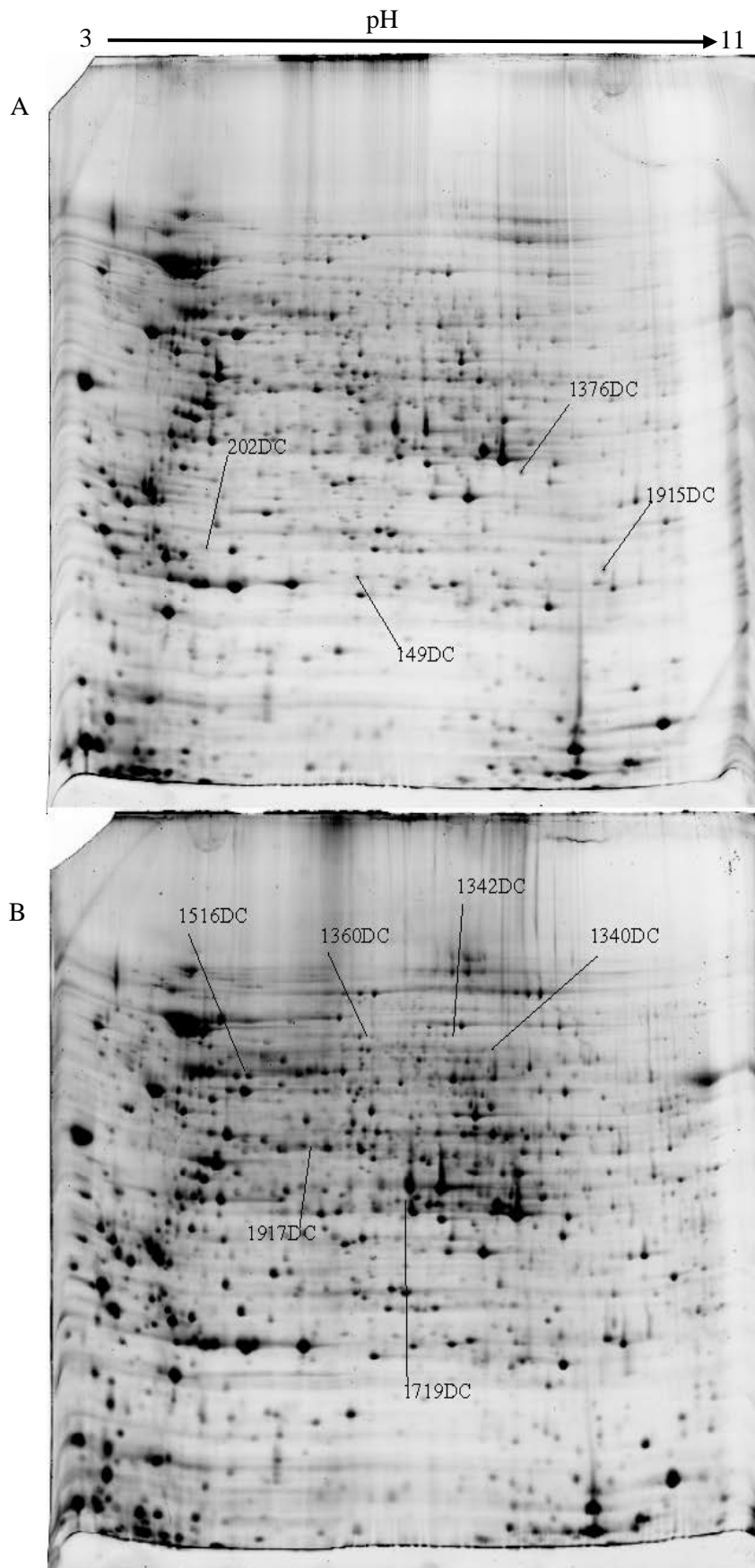
Esta comparación se realizó entre las proteínas obtenidas a partir del micelio del tipo silvestre crecido en iluminación en medio SIV líquido y las proteínas obtenidas a partir del micelio de la estirpe *madC* crecido en iluminación en medio SIV líquido. El objetivo de la misma fue detectar las proteínas con expresión diferencial entre el tipo silvestre y el mutante *madC* bajo la condición de crecimiento en iluminación.

Se detectaron un total de 16 proteínas con expresión diferencial, 8 de ellas se expresaron más en el tipo silvestre y el resto en el mutante *madC*. Mediante el análisis EM MALDI TOF-TOF se identificaron un total de 10 proteínas que están representadas en la figura 33 y los datos correspondientes de cada proteína se refleja en la Tabla 15.

Entre las proteínas que presentan expresión diferencial en iluminación entre el mutante *madC* y el tipo silvestre cabe destacar, por su posible relación con la regulación ejercida por la luz, un grupo de proteínas que intervienen en procesos de señalización celular entre las que están la proteína con ID *130038* que es una proteína de interacción con la actina a través de la unión de iones de  $\text{Ca}^{+2}$ . Esta proteína, que tiene una expresión significativamente superior en el mutante *madC*.

En el caso de la proteína *186603*, es una *proteína de choque térmico 70* (Mayer y Bukau, 2005) que se trata de una chaperona de la familia Hsp70 también se expresa más en el mutante *madC* y participa en modificaciones postraduccionales, recambio proteico y plegamiento de proteína mediante la unión a ATP.





**FIGURA 33.** A y B proteínas identificadas de la comparación entre tipo silvestre y el mutante *madC* ambos en condiciones de luz. Los números marcan las proteínas identificadas que tienen expresión diferencial en esa condición.

**TABLA 15.** Resultados del análisis de las proteínas diferenciales de la comparación entre NRRL1555 cultivado en condiciones de luz y *madC* cultivado en condiciones de luz.

N° De Proteína	ID	Nombre De Proteína	Del Luz	MutC Luz	Anova	SCORE	Peptidos
1376DC	41915	Serine protease [ <i>Lichtheimia corymbifera</i> ]	0,055	0,037	0,002	112	4 ,1
149DC	69796	Hipo Reg; Pyridoxine 5'-phosphate (PNP) oxidase-like proteins [ <i>Lichtheimia corymbifera</i> ]	0,042	0,016	0,025	132	2, 1
1719DC	76956	Glyceraldehyde- 3-phosphate dehydrogenase[ <i>Rhizomucor miehei</i> ]	0,014	0,046	0,009	207	7, 2
1915DC	77484	Hypothetical protein HMPREF1544_05024 [ <i>Mucor circinelloides</i> ]	0,074	0,047	0,003	92	4, 2
1342DC	130038	Actin-interacting protein 1-like isoform 2 [ <i>Lichtheimia corymbifera</i> ]	0,024	0,042	0,001	176	4, 2
1516DC	130942	UDP-n-acetylglucosamine diphosphorylase [ <i>Lichtheimia corymbifera</i> ]	0,071	0,202	0,013	184	9, 2
1917DC	133959	Beta-isopropylmalate dehydrogenase [ <i>Lichtheimia corymbifera</i> ]	0,060	0,088	0,017	143	2, 2
202DC	159308	F-actin-capping protein subunit alpha-like [ <i>Mucor ambiguus</i> ]	0,035	0,012	0,018	186	6, 2
1340DC	182458	Acetyl-CoA hydrolase [ <i>Mucor ambiguus</i> ]	0,026	0,077	0,014	63	4, 1
1360DC	186603	HSP70 family chaperone [ <i>Mucor ambiguus</i> ]	0,037	0,060	0,003	180	7, 2

Por su parte la proteína 41915 tiene actividad *serina proteasa* y participa también en modificaciones postraduccionales, recambio proteico y actuación como chaperona mediante proteólisis y peptidolisis, esta proteína se expresa significativamente más en el tipo silvestre.

La proteína 130942, con mayor expresión en el tipo silvestre que en el mutante *madC*, es una *UDP-n-acetilglucosamina difosforilasa* que se localiza en la pared celular y membranas con actividad nucleotidil-transferasa.

Además, la proteína con ID 159308 es una *proteína similar a la subunidad alfa de una proteína F de bloqueo de actina* que formaría parte de un complejo con funciones de organización y biogénesis en el citoesqueleto y se expresa más en el tipo silvestre que en el mutante *madC*.

Entre las proteínas con expresión significativamente menor en el mutante *madC* encontramos también a la proteína 69796, con una función probable del tipo *piridoxina-5'-fosfato oxidasa* que participa en la transcripción y podría estar implicada en mecanismos de regulación a través del procesamiento y modificación de ácidos nucleicos.

Las proteínas restantes identificadas por su expresión diferencial en esta comparación están implicadas en su mayor parte en distintos procesos del metabolismo como la proteína 76956 que es una *gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa* que interviene en el transporte y metabolización de carbohidratos, la 133959 que es una *beta-isopropil-malato deshidrogenasa* que participa en el transporte y metabolización de aminoácidos, o la 182458 que es una *acetil-CoA hidrolasa* que participa en la producción y conversión de energía. Todo este bloque de proteínas mostraron una expresión significativamente mayor en el mutante *madC* que en el tipo silvestre en esta condición de crecimiento en iluminación continua.

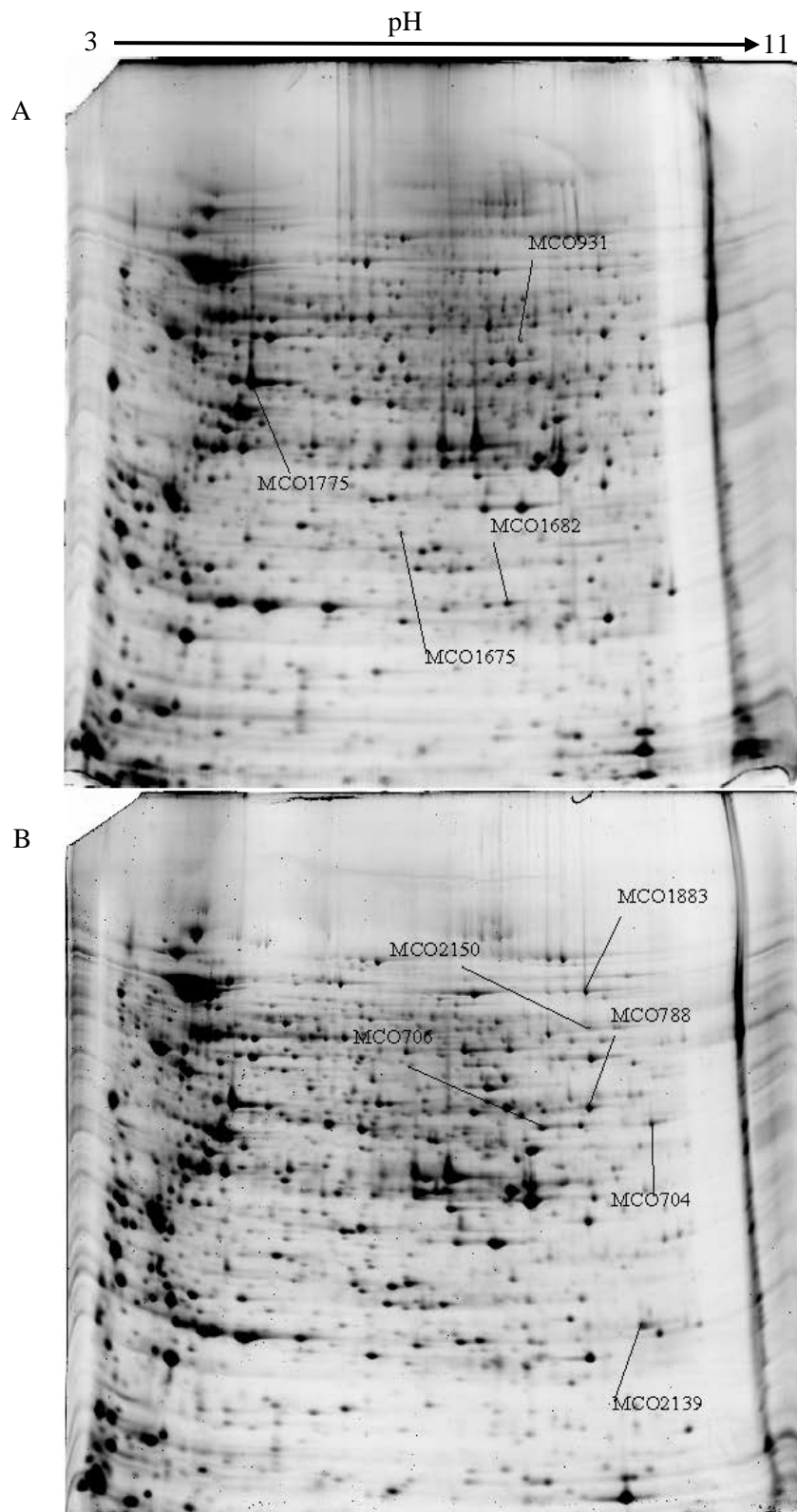
#### **4.3.10 Comparación entre micelios de la estirpe tipo silvestre crecidos en medio líquido en condiciones de oscuridad vs micelios de la estirpe *madC* crecidos en condiciones de oscuridad.**

Esta comparación se realizó entre las proteínas expresadas en micelios crecidos en medio SIV líquido en condición de oscuridad continua del tipo silvestre y la estirpe *madC*. El objetivo de la misma fue detectar las proteínas con expresión diferencial entre el tipo silvestre y el mutante *madC* bajo la condición de crecimiento en oscuridad, y posteriormente comparar las diferencias observadas en esta comparación con las detectadas en la comparación anterior (crecimiento en luz).

Se detectaron un total de 21 proteínas con expresión diferencial, de las cuales 15 se expresaron significativamente más en *el mutante madC* y 6 se expresaron más en el tipo silvestre. Se identificaron 10 de estas proteínas mediante análisis EM MALDI TOF-TOF. Estas proteínas aparecen representadas en la Figura 34. Los datos correspondientes de la identificación aparecen reflejados en la Tabla 15

Entre las diferencias identificadas en este apartado cabe destacar la proteína con ID 177616 (*uracilo fosforibosil transferasa*) por estar implicada en mecanismos de señalización celular que podrían estar relacionados, en esta condición de oscuridad, en la regulación de la expresión génica dependiente de la mutación *madC*, ya que se ha observado una expresión significativamente mayor en el mutante *madC* que en el tipo silvestre en estas condiciones.

La proteína 135540 codifica una *gamma actina* e interviene en la señalización celular mediante la unión a otras proteínas, esta proteína se expresó significativamente más en el tipo silvestre que en el mutante *madC*, por lo que podría estar implicada en el fenotipo de ceguera que presenta este mutante.



**FIGURA 34** A y B se representan las proteínas identificadas en la comparación entre tipo silvestre cultivado en condiciones de oscuridad y el mutante *mad C* en las mismas condiciones. Los números marcan las proteínas identificadas que tienen expresión diferencial en esa condición.

**TABLA 16.** Se representan las proteínas diferenciales analizadas de la comparación entre tipo silvestre cultivado en condiciones de oscuridad y el mutante *madC* en las mismas condiciones.

N° De Proteína	ID	Nombre De Proteína	Del Osc	MutC Osc	Anova	SCORE	Peptidos
MCO706	39747	Acetyl-CoA acetyltransferase [ <i>Mucor ambiguus</i> ]	0,051	0,087	0,005	313	7, 2
MCO704	74324	Isocitrate dehydrogenase (NAD+) [ <i>Mucor circinelloides</i> ]	0,056	0,087	0,014	118	4, 1
MCO788	75034	Acetyl-CoA acyltransferase [ <i>Mucor circinelloides</i> ]	0,106	0,170	0,001	324	7, 2
MCO2150	122316	Delta-1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase [ <i>Mucor circinelloides</i> ]	0,032	0,051	0,021	198	4, 2
MCO931	125895	Glutathione-disulfide reductase [ <i>Lichtheimia corymbifera</i> ]	0,049	0,032	0,014	172	9, 1
MCO1682/1755	135540	Gamma-actin [ <i>Blakeslea trispora</i> ]	0,137	0,090	0,001	74	2, 1
MCO1883	136654	5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide formyltransferase [ <i>Mucor ambiguus</i> ]	0,080	0,131	0,005	298	10, 2
MCO2139	177616	Uracil phosphoribosyltransferase 1 [ <i>Mucor circinelloides</i> ]	0,084	0,134	0,004	220	9, 2
MCO1675	181278	Methyltransferase [ <i>Mucor ambiguus</i> ]	0,037	0,022	0,021	268	4, 2

Además de estas proteínas hemos identificado en condiciones de oscuridad una expresión significativamente mayor en el tipo silvestre que en mutante *madC* de la proteína con ID 181278 que es una *metiltransferasa*. Esta proteína podría participar en el control epigenético de la expresión génica en este mutante atendiendo a la condición lumínica.

El resto de proteínas con expresión diferencial identificadas en este apartado intervienen en procesos metabólicos como es el caso de las proteínas 39747 y 75034 que son dos *acetil-CoA acetiltransferasas* que participan en el transporte y metabolismo de lípidos. Las proteínas 74324 (*isocitrato deshidrogenasa*) con función oxidoreductasa y 122316 (*delta-1-pirrolina-5-carboxilato deshidrogenasa*) que participan en el transporte y metabolismo de aminoácidos. La proteína 136654 que es una *5-aminoimidazol-4-carboxamida ribonucleótido formiltransferasa* que participa en el metabolismo y transporte de nucleótidos. Finalmente la proteína 125895 que es una *glutación-disulfito reductasa* que interviene en el transporte y metabolismo de metabolitos secundarios cuya expresión diferencial está aumentada en el tipo silvestre frente al mutante.

Al comparar las proteínas con expresión diferencial entre el tipo silvestre y el mutante *madC* detectadas en la condición de crecimiento en iluminación con las proteínas con expresión diferencial entre el tipo silvestre y el mutante *madC* detectadas en condición de crecimiento en oscuridad, cabe destacar, en primer lugar, que las proteínas con expresión diferencial encontradas en condiciones de iluminación (ver sección 4.3.9) no han sido detectadas en condiciones de oscuridad y viceversa (ver sección 4.3.10). De estos resultados podemos concluir que las diferencias de expresión observadas entre el mutante *madC* y el tipo silvestre parecen ser exclusivas de cada condición lumínica (luz u oscuridad). También es interesante señalar que una situación similar se observó al comparar la misma situación entre el mutante *madA* y el tipo silvestre (ver sección 4.3.4), y al comparar la misma situación entre el mutante *madB* y el tipo silvestre (ver sección 4.3.7).

Cuando consideramos conjuntamente los resultados obtenidos en los tres tipos de mutantes (*madA*, *madB* y *madC*) frente a los obtenidos en el tipo silvestre, se observan una serie de coincidencias que se describen a continuación. En la condición de crecimiento en oscuridad la proteína con ID 135540 (*gamma actina*) presentó una

expresión significativamente inferior en todos los mutantes *mad* respecto al tipo silvestre. Este resultado podría indicar que en condiciones de oscuridad esta proteína resulta esencial para mantener el fenotipo del tipo silvestre. Las mutaciones en las estirpes *mad* darían lugar, de una u otra forma, a cambios en la función de esta proteína en el citoesqueleto que se traducirían en cambios en los procesos de señalización celular en oscuridad, estos cambios culminarían en la manifestación del fenotipo *mad* que se observa en los mutantes ciegos de tipo I (tanto *madA*, como *madB* como *madC*). En *Phycomyces* el fototropismo empieza unos 5-6 minutos después de la captación por parte del esporangióforo de las distintas intensidades de luz. Por otra parte el pigmento visual es XXXX, eso significa que está orientado y por lo tanto que está ubicado en la membrana. Es una paradoja que cuando incidan los fotones en el pigmento visual sólo se tarden 6 minutos en viajar la señal (molécula/s) al núcleo, empezar la transcripción, la síntesis de proteínas y finalmente el transporte de estas proteínas al lugar de acción). Una posible teoría sería que la transmisión de las señales fuese desde la membrana celular (u otros orgánulos con membrana) por los filamentos de actina del citoesqueleto que parecen formar un *network* por la zona de crecimiento del esporangióforo que es donde se captan los protones. De esta manera se produciría una reorganización de las hifas de ese esqueleto de actina que induciría a crecer más por un lado de la pared que por otro dando lugar así al tropismo. En este trabajo se ha observado una expresión significativamente inferior de la *gamma actina* en los tres mutantes ciegos analizados (por lo tanto alterados entre otras fotorrespuestas en el fototropismo) en comparación con el tipo silvestre. Dado el posible papel crucial de la *actina* en el fototropismo, la reducida expresión de esta proteína en los mutantes podría explicar la alteración en el fototropismo observada en las estirpes *madA*, *madB* y *madC*.

Además, hemos observado que tanto en los mutantes *madA* como *madB* existe una sobreexpresión de la proteína con ID181959 (*regulador del proteosoma Pi3l*) en condiciones de oscuridad. Esta proteína interviene en procesos de señalización celular mediante modificaciones postraduccionales, por lo que las mutaciones *madA* y *madB* en el complejo *white collar* podrían provocar una sobreexpresión de la misma en condiciones de crecimiento en oscuridad.



### **4.3.11 Comparación llevada a cabo en la estirpe tipo silvestre entre el micelio crecido en medio sólido bajo iluminación vs el micelio crecido en medio sólido bajo oscuridad.**

Las cuatro comparaciones que se detallan en los apartados siguientes (del 4.3.11 a 4.3.14) se llevaron a cabo entre las proteínas extraídas a partir de la estirpe tipo silvestre crecida en medio SIV sólido en iluminación frente a la estirpe tipo silvestre crecida en medio SIV sólido en condición de oscuridad. El crecimiento en medio sólido, a diferencia del medio líquido empleado en los apartados anteriores, permite separar las fracciones de crecimiento en forma de micelio (en contacto con la placa Petri) de la fracción correspondiente al crecimiento de las hifas aéreas (esporangióforos). En cada una de las muestras crecidas en luz o en oscuridad se separaron la fracción correspondiente al micelio de la parte correspondiente a las hifas aéreas (esporangióforos), de tal manera que al final se obtuvieron cuatro condiciones de análisis distintas que son: proteínas obtenidas a partir de micelio de la estirpe tipo silvestre crecida en iluminación, proteínas obtenidas a partir de esporangióforos de la estirpe tipo silvestre crecida en iluminación, proteínas obtenidas a partir de micelio de la estirpe tipo silvestre crecida en oscuridad, y proteínas obtenidas a partir de esporangióforos de la estirpe tipo silvestre crecida en oscuridad.

En este apartado se procede a la comparación de las proteínas expresadas en el micelio de la estirpe tipo silvestre crecida en iluminación frente a las proteínas expresadas en el micelio de la estirpe tipo silvestre crecida en oscuridad. Con esta comparación pretendemos detectar si en la fase de crecimiento en micelio se observa alguna proteína con expresión diferencial entre la luz y la oscuridad, y si estas diferencias coinciden o no con las observadas en la misma comparación llevada a cabo en medio líquido.

Se detectaron un total de 18 proteínas con expresión diferencial, 11 de las cuales se expresaron más en el cultivo crecido en la luz y el resto en el cultivo de oscuridad. Mediante el análisis EM MALDI TOF-TOF se identificaron un total de 11 proteínas que están representadas en la figura 35 y los datos correspondientes a estas proteínas aparecen reflejados en la tabla 17.

Entre las 11 proteínas identificadas con expresión diferencial entre las condiciones de luz y oscuridad en el micelio del tipo silvestre, se encuentran 2 proteínas con una posible función reguladora ya intervienen en procesos de señalización celular y se expresan significativamente más en los micelios crecidos en luz que en los crecidos en oscuridad. La proteína *126931* es un *inhibidor de disociación rab gdp* que lleva a cabo modificaciones postraduccionales, recambio proteico y actuación como chaperona. Esta proteína podría estar implicada en el crecimiento en forma miceliar dependiente de la condición lumínica. La proteína *125551* es una *proteína tipo actina 3* participa en el citoesqueleto llevando a cabo distintos procesos de señalización celular. Como ya se ha comentado en el apartado anterior, parece ser que la actina tienen un papel importante en la regulación de la expresión mediada por la luz en *Phycomyces* ya que hemos detectado diferencias estadísticamente significativas en la expresión de la *gamma actina* (ID *135540*) entre todos los mutantes *mad* y el tipo silvestre.

Además de las proteínas anteriormente descritas se han identificado en esta comparación dos proteínas con expresión diferencial que están involucradas en procesos de producción y conversión de energía y se expresan significativamente más en la condición de crecimiento en iluminación que en oscuridad. La proteína *122770* que es una *oxidoreductasa* y la proteína *135989* que es una *fumarato reductasa* que interviene en el transporte de electrones. Estas dos proteínas pueden tener una función importante en la conversión de la energía lumínica en el micelio que crece en condiciones de iluminación.

El resto de proteínas con expresión diferencial identificadas en este apartado intervienen en distintos procesos metabólicos y muestran todas ellas una expresión significativamente superior en la luz que en la oscuridad. Este es el caso de la proteína *74324* que es una *isocitrato deshidrogenasa (NAD<sup>+</sup>)* que tiene actividad oxidoreductasa y participa en el transporte y metabolismo de aminoácidos. Las proteínas *76956* (*gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa*) y *186806* (*piruvato kinasa*) que participan en el transporte y metabolismo de carbohidratos. La proteína *182531* que es una *proteína con un dominio STAR* que participa en el metabolismo y transporte de lípidos. Finalmente las proteínas *77526* (*fosforibosilaminoimidazol-succinocarboxamida sintasa*) y *134980* (*nucleósido difosfato kinasa*) que intervienen en el transporte y metabolismo de nucleótidos.



**TABLA 16.** Aparecen reflejados las diferencias analizadas de la comparación entre la estirpe silvestre cultivado en el medio solido en las condiciones de luz y oscuridad.

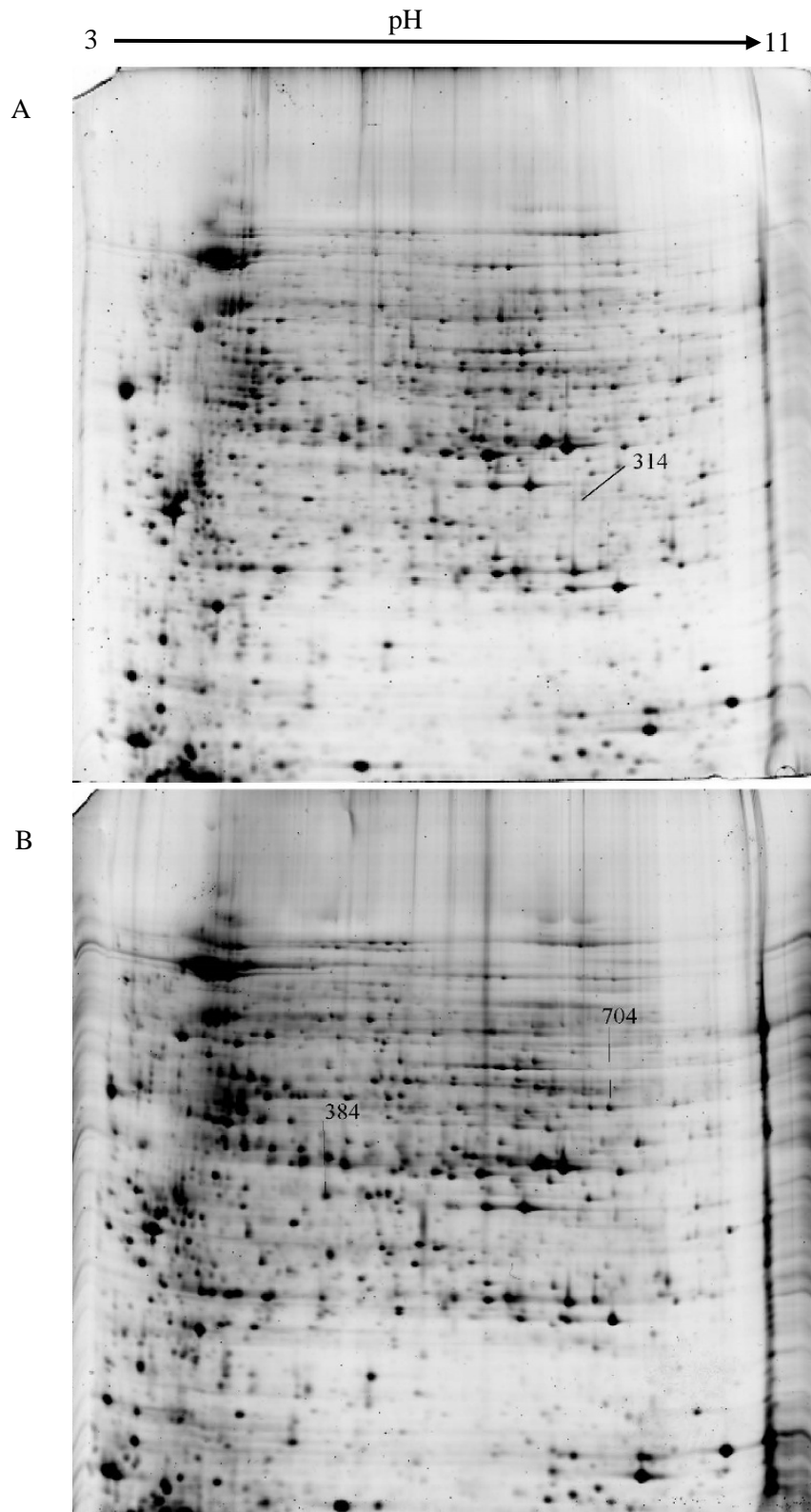
Nº De Proteína	ID	Nombre De Proteína	Del LuzS	DelOsc S	Anova	SCORE	Peptidos
1336	74324	Isocitrate dehydrogenase (NAD+) [ <i>Mucor circinelloides</i> ]	0,031	0,012	0,003	99	6, 1
2968	76956	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase[ <i>Rhizomucor miehei</i> ]	0,034		0,000	226	9, 2
1325	77526	Phosphoribosylaminoimidazole-succinocarboxamide synthase[ <i>Mucor circinelloides</i> ]	0,028	0,013	0,007	109	4, 1
1026	102610	Secreted protein [ <i>Mucor ambiguus</i> ]	0,170	0,520	0,016	204	4, 2
882	122770	Oxidoreductase [ <i>Mucor ambiguus</i> ]	0,236	0,084	0,017	204	7, 2
1054	125551	Actin-like protein 3 [ <i>Mucor circinelloides</i> ]	0,068	0,033	0,008	351	14, 2
673	126931	Rab gdp-dissociation inhibitor [ <i>Lichtheimia corymbifera</i> ]	0,065	0,031	0,004	187	6, 2
1027	134980	Nucleoside diphosphate kinase [ <i>Rhizopus delemar</i> ]	0,935	0,434	0,001	113	7, 2
886	135989	Fumarate reductase [ <i>Mucor ambiguus</i> ]	0,063	0,025	0,026	301	8, 2
1123	182531	START domain containing protein [ <i>Mucor ambiguus</i> ]	0,054	0,026	0,006	112	2, 1
1067/ 2617	186806	Pyruvate kinase [ <i>Mucor circinelloides</i> ]	0,026	0,012	0,003	153	9, 2

#### **4.3.12. Comparación llevada a cabo en la estirpe tipo silvestre entre esporangióforos crecidos en medio solido bajo iluminación vs esporangióforos crecidos en medio solido bajo oscuridad.**

En este apartado se procede a la comparación de las proteínas expresadas en los esporangióforos de la estirpe tipo silvestre crecida en iluminación frente a las proteínas expresadas en los esporangióforos de la estirpe tipo silvestre crecida en oscuridad. Con esta comparación pretendemos detectar si en la fase de crecimiento en esporangióforo se observa alguna proteína con expresión diferencial entre la luz y la oscuridad, y si estas diferencias coinciden o no con las observadas en la misma comparación llevada a cabo en el micelio (4.3.11).

Se identificaron un total de 6 proteínas con expresión diferencial, 3 de ellas se expresaron más en los esporangióforos del cultivo en luz y el resto en el cultivo de la oscuridad. Se identificaron 3 de estas proteínas mediante el análisis EM MALDI TOF-TOF. Estas proteínas aparecen representadas en la figura 36. Los datos correspondientes de la identificación EM MALDI TOF-TOF aparecen reflejados en la tabla 18.

Entre las proteínas con expresión diferencial en esta comparación se encuentra la proteína con ID 38715 que es un *supresor del alelo g2 de un homolog de skp1*. Esta proteína podría tener un papel importante en la regulación ejercida por la luz en el crecimiento del esporangióforo ya que interviene en procesos de señalización celular y se expresa significativamente más en oscuridad que en iluminación. La proteína 125429 es una *aspartato aminotransferasa* que participa en el transporte y metabolismo de aminoácidos y se expresa significativamente más en la oscuridad que en la luz. Finalmente la proteína con ID 176572 es una *2,4-dienoil-CoA reductasa (NADPH2)* que participa en el metabolismo.



**FIGURA 36.** A y B se representan las proteínas identificadas en la comparación entre el esporangioforo del tipo silvestre cultivado en las condiciones de luz y de

**TABLA 18.** Están presente las proteínas analizadas de la comparación entre el esporangioforo del tipo silvestre en condiciones de luz y

<b>N° De Proteína</b>	<b>ID</b>	<b>Nombre De Proteína</b>	<b>Del Luz Esp</b>	<b>Del Osc Esp</b>	<b>Anova</b>	<b>SCORE</b>	<b>Peptidos</b>
384	38715	Suppressor of g2 allele of skp1 homolog [ <i>Lichtheimia corymbifera</i> ]	0,092	0,148	0,001	79	1, 1
704	125429	Aspartate aminotransferase[ <i>Mucor circinelloides</i> ]	0,077	0,169	0,035	222	5, 2
314	176572	2,4-dienoyl-CoA reductase (NADPH2) [ <i>Mucor circinelloides</i> ]	0,027	0,016	0,004	128	3, 2

Al comparar las proteínas con expresión diferencial entre la luz y la oscuridad identificadas en el micelio con las identificadas en esta misma comparación en el esporangióforo cabe destacar, en primer lugar, que las 11 proteínas con expresión diferencial encontradas en el micelio (ver sección 4.3.11) no han sido detectadas en el esporangióforo. Además observamos que en el esporangióforo aparecen 3 proteínas con expresión diferencial que no aparecían en el micelio (ver sección 4.3.12). Este resultado indica que esta regulación ejercida por la condición lumínica parece ser distinta entre el esporangióforo y el micelio, provocando cambios en distintas vías de señalización celular. Teniendo en cuenta que las respuestas a la luz observadas en el esporangióforo (fototropismo, gravitropismo y evitación de objetos) son distintas a las observadas en el micelio (fotocarotenogénesis y fotomorfogénesis) no es de extrañar que la regulación ejercida por la luz sea distinta en ambos tipos de muestras.

#### **4.3.13. Comparación llevada a cabo en la estirpe silvestre entre micelios crecidos en medio sólido bajo iluminación vs esporangióforos en idénticas condiciones de crecimiento.**

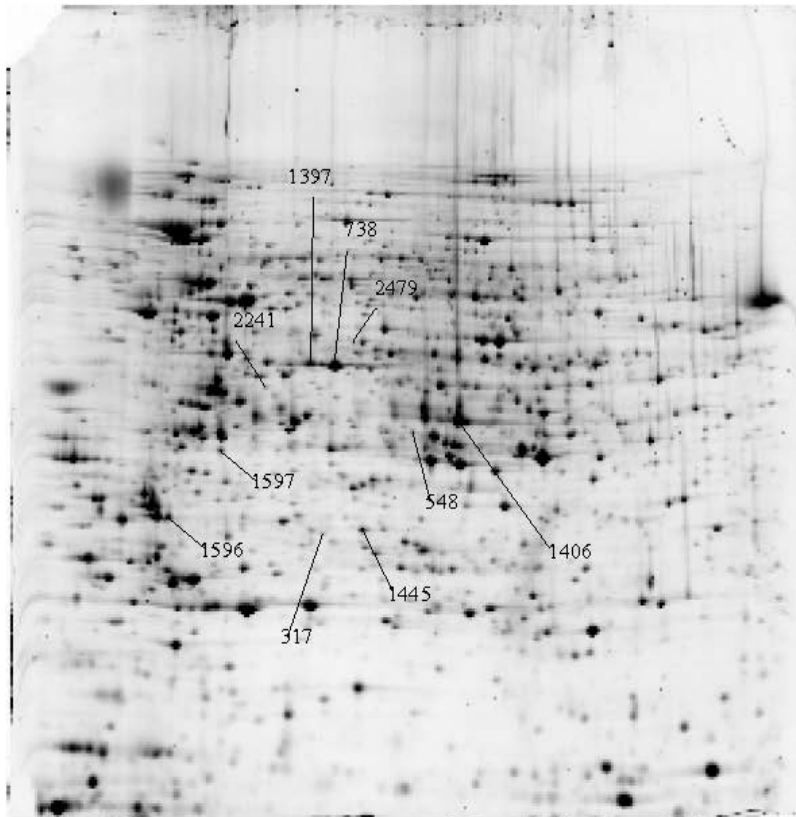
Esta comparación se realizó entre las proteínas expresadas en el micelio del tipo silvestre recogido del medio SIV sólido cultivado en la condición de luz y el esporangióforo de la misma estirpe crecida en las mismas condiciones que el micelio. Con esta comparación pretendemos detectar si bajo la condición de crecimiento en medio sólido e iluminación continua existen diferencias en los perfiles de expresión proteica entre las muestras de micelio y las de esporangióforo.

En esta comparación se detectaron un total de 55 proteínas con expresión diferencial de las que 40 se expresaron más en el esporangióforo, 1 proteína se expresó solo en el esporangióforo, 12 se expresaron más en el cultivo de micelio y 1 proteína solo se expresó en el micelio. Posteriormente se identificaron 34 de éstas que se presentan en la figura 37 y los resultados del análisis se observan en la tabla 19 (A, B).

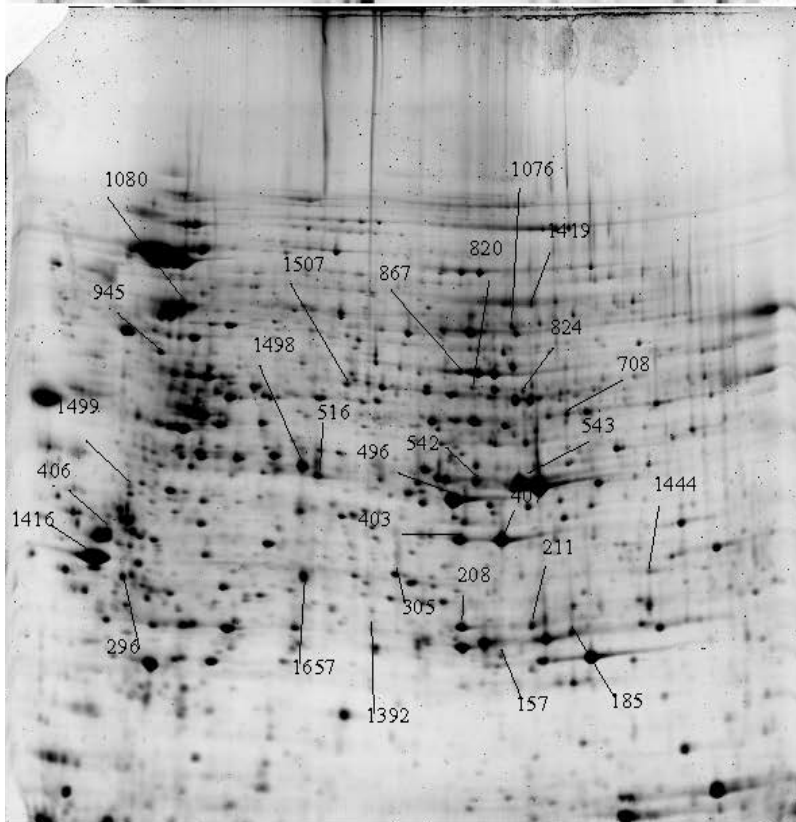


3 → pH → 11

A



B



**FIGURA 37.** A y B Representación de proteínas diferenciales identificadas en la comparación entre la estirpe silvestre cultivada en medio sólido, y el esporangióforo ambos en misma en condición de luz. Los números marcan las proteínas identificadas que tienen expresión diferencial en

**TABLA 19A.** Representa las proteínas diferenciales analizadas de la comparación entre el micelio del tipo silvestre cultivado en el medio sólido, condiciones de luz y el esporangióforo del mismo en las mismas condiciones.

N° De Proteína	ID	Nombre de Proteína	Del Luz Solido	Del Luz Espo	Anova	SCORE	Peptidos
1080	18255	Phosphoglycerate mutase [ <i>Lichtheimia corymbifera</i> ]	0,042	0,180	0,005	258,000	7, 2
211	36399	Dihydropteridine reductase [ <i>Lichtheimia corymbifera</i> ]	0,075	0,152	0,005	122	2, 1
2479	62269	Proliferation-associated protein 1 [ <i>Mucor ambiguus</i> ]	0,027		0,001	70	2, 1
2441	64493	TOM1-like protein 2-like [ <i>Mucor ambiguus</i> ]	0,022		0,000	167	7, 1
1596	65444	Hypothetical protein HMPREF1544_00169 [ <i>Mucor circinelloides</i> ]	0,112	0,044	0,016	190	2, 2
1392	69796	Folliculin-like [ <i>Mucor ambiguus</i> ]	0,030	0,083	0,003	80	1, 1
157	70026	NAD(P)H:quinone oxidoreductase, type IV [ <i>Mucor circinelloides</i> ]	0,037	0,139	0,000	78	2, 1
867	74310	Citrate synthase [ <i>Rhizopus delemar</i> ]	0,033	0,097	0,000	112	3, 1
1657	76361	Aldehyde dehydrogenase [ <i>Mucor ambiguus</i> ]		0,197	0,002	250	5, 3
1406/548	76956	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase [ <i>Rhizomucor miehei</i> ]	0,746	0,326	0,004	134	5, 2
1444	77484	Hypothetical protein HMPREF1544_05024 [ <i>Mucor circinelloides</i> ]	0,030	0,106	0,010	69	1, 1
820	77599	Hydroxyacid-oxoacid transhydrogenase, mitochondrial isoform X1 [ <i>Mucor ambiguus</i> ]	0,019	0,065	0,001	110	6, 2
317	79326	Mannose-1-phosphate guanyltransferase beta-like [ <i>Lichtheimia corymbifera</i> ]	0,034	0,004	0,013	169	5, 2
543/542	98645	Autophagic serine protease alp2 [ <i>Lichtheimia corymbifera</i> ]	0,357	0,984	0,007	288	3, 2
1445	124639	Hydroxyacylglutathione hydrolase, mitochondrial-like isoform X1 [ <i>Mucor ambiguus</i> ]	0,076	0,030	0,009	150	3, 1
708	125429	Aspartate aminotransferase [ <i>Mucor circinelloides</i> ]	0,034	0,102	0,022	108	3, 1
945	126931	Rab gdp-dissociation inhibitor [ <i>Lichtheimia corymbifera</i> ]	0,033	0,120	0,007	227	8, 2

**TABLA 19B.** Representa las proteínas diferenciales analizadas de la comparación entre el micelio del tipo silvestre cultivado en el medio sólido, condiciones de luz y el esporangióforo del mismo en las mismas condiciones.

N° De Proteína	ID	Nombre de Proteína	Del Luz Solido	Del Luz Espo	Anova	SCORE	Peptidos
296	128111	Proteasome subunit alpha type-5 [ <i>Mucor circinelloides</i> ]	0,052	0,144	0,013	178	3, 3
824	128417	Alpha-ketoglutarate dependent xanthinedioxygenase [ <i>Lichtheimia corymbifera</i> ]	0,031	0,065	0,014	128	4, 2
185	131929	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 3[ <i>Rhizomucor miehei</i> ]	0,006	0,098	0,025	102	2, 1
1498	133419	Ureohydrolase [ <i>Mucor ambiguus</i> ]	0,056	0,164	0,003	180	5, 2
1499	134581	Extracellular elastinolytic metallo proteinase [ <i>Mucor ambiguus</i> ]	0,019	0,137	0,030	67	5, 1
1397/738	134993	Glutamine synthetase [ <i>Lichtheimia corymbifera</i> ]	0,175	0,065	0,007	127	6, 2
305	135279	20S proteasome subunit beta 7 [ <i>Mucor circinelloides</i> ]	0,091	0,203	0,008	90	2, 1
496	146518	Cerevisin [ <i>Mucor circinelloides</i> ]	0,452	1,447	0,011	142	2, 2
1416	148740	Chitin deacetylase( <i>Mucor circinelloides</i> )	0,029	1,022	0,001	161	3, 2
1076	156664	Glutamate dehydrogenase (nad ) [ <i>Lichtheimia corymbifera</i> ]	0,051	0,209	0,000	63	3, 1
406	157282	Heat shock protein hss1 [ <i>Lichtheimia corymbifera</i> ]	0,091	0,397	0,018	170	5, 2
1419	176950	Isocitrate lyase [ <i>Mucor circinelloides</i> ]	0,028	0,118	0,002	187	8, 2
516	177523	Oxidoreductase [ <i>Mucor circinelloides</i> ]	0,122	0,393	0,001	292	8, 2
1597/407	178857	Had-superfamily hydrolase [ <i>Lichtheimia corymbifera</i> ]	0,074	0,044	0,239	81	2, 1
403	182531	START domain containing protein [ <i>Mucor ambiguus</i> ]	0,054	0,280	0,020	102	3, 1
1507	182982	Argininosuccinate synthetase [ <i>Lichtheimia corymbifera</i> ]	0,045	0,102	0,006	123	3, 1
208	188502	Protein bli-3 [ <i>Lichtheimia corymbifera</i> ]	0,038	0,153	0,010	74	4, 1

Entre las proteínas con expresión diferencial observadas en la condición de crecimiento bajo iluminación continua en medio sólido se detectaron varias proteínas involucradas en procesos de señalización celular a través de mecanismos de modificación postraducciona, recambio proteico y actuación como chaperonas. Todas estas proteínas presentaron una expresión significativamente superior en el esporangióforo

Hemos detectado dentro de esta comparación tres proteínas con expresión diferencial que intervienen en procesos de producción y conversión de energía. Entre ellas están la proteína 77599 que es una *isoforma X1 mitocondrial de la hidroxiaácido-oxoácido transhidrogenasa* que participa en la unión de iones metálicos y presenta una expresión significativamente superior en el esporangióforo que en el micelio. La 176950 que es una *isocitrato liasa* con expresión también significativamente superior en el esporangióforo que en el micelio. La 74310 que es una *citrato sintasa* que se expresa más en el micelio que en el esporangióforo.

Encontramos también en esta comparación un amplio grupo de proteínas que intervienen en distintos procesos metabólicos como por ejemplo en el transporte y metabolismo de carbohidratos, este es el caso de las proteínas 18255 (*fosfoglicerato mutasa*), 76361 (*aldehído deshidrogenasa*), 76956 (*gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa*) y 148740 (*xilano quitin deacetilasa*). En este grupo todas las proteínas se expresaron significativamente más en el esporangióforo que en el micelio a excepción de la 76956 en la que se detectó mayor expresión en el micelio.

Entre las proteínas implicadas en el transporte y metabolismos de aminoácidos con expresión diferencial en esta comparación se encuentran las proteínas 36399 (*dihidroteruduba reductasa*), 125419 (*aspartato aminotransferasa*), 76361 (*aldehído deshidrogenasa*), 133419 (*ureohidrolasa*), 134581 (*metalo proteinasa extracelular elastinolítica*), 156664 (*glutamato deshidrogenasa*), 182982 (*argininosuccinato sintetasa*) y 134993 (*glutamato sintetasa*). Todas ellas a excepción de la 134993 se expresaron significativamente más en el esporangióforo que en el micelio.

Con expresión significativamente mayor en el esporangióforo que en micelio en esta condición de crecimiento en iluminación también se encontraron las proteínas *182531* (*proteína contenedora de un dominio START*) implicada en el transporte y metabolismo lipídico, *128417* (*xantina dioxigenasa alfa-cetoglutarato dependiente*) con actividad oxido reductasa y participación en el metabolismo de electrones, *177523* (*oxido reductasa*) y *188502* (*proteína bli-3*) con actividad *piridoxamina fostato oxidasa*.

Finalmente con expresión significativamente mayor en el micelio que en el esporangióforo se identificaron las proteínas *64493* (*proteína tipo TOM1 2*) con actividad oxido reductasa e implicada en el transporte y secreción intracelular de proteínas, *79326* (*manosa-1-fosfato guanilil transferasa tipo  $\beta$* ) con actividad nucleotidil transferasa, *124639* (*hidroxiacilglutación hidrolasa tipo mitocondrial*) y *178857* (*hidrolasa de la superfamilia had*) implicada en el transporte y metabolismo de iones.

#### **4.3.14. Comparación llevada a cabo en la estirpe silvestre entre micelios crecidos en medio solido bajo oscuridad vs esporangióforos en idénticas condiciones de crecimiento.**

Esta comparación se realizó entre las proteínas expresadas en el micelio del tipo silvestre recogido del medio SIV solido cultivado en la condición de oscuridad y el esporangioforo de la misma estirpe crecida en las mismas condiciones que el micelio.

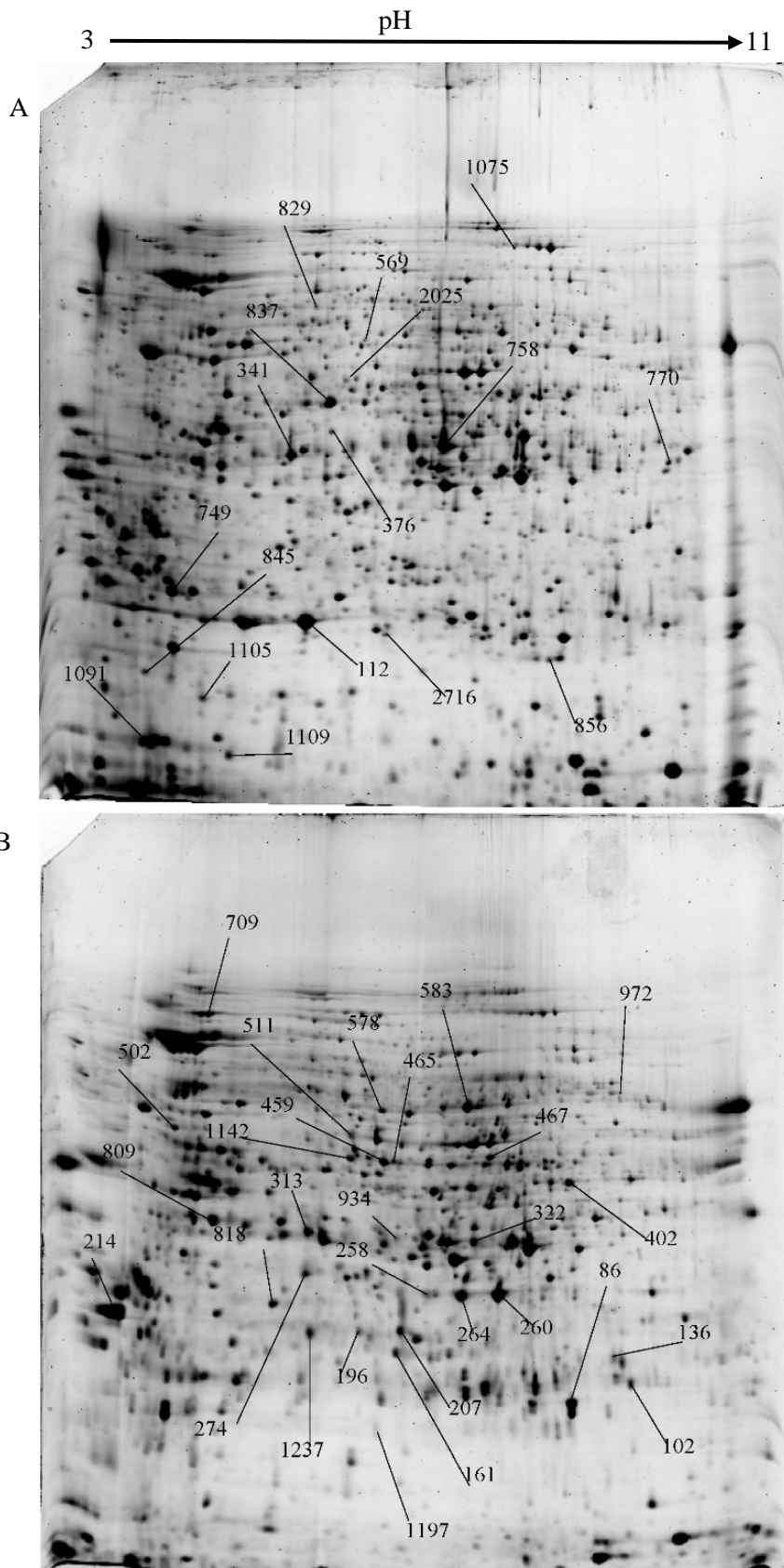
Con esta comparación pretendemos detectar si bajo la condición de crecimiento en medio sólido y oscuridad continua existen diferencias en los perfiles de expresión proteica entre las muestras de micelio y las de esporangióforo.

Se detectaron un total de 77 proteínas con expresión diferencial de las que 56 se expresaron significativamente más en el esporangióforo, 1 proteína se expresó sólo en el esporangióforo, 17 tuvieron una expresión mayor en el micelio y 3 tres proteínas sólo se detectaron en el micelio.

Se identificaron 41 de estas proteínas mediante el análisis EM MALDI TOF-TOF. Las proteínas mencionadas aparecen representadas en la figura 38. Los datos correspondientes de la identificación aparecen reflejados en la tabla 20 (A, B).

Entre las proteínas con expresión diferencial observadas en la condición de crecimiento bajo oscuridad total en medio sólido se detectaron varias proteínas involucradas en procesos de señalización celular a través de mecanismos de modificación postraducciona, recambio proteico y actuación como chaperonas. Estas proteínas son la 98645 es una *serina proteasa alp2 autofágica*, la 126931 y la 182982 que son *inhibidores de disociación rab GDPK*, la 29180 que es una *subunidad reguladora del proteosoma 26S* con actividad nucleosido trifosfatasa en el citoplasma, la 179677 que es una *subunidad alfa tipo 7 del proteosoma* implicada en el catabolismo de proteínas dependiente de ubiquitinas mediante actividad endopeptidasa, la 134437 que es una *subunidad alfa tipo 6 del proteosoma* implicada en el catabolismo de proteínas dependiente de ubiquitinas mediante actividad endopeptidasa, la 134824 que es una *subunidad beta 4 del proteosoma 20S* implicada en el catabolismo de proteínas dependiente de ubiquitinas mediante actividad treonina endopeptidasa, la 110897 que es una *subunidad beta 6 del proteosoma 20S* implicada en el catabolismo de proteínas dependiente de ubiquitinas mediante actividad treonina endopeptidasa, la 153870 que es una *proteína con cadena de unión a multiubiquitina*, la 187821 que es una *peptidasa de la familia s9c* con actividad peptidasa tipo serina, la 117188 que es una *glucosamina 6 fosfato* con actividad acetiltransferasa, la 38715 que es un *supresor del alelo g2 de skp1*. Todas estas proteínas presentaron una expresión significativamente superior en el esporangióforo que en el micelio, por lo que podrían tener un papel importante en la transmisión de la señal de crecimiento en forma de esporangióforo bajo condiciones de oscuridad.

La proteína 107242 que es un *activador de chaperonas aha1*, la 135421 que es una *proteína de la familia ahpC/TSA* con actividad antioxidante y la 180837 que es un *inhibidor de disociación rob GDP* que también participan en mecanismos de señalización celular se expresaron más en el micelio que en el esporangióforo por lo que podrían tener un papel importante en la transmisión de la señal de crecimiento en forma de micelio bajo condiciones de oscuridad.



**FIGURA 38.** A y B. están marcadas las proteínas identificadas en la comparación entre el micelio del tipo silvestre cultivado en el medio solido vs el esporangióforo, ambos en condiciones de oscuridad. Los números marcan las proteínas identificadas que tienen expresión diferencial en esa condición.

**TABLA 20A.** Se representan los resultados de las proteínas diferenciales en la comparación entre micelio del tipo silvestre cultivado en el medio sólido en condición de oscuridad con el esporangióforo de la misma en condición de oscuridad.

Nº De Proteína	ID	Nombre De Proteína	Delosolido	Del Espo Osc	Anova	SCORE	Peptidos
465	29180	26S protease regulatory subunit 10B [ <i>Rhizopus delemar</i> ]	0,029	0,071	0,002	89	4, 1
511	36112	Arginine biosynthetic enzyme activities [ <i>Lichtheimia corymbifera</i> ]	0,029	0,152	0,040	175	4, 2
274	38715	Suppressor of g2 allele of skp1 homolog [ <i>Lichtheimia corymbifera</i> ]	0,044	0,162	0,001	79	1, 1
207	58805	Aldehyde dehydrogenase [ <i>Mucor ambiguus</i> ]	0,063	0,246	0,001	117	4, 1
2025	62269	Proliferation-associated protein 1 [ <i>Mucor ambiguus</i> ]	0,035		0,000	265	6, 3
1075	74820	Aconitate hydratase [ <i>Lichtheimia corymbifera</i> ]	0,051	0,012	0,018	132	6, 1
1237	76361	Aldehyde dehydrogenase [ <i>Mucor ambiguus</i> ]		0,275	0,000	176	5, 2
758	76956	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase [ <i>Rhizomucor miehei</i> ]	0,936	0,291	0,000	307	7, 2
1109	77169	Coiled-coil domain-containing protein [ <i>Mucor ambiguus</i> ]	0,078	0,037	0,005	230	7, 2
583	77191	Citrate synthase [ <i>Rhizopus delemar</i> ]	0,111	0,434	0,013	134	3, 1
136	77484	Proteína hipotética	0,026	0,087	0,009	100	2, 1
467	77599	Hydroxyacid-oxoacid transhydrogenase, mitochondrial isoform X1 [ <i>Mucor ambiguus</i> ]	0,041	0,098	0,015	156	4, 3
934	78295	NAD-malate dehydrogenase [ <i>Mucor ambiguus</i> ]	0,017	0,080	0,013	69	2, 1
322	98645	Autophagic serine protease alp2 [ <i>Lichtheimia corymbifera</i> ]	0,038	0,184	0,011	275	4, 2
376	107242	Chaperone activator aha1 [ <i>Lichtheimia corymbifera</i> ]	0,041	0,010	0,015	150	5, 2
770	108290	NADH-cytochrome b5 reductase [ <i>Lichtheimia corymbifera</i> ]	0,050	0,013	0,009	230	8, 2
196	110897	20S proteasome subunit beta 6 [ <i>Mucor circinelloides</i> ]	0,041	0,133	0,001	189	2, 2
856	117188	Glucosamine 6-phosphate [ <i>Lichtheimia corymbifera</i> ]	0,052	0,117	0,000	78	2, 1
578	121388	Aldehyde dehydrogenase [ <i>Mucor circinelloides</i> ]	0,047	0,151	0,009	210	3, 2
86	124627	Fe-Mn family superoxide dismutase [ <i>Mucor circinelloides</i> ]	0,378	1,011	0,017	152	2, 1
402	125429	Aspartate aminotransferase [ <i>Mucor circinelloides</i> ]	0,037	0,167	0,000	205	6, 2



**TABLA 20B.** Se representan los resultados de las proteínas diferenciales en la comparación entre micelio del tipo silvestre cultivado en el medio solido en condición de oscuridad con el esporangióforo de la misma en condición de oscuridad.

N° De Proteína	ID	Nombre De Proteína	Deloscsolido	Del Espo Osc	Anova	SCORE	Peptidos
502	126931	Rab gdp-dissociation inhibitor [ <i>Lichtheimia corymbifera</i> ]	0,031	0,080	0,002	283	6, 3
1105	130118	RNA-binding domain-containing protein [ <i>Trametes versicolor</i> ]	0,694	0,184	0,004	78	3, 1
341	131929	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 3 [ <i>Rhizopus delemar</i> ]	0,325	0,145	0,003	372	6, 3
809	132539	Fructose-bisphosphate aldolase [ <i>Lichtheimia corymbifer</i> ]	0,134	0,327	0,006	209	3, 1
313	133419	Ureohydrolase [ <i>Mucor ambiguus</i> ]	0,043	0,217	0,001	204	4, 2
161	134437	Proteasome subunit alpha type-6 [ <i>Mucor circinelloides</i> ]	0,082	0,193	0,019	169	5, 2
102	134824	20S proteasome subunit beta 4 [ <i>Mucor circinelloides</i> ]	0,092	0,213	0,006	257	6, 2
112	135421	AhpC/TSA family protein [ <i>Mucor ambiguus</i> ]	1,799	0,305	0,001	290	6, 2
2716	135421	AhpC/TSA family protein [ <i>Mucor ambiguus</i> ]	0,073		0,002	198	4, 2
214	148740	Chitin deacetylase [ <i>Mucor ambiguus</i> ]	0,039	1,580	0,005	107	3, 1
1197	153870	Multiubiquitin chain binding protein MBP1 [ <i>Mucor ambiguus</i> ]		0,060	0,000	71	1, 1
829	157664	Pyruvate kinase [ <i>Mucor circinelloides</i> ]	0,049	0,006	0,006	115	6, 2
1091	169294	Actin depolymerizing factor [ <i>Lichtheimia corymbifera</i> ]	0,165	0,007	0,005	124	2, 1
845	172041	Kinesin family member C1 [ <i>Mucor ambiguus</i> ]	0,087	0,020	0,011	213	3, 2
818	179677	20S proteasome subunit alpha 7 [ <i>Mucor circinelloides</i> ]	0,076	0,185	0,000	263	6, 3
749	180837	RHO protein GDP dissociation inhibitor [ <i>Rhizopus delemar</i> ]	0,514	0,163	0,001	108	5, 1
258/260/264/972	182531	START domain containing protein [ <i>Mucor ambiguus</i> ]	0,017	0,169	0,004	119	4, 1
1142/459	182982	Argininosuccinate synthetase [ <i>Lichtheimia corymbifera</i> ]	0,045	0,126	0,001	170	4, 3
837	186327	Endonuclease exonuclease phosphatase familyprotein [ <i>Lichtheimia corymbifera</i> ]	0,976	0,212	0,018	169	2, 1
709	187821	S9c family peptidase [ <i>Lichtheimia corymbifera</i> ]	0,091	0,255	0,012	377	5, 3
569	188483	Arginine biosynthetic enzyme activities [ <i>Lichtheimia corymbifera</i> ]	0,040	0,010	0,018	197	7, 2

Hemos detectado dentro de esta comparación proteínas con expresión diferencial que intervienen en procesos de producción y conversión de energía. Entre ellas están las proteínas 77599 que es una *isoforma XI mitocondrial de la hidroxiaácido-oxoácido transhidrogenasa*, la 74310 que es una *citrato sintasa*, la 78295 que es una *NAD-malato deshidrogenasa* y la 121388 que es una *aldehído deshidrogenasa* que participa en el transporte de electrones con actividad *monooxigenasa*. Estas cuatro proteínas presentan una expresión significativamente superior en el esporangióforo que en el micelio por lo que podrían participar en la captación y procesado de energía necesarios para el crecimiento de los esporangióforos en condiciones de oscuridad.

También participan en procesos de producción y conversión de energía las siguientes proteínas que han mostrado una expresión significativamente mayor en el micelio que en el esporangióforo. La 74820 que es una *aconitato hidratasa* y la 108290 que es una *NADH-citocromo b5-reductasa* que participa en el transporte de electrones con actividad oxido reductasa. Estas tres proteínas podrían participar en la captación y procesado de energía necesarios para el crecimiento en forma miceliar en condiciones de oscuridad.

Se identificó en esta comparación otro grupo de proteínas con expresión significativamente superior en el micelio que en el esporangióforo que intervienen en el control del ciclo celular y en el citoesqueleto por lo que podrían estar involucradas en la transmisión de la señal de crecimiento en forma de micelio en condiciones de oscuridad. Estas proteínas son la 77169 que es una *proteína que contiene un dominio de bobina en espiral* y participa en el control del ciclo celular la división celular y el reparto cromosómico, la 169294 que es un *factor de despolimerización de actina* que participa en la unión a actina en el citoesqueleto y la 172041 que es un *miembro de la familia kinesina*.

Otro grupo de proteínas interesantes por su posible papel regulador para las que se detectó una expresión significativamente superior en el micelio que en el esporangióforo fueron la 62269 que es una *proteína asociada a proliferación* con actividad *metalopeptidasa*, la 130118 que es una *proteína que contiene un dominio de unión a ARN* y la 186327 que es una proteína de la familia *endonucleasa exonucleasa*

*fosfatasa*. Estas tres proteínas podrían participar en el control del crecimiento en fase miceliar en condiciones de oscuridad.

Encontramos también en esta comparación un amplio grupo de proteínas que intervienen en distintos procesos metabólicos como por ejemplo en el transporte y metabolismo de carbohidratos, este es el caso de las proteínas 36112 (*6-fosfogluconato deshidrogenasa*), 132539 (*fructosa-bisfosfato aldolasa*), 148740 (*quitina deacetilasa*), 76956 (*gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa*) y 157664 (*piruvato kinasa*). Las tres primeras proteínas se expresaron significativamente más en el esporangióforo que en el micelio mientras que en las dos últimas se detectó mayor expresión en el micelio.

Entre las proteínas implicadas en el transporte y metabolismos de aminoácidos con expresión diferencial en esta comparación se encuentran las proteínas 125429 (*aspartato aminotransferasa*), 58805 (*aldehído deshidrogenasa*), 76361 (*aldehído deshidrogenasa*), 133419 (*ureohidrolasa*), 182982 (*argininosuccinato sintetasa*) y la 188483 (*enzima con actividad biosintética de arginina*). Las tres primeras proteínas se expresaron significativamente más en el esporangióforo que en el micelio mientras que en las dos últimas se detectó mayor expresión en el micelio.

Con actividad en el transporte y metabolismo de lípidos se identificaron distintas variantes de la proteína 182531 que es una *proteína con un dominio START*. Finalmente se identificó la proteína 124627 que es una *superóxido dismutasa de la familia Fe-Mn* que participa en el transporte y metabolismo de iones (de Castro et al., 2013). Estas proteínas presentaron una expresión significativamente mayor en el esporangióforo que en el micelio por lo que podrían ser importantes en el crecimiento del esporangióforo en condiciones de oscuridad.

En el tipo silvestre NRRL1555 de *Phycomyces* al observar las proteínas con expresión diferencial entre el micelio y el esporangióforo detectadas en la condición de crecimiento en iluminación, así como las proteínas con expresión diferencial entre el micelio y el esporangióforo detectadas en la condición de crecimiento en oscuridad, cabe destacar, en primer lugar, que se observa un número muy elevado de proteínas diferencialmente expresadas entre el micelio y el esporangióforo tanto en iluminación como en oscuridad. Este gran número de diferencias es del orden de 5 veces más que en

las comparaciones anteriores llevadas a cabo en este trabajo como son las analizadas entre las condiciones de luz y oscuridad en el micelio del tipo silvestre, o entre las condiciones de luz y oscuridad en el esporangióforo del tipo silvestre o en cualquier comparación entre micelio del tipo silvestre y micelio de los mutantes *mad* tanto en luz como en oscuridad. Estos resultados parecen indicar que entre la fase de crecimiento en micelio y la fase de crecimiento en esporangióforo existen diferencias muy importantes en los patrones de expresión proteínica que parecen corresponder a dos estadios completamente distintos desde el punto de vista funcional en el desarrollo de este hongo.

Entre las proteínas expresadas diferencialmente entre el esporangióforo y el micelio, 20 se detectaron exclusivamente cuando el crecimiento tuvo lugar bajo iluminación continua, por lo que la irradiación con luz azul podría ser un requerimiento necesario para la manifestación de estas diferencias entre el micelio y el esporangióforo. En este grupo de proteínas algunas participan en procesos de señalización celular mediante modificaciones postraduccionales, recambio proteico y actuación como chaperonas y se expresan significativamente más en el esporangióforo que en el micelio (*subunidad alfa tipo 5 del proteosoma, subunidad beta 7 del proteosoma, cerevisina y preteína de choque térmico hss1*). Otras proteínas de este grupo participan en el control de la transcripción como es el caso de la *proteína tipo foliculina* y la *NAD (P)H-quinona oxidoreductasa tipo IV* o en procesos de producción y conversión de energía como la *isocitrato liasa*, proteínas significativamente más expresadas en el esporangióforo. Encontramos también proteínas que participan en el transporte intracelular y se expresan más en el micelio como son la *hidrolasa de la familia had* y la *proteína tipo TOM1*. Otras proteínas con expresión mayor en el esporangióforo participan en el metabolismo de aminoácidos como la *dihidropteridina reductasa* y la *glutamato deshidrogenasa*, o en el metabolismo de carbohidratos como la *fosfoglicerato mutasa*. Finalmente encontramos también la *proteína xantina dioxigenasa alfa-cetoglutarato dependiente* que participa en el transporte de electrones, la *metalo proteínasa elastinolítica*, la *oxido reductasa* y la *proteína bli-3* todas de expresión mayor en el esporangióforo y la *proteína manosa-1-fosfato guanidil transferasa tipo beta* que se expresa más en el micelio.

Encontramos igualmente, que entre las proteínas expresadas diferencialmente entre el esporangióforo y el micelio, 27 se detectaron exclusivamente cuando el crecimiento tuvo lugar bajo oscuridad continua, por lo que la irradiación ausencia de luz podría ser un requerimiento necesario para la manifestación de estas diferencias entre el micelio y el esporangióforo. En este grupo de proteínas algunas participan en procesos de señalización celular y se expresan significativamente más en el esporangióforo que en el micelio, es interesante señalar que la mayoría de estas proteínas de señalización están relacionadas con el proteosoma y son dependientes de ubiquitina y parecen ser proteínas análogas (pero en este caso exclusivas de la condición de crecimiento en oscuridad) a un grupo de proteínas mencionadas en el párrafo anterior y detectadas exclusivamente en la condición de crecimiento en iluminación. Entre estas proteínas se encuentran la *subunidad alfa tipo 6 del proteosoma*, *subunidad alfa tipo 7 del proteosoma 20S*, *subunidad beta 6 del proteosoma 20S*, *subunidad beta 4 del proteosoma 20S*, *la subunidad 10B de la proteasa reguladora 20S* y *la proteína de unión a la cadena de multiubiquitina*. También implicadas en procesos de señalización se encuentran *la peptidasa de la familia s9c* y *el supresor del alelo g2 de skp1*, ambas más con mayor expresión en el esporangióforo. Otras proteínas de este grupo participan la producción y conversión de energía como *la citrato sintasa*, *la NADH citocromo b5 reductasa* y *la NAD-malato deshidrogenasa*. Otras posibles proteínas con función reguladora son *el activador de chaperonas aha1*, *la proteína con un dominio de unión a RNA* y *el inhibidor de disociación rho GDP*, todas ellas con expresión significativamente mayor en el micelio. Algunas proteínas de este grupo participan en el citoesqueleto como *el factor de despolimerización de actina* y *el miembro de la familia de kinesina C1*, ambas con expresión significativamente superior en el micelio. Finalmente encontramos en este grupo varias proteínas implicadas en el metabolismo como son *la enzima con actividad biosintética de arginina*, *la piruvato kinasa*, *la proteína con un dominio de bobina en espiral*, *la superóxido dismutasa de la familia Fe-Mn*, *la aldehído deshidrogenasa*, *la 6-fosfogluconato deshidrogenasa*, *la fructosa-bisfosfato aldolasa*, y *la endonucleasa exonucleasa fosfatasa*.

Cabe mencionar también un grupo de 13 proteínas para las que se detectó una expresión diferencial entre el micelio y el esporangióforo tanto para la condición de crecimiento en iluminación como para la condición de crecimiento en oscuridad, por lo que las diferencias en la expresión parecen ser independientes de la condición lumínica

y deberse principalmente al tipo de crecimiento en forma de micelio o de esporangióforo. En este grupo se encuentran algunas proteínas con una posible función reguladora como es el caso del *inhibidor de disociación rab GDP*, de la *senina proteasa autofágica alp2* y de la *proteína 1 asociada a proliferación*, las dos primeras con una expresión significativamente superior en el esporangióforo y la última en el micelio. La proteína *hidroxiácido-oxiácido transhidrogenasa mitocondrial* que actúa en la producción y conversión de energía y presentó una mayor expresión en el esporangióforo que en el micelio. Proteínas implicadas en el metabolismo de aminoácidos con expresión significativamente superior en el esporangióforo como son la *aspartato aminotransferasa*, la *ureohidrolasa* y la *argininosuccinato sintetasa*. Proteínas implicadas en el metabolismo de carbohidratos como son dos proteínas con actividad *gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa* (mayor expresión en el micelio), la *aldehído deshidrogenasa* (mayor expresión en el esporangióforo) y la *quitin deacetilasa xilanasa* (mayor expresión en el esporangióforo). Finalmente la *proteína con dominio START* implicada en el metabolismo de lípidos y con expresión mayor en el esporangióforo y la proteína con ID 77484 con expresión significativamente mayor en el esporangióforo y de función desconocida.

El micelio de *Phycomyces* puede crecer en medio líquido o en medio sólido. En medio líquido solamente presenta crecimiento miceliar y no forma esporangióforos. Por el contrario, en medio sólido las esporas germinan y forman en primer lugar una capa de hifas horizontales que se ramifican con rapidez hasta cubrir toda la superficie del medio formando el micelio. Después de que el micelio ha crecido sobre la superficie del agar por dos o tres días se inicia el crecimiento en vertical de las estructuras aéreas denominadas esporangióforos (ver Introducción). Las esporas se acumulan dentro de los esporangios que están en el extremo de los esporangióforos. Los esporangióforos contienen una vacuola central a lo largo de toda su longitud y a la misma se incorporan las sustancias y los orgánulos del micelio incluyendo los núcleos, hasta que estos esporangióforos alcanzan el estado I-II, aunque no se sabe si las partículas subcelulares en el esporangióforo son sintetizadas sólo en el micelio o una parte puede ser sintetizada en los propios esporangióforos. El micelio no contiene tabiques o septos y por tanto el micelio, como un todo, puede decirse que es una sola célula o cenocito (del griego *kronos* = común y *cyros* = cavidad). A diferencia de otros hongos las hifas no se anastomosan. Los esporangios presentan en su interior corrientes protoplásmicas muy

rápidas 2-3  $\mu\text{m/s}$  y que son bidireccionales. Estas corrientes también se presentan en las hifas miceliarias aunque en el micelio son unas 10 veces más rápidas. Por tanto los esporangióforos son esencialmente tubos como las hifas miceliarias pero normalmente más largos y grandes, no están ramificados y crecen hacia el aire.

Tenemos pues tres tipos de estructuras diferentes por ser analizadas a nivel proteómico: los micelios crecidos en medio líquido, los micelios crecidos en medio sólido y los esporangióforos crecidos en medio sólido. Las condiciones de crecimiento del micelio en medio líquido con aireación y agitación constantes, no son las condiciones naturales de crecimiento de *Phycomyces* (que se asemejan más al crecimiento en medio sólido), sin embargo presentan las ventajas de un manejo más fácil y una mejor repetitividad de los resultados al controlarse mejor las condiciones de cultivo.

El micelio crecido en medio sólido presenta la ventaja de que se asemeja más a las condiciones naturales de crecimiento de *Phycomyces* pero la separación del agar de las estructuras miceliarias, así como la separación de los esporangióforos del micelio es más tediosa y requiere más tiempo.

Los esporangióforos responden a estímulos externos como la luz, gravedad y presencia de objetos cercanos (evitación). Estas respuestas tienen sentido ecológico si se considera que en el hábitat natural de ese hongo las esporas forman el micelio y los esporangióforos tienen que crecer evitando las hifas de los bosques y salir a la superficie creciendo hacia la luz, en donde el esporangióforo (portador de las esporas) contacta con roedores y otros animales y de esta manera se esparcen las esporas a otros lugares. Los micelios crecidos en medio sólido también presentan reacciones a otros estímulos. Por ejemplo la luz incrementa la síntesis de carotenos (fotocarotenogénesis) y también influye en la formación de los esporangióforos (fotomorfogénesis). Estas dos respuestas son fundamentalmente respuestas miceliarias.

Es por tanto comprensible, que la expresión proteica en los esporangióforos sea distinta de la de los micelios de donde provienen por las distintas funciones que realizan estas dos estructuras.

Así mismo, es de esperar, que el perfil de expresión proteica de los micelios crecidos en cultivo líquido sea diferente al de los micelios obtenidos a partir de cultivo en medio sólido y ambos dos diferentes al de los esporangióforos.

En esta tesis se han realizado las comparaciones de los proteomas del tipo silvestre y de los mutantes ciegos *madA*, *madB* y *madC* en las mismas condiciones de crecimiento en medio líquido, y a su vez se ha estudiado las diferencias en la expresión de las proteínas entre los micelios crecidos en medio sólido y sus esporangióforos en la estirpe tipo silvestre. Esta es la primera vez que se obtienen estos datos en la literatura. El elucidar las diferentes proteínas que están presentes en el esporangióforo y el micelio contribuirá notablemente al esclarecimiento de sus funciones y profundizará en el conocimiento a nivel molecular de los procesos de transmisión de señales tales como la recepción de la luz, transmisión de estímulos y elaboración de los mecanismos de respuesta.



## **5. CONCLUSIONES**

1. Las mutaciones presentes en el gen *cryA* en las estirpes *madC* son responsables, al menos en parte, del fenotipo de ceguera atribuido a estos mutantes que se caracterizan por tener alteradas todas las respuestas a la luz (fototropismo, fotogravitropismo, fotoevitación, fotomorfogénesis y fotocarotenogénesis).
2. En este trabajo se describe por primera vez el proteoma completo de *Phycomyces blakesleeanus*, siendo el primero que se realiza en esta familia de hongos. Este trabajo facilitará estudios posteriores que puedan investigar cambios en el proteoma en distintas condiciones así como establecer una referencia para la comparación con otro tipo de hongos de similares características.
3. En la comparación de los perfiles de expresión proteica entre micelios crecidos en condiciones de iluminación y oscuridad se detectaron varias proteínas con expresión diferencial entre ambas condiciones, tanto en el tipo silvestre como en los distintos mutantes *mad*. Muchas de estas proteínas llevan a cabo funciones de señalización celular por lo que podrían participar en los distintos procesos de transmisión de la señal lumínica.
4. La gran mayoría de las diferencias en los patrones de expresión proteica entre la condición de luz y la de oscuridad fueron específicas de cada estirpe (tipo silvestre, *madA*, *madB* o *madC*), lo que parece indicar que los patrones de regulación por la luz parecen estar alterados de forma distinta en cada uno de estos tres tipos principales de mutantes ciegos de *Phycomyces*.
5. Las principales diferencias en los patrones de expresión proteica se observaron al comparar las muestras obtenidas a partir de micelios con las obtenidas a partir de esporangióforos, tanto en iluminación como en oscuridad. Estas diferencias fueron significativamente superiores a las detectadas entre las condiciones de luz y de oscuridad para cualquiera de las estirpes, o para la misma condiciones de iluminación entre el tipo silvestres y cualquiera de los mutantes *mad*. De este resultado se puede concluir que estos dos estadios de crecimiento (micelio y esporangióforo) se corresponden con dos fases completamente distintas desde el

punto de vista de la expresión proteica del hongo, independientemente de la condición de iluminación.

6. Una de las pocas proteínas para la que se detectó un mismo patón de desregulación proteica en los tres tipos de mutantes *mad* fue la *gamma actina*. En condiciones de crecimiento en oscuridad se detectó una expresión significativamente inferior de esta proteína en los tres mutantes *mad* que en el tipo silvestre. Estos resultados parecen indicar que la reducción del nivel de expresión de esta proteína observada en los mutantes *madA*, *madB* y *madC* podría participar en la manifestación del fenotipo de ceguera atribuido a estos mutantes.

## **6. ANEXO I**

**TABLA 6 A.** Proteoma total de *Phycomyces blakesleeanus*, tipo silvestre NRRL1555.

N° De Proteína	ID	Nombre De Proteína	SCORE	Peptidos
3	75034	Putative Acetyl-CoA acyltransferase [ <i>Rhizopus microsporus</i> ]	117	2, 1
13	177169	Putative Isocitrate dehydrogenase [NADP] [ <i>Rhizopus microsporus</i> ]	147	8, 2
16	75347	Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase [ <i>Rhizopus delemar</i> ]	63	4, 1
17	178031	Glucose-6-phosphate dehydrogenase [ <i>Mucor circinelloides</i> ]	32	0, 1
25	108829	Related to bfr1-nuclear segregation protein [ <i>Lichtheimia corymbifera</i> ]	119	3, 2
26	125263	Cystathionine beta-synthase [ <i>Mucor ambiguus</i> ]	88	4, 1
31	156664	Putative Glutamate dehydrogenase [ <i>Rhizopus microsporus</i> ]	210	9, 2
32	133482	Mitochondrial 3-hydroxyisobutyryl-hydrolase [ <i>Lichtheimia corymbifera</i> ]	91	8, 1
33	77599	Hydroxyacid-oxoacid transhydrogenase, mitochondrial isoform X1 [ <i>Mucor ambiguus</i> ]	119	7, 2
39	118095	Mitochondrial pyruvate dehydrogenase E1 component beta subunit [ <i>Mucor ambiguus</i> ]	27	0, 1
40	187530	Isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit 2, mitochondrial [ <i>Mucor circinelloides</i> ]	55	3, 1
41	36604	Isocitrate dehydrogenase [NADP], mitochondrial [ <i>Mucor circinelloides</i> ]	162	5, 2
43	182982	Putative Argininosuccinate synthase [ <i>Lichtheimia ramosa</i> ]	114	8, 1
44	128779	Medium-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial [ <i>Mucor ambiguus</i> ]	284	6, 2
45	151682	Hypothetical protein [ <i>Parasitella parasitica</i> ]	23	0, 1
46	74908	O-acetylhomoserine (thiol)-lyase [ <i>Mucor circinelloides</i> ]	58	3, 1
47	133959	Beta-isopropylmalate dehydrogenase [ <i>Lichtheimia corymbifera</i> ]	311	11, 3
48	134993	Putative Glutamine synthetase [ <i>Rhizopus microsporus</i> ]	70	4, 1
52	109058	Aldehyde dehydrogenase (NAD+) [ <i>Mucor circinelloides</i> ]	65	3, 1

**TABLA 6 B.** Proteoma total de *Phycomyces blakesleeanus*, tipo silvestre NRRL1555.

N° De Proteína	ID	Nombre De Proteína	SCORE	Peptidos
53	36112	6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating [ <i>Rhizopus delemar</i> ]	215	6, 2
75	29940	Succinyl-CoA ligase [GDP-forming] subunit beta, mitochondrial [ <i>Mucor circinelloide</i> ]	77	3, 1
77	156418	Alkaline phosphatase [ <i>Mucor ambiguus</i> ]	176	3, 1
83	186453	Keto-acid reductoisomerase, mitochondrial [ <i>Mucor circinelloides</i> ]	68	7, 0
84	132539	Fructose-bisphosphate aldolase [ <i>Lichtheimia corymbifera</i> ]	92	1, 1
85	179552	Enolase [ <i>Lichtheimia corymbifera</i> ]	276	8, 2
86	121375	Elongation factor Tu [ <i>Rhizopus delemar</i> ]	32	0, 1
89	74820	Putative Aconitate hydratase, mitochondrial [ <i>Lichtheimia ramosa</i> ]	71	5, 1
90	135377	Eukaryotic translation initiation factor 5 [ <i>Mucor ambiguus</i> ]	58	7, 0
91	178459	2-oxoglutarate dehydrogenase E1 component [ <i>Mucor ambiguus</i> ]	84	6, 1
94	160008	Elongation factor 2 [ <i>Rhizopus delemar</i> ]	33	0, 1
110	126931	Rab gdp-dissociation inhibitor [ <i>Lichtheimia corymbifera</i> ]	222	7, 2
115	125125	Putative Piso0_001649 protein [ <i>Rhizopus microsporus</i> ]	146	7, 1
119	78179	Heat shock 70 kDa protein 2 [ <i>Rhizopus delemar</i> ]	506	13, 3
124	155542	Putative Mannose-6-phosphate isomerase [ <i>Rhizopus microsporus</i> ]	47	0, 1
126	180049	Heat shock protein ssc1 [ <i>Lichtheimia corymbifera</i> ]	162	7, 1
152	123571	Putative Elongation factor 1-beta [ <i>Rhizopus microsporus</i> ]	193	4, 2
153	134066	Hypothetical protein HMPREF1544_07893 [ <i>Mucor circinelloides</i> ]	126	4, 1
154	158069	Carboxypeptidase Y precursor [ <i>Mucor ambiguus</i> ]	81	1, 1
160	180837	Rho-gdp dissociation inhibitor [ <i>Rhizopus microsporus</i> ]	133	4, 1
161	159602	Triose phosphate isomerase [ <i>Lichtheimia corymbifera</i> ]	83	7, 0

**TABLA 6 C.** Proteoma total de *Phycomcyes blakesleeanus*, tipo silvestre NRRL1555.

N° De Proteína	ID	Nombre De Proteína	SCORE	Peptidos
163	131007	Putative Translationally-controlled tumor protein [ <i>Rhizopus microsporus</i> ]	107	5, 1
164	124245	Had-variant 3 family protein [ <i>Lichtheimia corymbifera</i> ]	79	3, 1
165	179677	20S proteasome subunit alpha 7 [ <i>Mucor circinelloides</i> ]	233	7, 2
166	149003	U2 small nuclear ribonucleoprotein A [ <i>Mucor ambiguus</i> ]	113	7, 1
167	160812	Putative Proteasome subunit alpha type [ <i>Rhizopus microsporus</i> ]	181	8, 1
170	137566	SGNH hydrolase [ <i>Lichtheimia corymbifera</i> ]	67	3, 1
171	110897	Putative Proteasome subunit beta type [ <i>Rhizopus microsporus</i> ]	182	7, 2
174	181278	Methyltransferase [ <i>Mucor ambiguus</i> ]	194	3, 2
175	120644	NGG1p interacting factor 3 family [ <i>Mucor ambiguus</i> ]	67	3, 1
178	31086	Proteasome subunit alpha type-4 [ <i>Mucor circinelloides</i> ]	58	3, 1
179	184359	Phosphatidylethanolamine-binding protein [ <i>Mucor ambiguus</i> ]	130	3, 1
180	38868	ATP synthase (E/31 kDa) subunit [ <i>Mucor circinelloides</i> ]	255	5, 3
181	128111	Proteasome subunit alpha type-5 [ <i>Mucor circinelloides</i> ]	166	4, 2
185	132962	Mitochondrial ornithine acetyltransferase [ <i>Mucor ambiguus</i> ]	98	1, 1
186	154878	Peptidase family M28 protein [ <i>Mucor ambiguus</i> ]	126	3, 1
188	36182	Thiamin diphosphate-binding protein [ <i>Lichtheimia corymbifera</i> ]	98	4, 1
189	36182	Thiamin diphosphate-binding protein [ <i>Lichtheimia corymbifera</i> ]	72	3, 1
190	75371	50S ribosomal protein LP0 [ <i>Mucor circinelloides</i> ]	91	6, 1
191	129416	L-lactate dehydrogenase A [ <i>Mucor circinelloides</i> ]	180	3, 2
196	130118	RNA-binding domain-containing protein [ <i>Trametes versicolor</i> ]	75	2, 1

**TABLA 6 D.** Proteoma total de *Phycomcyes blakesleeanus*, tipo silvestre NRRL1555.

N° De Proteína	ID	Nombre De Proteína	SCORE	Peptidos
198	166257	RNA-binding domain-containing protein [ <i>Mucor ambiguus</i> ]	93	6, 1
200	33625	40S ribosomal protein S17-B [ <i>Rhizopus delemar</i> ]	116	3, 1
202	29315	Putative Glutathione peroxidase [ <i>Rhizopus microsporus</i> ]	98	3, 1
203	153870	Multiubiquitin chain binding protein MBP1 [ <i>Mucor ambiguus</i> ]	191	3, 2
208	109503	Ran-specific gtpase-activating protein 1 [ <i>Lichtheimia corymbifera</i> ]	77	1, 1
209	133976	NAD(P)H:quinone oxidoreductase, type IV [ <i>Rhizopus delemar</i> ]	91	4, 1
213	124245	Had-variant 3 family protein [ <i>Lichtheimia corymbifera</i> ]	124	8, 1
214	122810	Vitamin B6 biosynthesis protein [ <i>Mucor ambiguus</i> ]	158	9, 2
215	129981	3-mercaptopyruvate sulfurtransferase [ <i>Mucor ambiguus</i> ]	189	8, 2
217	76441	Gamm1 protein [ <i>Lichtheimia corymbifera</i> ]	82	6, 1
218	72102	No asignado	28	0, 1
219	40660	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase [NAD+] [ <i>Mucor circinelloides</i> ]	116	5, 1
220	131929	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 3 [ <i>Rhizopus delemar</i> ]	206	6, 2
221	112334	Cyclase protein [ <i>Lichtheimia corymbifera</i> ]	91	6, 1
225	179677	20S proteasome subunit alpha 7 [ <i>Mucor circinelloides</i> ]	104	4, 1
226	95547	Glycine-rich rna binding protein [ <i>Moniliophthora roreri</i> ]	178	3, 1
227	176865	40S ribosomal protein S12-B [ <i>Mucor circinelloides</i> ]	157	4, 2
234	158699	Putative Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit J [ <i>Rhizopus microsporus</i> ]	131	3, 1
236	181959	Pi31 proteasome regulator domain-containingprotein [ <i>Lichtheimia corymbifera</i> ]	74	2, 1
237	92567	Co-chaperone GrpE [ <i>Mucor circinelloides</i> ]	141	5, 1



**TABLA 6 E.** Proteoma total de *Phycomyces blakesleeanus*, tipo silvestre NRRL1555.

N° De Proteína	ID	Nombre De Proteína	SCORE	Peptidos
238	93134	50S ribosomal protein L13e [ <i>Rhizopus delemar</i> ]	131	5, 1
241	123279	Adenine phosphoribosyltransferase [ <i>Mucor circinelloides</i> ]	94	2, 1
244	98645	Autophagic serine protease alp2 [ <i>Lichtheimia corymbifera</i> ]	216	4, 1
245	28725	Succinate-CoA ligase [ <i>Mucor ambiguus</i> ]	259	3, 2
246	177367	Dihydroorotate dehydrogenase (fumarate) [ <i>Mucor circinelloides</i> ]	208	7, 2
247	124225	6-phosphogluconate dehydrogenase [ <i>Mucor ambiguus</i> ]	172	5, 2
251	128144	Putative Glucose 1-dehydrogenase [ <i>Rhizopus microsporus</i> ]	155	8, 2
252	110373	Pirin [ <i>Mucor ambiguus</i> ]	227	3, 3
262	77971	Peroxisomal multifunctional enzyme [ <i>Mucor ambiguus</i> ]	135	4, 1
264	74324	Isocitrate dehydrogenase (NAD+) [ <i>Mucor circinelloides</i> ]	193	6, 2
270	74277	Pyridoxine 4-dehydrogenase [ <i>Rhizophagus irregulari</i> ]	128	5, 1
275	129877	S-formylglutathione hydrolase [ <i>Mucor circinelloides</i> ]	100	3, 1
276	176572	Putative 2,4-dienoyl-CoA reductase (NADPH2) [ <i>Rhizopus microsporus</i> ]	194	3, 2
278	181976	Exosome component 4 [ <i>Mucor ambiguus</i> ]	156	6, 2
281	160317	Guanine nucleotide binding protein beta subunit [ <i>Lichtheimia corymbifera</i> ]	93	1, 1
282	74785	Malate dehydrogenase, NAD-dependent [ <i>Rhizopus delemar</i> ]	302	4, 3
287	74916	Homoserine dehydrogenase [ <i>Lichtheimia corymbifera</i> ]	62	1, 1
296	182288	mRNA binding family [ <i>Lichtheimia ramosa</i> ]	177	3, 2
305	135279	20S proteasome subunit beta 7 [ <i>Mucor circinelloides</i> ]	134	3, 2
307	122026	Phosphomannomutase [ <i>Lichtheimia corymbifera</i> ]	120	4, 1

**TABLA 6 F.** Proteoma total de *Phycomyces blakesleeanus*, tipo silvestre NRRL1555.

Nº De Proteína	ID	Nombre De Proteína	SCORE	Peptidos
309	134437	Proteasome subunit alpha type-6 [ <i>Mucor circinelloides</i> ]	328	8, 3
327	180585	Hypothetical protein LRAMOSA01830 [ <i>Lichtheimia ramosa</i> ]	83	2, 1
330	129314	Orotate phosphoribosyltransferase [ <i>Mucor circinelloides</i> ]	200	5, 2
331	188502	Protein bli-3 [ <i>Lichtheimia corymbifera</i> ]□	74	4, 1
334	178542	Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase [ <i>Lichtheimia corymbifera</i> ]	90	3, 1
335	124627	Fe-Mn family superoxide dismutase [ <i>Mucor circinelloides</i> ]	209	6, 2
338	37677	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase cyp5[ <i>Rhizopus delemar</i> ]	98	2, 1
339	134824	20S proteasome subunit beta 4 [ <i>Mucor circinelloides</i> ]	262	5, 2
341	77484	Hypothetical protein HMPREF1544_05024 [ <i>Mucor circinelloides</i> ]	109	4, 2
342	69141	Ribonuclease t2 [ <i>Lichtheimia corymbifera</i> ]	154	2, 2
353	108945	Putative Cyanate hydratase [ <i>Rhizopus microsporus</i> ]	105	2, 1
360	134980	Putative Nucleoside diphosphate kinase [ <i>Rhizopus microsporus</i> ]	78	3, 1
364	118095	Mitochondrial pyruvate dehydrogenase E1 component beta subunit [ <i>Mucor ambiguus</i> ]	65	4, 1
383	118257	Sorting nexin [ <i>Lichtheimia corymbifera</i> ]	84	4, 1
387	125044	Ferritin heavy chain [ <i>Mucor circinelloides</i> ]	132	3, 2
389	176667	Proteasome subunit alpha type-2 [ <i>Mucor circinelloides</i> ]	98	7, 1
390	133951	Vacuolar protein sorting-associated protein 26B [ <i>Mucor circinelloides</i> ]	25	0, 1
397	177259	Bar adaptor protein hob3 [ <i>Lichtheimia corymbifera</i> ]	200	5, 3
401	127551	3-oxoacyl-[acyl-carrier protein] reductase [ <i>Mucor circinelloides</i> ]	94	2, 1
405	38849	Putative 40S ribosomal protein S3 [ <i>Rhizopus microsporus</i> ]	90	1, 1

**TABLA 6 G.** Proteoma total de *Phycomcyes blakesleeanus*, tipo silvestre NRRL1555.

Nº De Proteína	ID	Nombre De Proteína	SCORE	Peptidos
410	130873	Rhizopuspepsin 2 precursor [ <i>Rhizopus oryzae</i> ]	265	5, 2
412	27674	Saccharopepsin [ <i>Mucor circinelloides</i> ]	133	4, 1
414	56433	26S protease regulatory subunit 6B [ <i>Rhizopus delemar</i> ]	91	2, 1
415	121388	Putative Aldehyde dehydrogenase [ <i>Rhizopus microsporus</i> ]	312	6, 2
416	113218	Putative Phosphoenolpyruvate carboxykinase [ <i>Rhizopus microsporus</i> ]	203	7, 2
418	74487	Putative Aconitate hydratase, mitochondrial [ <i>Lichtheimia ramosa</i> ]	102	8, 1
420	184665	FAD dependent oxidoreductase [ <i>Mucor ambiguus</i> ]	185	6, 3
422	136881	Putative UDP- glucose 6- dehydrogenase [ <i>Lichtheimia ramosa</i> ]	130	4, 1
423	160840	ATP- dependent RNA helicase Uap56 [ <i>Mucor ambiguus</i> ]	95	4, 1
424	125551	Actin- like protein 3 [ <i>Mucor circinelloides</i> ]	194	3, 2
425	176535	DUF1688- domain- containing protein [ <i>Mucor ambiguus</i> ]	122	7, 1
426	122178	Gelsolin- like protein 2- like isoform X3 [ <i>Mucor ambiguus</i> ]	215	7, 2
429	152601	Nucleosome assembly protein 1- like 1 [ <i>Mucor circinelloides</i> ]	67	2, 1
430	183873	Actin- like 6a [ <i>Lichtheimia corymbifera</i> ]	62	1, 1
431	97223	DEAD- domain- containing protein [ <i>Mucor ambiguus</i> ]	30	0, 1
434	130942	Udp- n- acetylglucosamine diphosphorylase [ <i>Lichtheimia corymbifera</i> ]	212	5, 2
436	174110	60s ribosomal protein l10 [ <i>Lichtheimia corymbifera</i> ]	41	0, 1
437	178599	la- motif domain- containing protein [ <i>Mucor ambiguus</i> ]	88	2, 1
439	20709	phospho protein phosphatase PPZ [ <i>Mucor ambiguus</i> ]	96	3, 1
440	75021	vesicular- fusion protein sec17 [ <i>Lichtheimia corymbifera</i> ]	136	3, 1

**TABLA 6 H.** Proteoma total de *Phycomcyes blakesleeanus*, tipo silvestre NRRL1555.

N° De Proteína	ID	Nombre De Proteína	SCORE	Peptidos
442	103278	Putative 30S ribosomal protein S10e [ <i>Rhizopus microsporus</i> ]	165	4, 2
443	130041	40S ribosomal protein S19-A [ <i>Rhizopus delemar</i> ]	26	0, 1
444	179919	60S ribosomal protein L22 [ <i>Mucor ambiguus</i> ]	129	3, 2
445	107475	40S ribosomal protein S22-A [ <i>Rhizopus delemar</i> ]	93	2, 1
446	170753	Hypothetical protein MAM1_0021d01837 [ <i>Mucor ambiguus</i> ]	27	0, 1
447	66028	Hypothetical protein RMATCC62417_13613 [ <i>Rhizopus microsporus</i> ]	27	0, 1
454	132406	ATP synthase oligomycin sensitivity conferral protein [ <i>Mucor ambiguus</i> ]	213	5, 2
460	75840	Hypothetical protein RMATCC62417_09938 [ <i>Rhizopus microsporus</i> ]	160	5, 2
461	65669	Enoyl-hydratase isomerase domain-containing protein [ <i>Lichtheimia corymbifera</i> ]	163	7, 2
463	142937	Conserved hypothetical protein [ <i>Mucor ambiguus</i> ]	97	1, 1
465	168999	Putative 40S ribosomal protein S3 [ <i>Rhizopus microsporus</i> ]	193	7, 2
468	134043	26S protease regulatory subunit 8 [ <i>Rhizopus delemar</i> ]	175	8, 2
469	103278	Putative 30S ribosomal protein S10e [ <i>Rhizopus microsporus</i> ]	128	5, 1
470	30139	Small nuclear ribonucleoprotein Sm D2-like isoform X2 [ <i>Mucor ambiguus</i> ]	38	0, 1
471	164420	Elongation factor 1-alpha [ <i>Mucor circinelloides</i> ]	122	10, 1
472	34926	Acyl-CoA dehydrogenase [ <i>Mucor circinelloides</i> ]	84	8, 1
473	185260	Translation initiation factor eIF-2A [ <i>Mucor ambiguus</i> ]	185	10, 1
481	183164	Hypothetical protein LRAMOSA04572 [ <i>Lichtheimia ramosa</i> ]	28	0, 1
482	127075	Composite domain of metallo-dependent hydrolase [ <i>Mucor ambiguus</i> ]	95	1, 1
483	126634	Putative Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase H [ <i>Absidia idahoensis</i> ]	67	1, 1
484	159308	F-actin-capping protein subunit alpha-like [ <i>Mucor ambiguus</i> ]	186	6, 2
485	69796	Pyridoxine 5'-phosphate (PNP) oxidase-like proteins [ <i>Lichtheimia corymbifera</i> ]	132	2, 1
100/419	28419	Transketolase [ <i>Mucor circinelloides</i> ]	65	2, 1
112/117	129319	ATP synthase subunit beta [ <i>Rhizopus delemar</i> ]	90	6, 1
114/111	18255	Phosphoglycerate mutase [ <i>Lichtheimia corymbifera</i> ]	235	4, 2

**TABLA 6 I.** Proteoma total de *Phycomyces blakesleeanus*, tipo silvestre NRRL1555.

Nº De Proteína	ID	Nombre De Proteína	SCORE	Peptidos
155/156/157/158/162/314	135421	AhpC/TSA family protein [ <i>Mucor ambiguus</i> ]	85	2, 1
168/169	130500	Spermidine synthase [ <i>Mucor circinelloides</i> ]	66	2, 1
18/22/23	182458	Acetyl-CoA hydrolase [ <i>Mucor ambiguus</i> ]	35	0, 1
182/183/223	154725	14-3-3 family protein [ <i>Mucor ambiguus</i> ]	98	4, 1
184/403/406	126250	14-3-3 family protein 7 [ <i>Mucor circinelloides</i> ]	112	5, 1
19/20/21	135989	Fumarate reductase [ <i>Mucor ambiguus</i> ]	161	10, 2
193/267	136524	26S proteasome regulatory subunit N8 [ <i>Mucor circinelloides</i> ]	157	2, 1
2/432	136654	5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide formyltransferase [ <i>Mucor ambiguus</i> ]	171	2, 2
229/343/350	126915	Putative Oxidoreductase [ <i>Rhizopus microsporus</i> ]	81	3, 1
230/231/232/233	176929	Inorganic pyrophosphatase [ <i>Mucor circinelloides</i> ]	91	4, 1
239/240	126051	Hypothetical protein LRAMOSA00158 [ <i>Lichtheimia ramosa</i> ]	110	2, 1
24/27/28/216/269/285/286/290/300/303/321	76956	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase [ <i>Rhizomucor miehei</i> ]	62	2, 1
249/250/274	182531	Lipid-binding START domain [ <i>Mucor circinelloides</i> ]	82	2, 1
255/248	41915	Serine protease [ <i>Lichtheimia corymbifera</i> ]	144	2, 1
258/259	146839	Quinone oxidoreductase [ <i>Lichtheimia corymbifera</i> ]	103	2, 1
268/288	146518	Cerevisin [ <i>Mucor circinelloides</i> ]	95	1, 1
271/272/289/304	78295	NAD-malate dehydrogenase [ <i>Mucor ambiguus</i> ]	97	5, 1
273/243//254/280/282	74785	Malate dehydrogenase, NAD-dependent [ <i>Rhizopus delemar</i> ]	111	3, 1
283/284/411	182302	Orotidine 5'-phosphate decarboxylase [ <i>Phycomyces blakesleeanus</i> ]	55	2, 1
295/299	134895	Electron transfer flavoprotein subunit beta [ <i>Mucor ambiguus</i> ]	80	3, 1
306/308	107085	Enoyl-CoA hydratase [ <i>Mucor circinelloides</i> ]	86	5, 1
315/318	33934	Phosphoribosylglycinamide formyltransferase [ <i>Lichtheimia corymbifera</i> ]	73	2, 1
317/319/320	125211	NAD(P)H:quinone oxidoreductase, type IV [ <i>Mucor circinelloides</i> ]	77	1, 1
359/380	126660	Putative Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A1 [ <i>Rhizopus microsporus</i> ]	163	4, 2
466/467	149238	Hypothetical protein MAM1_0271c09037 [ <i>Mucor ambiguus</i> ]	189	6, 2
80/81/116/120/138/333	135540	Gamma-actin [ <i>Blakeslea trispora</i> ]	74	2, 1



## **6.BIBLIOGRAFÍA**

Agardh, C.A., 1817. Synopsis algarum Scandinaviae: adjecta dispositione universali algarum. ex officina Berlingiana.

Alvarez, M., Eslava, A., 1983. Isogenic strains of *Phycomyces blakesleeanus* suitable for genetic analysis. *Genetics* 105, 873-879.

Andersen, J.S., et al., 2003. Proteomic characterization of the human centrosome by protein correlation profiling. *Nature* 426, 570-574.

Anderson, N.L., Anderson, N.G., 1998. Proteome and proteomics: New technologies, new concepts, and new words. *ELECTROPHORESIS* 19, 1853-1861.

Bahn, Y.-S., et al., 2007. Sensing the environment: lessons from fungi. *Nature Reviews Microbiology* 5, 57-69.

Ballario, P., et al., 1996. White collar-1, a central regulator of blue light responses in *Neurospora*, is a zinc finger protein. *The EMBO journal* 15, 1650.

Bandziulis, R.J., et al., 1989. RNA-binding proteins as developmental regulators. *Genes & development* 3, 431-437.

Bayram, Ö., et al., 2008a. More than a repair enzyme: *Aspergillus nidulans* photolyase-like CryA is a regulator of sexual development. *Molecular biology of the cell* 19, 3254-3262.

Bayram, Ö., et al., 2010. Spotlight on *Aspergillus nidulans* photosensory systems. *Fungal Genetics and Biology* 47, 900-908.

Bejarano, E., et al., 1991. Photoinduced accumulation of carotene in *Phycomyces*. *Planta* 183, 1-9.

Belden, W.J., et al., 2007. Execution of the circadian negative feedback loop in *Neurospora* requires the ATP-dependent chromatin-remodeling enzyme CLOCKSWITCH. *Molecular cell* 25, 587-600.

Bergman, K., et al., 1969. *Phycomyces*. *Bacteriological reviews* 33, 99.

Bergman, K., et al., 1973. Mutants of *Phycomyces* with abnormal phototropism. *Molecular and General Genetics MGG* 123, 1-16.



- Bergmüller, E., et al., 2008. Mass Spectrometry-Based Proteomics: Identifying Plant Proteins, Plant Proteomics. John Wiley & Sons, Inc., pp. 33-45.
- Berrocal-Tito, G.M., et al., 2007. Trichoderma atroviride PHR1, a Fungal Photolyase Responsible for DNA Repair, Autoregulates Its Own Photoinduction. Eukaryotic Cell 6, 1682-1692.
- Bjellqvist, B., et al., 1982. Isoelectric focusing in immobilized pH gradients: Principle, methodology and some applications. Journal of Biochemical and Biophysical Methods 6, 317-339.
- Blakeslee, A.F., 1904. Sexual Reproduction in the Mucorineae. Proceedings of the American Academy of Arts and Sciences 40, 205-319.
- Blakeslee, A.F., 1906. Zygosporidia and Sexual Strains in the Common Bread Mould, Rhizopus Nigricans. Science (New York, N.Y.) 24, 118-122.
- Blumenstein, A., et al., 2005. The Aspergillus nidulans phytochrome FphA represses sexual development in red light. Current Biology 15, 1833-1838.
- Boersema, P.J., et al., 2015. Proteomics beyond large-scale protein expression analysis. Current Opinion in Biotechnology 34, 162-170.
- Borthwick, H.A., et al., 1952. A reversible photoreaction controlling seed germination. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 38, 662.
- Briggs, W.R., 2007. The LOV domain: a chromophore module servicing multiple photoreceptors. Journal of biomedical science 14, 499-504.
- Briggs, W.R., Christie, J.M., 2002. Phototropins 1 and 2: versatile plant blue-light receptors. Trends in plant science 7, 204-210.
- Briggs, W.R., Spudich, J.L., 2005. Handbook of Photosensory Receptors. Wiley.
- Brudler, R., et al., 2003. Identification of a new cryptochrome class. Structure, function, and evolution. Mol Cell 11, 59-67.
- Burgeff, H., 1912. 84. H. Burgeff: Über Sexualität, Variabilität und Vererbung bei Phycomyces nitens. Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft 30, 679-685.

Burgeff, H., 1914. Untersuchungen über Variabilität, Sexualität und Erbllichkeit bei *Phycomyces nitens*. *Flora (Jena)* 107, 259-448.

Burgeff, H., 1915. Untersuchungen über Variabilität, Sexualität und Erbllichkeit bei *Phycomyces nitens* Kuntze II. Gustav Fischer, Jena.

Burgeff, H., 1924. Untersuchungen über Sexualität und Parasitismus bei Mucorineen 1. 1. Fischer, Jena.

Burgeff, H., 1925. Über Arten und Artkreuzung in der Gattung *Phycomyces* Kunze. *Flora (Jena)* 18, 40-46.

Burgeff, H., 1929. Variabilität, Vererbung und Mutation bei *Phycomyces Blakesleeanus* Bgff. *Zeitschrift für Induktive Abstammungs- und Vererbungslehre* 49, 26-94.

Burnett, J.H., 1953. OXYGEN CONSUMPTION DURING SEXUAL REPRODUCTION OF SOME MUCORACEAE. *New Phytologist* 52, 58-64.

Calvo, A.M., 2008. The VeA regulatory system and its role in morphological and chemical development in fungi. *Fungal Genetics and Biology* 45, 1053-1061.

Campuzano, V., et al., 1995. Genetic characterization of two phototropism mutants of *Phycomyces* with defects in the genes *madI* and *madJ*. *Current genetics* 27, 524-527.

Campuzano, V., et al., 1994. Isolation and characterization of phototropism mutants of *Phycomyces* insensitive to ultraviolet light. *Current Genetics* 26, 49-53.

Cantos, D.P.d.C., 2015. Diversidad y ecología de los Mucorales, Departamento de Genética. Sevilla, p. 119.

Carnoy, J.B., 1870. Recherches anatomiques et physiologiques sur les Champignons. *Bulletin de la Société Royale de Botanique de Belgique / Bulletin van de Koninklijke Belgische Botanische Vereniging* 9, 157-vi.

Casas-Flores, S., et al., 2004. BLR-1 and BLR-2, key regulatory elements of photoconidiation and mycelial growth in *Trichoderma atroviride*. *Microbiology* 150, 3561-3569.

- Cashmore, A.R., 2003. Cryptochromes: enabling plants and animals to determine circadian time. *Cell* 114, 537-543.
- Cerdá-Olmedo, E., 2001. Phycomyces and the biology of light and color. *FEMS microbiology reviews* 25, 503-512.
- Cerdá-Olmedo, E., Lipson, E.D., 1987. *Phycomyces*. Cold Spring Harbor Laboratory.
- Corrochano, L.M., 2007. Fungal photoreceptors: sensory molecules for fungal development and behaviour. *Photochemical & Photobiological Sciences* 6, 725-736.
- Corrochano, L.M., Cerdá-Olmedo, E., 1988. Photomorphogenesis in *Phycomyces*: Dependence on environmental conditions. *Planta* 174, 309-314.
- Corrochano, L.M., Cerdá-Olmedo, E., 1992. Sex, light and carotenes: the development of *Phycomyces*. *Trends in Genetics* 8, 268-274.
- Corrochano, L.M., Garre, V., 2010. Photobiology in the Zygomycota: Multiple photoreceptor genes for complex responses to light. *Fungal Genetics and Biology* 47, 893-899.
- Corrochano, L.M., et al., En preparación. Expansion of signal transduction pathways in fungi by whole-genome duplication.
- Curry, G.M., Gruen, H.E., 1957. Negative Phototropism of *Phycomyces* in the Ultra-violet. *Nature* 179, 1028-1029.
- Chaudhary, S., et al., 2013. A new genetic linkage map of the zygomycete fungus *Phycomyces blakesleeanus*. *PloS one* 8, e58931.
- Chaves, I., et al., 2011. The cryptochromes: blue light photoreceptors in plants and animals. *Annual review of plant biology* 62, 335-364.
- Chen, C.-H., et al., 2009. Genome-wide analysis of light-inducible responses reveals hierarchical light signalling in *Neurospora*. *The EMBO Journal* 28, 1029-1042.
- Chen, C.H., et al., 2010b. Physical interaction between VIVID and white collar complex regulates photoadaptation in *Neurospora*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, 16715-16720.

Chen, C.H., et al., 2010a. *Neurospora* illuminates fungal photoreception. *Fungal Genet Biol* 47, 922-929.

de Castro, C., et al., 2013. Antioxidant defence system during exponential and stationary growth phases of *Phycomyces blakesleeana*: response to oxidative stress by hydrogen peroxide. *Fungal biology* 117, 275-287.

Degli-Innocenti, F., Russo, V.E., 1984. Isolation of new white collar mutants of *Neurospora crassa* and studies on their behavior in the blue light-induced formation of protoperithecia. *Journal of Bacteriology* 159, 757-761.

Dhingra, V., et al., 2005. New frontiers in proteomics research: A perspective. *International Journal of Pharmaceutics* 299, 1-18.

Dickson, H., 1932. The Effects of X-rays, Ultraviolet Light, and Heat in producing Saltants in *Chaetomium cochliodes* and other Fungi. *Annals of Botany* 46, 389-405.

Dong, W., et al., 2008. Systems Biology of the Clock in *Neurospora crassa*. *PloS one* 3, e3105.

Eberhard, S., et al., 2008. The dynamics of photosynthesis. *Annu Rev Genet* 42, 463-515.

Elfving, F., 1881. En obeaktad Känslighet hos *Phycomyces*. *Bot* 4, 105–107.

Eslava, A., Alvarez, M., 1987. Crosses, in: Cerdá-Olmedo, E., Lipson, E.D. (Eds.), *Phycomyces*. Cold Spring Harbor Laboratory, p. 361.

Eslava, A., et al., 1976. Recombination between mutants of *Phycomyces* with abnormal phototropism. *Molecular and General Genetics MGG* 147, 235-241.

Eslava, A.P., et al., 1975a. Genetic Recombination in Sexual Crosses of *Phycomyces*. *Genetics* 80, 445-462.

Eslava, A.P., et al., 1975b. Meiosis in *Phycomyces*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 72, 4076-4080.

Eslava AP, A.M., 1996. Genetics of *Phycomyces*, in: Bos, C. (Ed.), *Fungal Genetics: Principles and Practice*. Taylor & Francis.

Estrada, A.F., Avalos, J., 2008. The White Collar protein WcoA of *Fusarium fujikuroi* is not essential for photocarotenogenesis, but is involved in the regulation of secondary metabolism and conidiation. *Fungal Genetics and Biology* 45, 705-718.

Fenn, J.B., et al., 1989. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science (New York, N.Y.)* 246, 64-71.

Flaherty, K.M., et al., 1991. Similarity of the three-dimensional structures of actin and the ATPase fragment of a 70-kDa heat shock cognate protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88, 5041-5045.

Foster, L.J., et al., 2006. A Mammalian Organelle Map by Protein Correlation Profiling. *Cell* 125, 187-199.

Fowler, R.G., Schaaper, R.M., 1997. The role of the *mutT* gene of *Escherichia coli* in maintaining replication fidelity. *FEMS microbiology reviews* 21, 43-54.

Froehlich, A.C., et al., 2002. White Collar-1, a circadian blue light photoreceptor, binding to the frequency promoter. *Science (New York, N.Y.)* 297, 815-819.

Froehlich, A.C., et al., 2005. Genetic and molecular analysis of phytochromes from the filamentous fungus *Neurospora crassa*. *Eukaryot Cell* 4, 2140-2152.

Fu, H., et al., 2000. 14-3-3 Proteins: Structure, Function, and Regulation. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 40, 617-647.

Galland, P., 1983. ACTION SPECTRA OF PHOTOGEOGRAPHIC EQUILIBRIUM IN *Phycomyces* WILD TYPE AND THREE BEHAVIORAL MUTANTS. *Photochemistry and Photobiology* 37, 221-228.

Galland, P., 1996. Ultraviolet killing and photoreactivation of *Phycomyces* spores. *Microbiological Research* 151, 9-17.

Galland, P., Lipson, E., 1987. Light calibrations and radiometric units, in: Cerdá-Olmedo, E., Lipson, E.D. (Eds.), *Phycomyces*. Cold Spring Harbor Laboratory, pp. 375-380.

Galland, P., Lipson, E.D., 1985. ACTION SPECTRA FOR PHOTOTROPIC BALANCE IN *Phycomyces blakesleeanus*: DEPENDENCE ON REFERENCE WAVELENGTH and INTENSITY RANGE. *Photochemistry and Photobiology* 41, 323-329.

Galle, H.-K., 1965. Untersuchungen über die Entwicklung von *Phycomyces Blakesleeanus* unter Anwendung des Mikrozeitrafferfilmes. *Protoplasma* 59, 423-471.

Gehring, W.J., 2014. The evolution of vision. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology* 3, 1-40.

Gorg, A., et al., 2000. The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis* 21, 1037-1053.

Görg, A., et al., 1988. Two-dimensional electrophoresis. The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *ELECTROPHORESIS* 9, 531-546.

Görg, A., et al., 2004. Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. *PROTEOMICS* 4, 3665-3685.

Han, Y., et al., 2004. A eukaryotic BLUF domain mediates light-dependent gene expression in the purple bacterium *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 12306-12311.

He, Q., et al., 2002. White collar-1, a DNA binding transcription factor and a light sensor. *Science (New York, N.Y.)* 297, 840-843.

He, Q., Liu, Y., 2005. Molecular mechanism of light responses in *Neurospora*: from light-induced transcription to photoadaptation. *Genes & development* 19, 2888-2899.

Herrera-Estrella, A., Horwitz, B.A., 2007. Looking through the eyes of fungi: molecular genetics of photoreception. *Molecular Microbiology* 64, 5-15.

Hillenkamp, F., Karas, M., 1990. [12] Mass spectrometry of peptides and proteins by matrix-assisted ultraviolet laser desorption/ionization, *Methods in Enzymology*. Academic Press, pp. 280-295.

Hoffmeister, W., 1867. Dauernde Beeinflussung der Spannung von Zellmembranen durch

die Schwerkraft; geocentrische Krümmungen, Die Lehre v. der Pflanzenzelle Leipzig : Engelmann, pp. 281-286.

Huang, W., et al., 2011. Circadian rhythms, sleep, and metabolism. *The Journal of Clinical Investigation* 121, 2133-2141.

Hunt, S.M., et al., 2010. VIVID interacts with the WHITE COLLAR complex and FREQUENCY-interacting RNA helicase to alter light and clock responses in *Neurospora*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107, 16709-16714.

Idnurm, A., Heitman, J., 2005a. Light controls growth and development via a conserved pathway in the fungal kingdom. *PLoS Biol* 3, e95.

Idnurm, A., Heitman, J., 2010. Ferrochelatase is a conserved downstream target of the blue light-sensing White collar complex in fungi. *Microbiology* 156, 2393-2407.

Idnurm, A., et al., 2006. The *Phycomyces* *madA* gene encodes a blue-light photoreceptor for phototropism and other light responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 4546-4551.

Idnurm, A., et al., 2010. A glimpse into the basis of vision in the kingdom Mycota. *Fungal Genetics and Biology* 47, 881-892.

Idnurm, A., et al., 2008. Identification of the sex genes in an early diverged fungus. *Nature* 451, 193-196.

Iseki, M., et al., 2002. A blue-light-activated adenylyl cyclase mediates photoavoidance in *Euglena gracilis*. *Nature* 415, 1047-1051.

Jarillo, J.A., et al., 2001. Phototropin-related NPL1 controls chloroplast relocation induced by blue light. *Nature* 410, 952-954.

Jensen, O.N., 2006. Interpreting the protein language using proteomics. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7, 391-403.

Josic, D., et al., 2008. Membrane proteins as diagnostic biomarkers and targets for new therapies. *Current opinion in molecular therapeutics* 10, 116-123.

- Kagawa, T., et al., 2001. Arabidopsis NPL1: A Phototropin Homolog Controlling the Chloroplast High-Light Avoidance Response. *Science (New York, N.Y.)* 291, 2138-2141.
- Kami, C., et al., 2010. Light-regulated plant growth and development. *Curr Top Dev Biol* 91, 29-66.
- Karas, M., Hillenkamp, F., 1988. Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Analytical Chemistry* 60, 2299-2301.
- Karniol, B., et al., 2005. Phylogenetic analysis of the phytochrome superfamily reveals distinct microbial subfamilies of photoreceptors. *Biochem J* 392, 103-116.
- Kelber, A., Lind, O., 2010. Limits of colour vision in dim light. *Ophthalmic Physiol Opt* 30, 454-459.
- Kinoshita, T., et al., 2001. phot1 and phot2 mediate blue light regulation of stomatal opening. *Nature* 414, 656-660.
- Klein, R.M., 1992. Effects of green light on biological systems. *Biol Rev Camb Philos Soc* 67, 199-284.
- Kubo, H., 2009. Isolation of madA homologs in *Pilobolus crystallinus*. *Mycoscience* 50, 400-406.
- Kumagai, T., 1989. TEMPERATURE AND MYCOCHROME SYSTEM IN NEAR-UV LIGHT INDUCIBLE AND BLUE LIGHT REVERSIBLE PHOTOINDUCTION OF CONIDIATION IN *Alternaria tomato*\*. *Photochemistry and Photobiology* 50, 793-798.
- Kunze, G., 1823. *Mykologische Hefte*. 2. Voss.
- Kuratani, M., et al., 2010. The *dst2* gene essential for photomorphogenesis of *Coprinopsis cinerea* encodes a protein with a putative FAD-binding-4 domain. *Fungal Genetics and Biology* 47, 152-158.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.



- Lewis, Z.A., et al., 2002. Overexpression of White Collar-1 (WC-1) activates circadian clock-associated genes, but is not sufficient to induce most light-regulated gene expression in *Neurospora crassa*. *Molecular Microbiology* 45, 917-931.
- Li, J., et al., 2007. Identification and characterization of human uracil phosphoribosyltransferase (UPRTase). *Journal of human genetics* 52, 415-422.
- Li, X., et al., 2014. Molecular and cellular roles of PI31 (PSMF1) protein in regulation of proteasome function. *The Journal of biological chemistry* 289, 17392-17405.
- Lin, C., Todo, T., 2005. The cryptochromes. *Genome Biology* 6, 220-220.
- Linden, H., 2002. A white collar protein senses blue light. *Science (New York, N.Y.)* 297, 777.
- Linden, H., et al., 1997. Blue light regulation in *Neurospora crassa*. *Fungal Genetics and Biology* 22, 141-150.
- Linden, H., Macino, G., 1997. White collar 2, a partner in blue-light signal transduction, controlling expression of light-regulated genes in *Neurospora crassa*. *The EMBO Journal* 16, 98-109.
- Lipson, E., 1991. Phototropism in Fungi, in: Lenci, F., Ghetti, F., Colombetti, G., Häder, D.P., Song, P.-S. (Eds.), *Biophysics of Photoreceptors and Photomovements in Microorganisms*. Springer US, pp. 311-325.
- Liu, Y., et al., 2003. Photoreception in *Neurospora*: a tale of two White Collar proteins. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS* 60, 2131-2138.
- López-Díaz, I., Lipson, E., 1983. Genetic analysis of hypertropic mutants of *Phycomyces*. *Molecular and General Genetics MGG* 190, 318-325.
- Ma, L.J., et al., 2009. Genomic analysis of the basal lineage fungus *Rhizopus oryzae* reveals a whole-genome duplication. *PLoS Genet* 5, e1000549.
- Malzahn, E., et al., 2010. Photoadaptation in *Neurospora* by Competitive Interaction of Activating and Inhibitory LOV Domains. *Cell* 142, 762-772.

- Marouga, R., et al., 2005. The development of the DIGE system: 2D fluorescence difference gel analysis technology. *Anal Bioanal Chem* 382, 669-678.
- Martin-Rojas, V., et al., 1995. Specific tropism caused by ultraviolet C radiation in *Phycomyces*. *Planta* 197, 63-68.
- Massart, J., 1888. Recherches sur les organismes inférieurs 1. La loi de Weber vérifiée pour l'héliotropisme du champignon. *Bull. Acad. R. Sci. Belg* 3, 590-601.
- Mayer, M.P., Bukau, B., 2005. Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 62, 670-684.
- Medina, J.R., Cerdá-Olmedo, E., 1977. A quantitative model of *Phycomyces* phototropism. *Journal of Theoretical Biology* 69, 709-719.
- Mehta, B.J., Cerdá-Olmedo, E., 2001. Intersexual partial diploids of *Phycomyces*. *Genetics* 158, 635-641.
- Meyer, P., 2004. Structural basis for recruitment of the ATPase activator Aha1 to the Hsp90 chaperone machinery. *The EMBO Journal* 23, 1402-1410.
- Möller, E.M., et al., 1992. A simple and efficient protocol for isolation of high molecular weight DNA from filamentous fungi, fruit bodies, and infected plant tissues. *Nucleic Acids Research* 20, 6115-6116.
- Mooney, J.L., Yager, L.N., 1990. Light is required for conidiation in *Aspergillus nidulans*. *Genes & development* 4, 1473-1482.
- Müller, M., Carell, T., 2009. Structural biology of DNA photolyases and cryptochromes. *Current Opinion in Structural Biology* 19, 277-285.
- Nørregaard Jensen, O., 2004. Modification-specific proteomics: characterization of post-translational modifications by mass spectrometry. *Current Opinion in Chemical Biology* 8, 33-41.
- Obraztsova, I.N., et al., 2004. Genetic damage following introduction of DNA in *Phycomyces*. *Fungal Genet Biol* 41, 168-180.

- Ohtsu, M., et al., 1997. Inhibition of apoptosis by the actin-regulatory protein gelsolin. *The EMBO Journal* 16, 4650-4656.
- Olmedo, M., et al., 2010a. Regulation by Blue Light of the fluffy Gene Encoding a Major Regulator of Conidiation in *Neurospora crassa*. *Genetics* 184, 651-658.
- Olmedo, M., et al., 2010b. A complex photoreceptor system mediates the regulation by light of the conidiation genes con-10 and con-6 in *Neurospora crassa*. *Fungal Genetics and Biology* 47, 352-363.
- Ootaki, T., et al., 1974. Complementation between mutants of *Phycomyces* with abnormal phototropism. *Molecular and General Genetics MGG* 131, 233-246.
- Ootaki, T., et al., 1977. Complementation between *Phycomyces* mutants of mating type (+) with abnormal phototropism. *Molecular and General Genetics MGG* 152, 245-251.
- Orejas, M., et al., 1987. A genetic map of *Phycomyces blakesleeana*. *Molecular and General Genetics MGG* 210, 69-76.
- Palit, A., et al., 1986. System analysis of *Phycomyces* light-growth response. Photoreceptor and hypertropic mutants. *Biophysical Journal* 50, 661-668.
- Pasquali, C., et al., 1999. Subcellular fractionation, electromigration analysis and mapping of organelles. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* 722, 89-102.
- Patton, W.F., 2002. Detection technologies in proteome analysis. *Journal of Chromatography B* 771, 3-31.
- Pier Giorgio Righetti, A.B., and Cecilia Gelfi, 1998. *Gel Electrophoresis of Proteins : A Practical Approach: A Practical Approach, Third Edition* ed.
- Plempel, M., Braunitzer, G., 1958. [Isolation of sexual active substances from *Mucorineae*. L]. *Z Naturforsch B* 13B, 302-305.
- Poe, R.C., et al., 1986a. System analysis of *Phycomyces* light-growth response: Double mutants. *Biological Cybernetics* 55, 105-113.

- Poe, R.C., et al., 1986b. System analysis of *Phycomyces* light-growth response: Single mutants. *Biological Cybernetics* 55, 99-104.
- Purschwitz, J., et al., 2009. Mapping the interaction sites of *Aspergillus nidulans* phytochrome FphA with the global regulator VeA and the White Collar protein LreB. *Molecular Genetics and Genomics* 281, 35-42.
- Purschwitz, J., et al., 2008. Functional and physical interaction of blue- and red-light sensors in *Aspergillus nidulans*. *Curr Biol* 18, 255-259.
- R. J. Cohen, Y.N.J., J. Matricon, and M. Delbrock, 1975. Avoidance response, house response, and wind responses of the sporangiophore of *Phycomyces*. *The Journal of General Physiology* 66, 67-95.
- Rockwell, N.C., et al., 2006. PHYTOCHROME STRUCTURE AND SIGNALING MECHANISMS. *Annual review of plant biology* 57, 837-858.
- Rodriguez-Romero, J., et al., 2010. Fungi, Hidden in Soil or Up in the Air: Light Makes a Difference. *Annual Review of Microbiology* 64, 585-610.
- Rosales-Saavedra, T., et al., 2006. Novel light-regulated genes in *Trichoderma atroviride*: a dissection by cDNA microarrays. *Microbiology* 152, 3305-3317.
- Ruger-Herreros, C., et al., 2011. Regulation of Conidiation by Light in *Aspergillus nidulans*. *Genetics* 188, 809-822.
- Ruiz-Gonzalez, M.X., Marín, I., 2004. New insights into the evolutionary history of type 1 rhodopsins. *Journal of molecular evolution* 58, 348-358.
- Sancar, A., et al., 2004. Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. *Annual review of biochemistry* 73, 39-85.
- Sanz, C., et al., 2009. *Phycomyces* MADB interacts with MADA to form the primary photoreceptor complex for fungal phototropism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, 7095-7100.
- Schafmeier, T., Diernfellner, A.C.R., 2011. Light input and processing in the circadian clock of *Neurospora*. *FEBS Letters* 585, 1467-1473.

Schmoll, M., et al., 2005. Envoy, a PAS/LOV domain protein of *Hypocrea jecorina* (Anamorph *Trichoderma reesei*), modulates cellulase gene transcription in response to light. *Eukaryotic cell* 4, 1998-2007.

Schwartz, V.U., et al., 2014. Gene expansion shapes genome architecture in the human pathogen *Lichtheimia corymbifera*: an evolutionary genomics analysis in the ancient terrestrial mucorales (Mucoromycotina). *PLoS Genet* 10, e1004496.

Schwerdtfeger, C., Linden, H., 2003. VIVID is a flavoprotein and serves as a fungal blue light photoreceptor for photoadaptation. *The EMBO Journal* 22, 4846-4855.

Sharma, A.K., et al., 2006. Microbial rhodopsins: functional versatility and genetic mobility. *Trends in microbiology* 14, 463-469.

Shropshire, W., 1962. The lens effect and phototropism of *Phycomyces*. *The Journal of general physiology* 45, 949-958.

Shropshire, W., 1987. Sporangiothore and mycelial responses to stimuli other than light, in: Cerdá-Olmedo, E., Lipson, E.D. (Eds.), *Phycomyces*. Cold Spring Harbor Laboratory pp. 127-154.

Silva, F., et al., 2008. A RING-finger protein regulates carotenogenesis via proteolysis-independent ubiquitylation of a White Collar-1-like activator. *Molecular microbiology* 70, 1026-1036.

Silva, F., et al., 2006. Distinct white collar-1 genes control specific light responses in *Mucor circinelloides*. *Molecular Microbiology* 61, 1023-1037.

Smith, K.M., et al., 2010. Transcription Factors in Light and Circadian Clock Signaling Networks Revealed by Genomewide Mapping of Direct Targets for *Neurospora* White Collar Complex. *Eukaryotic Cell* 9, 1549-1556.

Spudich, J.L., et al., 2000. Retinylidene proteins: structures and functions from archaea to humans. *Annual review of cell and developmental biology* 16, 365-392.

Sun, H.Q., et al., 1999. Gelsolin, a multifunctional actin regulatory protein. *The Journal of biological chemistry* 274, 33179-33182.

- Sun, J., et al., 2012. Metabolic regulation of trisporic acid on *Blakeslea trispora* revealed by a GC-MS-based metabolomic approach. *PloS one* 7, e46110.
- Sutter, R.P., 1987. Sexual Development, in: Cerdá-Olmedo, E., Lipson, E.D. (Eds.), *Phycomyces*  
Cold Spring Harbor Laboratory, pp. 317-336.
- Taylor, B.L., Zhulin, I.B., 1999. PAS domains: internal sensors of oxygen, redox potential, and light. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 63, 479-506.
- Terakita, A., 2005. The opsins. *Genome biology* 6, 213.
- Terashima, K., et al., 2005. The *dst1* Gene Involved in Mushroom Photomorphogenesis of *Coprinus cinereus* Encodes a Putative Photoreceptor for Blue Light. *Genetics* 171, 101-108.
- Tisch, D., Schmoll, M., 2010. Light regulation of metabolic pathways in fungi. *Appl Microbiol Biotechnol* 85, 1259-1277.
- van den Ende, H., 1968. Relationship between sexuality and carotene synthesis in *Blakeslea trispora*. *J Bacteriol* 96, 1298-1303.
- van Heeswijck, R., Roncero, M.I., 1984. High frequency transformation of *Mucor* with recombinant plasmid DNA. *Carlsberg Research Communications* 49, 691-702.
- Wei, H., et al., 2013. Genomic, proteomic, and biochemical analyses of oleaginous *Mucor circinelloides*: evaluating its capability in utilizing cellulolytic substrates for lipid production. *PloS one* 8, e71068.
- Worby, C.A., Dixon, J.E., 2002. Sorting out the cellular functions of sorting nexins. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3, 919-931.